



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes

UPR CNRS 2357

THÈSE DE DOCTORAT

présentée par :

Thomas REGNAULT

soutenue le : **28 octobre 2014**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie**

Biosynthèse et transport des gibbérellines chez *Arabidopsis thaliana*

THÈSE dirigée par :

Dr. Patrick ACHARD Directeur de Recherche, CNRS

RAPPORTEURS

Dr. Catherine RAMEAU Directeur de Recherche, INRA

Dr. Benoit LACOMBE Chargé de Recherche, CNRS

EXAMINATEUR INTERNE :

Dr. Thierry HEITZ Directeur de Recherche, CNRS

Remerciements

Mes tous premiers remerciements vont à Patrick Achard pour m'avoir épaulé, encadré et recadré pendant l'ensemble de ma thèse. Patrick, ta patience, ton soutien et ta disponibilité m'ont été d'une aide précieuse. Tu sais laisser tes étudiants prendre leurs propres initiatives, tout en sachant leur rappeler qu'on ne peut pas s'intéresser à tout. J'ai beaucoup apprécié travailler à tes côtés. Je te remercie de m'avoir fait confiance et j'espère que tu continueras à supporter la SIG après mon départ.

Je tiens ensuite à remercier les autres membres de l'équipe « gibbérellines ». Jean-Michel, ta pédagogie et tes connaissances élargies sur le merveilleux monde des GA dont tu m'as fait profiter ont été d'une grande aide, autant dans la rédaction qu'à la paillasse. C'est à de nombreux étudiants d'en profiter maintenant. Lali, ton enthousiasme communicatif, ta bonne humeur et tes délicieuses spécialités géorgiennes ont également contribué à cette thèse. Merci (gmadlobth !) pour toutes ces expériences culinaires et ton aide au laboratoire. Et enfin « last but not least » Michael, merci (vielen Dank !) pour tous tes précieux conseils durant ces trois ans, pour les moments de détente et surtout pour l'odeur de munster dans le bureau chaque midi. J'espère en tout cas que l'on continuera toutes ces discussions à l'avenir.

Mes remerciements vont également à Catherine Rameau, Benoit Lacombe, et Thierry Heitz qui me font l'honneur de juger ces trois années de travail.

Je tiens également à remercier les différents collaborateurs de ce projet. Peter Hedden tout d'abord, pour sa gentillesse et son expertise concernant les dosages de GA. Dimitri Heintz, pour son optimisme et son savoir-faire en spectrométrie de masse. Théo Lange et Patrick Wehrung pour leur contribution aux dosages, et Sophie Léran pour m'avoir initié à l'expression hétérologue en ovocyte de xénope.

Un merci particulier au 4^{ème} étage, sans qui cette thèse n'aurait pas eu la même saveur. Benoit, nos discussions geeks quotidiennes et les randos VTT ont été un plaisir. Sabrina, merci pour toutes les petites astuces pendant ces trois ans. Esther, merci pour l'ensemble de tes conseils toujours précieux ainsi que pour tes incroyables gâteaux de 16h45. Merci à Alexis pour toutes les discussions intéressantes, au reste de l'étage Sandra, Marta, Thomas, Kinda, Thibaut, Marion, Geneviève, Anne, Alexandre, Marie-Claire, mais aussi à Pascal pour son accueil au début de ma thèse. Mes sincères souhaits de réussite à vous tous.

Évidemment, je remercie également le personnel des plateformes techniques et administratives de l'IBMP. Plus particulièrement les jardiniers, qui ont bien pris soin de mes greffes, Malek, Nicolas et Laurence, Jérôme et Mathieu, et Danièle et Lisiane.

Merci à mes amis scientifiques de la première heure, Ali, Alice, Imran et Ronald. Et Kevin surtout, j'espère que ce manuscrit (que tu ne liras pas, ne mens pas) te fera ouvrir les yeux. Oui, il n'y a pas que les champignons dans la science.

Ces années n'auraient pas été aussi épanouissantes sans mes amis Jean, Romain, Benjamin, Yoan, Xavier, Julien, et Manu. Il faut parfois savoir sortir de la science, et vous serez toujours là pour me le rappeler.

Je remercie affectueusement mes parents, mon frère, mes grands-parents, et le reste de ma famille pour leur soutien durant ces trois années, et bien avant aussi. Vous m'avez toujours soutenu et encouragé, même dans les moments « ronchons ». Ces longues études c'est aussi grâce (à cause ?) de vous. Je ne désespère pas en tout cas qu'un jour vous puissiez répondre à cette grande question « mais tu travailles sur quoi de nouveau ? ».

Enfin, merci à Camille, pour m'avoir supporté tout au long de cette thèse, et encouragé dans les moments difficiles. Ton soutien a beaucoup compté et une nouvelle aventure s'ouvre à nous.

À Mamie,

Sommaire

Liste des figures.....	1
Liste des annexes.....	4
Liste des abréviations.....	5
Introduction.....	11
1. 1 Préambule : Découverte des hormones végétales.....	13
1. 2 Les gibbérellines : De Mendel à la génétique moderne.....	15
1.2.1 Mendel, les débuts.....	15
1.2.2 Découverte des gibbérellines, d'un champignon à la phytohormone.....	17
1.2.3 Les gibbérellines, facteurs clés de la révolution verte.....	21
1. 3 Biosynthèse et Catabolisme des gibbérellines.....	25
1.3.1 Structure chimique et généralités.....	25
1.3.2 Biosynthèse des GA.....	27
1.3.3 Les étapes plastidiales: du GGPP à l' <i>ent</i> -kaurène.....	29
1.3.4 De l' <i>ent</i> -kaurène à la première gibbérelline : la GA ₁₂	31
1.3.5 Les étapes cytosoliques : de la GA ₁₂ aux formes bioactives.....	33
1.3.6 Désactivation des GA.....	37
1.3.7 Régulation homéostatique du métabolisme des GA.....	39
1.3.8 Régulation de la biosynthèse des GA par des signaux développementaux.....	43
1.3.9 Régulation de la biosynthèse des GA par des signaux environnementaux.....	45
1.3.9.1 Régulation de la biosynthèse des GA par la lumière.....	45
1.3.9.2 Régulation de la biosynthèse des GA par la température.....	47
1.3.9.3 Régulation de la biosynthèse des GA par la salinité.....	49
1.3.10 Régulation de la biosynthèse des GA par d'autres hormones.....	51
1. 4 Sites de production des GA au cours du développement chez <i>Arabidopsis</i>	53
1.4.1 Patron d'expression des gènes de biosynthèse au cours de la germination.....	53
1.4.2 Site de production des GA au cours du développement végétatif.....	55

1.4.3 Site de production des GA au cours du développement reproductif.....	59
1. 5 Voie de signalisation des GA.....	61
1.5.1 Les DELLA : protéines clés de la voie de signalisation des GA.....	63
1.5.2 Formation du complexe GA-GID1-DELLA.....	65
1.5.3 Dégradation protéasome-dépendante des protéines DELLA.....	67
1.5.4 Mécanismes d'action et cibles des protéines DELLA.....	69
1.5.5 Influence de la voie de signalisation sur l'homéostasie des GA.....	70
1. 6 Transport des GA.....	73
1.6.1 Le transport non-polaire des GA.....	73
1.6.2 Transport endogène des GA.....	77
1. 7 Objectifs de la thèse.....	85
Résultats.....	87
Chapitre 1 : Mise en évidence d'un transport de GA chez <i>Arabidopsis</i>.....	89
1. 1 Introduction.....	91
1. 2 Résultats.....	93
1.2.1 La GA ₁₂ est transportée sur des longues distances chez <i>Arabidopsis</i>	93
1.2.1.1 Etude du transport acropète de GA.....	93
1.2.1.2 Etude du transport basipète de GA.....	97
1.2.1.3 Validation biochimique du transport de GA ₁₂	99
1.2.1.4 Confirmation génétique du transport de GA ₁₂	101
1.2.2 Le transport de GA ₁₂ active la signalisation GA dans les tissus receveurs.....	103
1.2.2.1 Le transport de GA ₁₂ active la dégradation des répresseurs DELLA dans les tissus receveurs..	103
1.2.2.2 Le rétrocontrôle exercé par les protéines DELLA est atténué par le transport de GA ₁₂	105
1.2.3 La GA ₁₂ n'est pas transmise à la descendance.....	107
1. 2 Discussion.....	108

Chapitre 2 : Mécanisme du transport de la GA₁₂.....	111
2. 1 Introduction.....	113
2. 2 Résultats.....	117
2.2.1 La GA ₁₂ est transportée <i>via</i> le xylème des racines vers les parties aériennes.....	117
2.2.2 La GA ₁₂ est transportée <i>via</i> le phloème de la plante.....	117
2.2.3 Recherche de transporteurs potentiels de la GA ₁₂ chez <i>Arabidopsis</i>	119
2.2.3.1 Sélection de gènes candidats par analyse <i>in silico</i>	119
2.2.3.2 Patron d'expression des gènes candidats.....	121
2.2.3.3 Expression hétérologue des transporteurs.....	133
2.2.3.4 Vérification des mutants des transporteurs sélectionnés chez <i>Arabidopsis</i>	139
2.2.3.5 Phénotype des mutants d'insertion (résultats préliminaires).....	141
2.2.3.6 Expériences de micro-greffes (résultats préliminaires).....	141
2. 3 Discussion.....	143
Chapitre 3 : Sites de production de la GA₁₂.....	151
3. 1 Introduction et présentation du manuscrit.....	153
3. 2 Manuscrit d'article présentant la localisation et le rôle de KAO1 et KAO2, impliquées dans la production de la GA ₁₂ mobile chez <i>Arabidopsis</i>	155
3. 3 Résultats additionnels.....	199
3.3.1 Analyse histochimique de plantes transgéniques exprimant les fusions transcriptionnelles <i>pKAO1:GUS</i> et <i>pKAO2:GUS</i>	199
3.3.2 Localisation sub-cellulaire de KAO1 et KAO2.....	201
3. 3 Discussion complémentaire.....	203
Conclusion et perspectives.....	205
5. 1 Recherche de transporteurs de GA ₁₂	209
5. 2 Rôle biologique du transport de GA ₁₂	213

Matériel et méthodes.....	215
1. 1 Matériel.....	217
1.1.1 Matériel végétal.....	217
1.1.1.1 Mutants.....	217
1.1.1.2 Lignées transgéniques.....	218
1.1.2 Souches bactériennes.....	219
1.1.2.1 Escherichia Coli.....	219
1.1.2.2 Agrobacterium tumefaciens.....	219
1.1.2 Levures.....	219
1. 2 Méthodes.....	219
1.2.1 Techniques relatives aux plantes.....	219
1.2.1.1 Culture in vitro d'Arabidopsis thaliana.....	219
1.2.1.2 Culture en terre d'Arabidopsis thaliana.....	220
1.2.1.3 Culture de Nicotiana benthamiana.....	220
1.2.1.4 Transformation stable d'Arabidopsis.....	220
1.2.1.5 Transformation transitoire de Nicotiana benthamiana.....	220
1.2.1.6 Micro-greffes d'Arabidopsis.....	221
1.2.1.7 Test de germination.....	221
1.2.1.8 Phénotypage des plantules.....	221
1.2.1.9 Phénotypage de plantes en terre.....	222
1.2.1.10 Analyse des siliques.....	222
1.2.2 Techniques relatives à l'analyse de l'ADN.....	222
1.2.2.1 Extraction d'ADN génomique.....	222
1.2.2.2 Extraction de plasmides.....	223
1.2.2.3 La PCR.....	223
1.2.2.4 Purification des produits de PCR.....	224
1.2.2.5 Clonage par le système Gateway.....	224
1.2.2.6 Clonage par restriction.....	225
1.2.3 Analyse de l'expression des gènes.....	225
1.2.3.1 Extraction des ARN.....	225

1.2.3.2	<i>Transcription inverse des ARN</i>	227
1.2.3.3	<i>PCR quantitative</i>	227
1.2.4	<i>Analyse des protéines</i>	227
1.2.4.1	<i>Extraction des protéines totales de plantes</i>	227
1.2.4.2	<i>Quantification des protéines</i>	227
1.2.4.3	<i>Séparation et détection des protéines par SDS-PAGE</i>	228
1.2.4.4	<i>Observations par microscopie</i>	228
1.2.4.5	<i>Analyses phylogénétiques</i>	229
1.2.5	<i>Analyses histochimiques GUS</i>	229
1.2.6	<i>Expression hétérologue des transporteurs</i>	229
1.2.6.1	<i>Expression hétérologue en levure</i>	229
1.2.6.2	<i>Expression hétérologue en ovocyte de xénope</i>	230
1.2.7	<i>Dosages de GA</i>	231
1.2.7.1	<i>Analyse de la sève brute d'Arabidopsis</i>	231
1.2.7.2	<i>Analyse de la sève élaborée d'Arabidopsis</i>	231
1.2.7.3	<i>Dosage de GA dans les plantules</i>	231
1.2.7.4	<i>Dosage de GA dans les ovocytes de xénope</i>	232
1.2.7.5	<i>Dosage de GA dans les greffons</i>	232
	Bibliographie	233
	Annexe	253

Sommaire des figures

- Figure 1** : Phototropisme et coléoptiles (page 12)
- Figure 2** : Le caractère « longueur de la tige » étudié par Mendel (page 14)
- Figure 3** : Phénotype de plants de riz (*Oryza sativa*) infectés par *Gibberella fujikoro* (page 14)
- Figure 4** : Réponse de plantules de maïs *dwarf-1*, naines, à l'application de gibbérellines, et de substances « gibberellin-like » (page 16)
- Figure 5** : Phénotype des allèles « nains » *Rht-B1* et *Rht-D1* chez le blé à maturité (page 18)
- Figure 6** : Phénotype du riz comportant la mutation *semi-dwarf1 (sd1)* (page 20)
- Figure 7** : Rendements du blé (kg/ha) dans les pays en développement (page 22)
- Figure 8** : Schéma récapitulatif de la position des différents mutants GA (page 22)
- Figure 9** : Structure chimique générale des gibbérellines (page 24)
- Figure 10** : Phénotype d'un mutant affecté dans la biosynthèse des gibbérellines (page 24)
- Figure 11** : Localisation subcellulaire des enzymes et intermédiaires de la voie de biosynthèse des GA (page 26)
- Figure 12** : Principales voies de synthèse du GGPP chez les eucaryotes (page 28)
- Figure 13** : Biosynthèse des monoterpènes, GA, caroténoïdes et chlorophylles à partir de la voie du MEP (page 28)
- Figure 14** : Phénotype des mutants de biosynthèse *ga1*, *ga2* et *ga3* chez *Arabidopsis thaliana* (page 30)
- Figure 15** : Etapes précoces de la biosynthèse des GA, du GGPP à la GA₁₂ (page 32)
- Figure 16** : Conversion des gibbérellines C-20 en C-19 par l'action des GA20-oxydases (page 32)
- Figure 17** : Phénotype des mutants *ga20ox* chez *Arabidopsis* (page 32)
- Figure 18** : Phénotype de plantes surexprimant des GA20-oxydases (page 34)
- Figure 19** : Formation des GA bioactive par l'action des GA3-oxydases (page 34)
- Figure 20** : Phénotype des mutants *ga3ox* chez *Arabidopsis* (page 36)
- Figure 21** : Catabolisme des GA (page 36)
- Figure 22** : Phénotypes des surexprimeurs et mutants *ga2ox* chez *Arabidopsis* (page 38)
- Figure 23** : Désactivation des GA par des mécanismes autres que l'action des GA2ox (page 40)
- Figure 24** : Rétroaction positive et négative des GA bioactives sur la synthèse des GA (page 42)
- Figure 25** : Rôle des gènes *KNOX* et GA pour le maintien des cellules indifférenciées dans le méristème apical caulinaire (page 44)

Figure 26 : L'auxine régule positivement la biosynthèse des GA (page 50)

Figure 27 : Patron d'expression de *GA3ox2*, *KO* et *CPS* dans la graine en germination (page 52)

Figure 28 : Patron d'expression de la *CPS*, des *GA20ox*, *GA3ox* et *GA2ox* au cours des stades précoces du développement chez *Arabidopsis* (page 52)

Figure 29 : Niveau d'expression des *GA20ox*, *GA3ox* et *GA2ox* au cours du développement chez *Arabidopsis* (page 54)

Figure 30 : Patron d'expression de la *CPS*, des *GA20ox*, *GA3ox* et *GA2ox* à différents stades du développement végétatif chez *Arabidopsis* (page 56)

Figure 31 : Patron d'expression de la *CPS*, *GA20ox*, *GA3ox* et *GA2ox* à différents stades du développement de l'appareil reproductif chez *Arabidopsis* (page 58)

Figure 32 : Structure d'une protéine DELLA (page 60)

Figure 33 : Les protéines DELLA répriment la croissance des plantes (page 60)

Figure 34 : Phénotype des mutants *gibberellin-insensitive dwarf 1 (gid1)* et *slender rice 1 (slr1)* chez le riz (page 62)

Figure 35 : Phénotype des simples, doubles et triples mutants *gid1* chez *Arabidopsis* (page 62)

Figure 36 : Formation du complexe GA-GID1-DELLA (page 64)

Figure 37 : Dégradation protéasome-dépendante des protéines DELLA (page 64)

Figure 38 : Protéines interagissant avec les protéines DELLA (page 66)

Figure 39 : La séquestration de protéines régulatrices par les DELLA (page 68)

Figure 40 : L'activité transactivatrice des DELLA (page 68)

Figure 41 : Rétrocontrôle des DELLA sur la voie de biosynthèse et de signalisation des GA (page 70)

Figure 42 : Les GA sont transportées de façon non polaire dans les tiges de pois (page 72)

Figure 43 : Mouvement de [³H]GA dans des coupes de tige chez le pois (page 74)

Figure 44 : la GA₃-Fluorescente s'accumule spécifiquement dans l'endoderme de la racine (page 76)

Figure 45 : La température du sol influe sur la concentration en GA₃ dans le xylème du pin Douglas (page 78)

Figure 46 : Composition en GA de deux exsudats de sève élaborée provenant du ricin et du lupin (page 80)

Figure 47 : Greffe chez le pois (page 82)

Figure 48 : Expériences de micro-greffes chez *Arabidopsis* (page 82)

Figure 49 : Nomenclature des greffes utilisées dans la thèse (page 90)

Figure 50 : Mise en évidence par micro-greffes d'un transport acropète de GA₁₂ chez *Arabidopsis* (page 92)

Figure 51 : Mise en évidence par micro-greffes d'un transport basipète de GA₁₂ chez *Arabidopsis* (page 96)

Figure 52 : le promoteur du gène codant la kinase ARSK1 est spécifique à la racine (page 100)

Figure 53 : Validation génétique du transport de la GA₁₂ chez *Arabidopsis* (page 100)

Figure 54 : Les protéines DELLA sont dégradées dans les tissus receveurs de GA₁₂ (page 102)

Figure 55 : Les protéines DELLA sont dégradées dans les racines des tissus receveurs de GA₁₂ (page 102)

Figure 56 : Analyse par qRT-PCR de l'expression des gènes de biosynthèse et de catabolisme des GA dans les greffons issus de différentes combinaisons de plantes greffées (page 104)

Figure 57 : Les GA ne sont pas transportées de la plante mère aux graines (page 106)

Figure 58 : Phylogénie des protéines ATP-Binding cassette (ABC) chez *Arabidopsis* (page 114)

Figure 59 : Arbre phylogénique non enraciné représentant la famille des NRT1/PTR chez *Arabidopsis* (page 114)

Figure 60 : La GA₁₂ est transportée des racines vers les parties aériennes par le xylème (page 116)

Figure 61 : Niveau d'expression de gènes codant pour des transporteurs NRT1/PTR et ABCG en réponse à un traitement aux GA (page 118)

Figure 62 : Analyse par RT-qPCR de l'expression des transporteurs NRT1/PTR sélectionnés (page 120)

Figure 63 : Analyse par RT-qPCR de l'expression de transporteurs ABCG sélectionnés (page 120)

Figure 64 : Patron d'expression des 13 gènes candidats sélectionnés (page 128)

Figure 65 : Test d'import de GA₁₂ dans des ovocytes de xénope (page 132)

Figure 66 : Expression hétérologue des transporteurs sélectionnés en levure (page 134)

Figure 67A : Représentation schématique des transporteurs de la famille NRT1/PTR sélectionnés (page 136)

Figure 67B : Représentation schématique des transporteurs de la famille ABCG sélectionnés (page 137)

Figure 68 : Validation génétique des mutants correspondant aux transporteurs sélectionnés (page 138)

Figure 69 : Phénotype des mutants *nrt1/ptr* sélectionnés (page 140)

Figure 70 : Recherche d'un transporteur de GA₁₂ par des expériences de micro-greffes (page 142)

Figure 71 : Patron d'expression des fusions transcriptionnelles *pKAO1:GUS* et *pKAO2:GUS* (page 198)

Figure 72 : Localisation sub-cellulaire de KAO1 et KAO2 par expression transitoire dans *Nicotiana benthamiana* (page 200)

Figure 73 : Comparaison des patrons d'expression de gènes impliqués dans les étapes précoces et les étapes tardives de la voie de biosynthèse des GA (page 202)

Figure 74 : Stratégie de crible génétique *in planta* pour l'identification d'un transporteur de GA₁₂ (page 208)

Figure 75 : Stratégie d'un crible en levure basée sur un système double hybride modifié pour la recherche d'un transporteur de GA₁₂ (page 208)

Figure 76 : Niveau d'expression de *KAO1*, *KAO2*, *ACBG11*, *ABCG25* et *ABCG37* en présence d'un stress salin (page 211)

Figure 77 : Expérience permettant d'étudier *in vitro* le transport de GA₁₂ en présence d'un stress (page 212)

Figure 78 : Carte des vecteurs (page 226)

Sommaire des annexes

Annexe 1 : Amorces utilisées pour les clonages (page 255)

Annexe 2 : Amorces utilisées pour les RT-qPCR (page 256)

Annexe 3 : Amorces utilisées pour les RT-PCR (page 259)

Annexe 4 : Amorces utilisées pour les génotypages (page 260)

Annexe 5 : Manuscrit d'article publié dans la revue *Plant Cell* (page 261)

Annexe 6 : Manuscrit d'article publié dans la revue *Current Biology* (page 261)

Abréviations

ABA : Acide Abscissique

ABC : ATP-binding cassette

ACC : Acide 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylique

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADN-T : Acide Désoxyribonucléique de Transfert

ADNc : Acide Désoxyribonucléique Complémentaire

AIT3 : ABA-IMPORTING TRANSPORTER 3

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : Acide Ribonucléique Messenger

ARSK1 : Arabidopsis Root-Specific Kinase 1

ATP : Adenosyl Triphosphate

BET : Bromure d'éthidium

bHLH : Basic Helix-Loop-Helix

BR : Brassinostéroïdes

°C : Degré Celsius

CBF/DREB : C-repeat/drought-responsive element binding factor

CIMMYT : International Maize and Wheat Improvement Center

Col-0 : Columbia 0

COP1 : CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENETIC 1

CPS : *ent*-Copalyl Diphosphate Synthase

Ct : Cycle Threshold

C-ter : Carboxy-Terminale

d8 : dwarf 8

Da : Dalton

DDF1 : DWARF AND DELAYED FLOWERING 1

dNTP : mélange des 4 désoxyribonucléotide triphosphate

DMAPP : Diméthylallyl-pyrophosphate

DO : Densité Optique

DTT : Dithiothréitol

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique

EMS : Ethylméthane Sulfonate

EUI : ELONGATED UPPERMOST INTERNODE

RE : Reticulum Endoplasmique

g : Gramme

g : Accélération ($m.s^{-1}$)

GA : Gibbérellines

GA20ox : GA20-oxydases

GA3ox : GA3-oxydases

GA2ox : GA2-oxydases

GAI : GA-INSENSITIVE

GAMT : Gibbérelline Méthytransferase

GCOS : GeneChip Operating Software

GFP : Green Fluorescent Protein

GGDP : Geranylgeranyl Diphosphate

GID1 : GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1

GUS : beta-Glucuronidase

HY5 : ELONGATED HYPOCOTYL 5

IDD : INDETERMINATE DOMAIN

JA : Acide Jasmonique

JAZ : Jasmonate ZIM-domain

KAO : Acide *ent*-Kaurénoïque Oxydase

KO : *ent*-Kaurène Oxydase

KS : *ent*-Kaurène Synthase

l : Litre

Ler : Landsberg *erecta*

LC-MS : Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

ICI : Imperial Chemical Industries

IPP : Isopentényl-pyrophosphate

LB : Luria-Bertani

min : Minute

ml : Millilitre

mM : Millimole / Litre

M : Mole / Litre

MS : Matière Sèche

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NASC : Nottingham Arabidopsis Stock Center

NPF : NRT1/PTR FAMILY

NRT1/PTR : NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER

N-ter : N-Terminal

ODD : Dioxygénases 2-oxoglutarate-dépendantes

oligoDT : acide oligodesoxythymidylique

P450 : Cytochrome P450 Mono-Oxygénase

PAC : Paclobutrazole

PAGE : Polyacrylamide Gel Electrophoresis

pb : Paire de Bases

PBS : Phosphate Buffer Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction / réaction de polymérase en chaine

PDR : Pleitropic Drug Resistance

PEG : Polyéthylène Glycol

pH : Potentiel Hydrogène

PHY : PHYTOCHROME

PIF : PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR

PIL5 : PIF3-LIKE 5

PIN : PIN-FORMED

pKa : Constante d'acidité K_a

p/v : Poids / Volume

RGA : REPRESSOR OF GA1-3

RGL1 : RGA-LIKE 1

RGL2 : RGA-LIKE 2

RGL3 : RGA-LIKE 3

RFP : Red Fluorescent Protein

RHT : REDUCED HEIGHT

RSG : REPRESSION OF SHOOT GROWTH

RT : Reverse Transcription / transcription inverse

RT-PCR : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

s : Seconde

SA : Acide Salicylique

SAM : Shoot Apical Meristem / Méristème Apical

SCF : SKP1, CULLIN, F-BOX

SCR : SCARECROW

SCL3 : SCARECROW-LIKE 3

sd1 : semi-dwarf 1

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SL : Strigolactones

SLN : SLENDER

SLR1 : SLENDER RICE 1

SLY1 : SLEEPY 1

SN2 : SNEEZY

SOM : SOMNUS

SPL : SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE

SPT : SPATULA

SPY : SPINDLY

TAE : Tris-Acétate-EDTA

TAQ polymerase : *Thermophilus aquaticus* polymerase / polymerase de *Thermophilus aquaticus*

TBS : Tris-Buffered Saline

TCP : TEOSINTE BRANCHED1 (TB1), CYCLOIDEA (CYC), and PROLIFERATING CELL FACTOR (PCF)

TE : Tris-EDTA

TPS : Terpene Synthase

Tris : 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol

USDA : United State Department of Agriculture

UTR : Untranslated Region / région transcrite non traduite

UV : Rayonnement Ultraviolet

v/v : Volume / Volume

V : Volts

WT : Wild Type / sauvage

X-Gluc : Acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronique

μ E : micro-Einstein

μ L : micro-Litre

Introduction

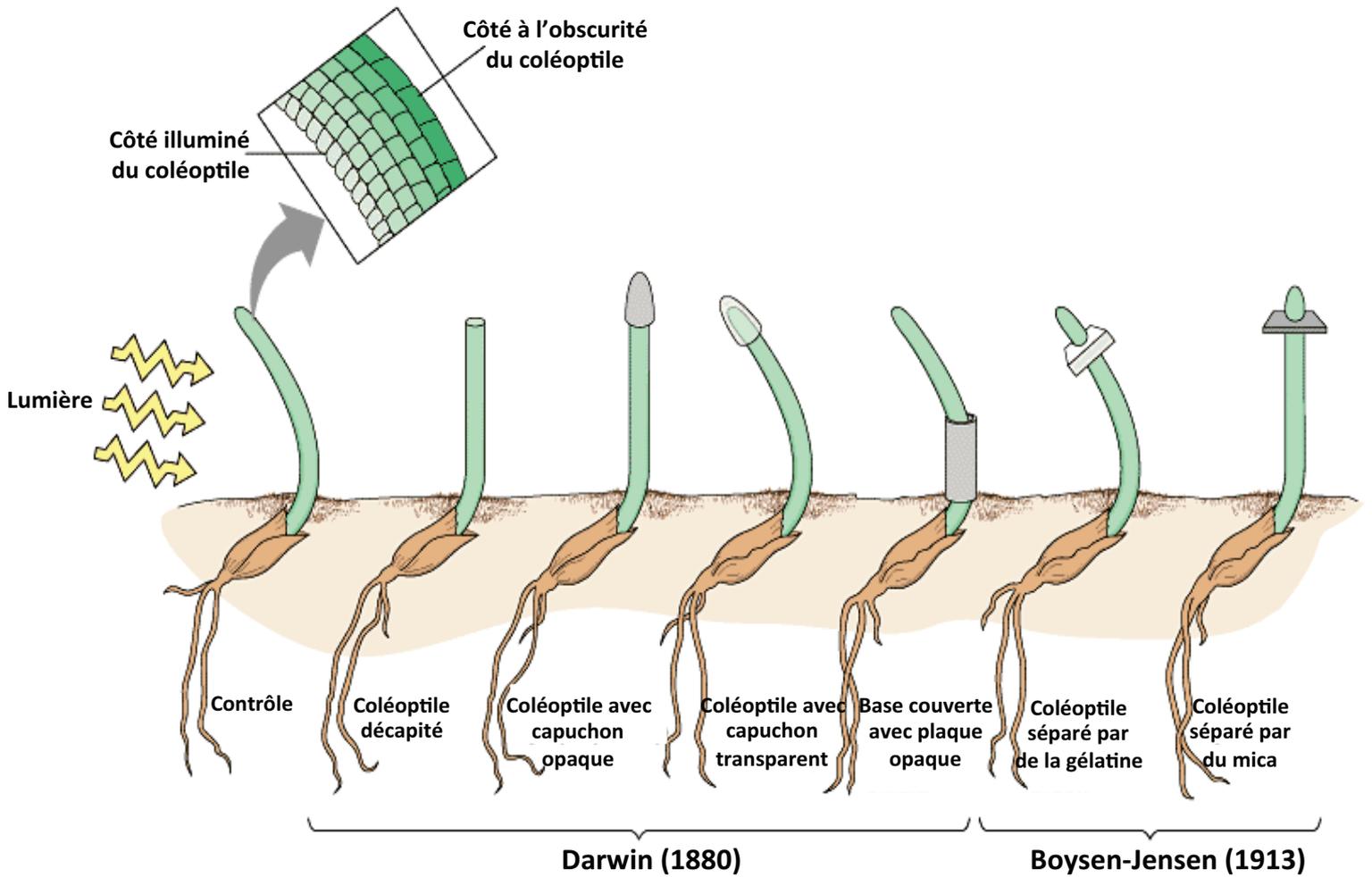


Figure 1 : Phototropisme et coléoptiles

Représentation schématique des expériences de Darwin, puis de Boysen-Jensen sur des coléoptiles de *Phalaris canariensis* en réponse à la lumière (adapté de Pearson Education, Inc., publié par Benjamin Cummings, 2008).

1. 1 Préambule : Découverte des hormones végétales

Pour s'assurer un développement et une croissance optimale, les plantes intègrent de nombreux signaux endogènes et environnementaux qui, combinés avec leur programme génétique intrinsèque, déterminent la forme de la plante. Les hormones végétales, ou phytohormones, exercent un rôle essentiel dans ces processus. Une hormone est une molécule endogène synthétisée par la plante et vectrice d'une information qu'elle apporte à une cellule cible, sélectivement sensible à son action. L'hormone est reconnue par un récepteur et cette interaction est à l'origine d'une cascade de réactions aboutissant à l'activation d'un mécanisme. Influencée par l'environnement auquel les plantes, immobiles, ne peuvent échapper, la régulation de ces messagers chimiques est fine et complexe.

C'est Charles Darwin qui, historiquement (1880), a été le premier à s'intéresser aux phytohormones en étudiant certains aspects de la physiologie végétale (*The Power of Movement in Plants*, Darwin). Il a remarqué l'aptitude des coléoptiles (gaine entourant les premières feuilles de la plantule des Graminées) d'alpistes (*Phalaris canariensis*) à se courber et orienter leur croissance vers la lumière d'une fenêtre. Cette aptitude disparaît si l'extrémité du coléoptile est sectionnée ou recouverte par un capuchon opaque illustrant l'existence d'un signal perçu et transmis au reste du coléoptile par son extrémité (Holland et al., 2009 ; Figure 1).

Ce qu'on appelle aujourd'hui le phototropisme a par la suite été étudié par Peter Boysen-Jensen (1910-1913) et ses expériences sur l'avoine (*Avena sativa*). Il a démontré, en greffant une extrémité de coléoptile sur un coléoptile décapité, que celui-ci retrouvait sa capacité à s'orienter vers la lumière. Il a observé également qu'une couche de gélose placée entre l'extrémité greffée, et le reste du coléoptile n'interrompait pas la transmission du signal (Hopkins, 2003 ; Heller et al., 2004 ; Holland et al., 2009 ; Figure 1).

Ces expériences ont été confirmées par Árpád Paál (1919) qui a déterminé en plus qu'une lame de platine ou du beurre de cacao placés au même endroit que la gélose dans les expériences de Boysen-Jensen ne permet plus la transmission du signal, n'observant plus d'orientation du coléoptile vers la lumière (Hopkins, 2003). Il en conclut que le signal en question n'est pas d'origine électrique (le platine ne l'aurait pas arrêté), ni liposoluble (il aurait franchi le beurre) mais chimique et hydrosoluble, n'étant pas stoppé par la gélose (Hopkins, 2003). L'ensemble de ces résultats suggérait donc l'existence d'une ou plusieurs substance(s) active(s) de type hormone chez les plantes déterminant la courbure du coléoptile en fonction de la lumière, une hypothèse appuyée à l'époque par la récente

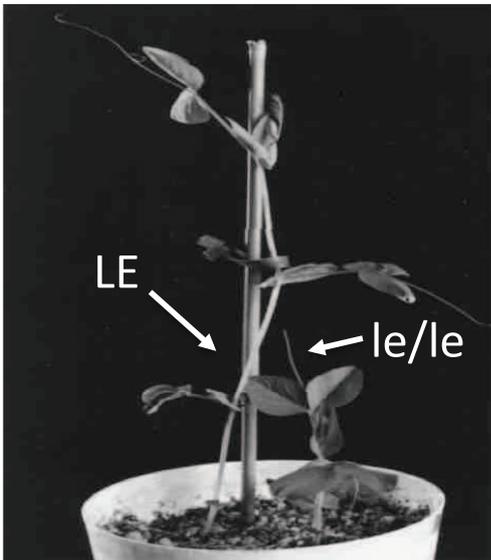


Figure 2 : Le caractère « longueur de la tige » étudié par Mendel

Plantules de pois (12 jours), avec à gauche le plant sauvage *LE*, et à droite le plant nain *le / le* (mutant de la GA3-oxidase) d'après Hedden et Proebsting, 1999.



Figure 3 : Phénotype de plants de riz (*Oryza sativa*) infectés par *Gibberella fujikoroï*

(A) Sur la gauche, des plants de riz non infectés, sur la droite des plants inoculés par le champignon *Gibberella fujikoroï*. L'allongement des plants infectés est accru, il s'accompagne d'un jaunissement des feuilles et d'une stérilité partielle. (B) Un plant de riz infecté par le champignon. Outre le gigantisme, le jaunissement est plus marqué.

découverte et publication d'hormones animales par Baylis et Starling en 1905 (Hopkins, 2003 ; Heller et al., 2004).

C'est finalement en 1928 que cette substance fut caractérisée par Frits Warmolt Went. Il cherchait à isoler, identifier et quantifier la substance responsable de la courbure et de l'allongement des coléoptiles à l'aide d'un test, dit test avoine. Went a déposé sur des blocs de gélose des extrémités de coléoptiles afin de laisser diffuser la substance active. Après un certain temps, il place ces petits blocs de gélose sur des coléoptiles décapités et observe que la stimulation de la courbure et la croissance de ces derniers sont conservées (Hopkins, 2003). De plus, l'angle de la courbure dépend de la concentration en substance active, qu'il nomme auxine (dérivé du grec auxein, « augmenter, croître »). En 1934, les chimistes hollandais Kögl et Haagen-Smit isolent, à partir d'urine humaine, l'acide indole-3-acétique (AIA). C'est en 1946 que l'AIA est enfin identifiée comme étant la molécule capable de stimuler la croissance des coléoptiles, et finalement isolée dans le maïs (Hopkins, 2003).

Plus d'un siècle après les travaux de Darwin, nous savons donc désormais que ces substances en question sont de petites molécules appelées phytohormones provenant de diverses voies métaboliques essentielles. En général, ces composés sont présents à des concentrations très faibles et agissent soit à proximité de leur site de synthèse, ou soit dans des tissus plus éloignés. Ce groupe inclut l'auxine, les cytokinines, les gibbérellines (GA), l'acide abscissique (ABA), l'éthylène, les brassinostéroïdes (BR), les strigolactones (SL), l'acide jasmonique (JA) et l'acide salicylique (SA). Si chaque phytohormone possède un rôle spécifique, c'est ensemble que tous ces composés contrôlent les aspects de la vie de la plante, de son développement à sa réponse aux stress environnementaux.

1. 2 Les gibbérellines : De Mendel à la génétique moderne

1.2.1 Mendel, les débuts

Comme les autres phytohormones, les gibbérellines (GA) sont essentielles pour de nombreux processus du développement comme la germination de la graine, l'allongement de la tige, l'expansion des feuilles, la maturation du pollen et l'induction de la floraison (Achard et Genschik, 2009). Leur découverte au cours du 20^e siècle a joué un rôle majeur, et moteur, dans la compréhension de ces mécanismes.

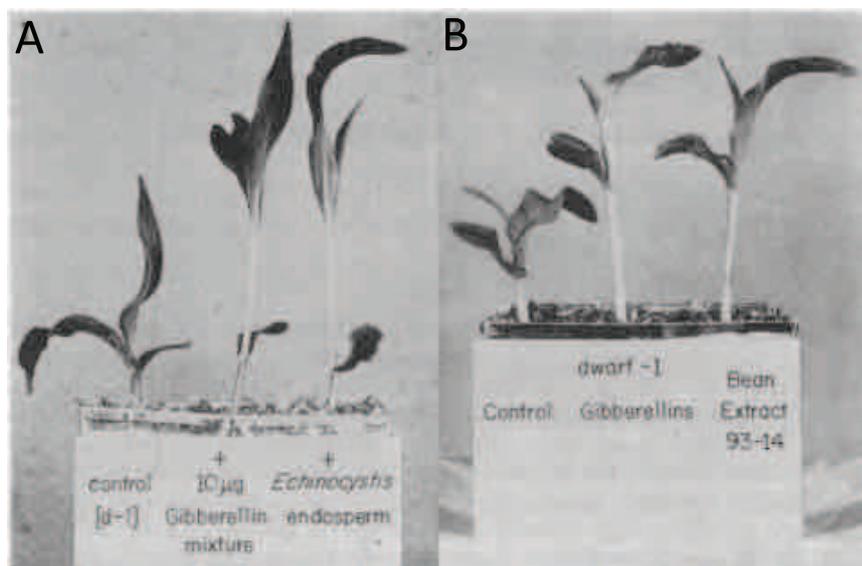


Figure 4 : Réponse de plantules de maïs *dwarf-1*, naines, à l'application de gibbérellines, et de substances « gibberellin-like »

(A) A gauche, un plant *dwarf-1* non traité (contrôle), au milieu un plant traité avec un mélange de gibbérellines extrait de *Gibberella fujikuroi*, et à droite un plant traité avec des substances « gibberellin-like » extraites d'*Echinocystis* (concombre).

(B) Sur le même principe, à gauche un plant *dwarf-1* non traité (contrôle), au milieu un plant traité avec des gibbérellines extraites de *Gibberella fujikuroi*, et à droite un plant traité avec des substances « gibberellin-like » extraites de haricots.

Suite aux traitements (A et B), la croissance du mutant *dwarf-1* est restaurée, soulignant la présence de gibbérellines endogènes chez les plantes. (Adapté de Phinney et al., 1957).

Dans les années 1860, Gregor Mendel, s'intéresse à la naissance de caractères nouveaux apparaissant dans la descendance des plantes après hybridation (ou croisement). Il met en place un protocole expérimental dans le but de comprendre les lois régissant ces phénomènes. Il utilise le pois comestible (*Pisum sativum*), une plante ayant une croissance et une reproduction rapide, et il choisit sept caractères facilement identifiables et présents sous deux formes différentes : forme et couleur de la gousse, forme et couleur de la graine, couleur de l'enveloppe de la graine, position des fleurs et longueur de la tige. Concernant ce dernier caractère, il arrive dans 25% des cas, après ségrégation, que le pois n'atteigne pas sa hauteur « normale » mais présente une taille réduite (figure 2). Mendel démontre ainsi la dominance du caractère « grande tige » par rapport au caractère « courte tige », ce résultat participant à l'élaboration des lois de l'hérédité, bases de la génétique moderne (Martin et al., 1997 ; Hedden et Proebsting, 1999). Au début du 20^e siècle, ce travail sur la longueur de la tige du pois a été redécouvert par Orland White, qui nomme « *Le* » ce caractère (pour *Lenght*). White introduit la notion de paire d'allèle *Le/le* contrôlant la présence ou l'absence d'une grande taille de tige chez le pois (White, 1917 ; Hedden et Proebsting, 1999). Beaucoup plus tard, en 1984, Timothy J. Ingram démontre que le gène relié à l'allèle *Le* codait en fait pour une enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse des gibbérellines (Ingram et al., 1984). Il s'agit d'une 3 β -hydroxylase (la GA3-oxidase) permettant la conversion d'une forme inactive des gibbérellines, la GA₂₀, en une forme bioactive, la GA₁. C'est à l'aide d'une GA₂₀ marquée radioactivement qu'Ingram a pu démontrer que celle-ci est convertie en GA₁ dans les plantes *Le* (sauvages) alors que la GA₂₀ s'accumule dans les plantes *le* (mutantes). En 1997, le gène *Le* est finalement cloné, concluant ainsi, sur des bases moléculaires, les observations de Mendel 140 ans plus tôt (Lester et al., 1997 ; Martin et al., 1997). Mais Mendel ignore à l'époque qu'il étudie un caractère lié à la production d'une hormone végétale, et le crédit de la découverte des gibbérellines est à attribuer aux Japonais.

1.2.2 Découverte des gibbérellines, d'un champignon à la phytohormone

Entre la fin du 19^e siècle et le début du 20^e siècle, au Japon, les cultivateurs sont confrontés à d'importantes baisses de rendements dans leurs cultures de riz. C'est en 1898 qu'est publiée la première étude scientifique concernant les symptômes observés sur les plants malades (Hori, 1898). Ils consistent en une élongation anormale et importante (gigantisme) des entre-nœuds, un jaunissement des feuilles ainsi qu'une très faible production de grains (figure 3). Très vite en réponse à ce que l'on appelle le *bakanae* (« plantes folles »), les phytopathologistes japonais identifient un ascomycète parasite du riz appartenant au genre

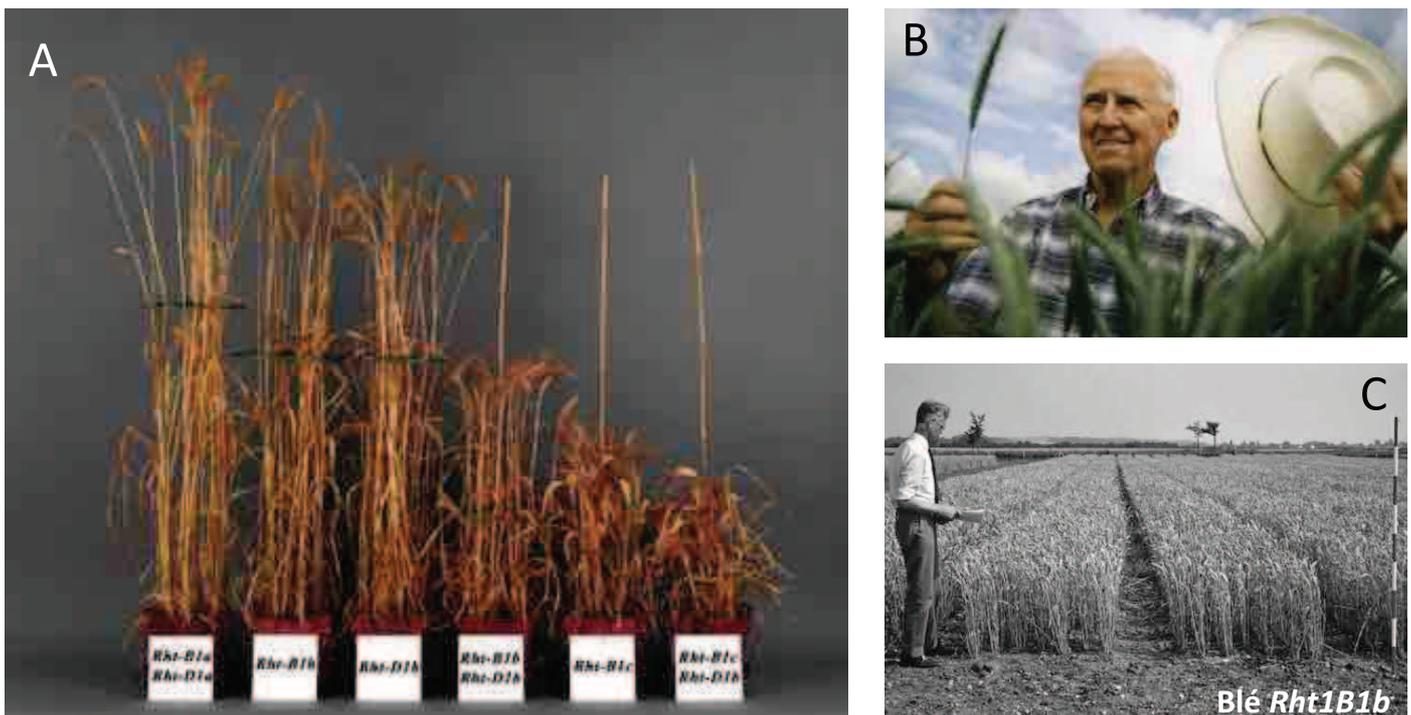


Figure 5 : Phénotype des allèles « nains » *Rht-B1* et *Rht-D1* chez le blé à maturité

(A) Les allèles *Rht-B1* et *Rht-D1* codent pour des protéines DELLA tronquées devenant insensibles à l'action des gibbérellines. Selon la mutation et les combinaisons génomiques, celles-ci confèrent différents degrés de « nanisme » à la plante (Hedden, 2010).

(B) Norman Borlaug, à l'origine des croisements entre la variété Norin 10, semi-naine, et des variétés tropicales de blé commercial, obtiendra le prix Nobel de la paix en 1970.

(C) Francis Lupton, qui a introgressé par croisement les allèles *Rht-B1b* et *Rht-D1b* dans les variétés européennes. La présence des allèles *Rht-B1b* et *Rht-D1b* confère au blé une résistance accrue au risque de verse, ceci lui permettant, couplé à l'utilisation d'engrais, d'atteindre de très hauts rendements.

Fusarium comme responsable de la maladie. Celle-ci s'étendant à Taiwan et ravageant plus de 40% des cultures, des recherches plus poussées la concernant débutent alors.

En 1926, Eiichi Kurosawa fait pousser le champignon sur un milieu composé de grains de riz secs. Après extraction du milieu avec de l'eau bouillante, il filtre l'ensemble afin d'obtenir une solution exempte de tout champignon. Il utilise ensuite cet extrait aqueux pour cultiver des grains de riz ce qui lui permis d'observer une elongation anormale des plantules, signifiant qu'une substance produite par l'ascomycète est à l'origine des symptômes du *bakanae* (Kurosawa, 1926). En 1931, Hans Wilhelm Wollenweber clarifie la nomenclature du pathogène (Wollenweber, 1931 ; Wollenweber et Reinking, 1935) : la forme imparfaite et asexuée du champignon est nommée *Fusarium heterosporum* (Sheldon) tandis que sa forme reproductive, sexuée, et responsable de la maladie est nommée *Gibberella fujikuroi* (Sawada).

En 1935, Teijiro Yabuta, professeur à la faculté de Tokyo, isole à partir de l'extrait aqueux obtenu par Kurosawa un mélange de substances cristallisées inséparables à l'époque ayant pour effet, à faible dose, de stimuler la croissance du riz, mais aussi d'autres plantes (Yabuta, 1935). Il nomme ce mélange « gibbérellines », se basant sur le nom scientifique du pathogène. Et c'est en 1938 finalement que la molécule responsable et active est réellement isolée dans sa forme cristalline et appelée gibbérelline A (Yabuta et Sumiki, 1938).

Cette découverte est stoppée dans son élan par la situation de l'époque, et ce n'est qu'après la deuxième guerre mondiale qu'elle attire l'attention de la recherche internationale. En 1949, Yasuke Sukimi prend la suite des travaux de Teijiro Yabuta à l'Université de Tokyo et présente ses résultats sur les gibbérellines à différents congrès internationaux. En 1954, un groupe anglais, l'ICI (Imperial Chemical Industries), rapporte la purification d'un acide gibbérellique aux propriétés chimiques différentes de la gibbérelline A (Curtis et Cross, 1954). En 1955, l'USDA (United State Department of Agriculture) avec à sa tête Franck Stodola annonce l'isolement de deux gibbérellines, l'une identique à la gibbérelline A, l'autre différente nommée gibbérelline X (Stodola et al., 1955). Celle-ci est confirmée en 1957 comme étant identique à celle trouvée par l'ICI (Stodola et al., 1957). En 1955, le groupe de Yasuke Sukimi étudie à nouveau la pureté de son échantillon contenant la gibbérelline A. Après de nouvelles purifications, il s'avère que l'échantillon comporte en fait un mélange de 3 gibbérellines différentes, nommées GA₁, GA₂ et GA₃ (Takahashi et al., 1955). Une comparaison chimique des découvertes des trois laboratoires montre finalement que la gibbérelline A et la GA₁ sont identiques. Tout comme le sont également la gibbérelline X, la GA₃ et l'acide gibbérellique trouvé par l'ICI. La GA₂, elle, est une nouvelle forme de



Figure 6 : Phénotype du riz comportant la mutation *semi-dwarf1 (sd1)*

A gauche la variété Dee-geo-woo-gen (sauvage), à droite le mutant *sd1* (Hedden, 2003). Contrairement aux mutants *Rht* du blé, l'application de gibbérellines restaure la croissance du mutant semi-nain *sd1*. Cette mutation affecte la GA20ox2 une enzyme de biosynthèse de GA (Monna et al., 2002 ; Sasaki et al., 2002 ; Spielmeier et al., 2002).

gibbérelline. Le groupe de l'Université de Tokyo isole par la suite la GA₄ (Takahashi et al., 1957), et l'ICI les gibbérellines A₁₀, A₁₁, A₁₂, A₁₃, A₁₄, A₁₅, A₁₆, A₂₄ et A₂₅ entre 1965 et 1968.

En parallèle à ces travaux sur des micro-organismes, des recherches sur les plantes sont également entreprises. En 1955, P.W. Brian, dans les laboratoires de l'ICI, réussit à restaurer la croissance de pois nains en appliquant de la GA₃. Il propose alors l'hypothèse selon laquelle les gibbérellines agissent comme facteurs de croissance des plantes, facteurs déficients en l'occurrence chez ces pois nains. Dans le même temps et le même laboratoire, Margaret Radley publie dans la revue *Nature* en 1956 la présence de substances « gibberellin-like », dans des extraits de plantules de pois grâce à des analyses par chromatographie (Radley, 1956). Des expériences similaires qui conduisent à des résultats semblables ont lieu aux Etats-Unis, dans les laboratoires de l'Université de Californie, en utilisant non pas le pois, mais des plants de maïs nains (Phinney et al., 1957) (figure 4).

Depuis leurs découvertes chez *Gibberella fujikuroi* en 1938, plus de 136 dérivés de GA ont été identifiés à partir de diverses plantes, champignons et bactéries, dont seulement quelques-unes ont une activité biologique. Beaucoup de GA "non bioactives" existent chez les plantes comme précurseurs ou catabolites des formes bioactives. Il est désormais admis que les principales GA bioactives (GA₁, GA₃, GA₄ et GA₇) sont toutes issues d'un squelette diterpène tétracyclique, appartenant à la famille des stéroïdes.

1.2.3 Les gibbérellines, facteurs clés de la révolution verte

A partir des années 1960, la population mondiale augmente drastiquement. Dès lors, le défi consiste à trouver un moyen d'améliorer les rendements des cultures, afin « d'accompagner » cette augmentation et éviter des famines. Ainsi débute la révolution verte. L'utilisation massive de fertilisants azotés et la modernisation des procédés agricoles sur les cultures sont une première réponse apportée par les cultivateurs, mais, si elles ont pour conséquence d'augmenter le nombre de grains et la taille des plants, les rendements n'augmentent pas pour autant. En effet, les plants étant significativement plus hauts et plus lourds, ils ne sont plus assez forts pour supporter leur propre poids, encore moins lors d'irrigations intensives ou d'aléas climatiques. Les producteurs de semences se mettent alors en quête de nouveaux cultivars plus résistants, notamment chez le riz, le maïs et le blé.

Concernant ce dernier, dans les années 1920, des cultivateurs Japonais ont l'idée de croiser une variété de blé semi-naine (Daruma), avec une variété américaine hautement productive. Le cultivar obtenu (Norin 10) est ensuite envoyé, après la deuxième guerre mondiale, aux

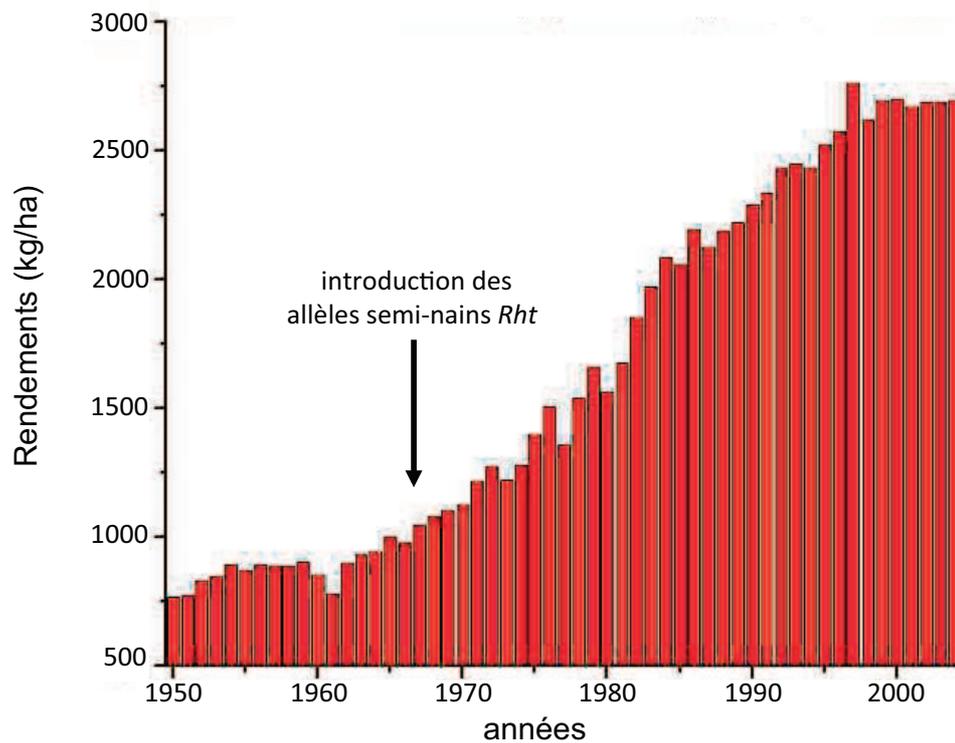


Figure 7 : Rendements du blé (kg/ha) dans les pays en voie de développement
(Source Food and Agriculture Organization; FAO)

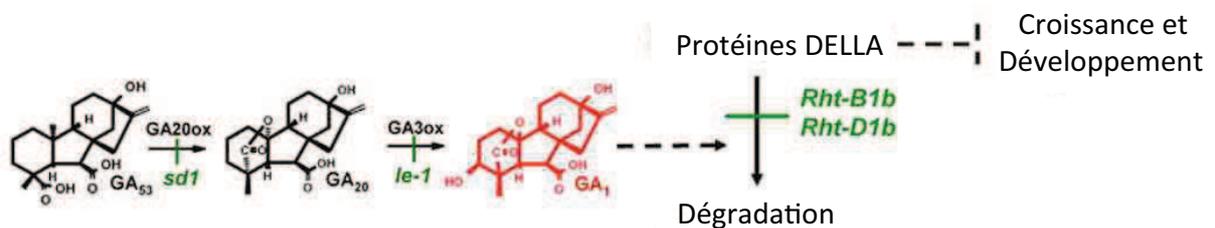


Figure 8 : Schéma récapitulatif la position des différents mutants GA

Les enzymes GA20ox (SD1) et GA3ox (LE-1) permettent la conversion de la GA₅₃ en GA₂₀ et de la GA₂₀ en GA₁ bioactive, respectivement. La mutation *sd1* chez le riz bloque la première conversion, et la mutation *le-1* chez le pois bloque la deuxième. Les mutations *Rht-B1b* et *Rht-D1b* chez le blé altèrent la stabilité des protéines DELLA, les rendant insensibles aux GA (adapté de Hedden, 2003).

Etats-Unis et utilisé dans différents programmes de croisement (Hedden, 2003). L'un d'entre eux se révèle particulièrement prometteur et le croisement (Norin 10-Brevor 14), est envoyé à Norman Borlaug, un agronome américain travaillant au CIMMYT (Centre International d'Amélioration du Maïs et du Blé) de Mexico. Borlaug, mandaté à l'époque par la Fondation Rockefeller pour sélectionner des variétés adaptées aux climats chauds, croise le Norin 10-Brevor 14 avec des variétés traditionnelles adaptées au climat tropical, et distribue la progéniture en Amérique Latine, en Amérique du Sud et en Asie du Sud-Est. Rapidement adoptés, ces cultivars sont à l'origine d'une hausse considérable des rendements dans ces régions à forte démographie, couvrant ainsi leur besoin dans ce domaine. Norman Borlaug obtient pour ces travaux le prix Nobel de la paix en 1970. Les gènes responsables du nanisme du Norin 10 sont désormais présents dans plus de 70% des variétés commerciales du blé cultivées à l'heure actuelle dans le monde (Evans, 1996). Ces gènes, au nombre de deux dans le Norin 10, se nomment *Rht-B1b* et *Rht-D1b* (anciennement *Rht1* et *Rht2*, respectivement) pour « *reduced height* » (figure 5). Il a été démontré dans les années 1990 que ces deux gènes codent pour des protéines DELLA, en charge de la répression de la croissance des plantes dans la voie de signalisation des gibbérellines (Peng et al., 1999). En absence de l'hormone, ces protéines s'accumulent et répriment la croissance et le développement de la plante. Au contraire, en présence de l'hormone, ces protéines sont dégradées et la plante se développe normalement (voir introduction 1.5). Il se trouve dans le cas de *Rht-B1b* et *Rht-D1b* qu'une mutation introduisant un codon STOP dans un domaine essentiel à la dégradation de la protéine est présente. Une réinitiation de la traduction suivant ce codon STOP a pour conséquence la formation de protéines Rht tronquées, non-dégradables. Etant alors présentes constitutivement, la plante présente un phénotype nain, qui se maintient lors d'applications exogènes de gibbérellines, on parle alors de plantes insensibles aux gibbérellines. A noter que de tels mutants ont par la suite également été retrouvés chez d'autres espèces d'intérêt agronomique comme le maïs (*d8*), l'orge (*sln*), ou le riz (*slr1*) (Peng et al., 1999 ; Ikeda et al., 2001 ; Chandler et al., 2002).

Chez le riz, la sélection de variétés moins hautes et plus résistantes est également employée. Ainsi, les variétés semi-naines *indica* sont obtenues dans les années 1950 à Taiwan, avec la variété TN-1, et aux Philippines (International Rice Research Institute), avec la variété IR-8. Elles servent de base dans des programmes de croisement avec d'autres variétés commerciales *indica* (climat tropical), ou *japonica* (climat tempéré) et avec le même succès concernant les rendements que pour le blé. Mais contrairement à ce dernier, le caractère semi-nain chez le riz est apporté par un seul gène affecté par une mutation, *sd1* (*semi-dwarf 1*) (figure 6). Des travaux récents ont pu mettre en évidence que *sd1* code pour une enzyme impliquée dans la biosynthèse des gibbérellines, la GA20-oxidase 2 (Monna et

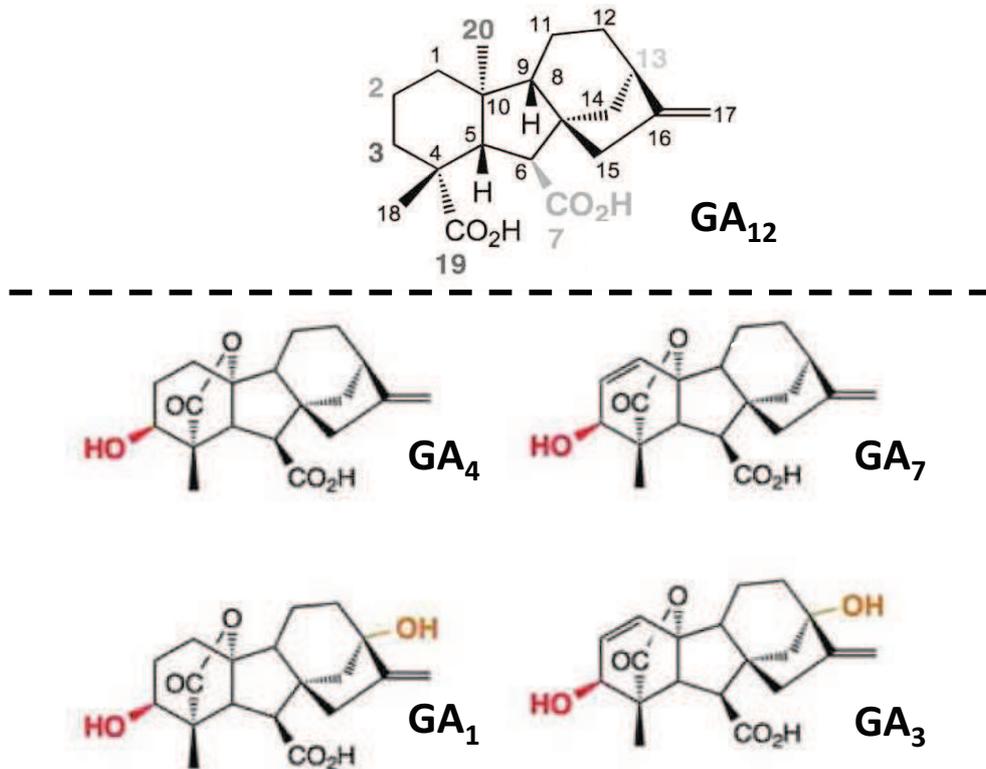


Figure 9 : Structure chimique générale des gibbérellines

En haut, la structure d'une gibbérelline inactive de type C₂₀ (GA₁₂), selon la nomenclature propre aux molécules carbonées. En bas, représentation des principales gibbérellines bioactives de type C₁₉. On remarque que la GA₁ et la GA₃ diffèrent de la GA₄ et de la GA₇ par la présence d'un groupement hydroxyle en position C₁₃ (en orange). Mais toutes possèdent une fonction lactone, un groupement carboxyle en C₆ et un groupement hydroxyle en C₃ (en rouge). (Adapté de Sun, 2008).

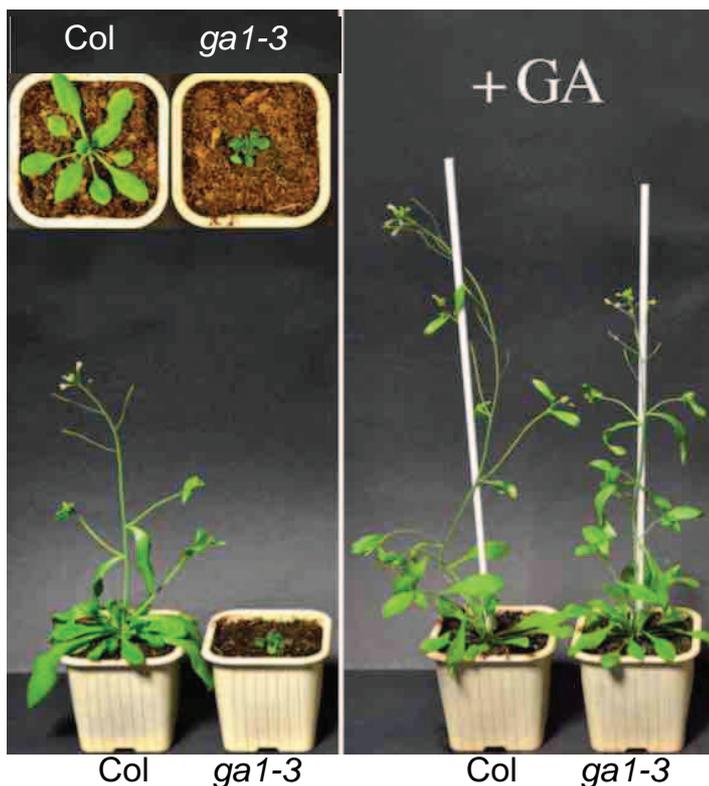


Figure 10 : Phénotype d'un mutant affecté dans la biosynthèse des gibbérellines

A gauche, une plante d'*Arabidopsis* sauvage (Col) et un mutant de biosynthèse (*ga1-3*), au même âge (40 jours). Ce mutant présente un nanisme important ainsi qu'un retard de floraison. L'application de GA bioactives sur ces mêmes génotypes (à droite) restaure la croissance du mutant qui recouvre un développement semblable à la plante sauvage.

al., 2002 ; Sasaki et al., 2002 ; Spielmeier et al., 2002). L'inactivité de cette enzyme due à la mutation a pour conséquence une diminution de production de la forme bioactive de l'hormone, d'où le phénotype semi-nain. A l'inverse des mutants *Rht1* du blé, ce phénotype peut être complété par l'application exogène de gibbérellines. Il existe une autre GA20-oxidase chez le riz (GA20-oxidase 1), dont le patron d'expression diffère de la GA20-oxidase 2. Alors que cette dernière est exprimée majoritairement dans les feuilles matures et impliquée dans la croissance végétative du riz, la GA20-oxidase 1 est quant à elle exprimée plus spécifiquement dans les fleurs. Il est intéressant de remarquer qu'une variété semi-naine possédant une mutation dans le gène codant la GA20-oxidase 1 n'aurait pu être sélectionnée dans des programmes de croisement, en raison de ses probables faibles rendements.

Couplée à l'amélioration et à la modernisation des techniques agricoles, à l'utilisation d'engrais, de pesticides et fongicides, la sélection de variété semi-naine a permis un incroyable accroissement de la productivité agricole (figure 7). En évitant des famines, la révolution verte a pu accompagner l'accroissement démographique mondial depuis les années 60 (Pingali, 2012). Ainsi, cet historique souligne le rôle clé qu'ont joué les gibbérellines dans ces événements grâce, en grande partie, à l'identification et à l'utilisation de mutants (figure 8).

1. 3 Biosynthèse et Catabolisme des gibbérellines

1.3.1 Structure chimique et généralités

Le terme « gibbérellines » (ou GA) englobe un large groupe d'acides carboxyliques diterpénoïdes et tétracycliques. Les GA possèdent un squelette basé sur l'*ent*-gibbérellane, et sont formées par 19 ou 20 atomes de carbone (on parle alors de gibbérellines C-19 ou C-20) (Figure 9). En effet, beaucoup de gibbérellines C-20 sont décarboxylées en position 20 au cours de la biosynthèse. Il en existe 136 formes différentes isolées de plantes ou de micro-organismes, nommées gibbérellines A_n, où n est un nombre arbitraire attribué selon l'ordre de leur découverte (http://www.plant-hormones.info/gibberellin_nomenclature.htm). La grande majorité de ces molécules sont inactives et sont en réalité des précurseurs ou catabolites des formes bioactives: la GA₁, la GA₃, la GA₄ et la GA₇ (Figure 9). La GA₃ est produite en quantité par le champignon *Gibberella fujikuroi* tandis que la GA₁ et la GA₄ sont les deux formes bioactives prédominantes chez les plantes. La bioactivité des GA réside dans de légères différences structurales permettant à ces phytohormones de se lier

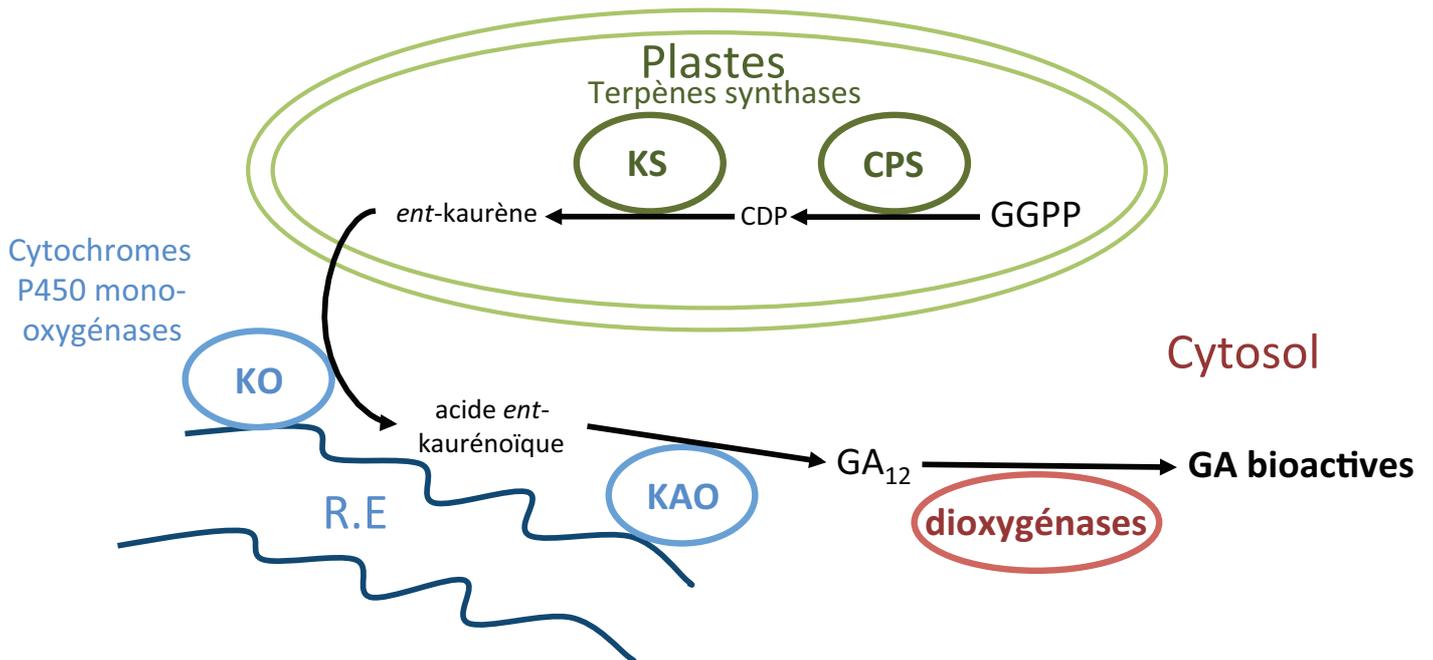


Figure 11 : Localisation subcellulaire des enzymes et intermédiaires de la voie de biosynthèse des GA
 GGPP = géranylgeranyl diphosphate, CPS = copalyl diphosphate synthase, CDP = copalyl diphosphate, KS = kaurène synthase, KO = kaurène oxydase, KAO = acide *ent*-kaurénoïque oxydase, R.E = réticulum endoplasmique (Helliwell et al., 2001).

spécifiquement à leur récepteur, *GID1* (*GA INSENSITIVE DWARF1*), localisé dans le noyau des cellules (Griffiths et al., 2006). Ainsi, la présence d'un groupement hydroxyle en C3 et/ou C13, d'un groupement carboxyle en C6, et d'une fonction lactone résultant d'une réaction entre le groupement hydroxyle en C10 et le groupement carboxyle en C4, semblent avoir un rôle primordial dans cette interaction (Figure 9) (Murase et al., 2008). Une GA bioactive peut également être désactivée par une β -hydroxylation en position C2 (Thomas et al., 1999), rendant impossible sa fixation au récepteur (Shimada et al., 2008).

Le phénotype d'un mutant affecté dans la biosynthèse des GA se caractérise par un nanisme important incluant des racines courtes, une stérilité élevée, une rosette compacte avec des feuilles de couleur vert foncé, et des graines ne germant pas (Koorneef et Van der Veen, 1980), soulignant l'importance de l'hormone. C'est le cas chez *Arabidopsis thaliana* du mutant de biosynthèse *ga1-3*, où ce phénotype sévère peut être totalement restauré par l'application exogène de GA bioactives (Figure 10). D'une façon générale, les GA stimulent la croissance et le développement des plantes dans des processus variés, tels que la germination de la graine, l'allongement de la tige, l'expansion des feuilles, la maturation du pollen ou encore l'induction de la floraison (Achard et Genschik, 2009). Elles influencent ces processus en activant l'élongation et la division cellulaire (Ubeda-Thomas et al., 2008 ; Achard et al., 2009).

1.3.2 Biosynthèse des GA

La voie de biosynthèse des GA est désormais bien décrite, le précurseur étant le géranylgeranyl diphosphate (GGPP), molécule formée de 20 atomes de carbone à partir de laquelle la biosynthèse suit un tronc commun impliquant différentes enzymes et aboutissant à la formation de la GA_{12} d'où dérivent toutes les GA. Cette voie s'étend sur trois compartiments subcellulaires distincts : les plastes, le réticulum endoplasmique et le cytosol, ainsi que trois classes d'enzymes différentes : les terpènes synthases, les cytochromes P450 mono-oxygénases, et les dioxygénases 2-oxoglutarate-dépendantes (figure 11). Les composants de cette voie de biosynthèse ont été identifiés et caractérisés chez *Arabidopsis* mais également chez le riz signifiant que cette unique voie semble conservée aussi bien chez les monocotylédones que chez les dicotylédones (Hedden et Philips, 2000 ; Yamaguchi, 2008).

C'est la voie du méthylérythritol phosphate, se déroulant dans les plastes, qui est principalement à l'origine du GGPP utilisé pour la biosynthèse des GA chez les plantes

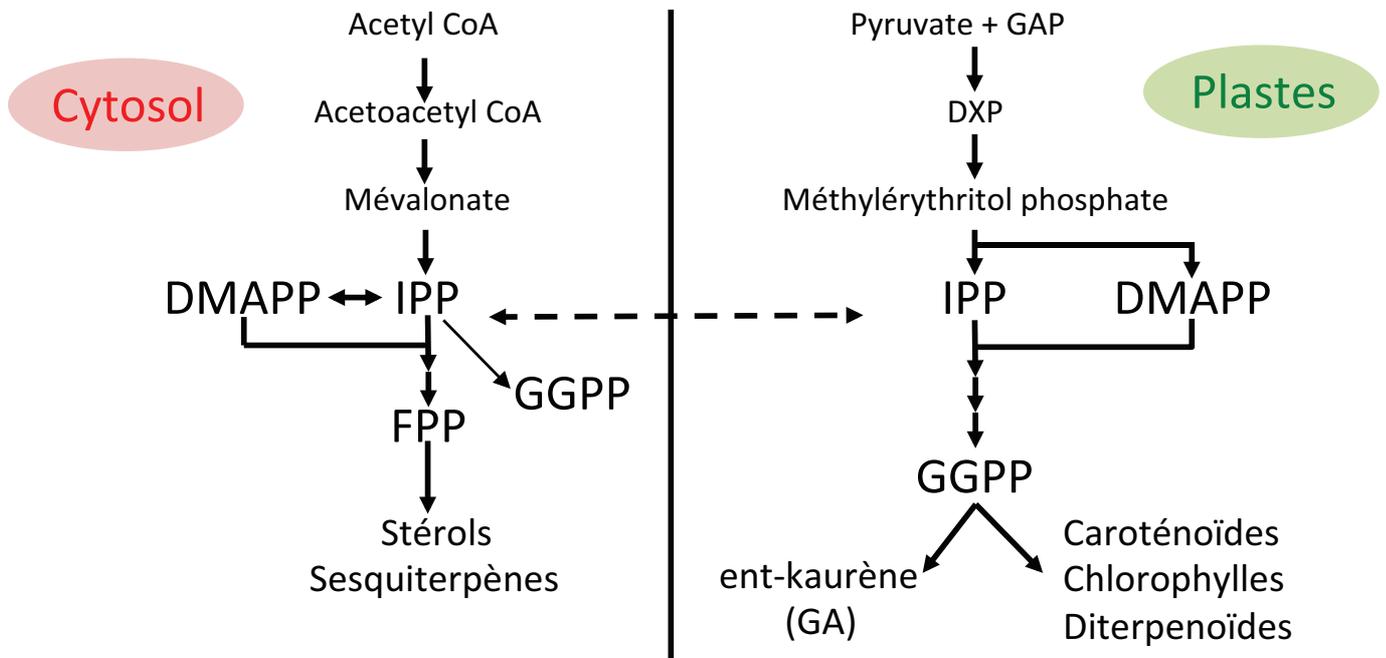


Figure 12 : Principales voies de synthèse du GGPP chez les eucaryotes

La voie du mévalonate (à gauche) et la voie du méthylérythritol phosphate (à droite) sont toutes deux à l'origine de la synthèse de DMAPP et d'IPP, un précurseur du GGPP. Si il existe des « ponts » entre les deux voies (flèche discontinue), chez les plantes c'est la voie du méthylérythritol phosphate qui est principalement à l'origine de la production de GGPP. (DMAPP = diméthylallyl-pyrophosphate, DXP = 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate, FPP = farnesyl diphosphate, GGPP = géranylgeranyl diphosphate, IPP = isopentényl-pyrophosphate) (Adapté de Kashara et al., 2002).

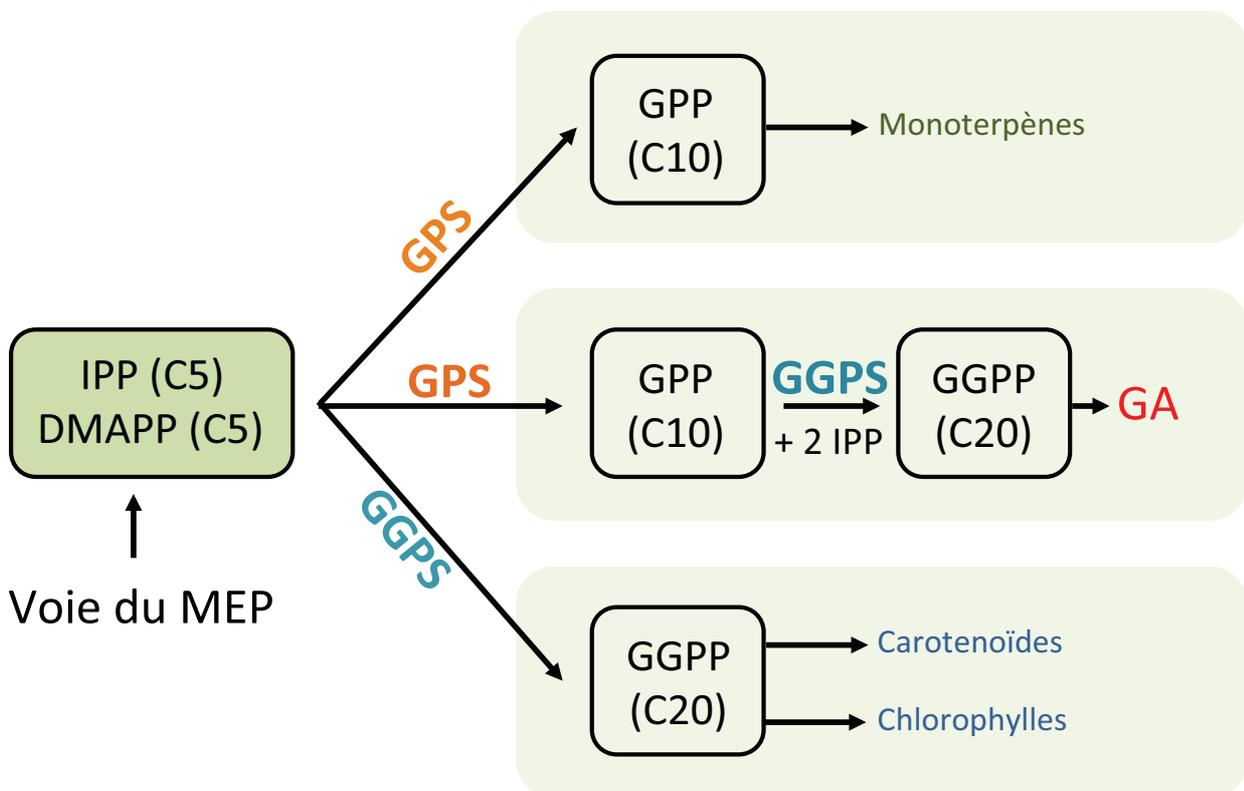


Figure 13 : Biosynthèse des monoterpènes, GA, caroténoïdes et chlorophylles à partir de la voie du MEP

Un pool de GGPP est principalement dédié à la production de GA grâce à une GGPS (GGPP Synthase) spécifique utilisant comme substrat du GPP et 2 IPPs. Au contraire, pour les caroténoïdes et les chlorophylles, c'est une autre GGPS utilisant comme substrat l'IPP et le DMAPP qui permettrait leur biosynthèse (DMAPP = diméthylallyl-pyrophosphate, GGPP = géranylgeranyl diphosphate, IPP = isopentényl-pyrophosphate) (Adapté de Van Schie et al., 2007).

(Figure 12). Alternative à la voie cytosolique du mévalonate, elle permet comme cette dernière la formation d'IPP (isopentényl-pyrophosphate) et de DMAPP (diméthylallyl-pyrophosphate) via une cascade de réactions enzymatiques, et c'est à partir de l'IPP que sera formé le GGPP. Si le GGPP est le précurseur de la voie de biosynthèse des GA, il est également à l'origine de la synthèse d'autres diterpénoïdes comme le phytol, des chlorophylles et des tetraterpénoïdes comme les caroténoïdes (Figure 12). La synthèse d'*ent*-kaurène, pour la voie de biosynthèse des GA, à partir de GGPP entrerait donc en compétition avec la synthèse d'autres métabolites (Fray et al., 1995). Or, il a été démontré chez la tomate et chez *Arabidopsis* qu'une perte de GGPP synthase entraînait une réduction des niveaux de GA, sans pour autant affecter les niveaux de chlorophylles ou de caroténoïdes (Van Schie et al., 2007). Cette observation suggère l'existence d'un pool séparé de GGPP, produit grâce à une GGPP synthase spécifique nécessitant du GPP et deux IPP comme substrats, et qui serait alors utilisée pour la production de GA uniquement (Figure 13). Cela suppose également que l'*ent*-kaurène à l'origine des GA, et les autres dérivés du GGPP soient produits dans des tissus différents (Silverstone et al., 1997, Hedden et Thomas, 2012). Les plantes possèdent de nombreuses GGPP synthases, il en existe par exemple 12 chez *Arabidopsis*, et il serait possible que l'une d'entre elles soit spécifiquement dédiée aux GA (Lange et al., 2003 ; Hedden et Thomas, 2012).

1.3.3 Les étapes plastidiales : du GGPP à l'*ent*-kaurène

Les deux premières étapes enzymatiques concernant la biosynthèse des GA ont donc lieu dans les plastes (Helliwell et al., 2001). Elles impliquent deux terpènes synthases (TPS), la *ent*-copalyl diphosphate synthase (CPS) et la *ent*-kaurène synthase (KS). La CPS permet la cyclisation du GGPP en *ent*-copalyl diphosphate qui est ensuite, également par cyclisation, convertie en *ent*-kaurène par l'action de la KS (Figure 15). Ces deux enzymes sont codées par un seul gène chez *Arabidopsis* et chez le riz. C'est suite à un crible chimique à l'EMS (Ethyl methanesulfonate) dans l'écotype *Landsberg* au début des années 1980 que les mutants « perte de fonction » pour la CPS (mutants *ga1*) et la KS (mutants *ga2*) ont été identifiés (Koorneef et Van der Veen, 1980 ; figure 14A et 14B). Leur phénotype sévère caractéristique d'un mutant déficient dans la production de GA peut être entièrement complémenté par l'application de GA₄ et de GA₇ bioactive, mais également d'*ent*-kaurène ce qui a facilité leur identification (Koorneef et Van der Veen, 1980 ; Zeevaart 1986 ; Sun et al., 1992 ; Sun et Kamiya, 1994 ; Yamaguchi et al., 1998).

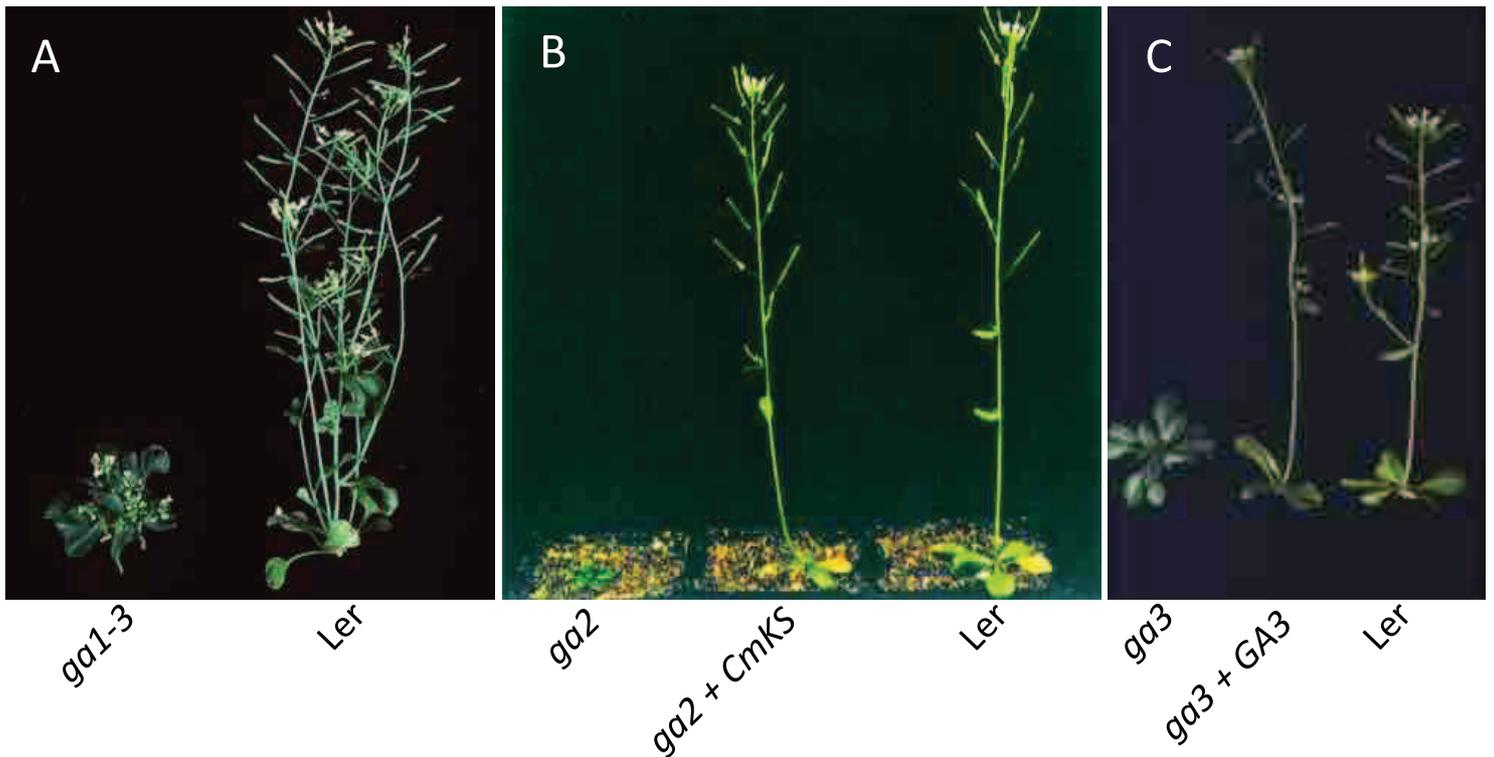


Figure 14 : Phénotype des mutants de biosynthèse *ga1*, *ga2* et *ga3* chez *Arabidopsis thaliana*

(A) Phénotype du mutant *ga1-3* comparé à une plante sauvage (Ler), où le gène codant pour l'enzyme CPS est altéré. (B) Phénotypes du mutant *ga2*, du mutant *ga2* complétementé avec un gène codant la kaurène synthase (KS) du potiron (*Cucurbita maxima*), et de la plante sauvage (Ler). (C) Phénotype du mutant *ga3*, du mutant *ga3* complétementé par le gène *GA3*, et de la plante sauvage (Ler) (Yamaguchi et al., 1998 ; Helliwell et al., 1998).

La surexpression de la *CPS* et de la *KS* chez *Arabidopsis* permet d'augmenter significativement les niveaux d'*ent*-kaurène, sans pour autant augmenter les niveaux des GA bioactives, un résultat appuyé par le phénotype des surexprimeurs, identique à celui d'une plante sauvage (Fleet et al., 2003). Ces observations suggèrent que certaines étapes de la voie de biosynthèse pourraient être limitantes dans la production de GA bioactives. D'autres travaux ont également mis en évidence le caractère très volatile de l'*ent*-kaurène. En effet, des plantes surexprimant à la fois la *CPS* et la *KS* et placées dans un environnement clos avec des mutants *ga1* et *ga2*, sont capables de compléter leur phénotype simplement par émission du composé (Otsuka et al., 2004). L'*ent*-kaurène serait donc très facilement et rapidement métabolisé en GA bioactive sous cette forme volatile.

1.3.4 De l'*ent*-kaurène à la première gibbérelline : la GA₁₂

L'*ent*-kaurène formé précédemment est converti en GA₁₂ par différentes étapes d'oxydation catalysées par deux cytochromes P450 appartenant à la sous-famille des CYP701A. Tout d'abord, l'*ent*-kaurène est oxydé en acide *ent*-kaurénoïque par l'action de la KO (*ent*-kaurène-19-oxydase) (figure 15). Cette enzyme ajoute un groupement hydroxyle en C-19 pour former l'*ent*-kaurenol qui est ensuite oxydé pour former un aldéhyde, l'*ent*-kaurenal, converti à son tour en acide carboxylique pour former l'acide *ent*-kaurénoïque (Helliwell et al., 1999 ; Morrone et al., 2010). La KO présente une double localisation, à la fois sur la membrane externe des plastides, et sur la membrane du reticulum (Helliwell et al., 2001). Comme pour la *CPS* et la *KS*, la KO est codée par un gène unique à la fois chez *Arabidopsis* et chez le riz et le mutant *ko* est nain (Fig. 14C). L'enzyme KO est la cible des principaux inhibiteurs chimiques de la biosynthèse des GA (on parle aussi de ralentisseurs de croissance) tel que le paclobutrazole, l'uniconazole, l'ancymidol ou l'inabenfide (Rademacher, 2000). Ces inhibiteurs possèdent une paire d'électrons libres qui remplace l'oxygène au niveau de l'hème de l'enzyme. Les plantes transgéniques surexprimant la KO ont une croissance identique à celle de plantes sauvages, mais au contraire de ces dernières, elles sont plus résistantes à l'action des inhibiteurs de croissance paclobutrazole et uniconazole (Swain et al., 2005).

L'acide *ent*-kaurénoïque ainsi formé est oxydé en trois étapes successives en GA₁₂ par l'action d'une autre cytochrome P450 appartenant aux CYP88A, l'acide *ent*-kaurénoïque oxydase (KAO) (Figure 15). Premièrement, l'acide *ent*-kaurénoïque est hydroxylé en position C-7β pour former l'acide *ent*-7α-hydroxykaurénoïque. Cet intermédiaire est ensuite oxydé en C-6β pour aboutir à la GA₁₂-aldéhyde, première molécule de type *ent*-gibbérellane.

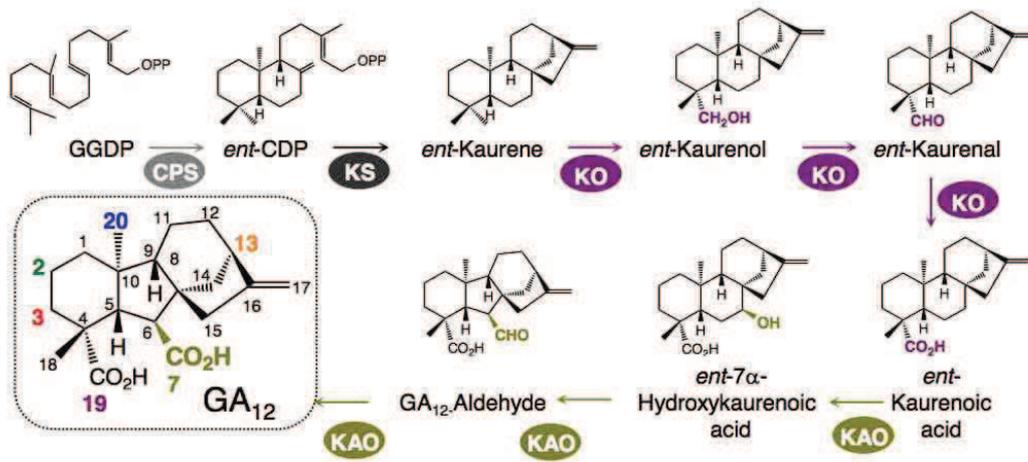


Figure 15 : Etapes précoces de la biosynthèse des GA, du GGPP à la GA₁₂

CPS = ent-copalyl diphosphate synthase, KS = ent-kaurène synthase, KO = ent-kaurène-19-oxydase, KAO = acide ent-kaurénoïque oxidase (Adapté de Yamaguchi et al., 2008 ; Barker, 2011).

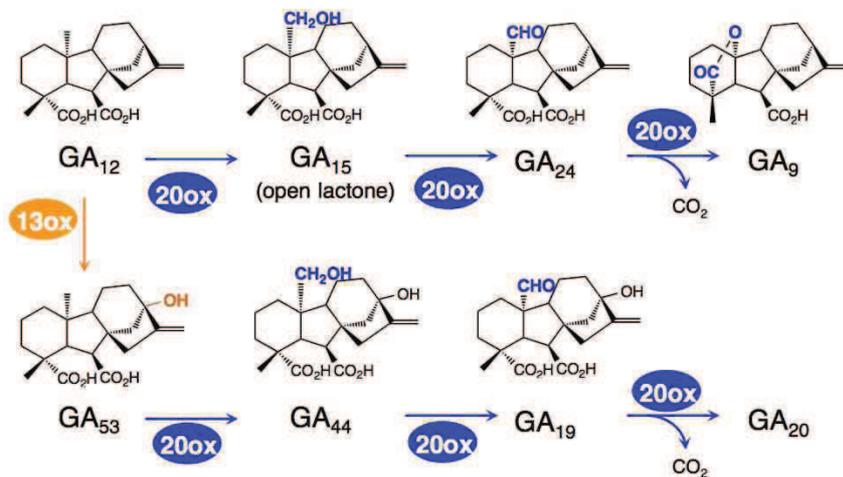


Figure 16 : Conversion des gibbérellines C-20 en C-19 par l'action des GA20-oxydases

20ox = GA20ox ; 13ox = GA13-hydroxylase (Adapté de Yamaguchi et al., 2008 ; Barker, 2011)



Figure 17 : Phénotype des mutants *ga20ox* chez *Arabidopsis*

Phénotype des simples mutants *ga20ox1*, *ga20ox2* et *ga20ox3*, des combinaisons de doubles et de triples mutants *ga20ox* en comparaison à la plante sauvage (Col-0) et au mutant *ga1-3*. Les plantes sont âgées de 44 jours (d'après Plackett et al., 2012)

Finalement, la GA₁₂-aldéhyde est oxydée sur le groupement aldéhyde pour produire la GA₁₂ (Helliwell et al., 2001). Un seul gène code la KAO chez le riz, mais deux copies à l'action redondante sont présentes chez *Arabidopsis* (*AtKAO1* et *AtKAO2*) (Helliwell et al., 2001). Le pois possède lui aussi deux copies pour la KAO: l'une d'entre elle est exprimée dans la majorité des tissus (*PsKAO1*), l'autre est restreinte uniquement aux racines et à la graine (*PsKAO2*). Le mutant perte de fonction *Pskao1*, (aussi nommé *na1*) présente un phénotype nain caractéristique des mutants de biosynthèse de GA (Davidson et al., 2003). C'est également le cas chez le maïs (*dwarf3*), le riz (*d35*), et le tournesol (*dwarf2*) (Sakamoto et al., 2004 ; Itoh et al., 2004 ; Fambrini et al., 2011).

1.3.5 Les étapes cytosoliques : de la GA₁₂ aux formes bioactives

A partir de la GA₁₂, la voie de biosynthèse présente des différences selon les espèces, on parle de « point de branchement » (Figure 16). En effet, cette molécule peut être hydroxylée ou non en position C-13 par l'action d'une P450 mono-oxygénase ou d'une dioxygénase 2-oxoglutarate-dépendante (ODD) possédant une activité 13-hydroxylase, la convertissant alors en GA₅₃ (Hedden et Thomas, 2012) (Figure 16). Si la nature exacte de l'enzyme responsable de cette conversion est encore méconnue, il a toutefois été démontré que chacune de ces deux familles peut posséder une activité 13-hydroxylase (Sponsel et Hedden, 2004), notamment chez le riz où deux P450 convertissent *in-vitro* la GA₁₂ en GA₅₃ (Magome et al., 2010). Cette étape d'hydroxylation en C-13 est fréquente chez les monocotylédones comme le riz, et plutôt rare chez *Arabidopsis* (Sponsel, 2010).

Alors que les étapes précédentes (du GGPP à la GA₁₂) concernent des gènes de biosynthèse généralement présents à raison d'une seule copie, les étapes tardives (à partir de la GA₁₂) impliquent des familles multigéniques à la fois chez *Arabidopsis* et chez le riz. Solubles dans le cytosol, les GA₂₀-oxydases sont des enzymes appartenant à la famille des ODD utilisant le NADPH et l' α -cétoglutarate comme co-facteurs. Elles oxydent en C-20 la GA₁₂ et la GA₅₃ en GA₉ et GA₂₀ respectivement (Figure 16). Une fonction alcool est créée par ajout d'un groupement hydroxyle en C-20 formant la GA₁₅ pour la GA₁₂, et la GA₄₄ pour la GA₅₃. Puis la GA₁₅ et la GA₄₄ sont oxydées en C-20 conduisant à la formation d'un groupement aldéhyde caractéristique de la GA₂₄ et GA₁₉ nouvellement formées, respectivement. Enfin, ces deux intermédiaires perdent leur C-20 en CO₂, pour produire une fonction lactone entre la position C-10 et C-19 formant la GA₉ et la GA₂₀ (Figure 16). Les intermédiaires de ces réactions enzymatiques sont relativement abondants en comparaison à ceux des réactions catalysées par les P450, signifiant qu'ils sont relâchés après chaque

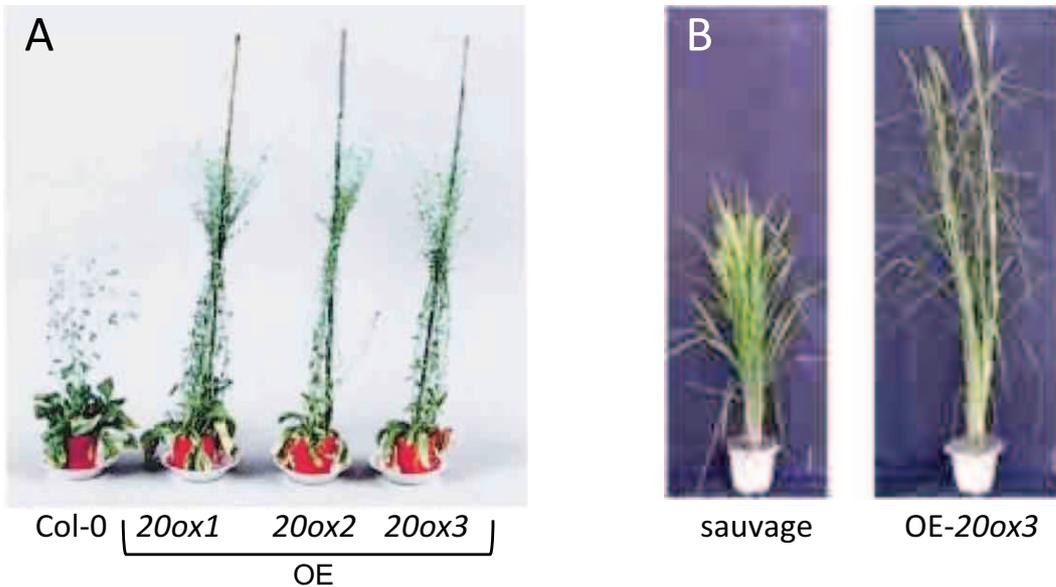


Figure 18 : Phénotype de plantes surexprimant des GA20-oxydases

(A) Les plantes d'*Arabidopsis* surexprimant *AtGA20ox1*, *AtGA20ox2* ou *AtGA20ox3* ont une hauteur finale plus grande que la plante contrôle (Col-0). (B) Chez le riz, la surexpression de *OsGA20ox3* augmente la taille de la plante. OE = surexprimeur. (Coles et al., 1999).

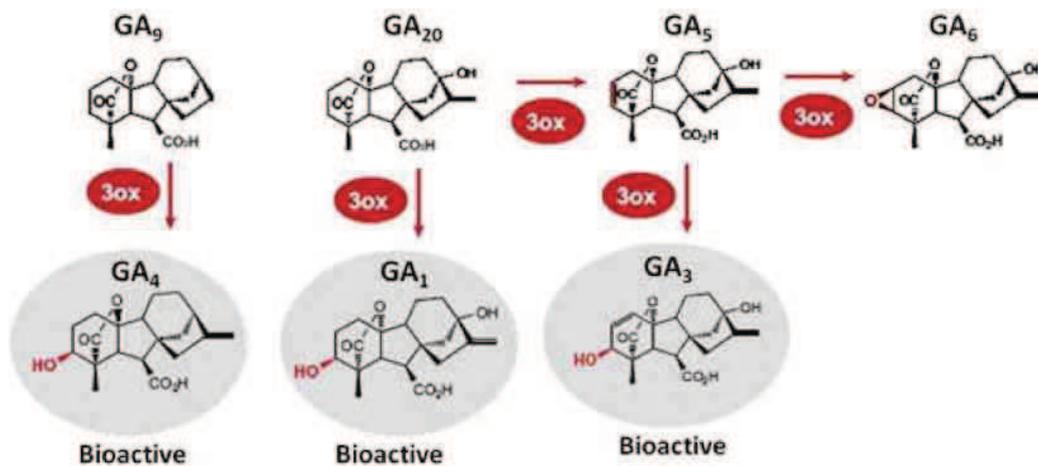


Figure 19: Synthèse des GA bioactives par l'action des GA3-oxydases
 3ox = GA3-oxydases. (Adapté de Yamaguchi et al., 2008 ; Barker, 2011)

étape et qu'ils doivent interagir à nouveau avec le site d'action de l'enzyme (Suzuki et al., 1992 ; Hedden et Thomas, 2012). Ainsi, les GA20ox permettent la décarboxylation des GA de type C-20 en C-19, et la formation d'une fonction lactone, des conditions nécessaires à la production de formes bioactives (Figure 16).

Chez *Arabidopsis*, il existe cinq GA20ox (GA20ox1-GA20ox5). Le mutant *ga20ox1* est semi nain, ayant une hauteur finale intermédiaire à celle d'une plante sauvage et d'un mutant sévère de biosynthèse de GA, tel que *ga1-3* (figure 17). Au contraire, les simples mutants *ga20ox2* et *ga20ox3*, tout comme le double mutant *ga20ox2 ga20ox3* n'ont pas de phénotype apparent. Par contre, le double mutant *ga20ox1 ga20ox2* et surtout le triple mutant *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3* sont sévèrement affectés dans leur croissance, avec un phénotype proche de celui du mutant *ga1-3* (Plackett et al., 2012) (Figure 17). Dans leur ensemble, ces observations suggèrent que les GA20ox ont des rôles aussi bien distincts que redondants et illustrent le rôle mineur de GA20ox4 et GA20ox5 (Plackett et al., 2012).

De manière intéressante, les plantes qui surexpriment les GA20ox possèdent des niveaux plus élevés en GA bioactives et une hauteur finale plus grande (Coles et al., 1999). Ce n'était pas le cas pour les gènes de biosynthèse des étapes plus précoces, signalant le caractère limitant de cette étape (Figure 18A). Toutes ces caractéristiques sont également observables chez le riz, qui comprend quatre GA20ox (*OsGA20ox1-OsGA20ox4*). Les simples mutants *Osga20ox1*, *Osga20ox2* (plus connu sous le nom de *sd1* et pour son importance lors de la révolution verte) et *Osga20ox3* présentent un phénotype semi-nain (Oikawa et al., 2004). A l'opposé, la surexpression de ces GA20ox augmente la taille de la plante, résultat d'une hausse de production des GA bioactives (Figure 18B).

L'ultime étape aboutissant à la formation des GA bioactives est catalysée par les GA3-oxydases (GA3ox), une autre classe d'ODD (Figure 19). Ces enzymes catalysent l'ajout d'un groupement hydroxyle par une oxydation en C-3 β , convertissant ainsi la GA₉ et la GA₂₀ en GA₄ et GA₁ respectivement (Hedden et Kamiya, 1997). Dans de rares cas observés chez des monocotylédones, les GA3ox peuvent également convertir la GA₂₀ en GA₃ via un intermédiaire, la GA₅ (Appleford et al., 2006) (Figure 19).

Le génome d'*Arabidopsis* comprend quatre gènes (GA3ox1-GA3ox4). Le mutant *ga3ox1* présente un phénotype semi-nain similaire au mutant *ga20ox1*, démontrant son implication pour la régulation de la croissance de la plante. Au contraire, les simples mutants *ga3ox2*, *ga3ox3* et *ga3ox4* n'ont pas de phénotype particulier, illustrant une probable redondance fonctionnelle (Mitchum et al., 2006 ; Hu et al., 2008) (figure 20). Les doubles mutants *ga3ox1 ga3ox3*, *ga3ox1 ga3ox4* et le triple mutant *ga3ox1 ga3ox3 ga3ox4* ont tous une croissance végétative identique au simple mutant *ga3ox1* (Hu et al., 2008) (figure 20). Cependant, le

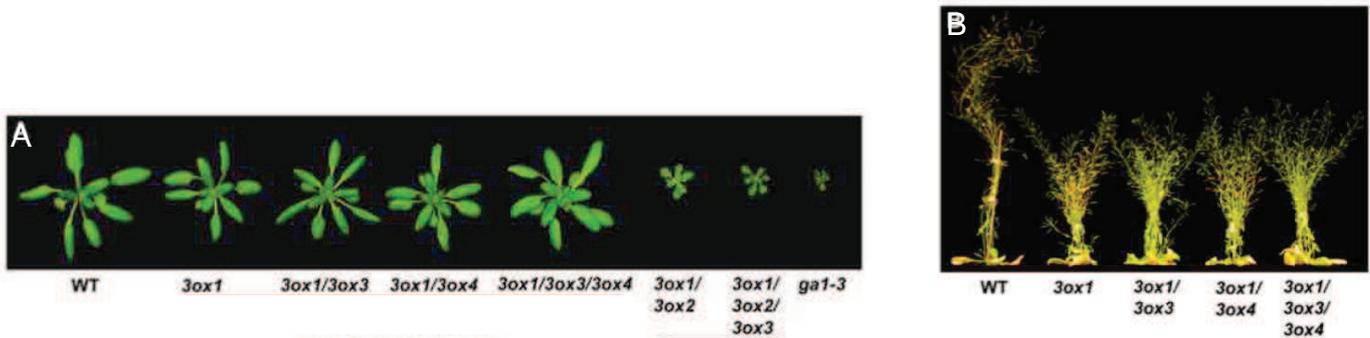


Figure 20 : Phénotype des mutants *ga3ox* chez *Arabidopsis* (d'après Hu et al., 2008)

(A) De gauche à droite, phénotype au stade rosette (24 jours) d'une plante sauvage (WT), du simple mutant *ga3ox1*, de combinaison de doubles mutants et triples mutants, en comparaison au mutant *ga1-3*.

(B) De gauche à droite, phénotype à un stade plus avancé (44 jours) d'une plante sauvage (WT), du simple mutant *ga3ox1*, des doubles mutants *ga3ox1 ga3ox3* et *ga3ox1 ga3ox4*, et du triple mutant *ga3ox1 ga3ox3 ga3ox4*.

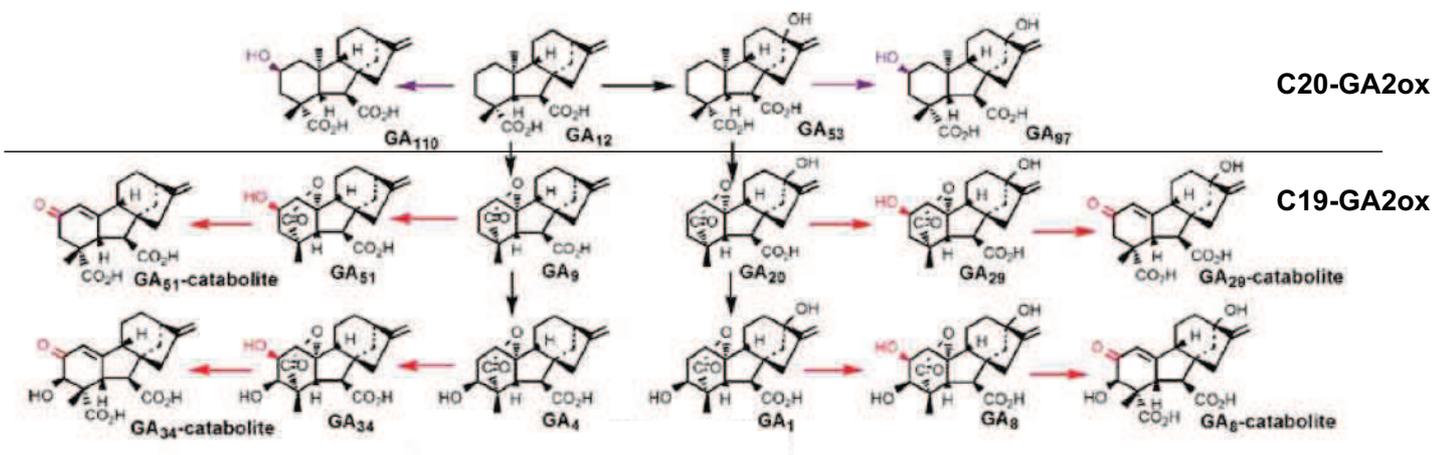


Figure 21 : Catabolisme des GA

La désactivation des GA peut se faire à deux niveaux différents. Le premier niveau concerne les GA de type C20 comme la GA_{12} et la GA_{53} qui peuvent être désactivées par des C20-GA2ox (en violet). Le deuxième niveau concerne les GA de type C19, dont les formes bioactives, désactivées par des C19-GA2ox (en rouge) (d'après Hedden et Thomas, 2012).

double mutant *ga3ox1 ga3ox2* est plus petit que le simple mutant *ga3ox1*, sans être aussi sévère que le mutant fort *ga1-3*.

L'ensemble de ces observations suggèrent que les GA3ox présentent des fonctions à la fois redondantes et distinctes, avec un rôle prépondérant de *GA3ox1* et *GA3ox2* pour la régulation de la croissance de la plante (Mitchum et al., 2006 ; Hu et al., 2008).

1.3.6 Désactivation des GA

Si l'effet des GA est primordial pour la croissance des plantes, il est essentiel que ces dernières régulent leur concentration en GA bioactives afin qu'elles puissent moduler leur développement en fonction des contraintes environnementales. Un moyen rapide consiste en l'inactivation des GA, principalement via une hydroxylation en C-2, effectuée par les GA2-oxydases (*GA2ox*) (MacMillan, 2001). Ces enzymes sont divisées en deux groupes: l'un agissant sur les GA de type C-19, et l'autre sur les GA de type C-20 (Thomas et al., 1999 ; Hedden et Phillips, 2000 ; Schomburg et al., 2003).

Le premier groupe (C19-GA2ox) peut lui-même être subdivisé en deux sous groupes. Le premier sous-groupe (I) comprend les GA20ox possédant une activité β -hydroxylase en C-2, et qui sont également capables d'oxyder le groupement hydroxyle résultant de cette réaction en une fonction cétone, produisant ainsi un catabolite de la voie de biosynthèse des GA au sens propre. Le deuxième sous-groupe (II) englobe des C19-GA2ox incapables de réaliser cette deuxième étape. Les C19-GA2ox convertissent la GA₉, GA₂₀, GA₄ et GA₁ en GA₅₁, GA₂₉, GA₃₄ et GA₈ respectivement (Figure 21). Chez *Arabidopsis*, *GA2ox1*, -2 et -3 appartiennent au sous-groupe I, et *GA2ox4* et *GA2ox6* au sous-groupe II. Le deuxième groupe (C20-GA20ox) est composé de GA20ox possédant une activité β -hydroxylase en C-2. Les C20-GA20ox ont pour substrat des GA de type C-20, et catalysent ainsi la formation de GA₁₁₀ et GA₉₇ à partir de GA₁₂ et GA₅₃ respectivement (Figure 21). Le génome d'*Arabidopsis* contient deux gènes codant pour des C20-GA2ox, *GA2ox7* et *GA2ox8*. C'est par des « cribles activateurs » que les gènes codant des GA2ox ont été identifiés (Schomburg et al., 2003). Dans ces cribles, un T-DNA comportant des éléments activateurs est inséré dans le génome d'*Arabidopsis* et y stimule constitutivement la transcription des gènes adjacents. Ainsi, des plantes surexprimant *GA2ox7* ou *GA2ox8* présentent un phénotype nain, due à la désactivation de précurseurs de GA de type C-20. A l'opposé le double mutant *ga2ox7 ga2ox8*, tout comme le quintuple mutant *ga2ox1 ga2ox2 ga2ox3 ga2ox4 ga2ox6*, accumulent des niveaux élevés de GA bioactives, corrélé phénotypiquement par une plante plus grande et présentant des problèmes de stérilité du à

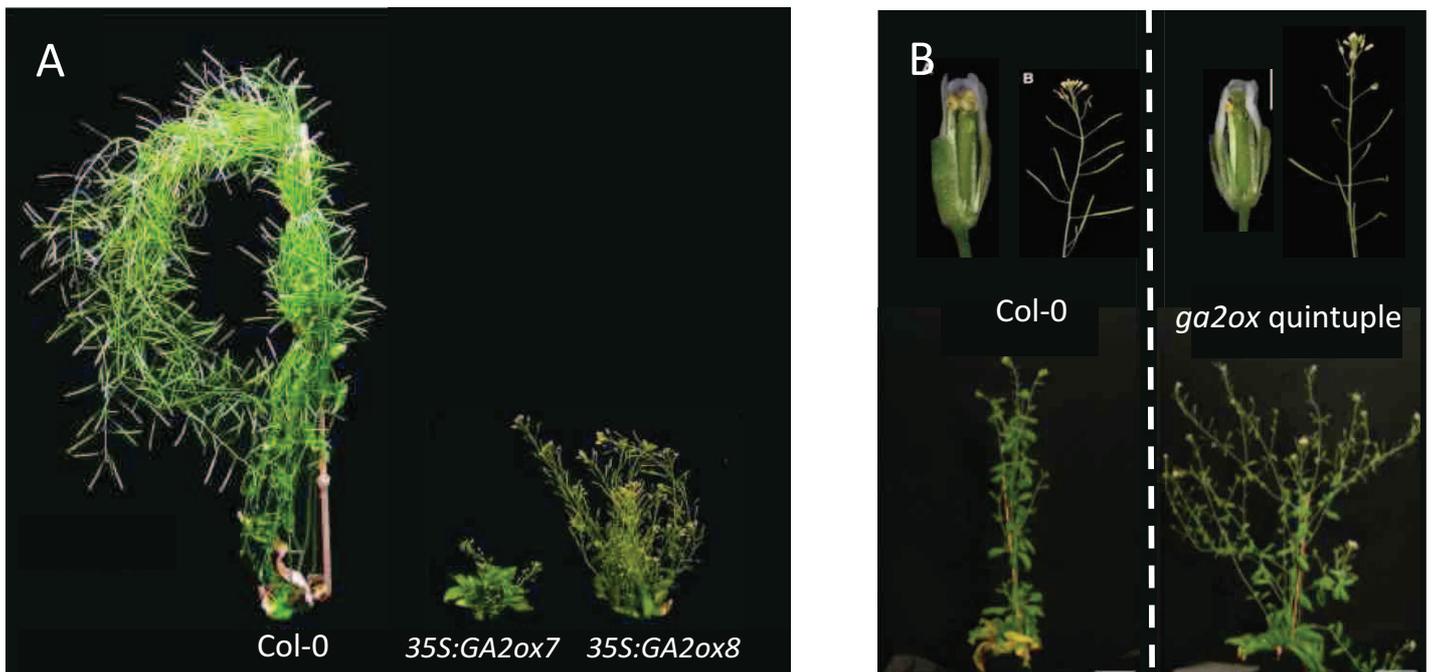


Figure 22 : Phénotypes des surexprimeurs et mutants *ga2ox* chez *Arabidopsis* (Schomburg et al., 2003 ; Rieu et al., 2008b)
(A) Phénotype de plantes surexprimant *AtGA2ox7* et *AtGA2ox8* en comparaison à une plante sauvage (Col-0).
(B) Phénotype du quintuple mutant *ga2ox1 ga2ox2 ga2ox3 ga2ox4 ga2ox6* (*ga2ox* quintuple) en comparaison à une plante sauvage (Col-0).

l'excès de GA (Schomburg et al., 2003 ; Rieu et al., 2008b) (Figure 22). Ces observations démontrent que si une déficience en GA est critique pour la plante, un excès de l'hormone est également délétère. Une régulation fine de la concentration endogène en GA est par conséquent primordiale.

Deux autres mécanismes permettant la désactivation des GA ont été découverts plus récemment. Le premier consiste en une méthylation du groupement carboxyle en C-6, ce qui est catalysé par deux méthytransférases nommées *GAMT1* et *GAMT2* (Gibbérelline Méthytransférase 1 et 2) chez *Arabidopsis* (Varbanova et al., 2007). Il a été démontré *in-vitro* que ces deux enzymes utilisent un grand nombre de précurseurs, y compris des formes bioactives, comme substrats. Des plantes surexprimant *GAMT1* et *GAMT2* sont naines, aussi sévèrement qu'un mutant *ga1-3* (Figure 23A). *GAMT1* et *GAMT2* sont exprimés majoritairement dans les graines, suggérant que la désactivation des GA par des méthylations a lieu préférentiellement à ce stade (Varbanova et al., 2007 ; Yamaguchi, 2008). Les graines du double mutant *gamt1 gamt2* contiennent des concentrations élevées de GA bioactives par rapport à des graines sauvages, ce qui soutient cette hypothèse (Varbanova et al., 2007).

Le deuxième mécanisme a été découvert chez le riz. Le gène *EUI* (*ELONGATED UPPERMOST INTERNODE*) code pour une cytochrome P450 mono-oxygénase capable de convertir *in-vitro* la GA_{12} , la GA_9 et la GA_4 en des formes époxydes (16 α ,17-époxydes), inactives (Zhu et al., 2006). La surexpression de *EUI* cause un nanisme sévère (Figure 23B), corrélé à une baisse de concentration en GA_4 , confirmant les observations *in-vitro*. Si les formes 16 α ,17-époxydes n'ont pas été retrouvées chez le riz, la présence de GA 16 α ,17-dihydroles indique que les formes époxydes sont probablement hydratées *in-planta*, et que ce mécanisme de désactivation est bel et bien actif (Zhu et al., 2006 ; Hedden et Thomas, 2012). Il existe deux enzymes du même type chez *Arabidopsis* (*CYP714*) dont la surexpression, encore une fois, aboutit à un phénotype nain (Zhang et al., 2011) (Figure 23C). Leur fonction n'a pas encore été étudiée.

1.3.7 Régulation homéostatique du métabolisme des GA

Les phénotypes observés concernant les mutants de biosynthèse ou de catabolisme illustrent l'importance des GA pour la plante. Une déficience en production de GA freine la croissance de la plante, retarde la floraison et diminue la fertilité. A l'opposé, un excès de GA provoque une croissance excessive, et affecte également la fertilité. Il est donc primordial

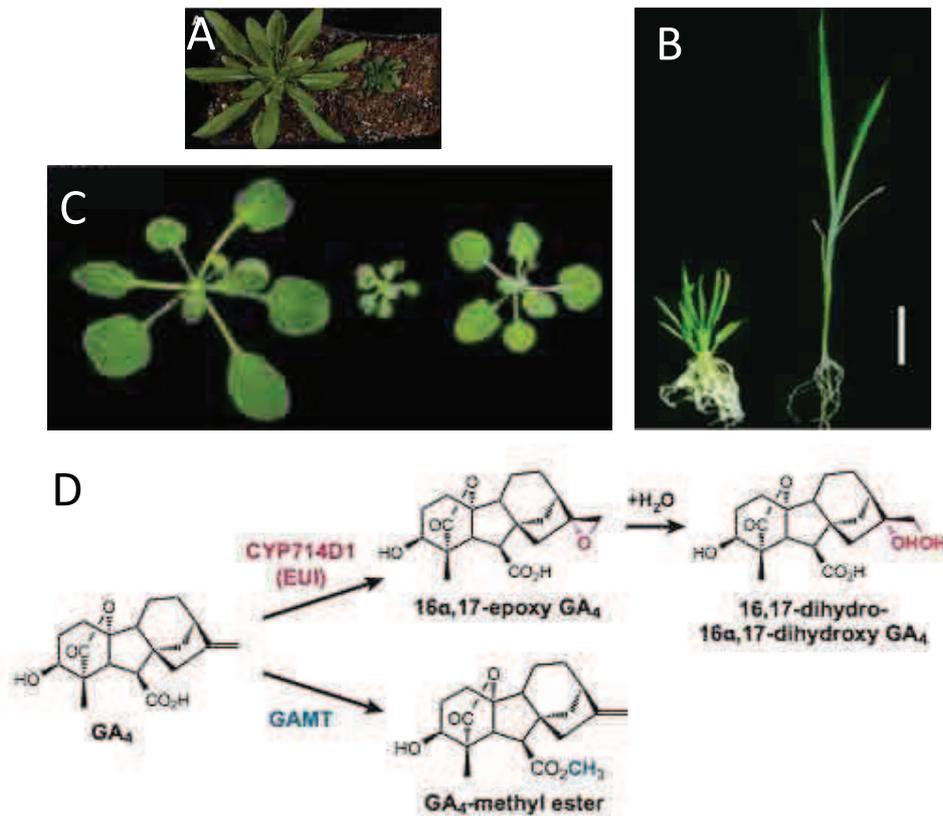


Figure 23 : Désactivation des GA par des mécanismes autres que l'action des GA2ox

(A) Différence morphologique entre une plante sauvage (à gauche) et une plante surexprimant *Gibberellin Methytransferase 1 (GAMT1)* (à droite), chez *Arabidopsis* (Varbanova et al., 2007). **(B)** Différence morphologique entre un plant de riz sauvage (à droite) et un plant de riz surexprimant le gène *ELONGATED UPPERMOST INTERNODE (EUI)* (à gauche) (Zhu et al., 2006). **(C)** Différence morphologique entre une plante sauvage (à gauche) et des plantes surexprimant *CYP714A1* (au milieu) et *CYP714A2* (à droite) chez *Arabidopsis* (Zhang et al., 2011). **(D)** Mécanisme de désactivation de la GA_4 par les GAMT, et CYP174 (Yamaguchi, 2008).

pour la plante de pouvoir réguler ses niveaux endogènes en GA en contrôlant la voie de biosynthèse.

L'auto-régulation par rétrocontrôle et « feedforward » de la voie de biosynthèse constitue le premier niveau de contrôle de la production des formes bioactives (figure 24). L'importance de ce mécanisme est illustrée par la comparaison des niveaux endogènes de GA bioactives entre plantes sauvages, et différents mutants de biosynthèse, ou de signalisation de l'hormone. Ainsi le mutant *d1* chez le maïs, affecté dans la biosynthèse des GA, en conséquence d'une GA3ox non fonctionnelle, présente des niveaux élevés de GA₂₀ et bas des précurseurs GA₁₉ et GA₅₃ en comparaison avec la plante sauvage suggérant une surexpression des GA20ox chez le mutant (Croker et Hedden, 1990). Si la forme bioactive est appliquée de façon exogène sur ce mutant, l'expression des GA20ox diminue, signifiant que les formes bioactives opèrent une régulation négative sur les gènes de biosynthèse (Philips et al., 1995) (figure 24). Cette régulation est rapide puisqu'en 15 minutes, dans un mutant *ga1-3* traité avec de la GA₄, une baisse de l'expression de GA3ox1 et GA20ox1 a pu être observée (Ogawa et al., 2003 ; Griffiths et al., 2006). Les gènes codants pour les enzymes en charge de la désactivation des formes bioactives, les GA2ox, sont également impliqués dans ces processus de régulation (Elliott et al., 2001). Ainsi, dans un mutant de biosynthèse des GA les GA2ox sont sous-exprimés, et l'application exogène de GA bioactives permet d'augmenter l'expression de ces mêmes gènes (Thomas et al., 1999 ; Rieu et al., 2008b). De même, les mutants affectés dans la voie de signalisation, nains et insensibles aux GA comme les mutants *rht* chez le blé, présentent également des niveaux plus élevés en GA bioactives et plus faibles en précurseurs (Talon et al., 1990 ; Appleford et Lenton, 1991). Ces mutants activent la voie de biosynthèse, en vain, en cherchant à produire plus de GA bioactives afin de rétablir une croissance identique aux plantes sauvages.

Le mécanisme exact de l'auto-régulation de la voie de biosynthèse des GA reste encore à déterminer, et pourrait impliquer différents facteurs de transcription. Chez le tabac par exemple, RSG (REPRESSION OF SHOOT GROWTH) migre dans le noyau en réponse à une baisse de concentration en GA bioactives (Ishida et al., 2004). Cette observation suggère que ce facteur de transcription, une fois dans le noyau, pourrait réguler positivement les gènes de biosynthèse des GA (Ishida et al., 2004). Chez le riz, le facteur de transcription OsYAB1 se fixe au promoteur de OsGA3ox2 et régule négativement son expression (Dai et al., 2007). Aussi, plantes surexprimant OsYAB1 sont semi-naines, présentant une baisse des niveaux de GA₁ (Dai et al., 2007).

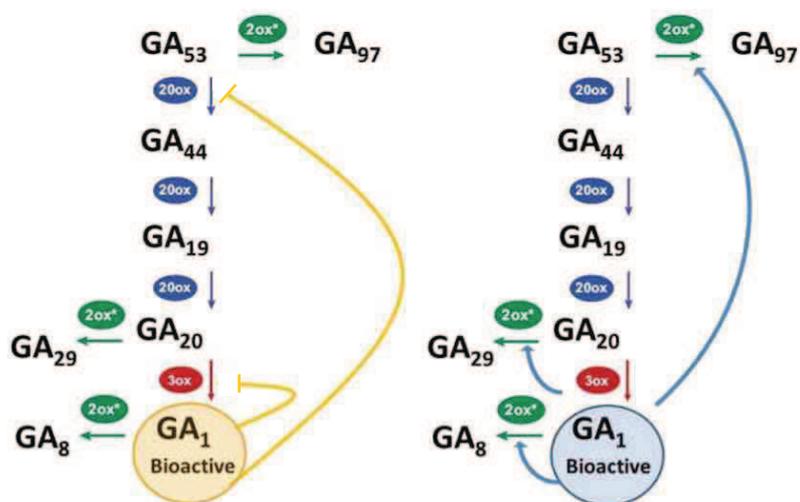


Figure 24 : Rétroaction positive et négative des GA bioactives sur la synthèse des GA

Les GA bioactives exercent un rétrocontrôle négatif (barres jaunes) sur les gènes de biosynthèse codant les GA20ox et GA3ox. A l'opposée les GA bioactives stimulent (flèches bleues) les gènes de catabolisme codant les GA2ox (adapté de Yamaguchi, 2008).

Tous les gènes de biosynthèse ne sont pas sujets à une régulation positive ou négative par les GA bioactives. Ces mécanismes concernent principalement la famille des ODD (Yamaguchi, 2008).

1.3.8 Régulation de la biosynthèse des GA par des signaux développementaux

Un second niveau de contrôle de la concentration en GA bioactives s'opère sous l'influence de différents signaux endogènes, au cours du développement de la plante.

Ainsi la CPS, première enzyme de la voie de biosynthèse, est hautement régulée durant le développement, où l'activité promotrice de CPS est forte dans les tissus en croissance comme les méristèmes, les inflorescences ou les graines (Silverstone et al. 1997). Ces résultats suggèrent que ce haut degré de régulation permet de contrôler le flux de métabolites entrant dans la voie de biosynthèse (Silverstone et al., 1997). Si la « porte d'entrée » de la voie de biosynthèse est un point important de régulation, les ODD à l'origine de la formation des GA bioactives le sont également. Les différents paralogues des GA20ox, GA3ox et GA2ox possèdent des patrons d'expression à la fois distincts et complémentaires, contribuant à des degrés divers aux différents processus développementaux (Mitchum et al., 2006 ; Rieu et al., 2008a et b ; Hedden et Thomas ; 2012).

Au niveau moléculaire, les mécanismes requis dans cette régulation commencent à être élucidés. Il a par exemple été démontré que la biosynthèse des GA était directement contrôlée par des régulateurs au cours de l'embryogénèse chez *Arabidopsis*. En effet, dans la graine, les facteurs de transcription LEC2 (LEAFY COTYLEDON 2) et FUS3 (FUSCA3) sont indispensables à son développement et à la spécification des différents tissus la composant. LEC2 et FUS3 réduisent l'expression de GA3ox2 dans l'épiderme des embryons, où FUS3 interagit directement à son promoteur (Curaba et al., 2004). A ce niveau, AGAMOUS-LIKE15, un autre facteur de transcription, augmente l'expression de GA2ox6, gène de catabolisme (Wang et al., 2004). Ces découvertes suggèrent qu'une diminution de la production de GA est nécessaire pour le bon déroulement de l'embryogénèse (Hedden et Thomas, 2012).

Dans les fleurs, où les GA sont essentielles pour leur développement, l'expression de GA3ox1 est augmentée par AG (AGAMOUS), un facteur de transcription déterminant pour la spécification des organes floraux (Gomez-Mena et al., 2005). GA3ox1 est également une cible directe de IND (INDEHISCENT), un facteur d'identité de la valve des siliques, dont

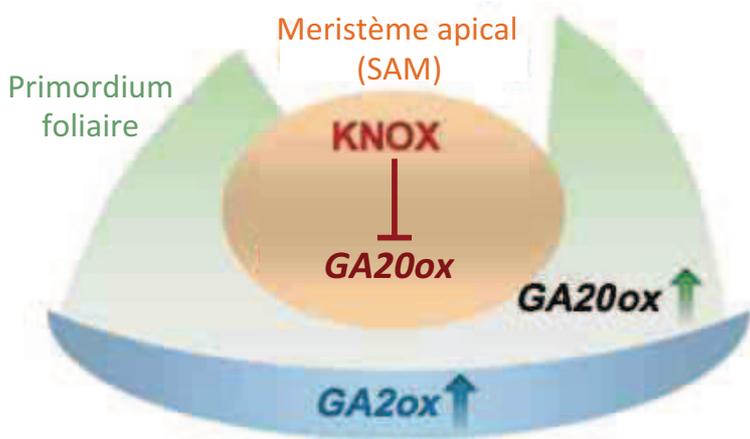


Figure 25 : Rôle des gènes *KNOX* et *GA* pour le maintien des cellules indifférenciées dans le méristème apical caulinaire

Les protéines de type *KNOX* répriment la biosynthèse des *GA* en diminuant l'expression des *GA20ox* dans le méristème apical (orange, SAM). Ce mécanisme contribue au maintien de cellules à l'état indifférencié dans cette zone. Dans le primordium foliaire (vert), les gènes *KNOX* ne sont pas exprimés et la production de *GA* bioactives n'est pas inhibée. A la base du méristème (bleu), les gènes *GA2ox* sont surexprimées afin de maintenir un niveau général faible de *GA* bioactives dans l'ensemble de ce tissu (Jasinski et al. 2005 ; adapté de Yamaguchi, 2008).

l'interaction promouvrait une hausse des niveaux de GA bioactives nécessaires à la dispersion des graines (Arnaud et al., 2010).

Enfin dans les méristèmes apicaux, l'absence de GA bioactives contribuerait au maintien d'un lot de cellules indéterminées. Ceci pourrait fonctionner via l'action de facteurs de transcription de type KNOX (KNOTTED-like homeobox) exprimés dans ces méristèmes et plus particulièrement KNAT1 (KNOTTED1-LIKE in ARABIDOPSIS THALIANA1) et STM (SHOOTMERISTEMLESS) connus pour diminuer l'expression de *GA2ox1* (Hay et al., 2002), ainsi que pour augmenter l'expression de *GA2ox2* et *GA2ox4* (Jasinski et al., 2005 ; Yamaguchi, 2008) (figure 25).

1.3.9 Régulation de la biosynthèse des GA par des signaux environnementaux

Les plantes, organismes sessiles, subissent de nombreuses contraintes liées à l'environnement et ses variations. En réponse à ces stress, elles ont la capacité de moduler leur croissance et leur développement pour mieux s'adapter. Les GA jouent un rôle majeur dans ces processus. Elles fonctionnent comme des médiateurs clés entre la perception d'un signal environnemental et la réponse sur la croissance. Il est logiquement concevable que l'environnement puisse exercer une influence sur la voie de biosynthèse des GA.

1.3.9.1 Régulation de la biosynthèse des GA par la lumière

La lumière est un facteur environnemental majeur affectant la croissance et le développement des plantes, et agissant en partie via les GA. Ainsi, les concentrations endogènes en GA subissent des variations en fonction de la quantité, de la qualité, mais aussi de la durée de lumière reçue par la plante. Chez *Arabidopsis*, comme chez la laitue (*Lactuca sativa*) ou la tomate (*Solanum lycopersicum*), la germination des graines est sous le contrôle des phytochromes A et B (Shinomura et al., 1996). Lorsque ces deux phytochromes sont activés par la lumière, stimulant la germination, ce processus s'accompagne d'une hausse de la concentration en GA₄. Cette hausse est le résultat d'une augmentation de l'expression de *GA3ox1* et *GA3ox2* et d'une diminution de l'expression de *GA2ox2* influencée par le facteur de transcription PIL5 (PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 3-LIKE 5) (Yamaguchi et al., 1998 ; Oh et al., 2006 ; Yamauchi et al., 2007 ; Kim et al., 2008).

Si dans les graines en germination les phytochromes régulent positivement la voie de biosynthèse, c'est l'opposé qui se produit lorsque des plantules cultivées à l'obscurité sont exposées à la lumière (on parle de dé-étiolement). Chez le pois, des plantules cultivées à l'obscurité présentent une baisse de la concentration en GA₁ après exposition à la lumière blanche, due principalement à la surexpression de *PsGA2ox2* (Weller et al., 2009). Chez *Arabidopsis*, le dé-étiolement par de la lumière bleue de plantules cultivées à l'obscurité aboutit à une baisse de l'expression de *GA20ox1* et *GA3ox1* et à une surexpression de *GA2ox1* (Zhao et al., 2007). Ces résultats indiquent que la lumière, à travers l'action des phytochromes et des cryptochromes, est impliquée dans la réduction des niveaux de GA bioactives dans les plantules dé-étiolées (Zhao et al., 2007 ; Yamaguchi, 2008). Ces mécanismes sont contrôlés par le facteur de transcription LONG1 chez le pois, et par le couple HY5 (ELONGATED HYPOCOTYL 5) / COP1 (CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1), chez *Arabidopsis* (Weller et al., 2009).

Il est également connu que les GA induisent la floraison chez les espèces nécessitant une phase lumineuse supérieure à 12h par jour pour fleurir (Garcia-Martinez et Gil, 2002). La photopériode agit principalement sur les *GA20ox*, afin d'augmenter la concentration en GA bioactives et ainsi promouvoir la floraison (Zhao et al., 2008). En condition de jours longs, des mutants de biosynthèse comme *ga1-3* présentent un retard de floraison, mais arrivent tout de même à fleurir (Wilson et al., 1992). En effet, la voie de floraison en jours longs implique majoritairement l'inducteur floral CONSTANS qui est indépendant des GA (Zhao et al., 2007). En condition de jours courts, CONSTANS est absent, et l'induction florale est entièrement dépendante de la présence de GA bioactive (Wilson et al., 1992 ; Searle et Coupland, 2004). Dans ces conditions, la production de GA est diminuée, et la plante en jours courts fleurit plus tard qu'en jours longs.

1.3.9.2 Régulation de la biosynthèse des GA par la température

La température est un autre facteur environnemental influençant le métabolisme des GA (Yamaguchi, 2008). Dans les graines matures en imbibition à l'obscurité, un traitement au froid à 4°C (stratification) stimule l'expression de *GA20ox2* et *GA3ox1* et inhibe l'expression de *GA2ox2*, augmentant la concentration endogène en GA bioactives (Yamauchi et al., 2004). A l'inverse, la dormance des graines en réponse au froid est associée à une augmentation de l'expression de *GA2ox6* (Kendall et al., 2011). A des stades plus avancés du développement, un traitement au froid sur des plantes d'*Arabidopsis* provoque une surexpression de *GA2ox3* et *GA2ox6* (Magome et al., 2008 ; Achard et al., 2008). Ceci

permet à la plante de freiner sa croissance et de mieux tolérer un froid prolongé ou le gel (Magome et al., 2008 ; Achard et al., 2008).

Les GA interviennent également dans la perception de la transition jour/nuit en relation avec les variations de température. Chez le pois, des plantes cultivées en conditions 13°C jour / 21°C nuit présentent une taille réduite avec des tiges plus courtes par rapport à des plantes cultivées en condition normale 21°C jour / 13°C nuit (Stavang et al., 2009). La concentration en GA₁ chez ces plantes de morphologie plus petite est sensiblement plus faible que des plantes contrôles cultivées en condition normale, due à une répression de *PsGA2ox2* (Stavang et al., 2009). Le mutant *la cry*^s, dans lequel les protéines DELLA LA et CRY présentent une mutation les rendant insensibles aux GA, ne répond pas à ces différences de conditions de culture. Les GA seraient par conséquent des médiateurs de la réponse au thermoperiodisme (Stavang et al., 2009).

1.3.9.3 Régulation de la biosynthèse des GA par la salinité

Chez *Arabidopsis*, le facteur de transcription DDF1 (DWARF AND DELAYED FLOWERING 1), est fortement induit par le sel. La surexpression de DDF1 cause chez la plante un nanisme sévère ainsi qu'une forte baisse de la concentration en GA₄ (Magome et al., 2004). Au niveau moléculaire, DDF1 se fixe au promoteur de *GA2ox7*. Ainsi, en présence d'une forte salinité, la concentration en GA bioactives diminue, ce qui a pour conséquence de ralentir la croissance de la plante et d'augmenter sa tolérance au sel (Magome et al., 2004; Achard et al., 2006). Une analyse transcriptomique chez *Arabidopsis* a mis en évidence l'induction de six *GA2ox* (sur huit) suite à un traitement au sel, suggérant que d'autres facteurs de transcription pourraient également être impliqués dans la résistance de la plante à ce stress (Kilian et al., 2007).

Ainsi les plantes au cours de l'évolution ont développé de nombreux mécanismes de régulation afin de mieux adapter leur croissance et leur développement aux conditions environnementales. Les GA participent à ces processus, l'environnement influençant finement la voie de biosynthèse et plus particulièrement les gènes codant pour la famille des ODD.

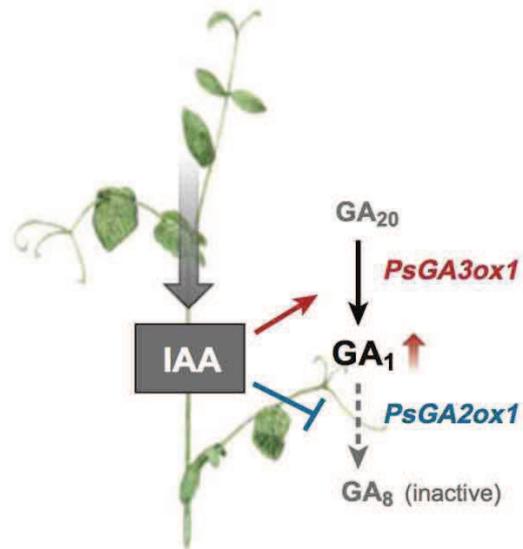


Figure 26 : l'auxine régule positivement la biosynthèse des GA

L'auxine (IAA) en provenance des bourgeons apicaux stimule la production de GA bioactives au niveau des entre-nœuds de la tige chez le pois. Cette régulation positive s'effectue principalement via l'augmentation de l'expression du gène *PsGA3ox1* et par l'inhibition de l'expression de *PsGA2ox1* (Adapté de Yamaguchi, 2008).

1.3.10 Régulation de la biosynthèse des GA par d'autres hormones

Le développement des plantes implique de nombreuses classes d'hormones qui participent activement à la régulation de ce processus et contribuent à moduler leur architecture et leur plasticité en réponse à des changements développementaux et environnementaux (Vandenbussche et Van Der Straeten, 2004). Les auxines, par exemple, régulent majoritairement la forme des plantes (Friml, 2003), les GA et les brassinostéroïdes stimulent la croissance, l'acide abscissique (ABA) induit la dormance et réprime la germination, quand l'éthylène inhibe l'expansion longitudinale et stimule la croissance radiale (Vandenbussche et Van Der Straten, 2007). Il existe par conséquent des interactions et des régulations croisées entre ces classes d'hormones, qui influencent ainsi le développement des plantes.

L'auxine par exemple agit positivement et directement sur la biosynthèse des GA en augmentant l'expression des *GA20ox* et des *GA3ox*, tout en réduisant l'expression des *GA2ox* dans de nombreuses espèces comme l'orge, le pois, le tabac et *Arabidopsis* (Frigerio et al., 2006 ; Weston et al., 2008 ; O'Neill et al., 2010 ; Reid et al., 2011). Chez le pois et le tabac par exemple, la décapitation des bourgeons apicaux réduit dramatiquement la concentration en GA_1 dans la tige, l'application exogène d'auxine restaurant totalement cet effet (Ross et al., 2000 ; Weston et al., 2009) (figure 26). Chez l'orge, l'auxine provenant des inflorescences augmente l'expression des *GA3ox* et réduit celle des *GA2ox* dans la tige (Wolbang et al., 2004). Ces résultats suggèrent qu'un transport d'auxine depuis les inflorescences promouvrait l'élongation de la tige en stimulant la production de GA bioactives. Le mécanisme moléculaire précis reste à découvrir.

L'éthylène est une autre hormone interagissant étroitement avec les GA. Il a été démontré que l'application exogène d'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxlique, un précurseur de l'éthylène, retarde la floraison chez *Arabidopsis*, en réduisant les niveaux de GA bioactives (Achard et al., 2007). De plus, le mutant *ctr1-1*, dans lequel la voie de signalisation de l'éthylène est activée constitutivement présente un retard de floraison, qui est supprimé si des GA bioactives exogènes sont appliquées sur la plante (Achard et al., 2007). Toujours chez ce mutant, les concentrations en GA_1 et GA_4 sont sensiblement réduites malgré une augmentation de l'expression des gènes *GA20ox1* et *GA3ox1* par effet rétroactif (Achard et al., 2007). Le mécanisme moléculaire en jeu n'est pas encore élucidé.

L'ABA possède une action généralement antagoniste à celle des GA. Par exemple, l'ABA induit la dormance des graines et inhibe la germination, alors que les GA ont une action opposée. Une étude récente a démontré que le facteur de transcription CHO1 (CHOTTO1) inhibait la levée de dormance des graines chez *Arabidopsis* via une diminution de la

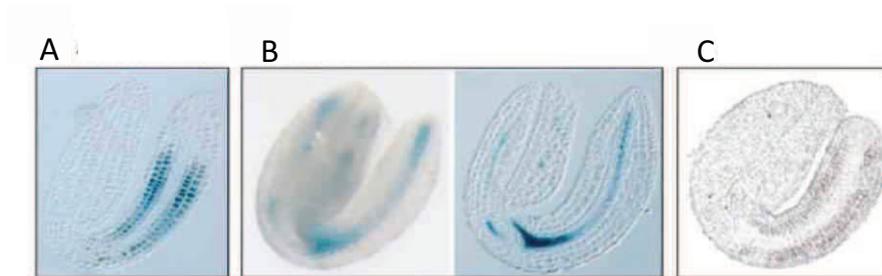


Figure 27 : Patron d'expression de GA3ox2, KO et CPS dans la graine d'Arabidopsis en germination
 Coloration GUS de graines transgéniques exprimant GA3ox2-GUS (A), et CPS1-GUS (B). (C) Analyse par hybridation *in-situ* de l'expression de KO1. (CPS = ent-copalyl diphosphate synthase, KO = ent-kaurène-19-oxydase) (Adapté de Yamaguchi et al. 2001).

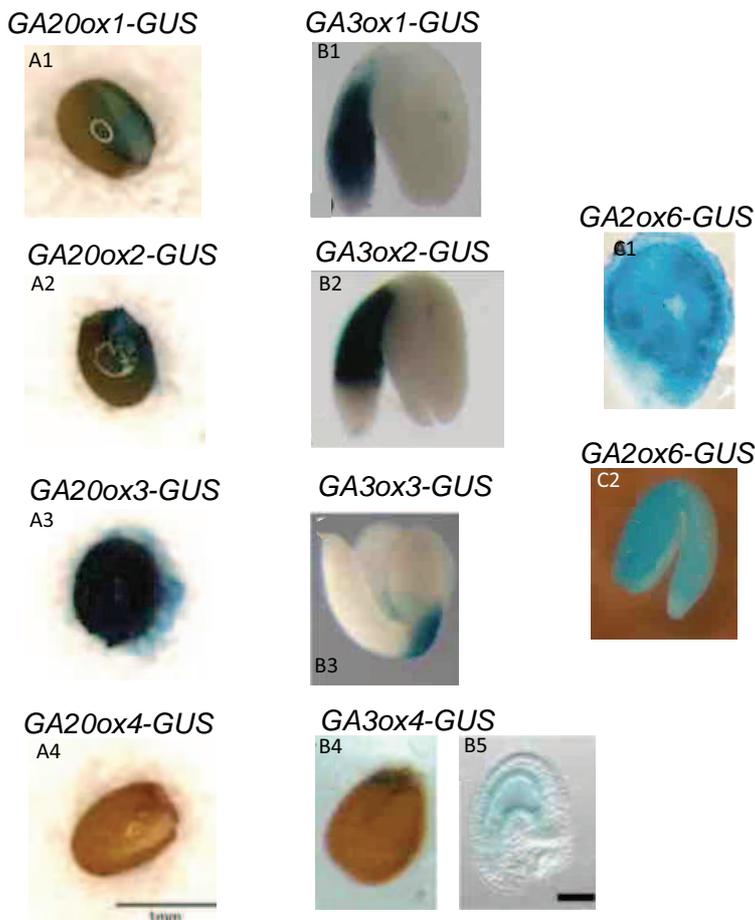


Figure 28 : Patron d'expression de la CPS, des GA20ox, GA3ox et GA2ox au cours des stades précoces du développement chez Arabidopsis
 (A1-2-3-4) : graines en germination
 (B1-2-3) : embryon 16h après germination
 (B4-5) : graine 16h après imbibition
 (C1) : embryon stade globulaire
 (C2) : embryon 8h après imbibition
 (CPS = ent-copalyl diphosphate synthase)
 (Silverstone et al., 1997 ; Wang et al., 2004 ; Mitchum et al., 2006 ; Hu et al., 2008 ; Plackett et al., 2012)

concentration en GA, induite par une répression de *GA3ox2* (Seo et al., 2006). L'expression de *CHO1* étant ABA dépendante, fait de *CHO1* un intermédiaire clé entre la biosynthèse des GA et la voie de signalisation de l'ABA dans la graine. De manière consistante, l'expression des gènes de biosynthèse *GA3ox1* et *GA3ox2* augmente chez les mutants de production d'ABA (Seo et al., 2006). Toutefois, *CHO1* régule indirectement l'expression de *AtGA3ox2* ; *CHO1* n'interagissant pas au promoteur du gène (Seo et al., 2006 ; Yamaguchi, 2008).

Enfin, il existe une étroite relation entre les GA et les brassinostéroïdes. En effet, un mutant de biosynthèse des brassinostéroïdes mais dans lequel était apporté de manière exogène du 24-*epi*-brassinolide, un brassinostéroïde sous forme active, présente une augmentation de l'expression du gène *GA20ox1* (Bouquin et al., 2001). Ce résultat suggère une possible induction des gènes de biosynthèse des GA par les brassinostéroïdes (Bouquin et al., 2001 ; Jager et al., 2005). Toutefois, le rôle et le mécanisme précis de cette interaction ne sont pas encore clairement définis.

Si de nombreux mécanismes restent encore à élucider concernant ces interconnexions hormonales, il devient clair que la régulation fine des GA par d'autres classes de phytohormones contribue au contrôle du développement des plantes.

1. 4 Sites de production des GA au cours du développement chez *Arabidopsis*

D'une façon générale, les concentrations les plus élevées en GA bioactives sont retrouvées dans les jeunes tissus en expansion. On pourrait donc facilement imaginer que leur production a lieu directement dans les organes nécessitant des GA bioactives pour se développer. L'étude du profil d'expression des gènes de biosynthèse des GA a commencé à révéler les sites précis du métabolisme des GA, illustrant une distribution spatiale et temporelle relativement homogène de ces gènes, avec cependant des différences. Ainsi, la localisation des sites de production des GA au cours du cycle de vie de la plante permet de mieux comprendre comment les GA participent au développement des végétaux.

1.4.1 Patron d'expression des gènes de biosynthèse au cours de la germination

Les GA sont essentielles pour la germination de la graine et stimulent la croissance de l'embryon, tout en inhibant les contraintes physiques imposées par l'endosperme et la testa. Les GA activent des enzymes hydrolytiques permettant la protrusion du radicule (Karssen et

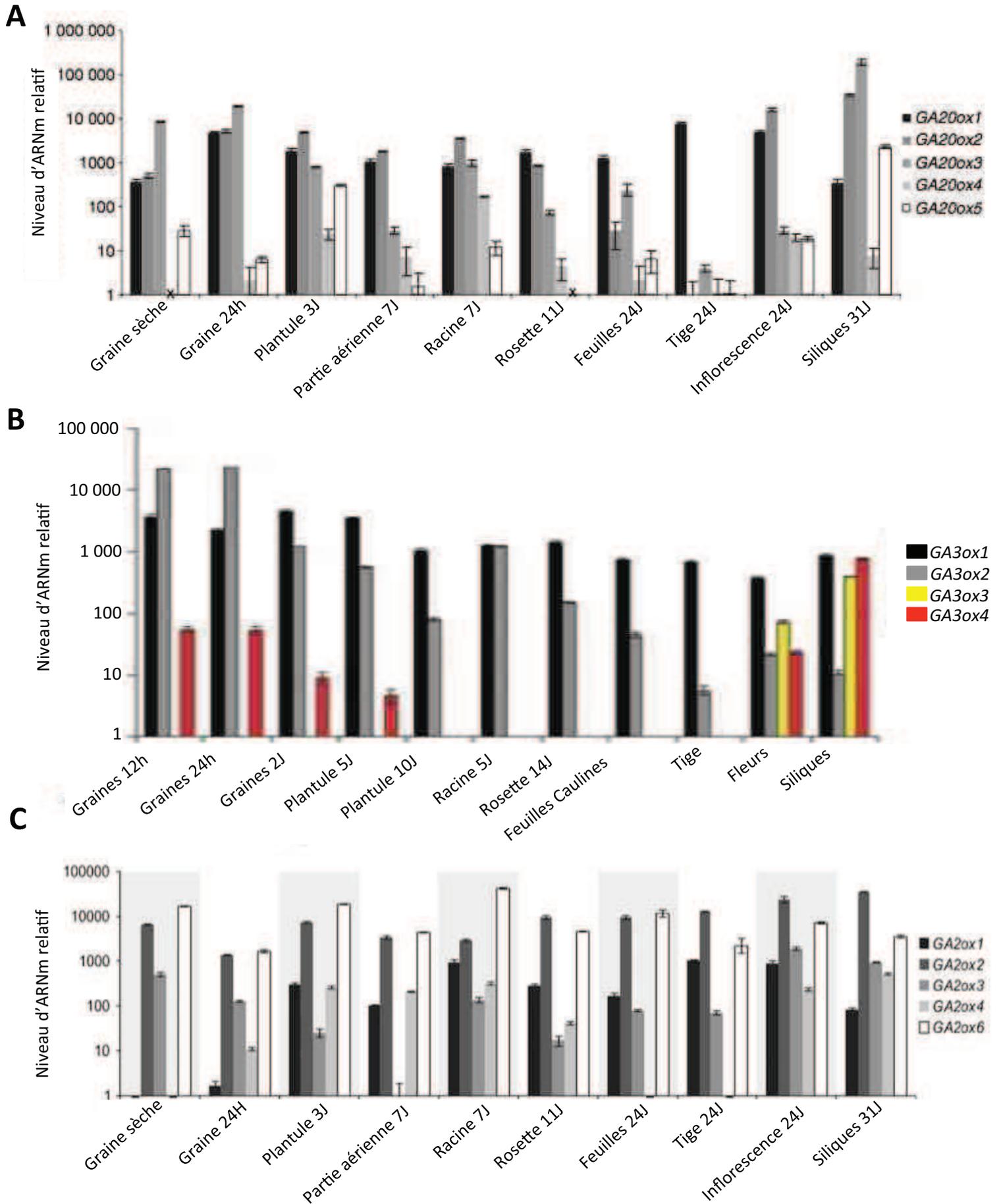


Figure 29 : Niveau d'expression des GA20ox, GA3ox et GA2ox au cours du développement chez *Arabidopsis*
 Analyse par PCR quantitative de l'expression des GA20ox (A), GA3ox (B) et GA2ox (C) pour les tissus ou organes et stades de développement comme indiqué (Mitchum et al., 2006 ; Rieu et al., 2008a et b)

Lačka, 1986 ; Debeaujon et Koornneef, 2000). Ainsi chez *Arabidopsis*, un mutant *ga1-3* est capable de germer si l'enveloppe de la graine est enlevée mécaniquement (Silverstone et al., 1997 ; Telfer et al., 1997).

A ce stade du développement, la CPS est exprimée principalement dans les tissus pré-vasculaires des cotylédons et de l'axe embryonnaire (Yamaguchi et al., 2001 ; figures 27B). A l'opposé, la KO (Figure 27C), mais aussi certaines GA3ox comme la GA3ox2 sont exprimées dans le cortex de l'axe embryonnaire (Yamaguchi et al., 2001 ; figure 27A). Les cinq gènes codant pour les GA20ox chez *Arabidopsis* sont également exprimés lors de la germination où *GA20ox1*, *GA20ox2* et *GA20ox3* présentent les niveaux d'expression les plus élevés (Rieu et al., 2008a ; figures 28A et 29). Ce résultat est confirmé par des coloration GUS sur des graines 24h après semis (Plackett et al., 2012 ; figure 28). Enfin, il est à noter que les enzymes de catabolismes sont exprimées de façon relativement homogène dans l'ensemble des tissus au stade embryonnaire, comme l'atteste l'observation des lignées *GA2ox6::GUS* (Rieu et al., 2008b ; figure 28C). Cette observation suggère un renouvellement rapide des GA bioactives. Le profil d'expression des cinq C19-GA2ox (*GA2ox1*, *GA2ox2*, *GA2ox3*, *GA2ox4* et *GA2ox6*) a été étudié par PCR quantitative (Rieu et al., 2008b) (figure 29). Si *GA2ox2* et *GA2ox6* sont les plus exprimés, on détecte ces cinq gènes dans les graines en germination.

Au vu de ces résultats, on remarque que les sites d'expression dans la graine de gènes assurant les premières étapes de la biosynthèse (CPS) diffèrent de ceux de gènes assurant les étapes suivantes (KO, GA3ox). Cette observation suggère un potentiel transport d'intermédiaires de GA, en l'occurrence et dans cette condition l'*ent*-copalyl diphosphate et/ou l'*ent*-kaurène.

1.4.2 Sites de production des GA au cours du développement végétatif

Les GA sont nécessaires à de nombreux processus du développement végétatif des plantes. Elles stimulent par exemple la croissance racinaire, l'expansion foliaire, ou encore l'allongement de la tige par leur action sur la division et l'élongation cellulaire. Au cours de ce développement, l'expression des gènes de biosynthèse est principalement localisée dans les jeunes tissus en croissance.

C'est le cas des gènes précoces de la biosynthèse, où CPS, KS et KO sont fortement régulés au cours du développement végétatif (Silverstone et al., 1997 ; Helliwell et al., 1998 ;

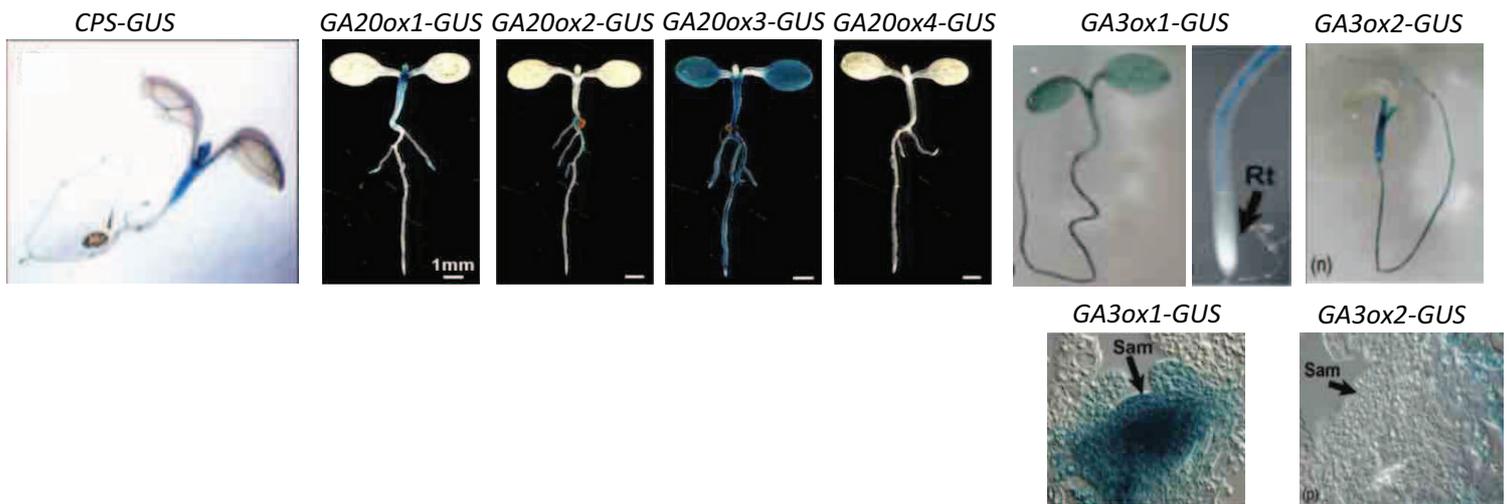
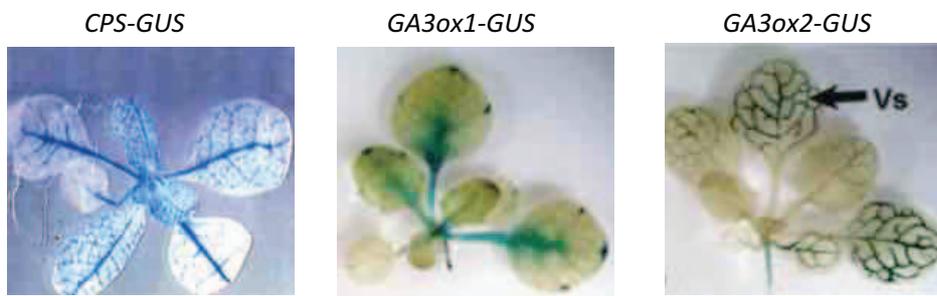
A**B**

Figure 30 : Patron d'expression de la CPS, des GA20ox, GA3ox et GA2ox à différents stades du développement végétatif chez *Arabidopsis*

(A) Observation des colorations GUS au stade plantule. Rt = apex racinaire, SAM méristème apical caulinaire.
(B) Coloration GUS au stade rosette 15 jours (Vs = système vasculaire). CPS = ent-copalyl diphosphate synthase. (Silverstone et al., 1997 ; Mitchum et al., 2006 ; Plackett et al., 2012)

Yamaguchi et al., 1998). Ainsi, au stade plantule et au stade rosette, le gène codant pour la CPS est principalement exprimé dans l'apex racinaire et apical, mais également dans les vaisseaux conducteurs des pétioles et des feuilles (Silvertstone et al., 1997 ; figures 30A et B). De même, la KS est uniquement présente dans les méristèmes et son activité se limite au stroma des pro-plastes issus de tissus sièges de divisions cellulaires (Aach et al., 1995 ; Aach et al., 1997).

Concernant les enzymes plus tardives, les cinq *GA20ox* présentent un patron d'expression distinct (figure 30A), mais aussi redondant à l'image des phénotypes observés (voir chapitre biosynthèse). Au niveau plantule, les *GA20ox* sont exprimées principalement dans les méristèmes apical, dans la zone de différenciation et d'élongation de la racine, dans l'hypocotyle, et dans les cotylédons (Plackett et al., 2012 ; figure 30A). L'analyse des *GA20ox* par PCR quantitative montre que *GA20ox3* est exprimé à des niveaux relativement équivalents à *GA20ox1* et *GA20ox2* à différents stades du développement végétatif, confirmant une redondance fonctionnelle, et le phénotype sévère du triple mutant *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3* (Rieu et al., 2008a ; figure 29A). Le rôle mineur et plus spécifique de *GA20ox4* et *GA20ox5* est également confirmé, ces deux gènes étant les moins exprimés au cours du développement végétatif (Rieu et al., 2008a ; figure 29A). Sur le même principe que les *GA20ox*, les *GA3ox* présentent une distribution spatiale redondante mais également spécifique, suggérant que ces quatre gènes chez *Arabidopsis* ont des rôles distincts durant la croissance de la plante. De façon générale, on retrouve classiquement ces gènes dans les tissus et organes en croissance, où *GA3ox1* présente la plus forte activité tout au long du développement végétatif, tandis que *GA3ox3*, et *GA3ox4* sont plus spécifiques et exprimés à des stades précis (Mitchum et al., 2006 ; Hu et al., 2008 ; figure 29B). Au stade plantule, on retrouve les *GA3ox* dans les méristèmes mais également dans la zone d'élongation et de différenciation de la racine ainsi que les cotylédons (figure 30A). Au stade rosette, outre les méristèmes et la racine, les *GA3ox* sont exprimées dans les vaisseaux conducteurs et la base des feuilles (Mitchum et al., 2006 ; Hu et al., 2008 ; figure 30B).

Concernant les gènes de catabolisme, dans les étapes les plus précoces du développement c'est *GA2ox6* qui est le plus exprimé, notamment dans la racine (Wang et al., 2004 ; Rieu et al., 2008b). Dans les tissus plus tardifs comme la tige c'est *GA2ox2* qui est le gène dominant parmi les *GA2ox* (figure 29C). D'une façon générale, et même si des différences de niveau d'expression subsistent, le profil d'expression des *C19-GA2-oxydases* au cours du développement végétatif suggère une redondance notable entre chacun d'entre eux, ce qui est appuyé par l'absence de phénotype des simples mutants *ga2ox*, semblable à la plante sauvage.

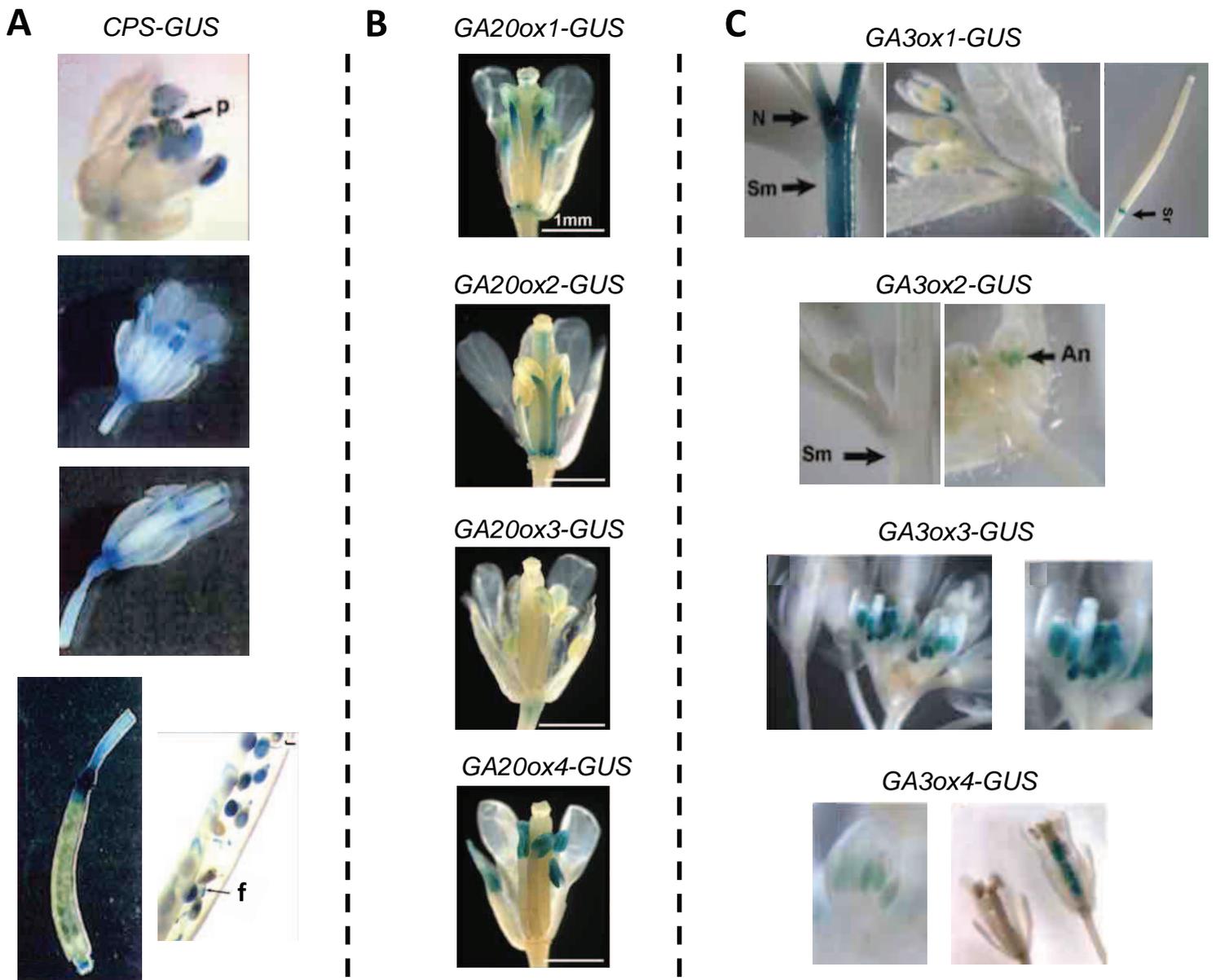


Figure 31 : Patron d'expression de la *CPS*, *GA20ox*, *GA3ox* et *GA2ox* à différents stades du développement de l'appareil reproductif chez *Arabidopsis*

Coloration GUS sur des fleurs et siliques de plantes transgéniques *CPS-GUS* (A), *GA20ox-GUS* (B) ou *GA3ox-GUS* (C) (p= pistil; N=nœud; Sm= tige; An= anthères; Sr= réceptacle des siliques; f= funicule) (Silverstone et al., 1997 ; Mitchum et al., 2006 ; Plackett et al., 2012).

En analysant ces résultats, on peut remarquer que le gène codant la CPS est exprimée dans les feuilles matures, au stade rosette. Or ces tissus ne sont plus en croissance, et n'ont donc plus de réelle nécessité en GA bioactives. Cette observation suggère que ces tissus pourraient constituer un site de production de GA, qui seraient transportées par la suite vers des organes en élongation, ou pour initier la transition florale.

Autre observation intéressante, les enzymes précoces de la voie de biosynthèse des GA telles que la CPS ne sont jamais exprimées dans la zone d'élongation ou de différenciation de la racine. On peut supposer qu'un intermédiaire puisse être transporté depuis le méristème racinaire vers ces zones, afin d'y être converti en forme bioactive.

1.4.3 Sites de production des GA au cours du développement reproductif

La transition florale délimite la phase végétative de la phase reproductive. A partir de ce stade, l'élongation des entre-noeuds se met en place donnant naissance à la tige, et le méristème apical les fleurs. Les GA exercent un rôle déterminant dans ces processus, comme l'indique le retard de floraison important et la stérilité du mutant *ga1-3*.

Au cours de la floraison, la CPS est exprimée dans le réceptacle, les anthères, et la surface du stigmate après pollinisation (Silverstone et al., 1997 ; figure 31A). On retrouve également l'expression de la CPS dans le funiculus et à la base des siliques. Concernant la KS, des analyses par northern-blot indiquent que cette enzyme est exprimée aussi bien dans la tige, que dans la fleur et les jeunes siliques, sans plus de précisions sur sa localisation exacte (Yamaguchi et al., 1998).

Les gènes tardifs sont également impliqués dans le développement de l'appareil reproductif. De la même façon qu'au cours du développement végétatif les cinq *GA20ox* présentent un patron d'expression aussi bien redondant que distinct. *GA20ox1* est ainsi le seul à être exprimé dans la tige (figure 29A). Dans les inflorescences, les *GA20ox* sont majoritairement exprimées dans le filet des étamines, dans le pistil et à la base du réceptacle floral (Plackett et al., 2012 ; figure 29A et 31B). Concernant les *GA3ox*, ces gènes sont exprimés dans la tige, à l'extrémité des sépales, dans le filet des étamines, dans les anthères ainsi que dans le réceptacle des siliques (Mitchum et al., 2006 ; Hu et al., 2008 ; figure 31C). Là aussi, chaque gène possède un patron d'expression spécifique, *GA3ox1*, par exemple, est la principale *GA3ox* exprimée dans la tige (Mitchum et al. 2006, figure 29B). Au contraire, *GA3ox3* et *GA3ox4* sont abondants au cours du développement reproductif, contrastant avec leur faible expression au cours du développement végétatif (figure 29B).

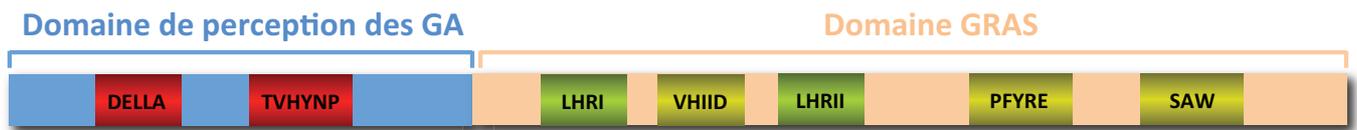


Figure 32 : Structure d'une protéine DELLA

La partie N-terminale comprend un domaine de perception aux GA, constitué de deux motifs DELLA et TVHYNP. La partie C-terminale, conservée chez toutes les protéines à domaine GRAS, comprend cinq domaines (LHRI, VHIID, LHRII, PFYRE et SAW) essentiels à l'activité de la protéine (Adapté de Davière et Achard, 2013).



Ler *ga1-3* *ga1-3 gai* *ga1-3 rga* *ga1-3 gai rga* *ga1-3 gai rga rgl1 rgl2 rgl3*



Figure 33 : Les protéines DELLA répriment la croissance des plantes

Les GA lèvent l'inhibition de croissance en déstabilisant les protéines DELLA (GAI, RGA, RGL1, RGL2 et RGL3). La croissance du mutant nain de biosynthèse *ga1-3* peut être progressivement restaurée par la perte de fonction des différentes protéines DELLA chez *Arabidopsis*.

Enfin, les cinq gènes codant pour des C19-GA2ox sont tous exprimés au cours des différents stades du développement reproductif (Rieu et al., 2008b ; figure 29C). Cette analyse confirme que les C19-GA2ox sont exprimés tout au long du développement de la plante, et préférentiellement dans les organes et tissus en croissance (Rieu et al., 2008b). A l'inverse des GA20ox et GA3ox, et si des différences sont bien présentes au niveau des profils d'expression, ces résultats n'indiquent pas de spécialisation très précise pour chacun de ces gènes (Rieu et al., 2008). Les simples mutants n'ont pas de phénotype, ce qui appuie l'hypothèse de la redondance des C19-GA2ox (Rieu et al., 2008b). Le profil d'expression des C20-GA2ox (GA2ox7 et GA2ox8) reste par ailleurs à étudier.

De façon intéressante, on ne retrouve aucune GA3ox dans les pétales, alors que les mutants *ga3ox* présentent des défauts d'allongement des pétales (Koornneef et Van der Veen, 1980 ; Hu et al., 2008). Ainsi, un transport ou une diffusion de GA bioactives pourrait exister entre le réceptacle floral et/ou les étamines vers les pétales pour y stimuler leur croissance. Un transport de GA bioactives pourrait aussi exister entre les anthères et le filet, *GA3ox1* étant le seul des quatre gènes à être exprimé dans le filet des étamines et un mutant *ga3ox1* possédant des étamines similaires à une plante sauvage (Hu et al., 2008).

Différents travaux permettent ainsi de localiser précisément les sites de production de GA dans la plante. Ces résultats aident à mieux comprendre le mode d'action des GA sur le développement des plantes. Toutefois, une enzyme reste encore peu étudiée chez *Arabidopsis*, la KAO. Etant à l'interface entre les étapes précoces et tardives de la biosynthèse des GA et catalysant la formation de la première molécule de type *ent-gibbèrellane*, la GA₁₂, sa caractérisation pourrait apporter des informations complémentaires quant à la localisation des sites de production des GA au cours du développement.

1. 5 Voie de signalisation des GA

La présence seule de GA bioactives ne suffit pas à induire l'élongation et les divisions cellulaires à l'origine des divers mécanismes de réponse aux GA. Il est également nécessaire que les cellules végétales puissent percevoir l'hormone, impliquant la présence d'un récepteur, point d'origine de la voie de signalisation des GA. Celle-ci est désormais bien caractérisée grâce à l'identification de ses composants au cours des dix dernières années à la fois chez *Arabidopsis* et chez le riz, signifiant que la transduction du signal induit par les GA suit un modèle relativement bien conservé.

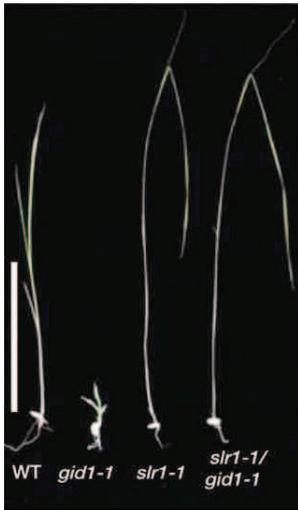


Figure 34 : Phénotype des mutants *gibberellin-insensitive dwarf 1* (*gid1*) et *slender rice 1* (*slr1*) chez le riz

Phénotype des mutants *gid1-1*, *slr1-1*, et *slr1-1 gid1* en comparaison à un plant sauvage (WT). (Ueguchi-Tanaka et al., 2005).



Figure 35 : Phénotype des simples, doubles et triples mutants *gid1* chez *Arabidopsis*

Le triple mutant *gid1a-1 gid1b-1 gid1c-1* montre un phénotype nain aussi sévère que le mutant *ga1-3*, au contraire des simples et doubles mutants *gid1*, illustrant la redondance fonctionnelle de ces gènes. (Griffiths et al., 2006).

Le récepteur des GA, appelé GA INSENSITIVE DWARF1 (GID1), interagit avec l'hormone dans le noyau de la cellule (Ueguchi-Tanaka et al., 2005 ; Griffith *et al.*, 2006). La transmission du signal des GA dépend également directement de la présence ou de l'absence de protéines nucléaires appelées DELLA. Ce sont des répresseurs de croissance inhibant toutes les voies impliquant les GA. En absence de GA bioactives, les protéines DELLA s'accumulent dans le noyau des cellules et inhibent la croissance de la plante. En présence de GA bioactives fixées au récepteur GID1, une cascade d'activation aboutit à la dégradation des protéines DELLA par le protéasome, promouvant ainsi la croissance et le développement de la plante (Ueguchi-Takana *et al.* 2007). La régulation fine de la croissance repose principalement sur la présence, ou l'absence des protéines répressives DELLA. Ce mécanisme est très efficace, et par ce moyen de dégradation sélectif la plante peut inhiber ou activer une voie très rapidement et spécifiquement.

1.5.1 Les DELLA : protéines clés de la voie de signalisation des GA

Les protéines DELLA appartiennent à la famille des protéines GRAS, spécifiques aux plantes et nommée ainsi suite à l'identification des trois premiers membres : GAI (GA-Insensitive), RGA (Repressor of *ga1-3*) et SCR (Scarecrow) (Pysh et al., 1999 ; Bolle, 2004). Comme toutes les protéines GRAS, les DELLA sont caractérisées par la présence d'une partie C-terminale (ou domaine GRAS) conservée et constituée de cinq motifs distincts: LHR1 (Leucine heptade repeat I), VHIID, LHR2, PFYRE et SAW (noms faisant référence à leur composition en acide aminé) (figure 32). La partie N-terminale des DELLA leur est spécifique et contient un motif conservé de 17 acides aminés débutant par la séquence aspartate (D) glutamate (E) leucine (L) leucine (L) alanine (A), et le motif TVHYNP (Davière et Achard, 2013) (figure 32). La perte du domaine GRAS provoque l'abolition de la fonction des protéines DELLA ce qui permet dans un mutant de biosynthèse de GA de rétablir la croissance de la plante (Silverstone et al., 1997 ; Silverstone et al., 1998 ; Dill et al., 2001). A l'opposé, la perte de la partie N-terminale, aussi appelé domaine de perception des GA, rend les protéines DELLA non-dégradables et insensibles aux GA, d'où des plantes naines ou semi-naines comme le mutant *rht* chez le blé sélectionné lors de la révolution verte (Peng et al., 1999).

Si le riz ne possède qu'une seule protéine DELLA (SLENDER-Rice 1) (figure 34), le génome d'*Arabidopsis* code pour 5 protéines DELLAs : GAI (GA-Insensitive), RGA (Repressor of *ga1-3*), RGL1 (RGA-like 1), RGL2 et RGL3 (Dill et al., 2001). Ces protéines ont des activités partiellement redondantes comme l'atteste les analyses de mutants dans un contexte de

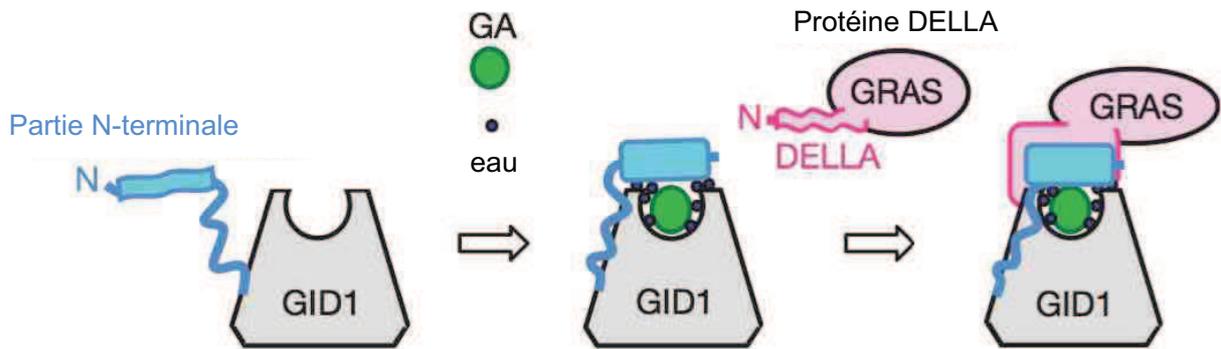


Figure 36 : Formation du complexe GA-GID1-DELLA

Les GA bioactives sont perçues par un récepteur soluble, GID1. La liaison entre GA et GID1 provoque un changement de conformation du récepteur au niveau de son extrémité N-terminale, tel un couvercle. Cette conformation rend alors possible l'interaction entre GID1 et la partie N-terminale des protéines DELLA (Adapté de Murase et al., 2008).

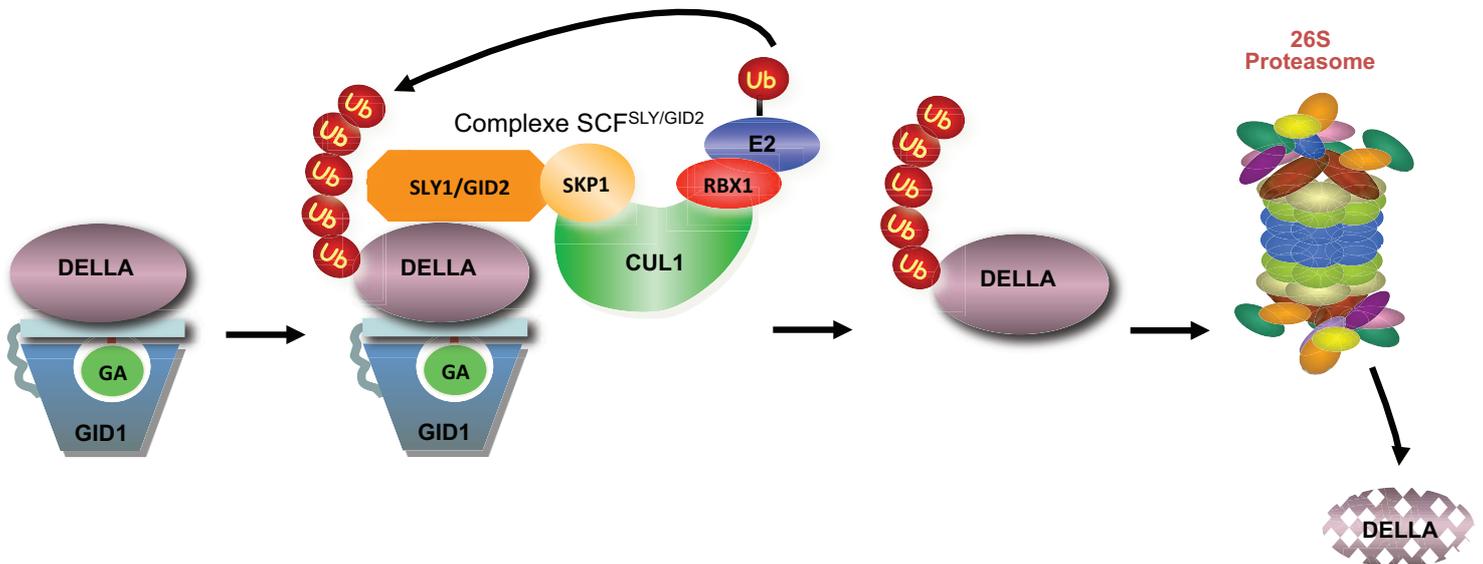


Figure 37 : Dégradation protéasome-dépendante des protéines DELLA

La formation du complexe GA-GID1-DELLA stimule l'interaction des protéines DELLA au complexe SCF^{SLY1/GID2}, une E3 ubiquitine ligase. Ainsi, les protéines DELLA sont polyubiquitylées et dégradées via le protéasome 26S.

Ub = ubiquitine, SLY1 = Sleepy 1, SKP1 = S-phase kinase-associated protein 1, CUL1 = cullin 1, RBX1 = ring-box 1, E2 = ubiquitin-conjugating enzyme (Adapté de Davière et Achard, 2013).

déficiences en GA (*ga1-3*) où chaque DELLA possède une fonction de régulation de la croissance de la plante (Dill et al., 2001 ; Lee et al., 2002 ; Tyler et al., 2004 ; figure 33). Ainsi, GAI et RGA sont impliquées dans le développement végétatif de la plante (King et al., 2001). RGA, RGL1 et RGL2 participent au développement des organes floraux (Cheng et al., 2004). RGL2 est plus spécifiquement impliquée dans l'inhibition de la germination (Lee et al., 2002). Et RGL3 participe à la défense des plantes orchestrée par le jasmonate (Wild et al., 2012). L'origine de ces différences entre les cinq protéines DELLA d'*Arabidopsis* réside plus dans l'importance de leur patron d'expression que dans leurs fonctionnalités. Des expériences d'échanges réciproques de promoteurs-gènes, comme par exemple l'expression de RGA sous le contrôle du promoteur de RGL2 et inversement, ont permis de compléter leurs fonctions respectives (Gallego-Bartolomé et al., 2010).

1.5.2 Formation du complexe GA-GID1-DELLA

En raison de la présence de multiples paralogues de *GID1* chez *Arabidopsis*, c'est chez le riz que le récepteur des GA a été identifié et cloné en premier lieu (Ueguchi-Tanaka et al., 2005). Le mutant *gid1* présente un phénotype nain, insensible à l'action de GA bioactives (Figure 34). Chez *Arabidopsis*, GID1a, -b et -c agissent de façon redondante mais également spécifique (Griffith et al., 2006 ; Nakajima et al., 2006). En effet, si les simples mutants n'ont pas de phénotype particulier, le triple mutant *gid1a gid1b gid1c* présente un nanisme aussi sévère que le mutant de biosynthèse *ga1-3* (figure 35).

GID1 est une protéine monomérique, soluble, possédant une forte homologie avec les lipases hormones-sensitives (HSL) qui clivent des acides gras chez les animaux, à la seule différence qu'il lui manque un acide aminé conservé responsable de l'activité catalytique de ces enzymes. *In-vitro*, GID1 présente une forte affinité pour les GA bioactives, avec une préférence pour la GA₄ (Yamaguchi, 2008). GID1 possède une poche dans laquelle l'hormone bioactive se fixe grâce à la présence d'un groupement hydroxyle en C3 et/ou C13, d'un groupement carboxyle en C6, et d'une fonction lactone résultant d'une réaction entre le groupement hydroxyle en C10 et le groupement carboxyle en C4 de la GA (Murase et al., 2008) (figure 36). La fixation de l'hormone à GID1, par interactions hydrophobes, induit un changement de conformation de l'hélice N-terminale du récepteur, qui va se refermer sur la poche, à l'image d'un couvercle sur une boîte (figure 36). La surface extérieure de ce couvercle est alors exposée et permet ainsi l'interaction du complexe GID1-GA avec le domaine N-terminal des protéines DELLA (Griffith et al., 2006 ; Willige et al., 2007 ; Ueguchi-Takana et al., 2007 ; Shimada et al., 2008) (figure 36).

DELLA	Intéragissant	Fonction	Références
GAI, RGA, RGL1, RGL2, RGL3	PIF1, PIF3, PIF4, PIF6	Elongation de l' hypocotyle Biosynthèse de la chlorophylle	De Lucas et al., 2008 Feng et al., 2008 Gallego-Bartolomé et al., 2010 Cheminant et al., 2011
GAI, RGA, RGL2	ALC	Formation du fruit	Arnaud et al., 2010
RGA, RGL2	SPT	Germination Expansion des cotylédons	Gallego-Bartolomé et al., 2010 Josse et al., 2011
GAI, RGA, RGL1, RGL2, RGL3	MYC2	Interactions GA/JA Biosynthèse des sesquiterpènes	Hong et al., 2012
GAI, RGA, RGL1, RGL2, RGL3	JAZ1, JAZ3, JAZ, JAZ8, JAZ9, JAZ10, JAZ11	Interactions GA/JA Elongation de la racine/hypocotyle Défense contre les pathogènes	Hou et al., 2010 Yang et al., 2012 Wild et al., 2012
GAI, RGA, RGL1, RGL2, RGL3	IDD1 IDDs	Germination Maturation de la graine Transactivation	Feurtado et al., 2011 Yoshida et al., 2014
GAI, RGA, RGL1	SCL3	Germination Elongation de la racine/hypocotyle	Zhang et al., 2012
GAI, RGA	EIN3, EIL1, EIL2	Interactions GA/Ethylène Développement du crochet apical	An et al., 2012
GAI, RGA, RGL1, RGL3	BZR1, BZR2	Interactions GA/Brassinostéroïdes Elongation de l' hypocotyle	Bai et al., 2012 Gallego-Bartolomé et al., 2010
RGA	SPL9	Transition florale	Yu et al., 2012
GAI, RGA, RGL1, RGL2, RGL3	BOI	Co-represseurs des DELLA	Park et al., 2013
GAI	PFD	Organisation des microtubules	Locascio et al., 2013
GAI, RGA, RGL1, RGL2, RGL3	TCP8, TCP9, TCP14, TCP15, TCP20, TCP22, TCP23, TCP3	Contrôle de la taille de la plante	Davière et al., 2014

Figure 38 : Protéines interagissant avec les protéines DELLA

PIF = PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR, ALC = ALCATRAZ, SPT = SPATULA, JAZ = JASMONATE-ZIM DOMAIN, IDD = INDETERMINATE DOMAIN, SCL3 = Scarecrow-like 3, EIN = ETHYLENE INSENSITIVE, BZR = BRASSINAZOLE-RESISTANT, SPL = SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE, BOI = BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1 INTERACTOR, PFD = PREFOLDIN, TCP = [TEOSINTE BRANCHED1 (TB1), CYCLOIDEA (CYC), and PROLIFERATING CELL FACTOR (PCF)]

L'identification de mutants nains insensibles aux GA, comme *gai* (*gibberellin insensitive*), fut une première indication de l'implication des protéines DELLA dans la voie de signalisation des GA (Koornneef et al., 1985), indication confirmée par la suite avec la démonstration qu'une mutation dans le domaine de perception de l'hormone était à l'origine de ce phénotype (Peng et al., 1999). En effet, une mutation dans la partie N-terminale des DELLA bloque l'interaction avec l'hélice N-terminale du récepteur GID1. C'est donc via leurs domaines DELLA et VHYNP que les protéines DELLA se lient à GID1.

1.5.3 Dégradation protéasome-dépendante des protéines DELLA

En réponse à un signal GA, plutôt que d'être séquestrées ou relocalisées, les protéines DELLA sont dégradées (Silverstone et al., 2001). L'interaction entre les DELLA et GID1 provoque un changement de conformation du domaine GRAS des DELLA permettant la reconnaissance de ces protéines par le complexe SKP1-Cullin-F-Box (SCF) (Hirano et al., 2010). Cette E3-ubiquitine ligase va alors polyubiquitinyler les DELLA. Ainsi étiquetées elles sont reconnues par le protéasome 26S et dégradées (figure 37).

C'est la protéine F-Box qui permet la reconnaissance spécifique de la cible du complexe GA-GID1-DELLA en jouant le rôle d'adaptateur. L'analyse de mutants nains obtenus suite à des cribles génétiques a permis d'identifier GID2 (GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF 2) chez le riz, et SLEEPY (SLY1) chez *Arabidopsis* comme les F-BOX ciblant spécifiquement les protéines DELLA (Sasaki et al., 2003 ; McGinnis et al., 2003). Il existe également une deuxième F-Box de ce type chez *Arabidopsis*, SNEEZY (SNE) possédant une séquence très proche de *SLY1* (Strader et al., 2004). Les mutants *gid2/sly* ont un phénotype nain, insensible à l'action des GA due à l'accumulation des DELLA. La surexpression de *SNE* dans un mutant *sly1* permet de compléter partiellement son phénotype par une diminution de l'accumulation des DELLA (Strader et al., 2004). Cette diminution concerne essentiellement RGA et GAI, mais pas RGL2 qui reste à des niveaux élevés, suggérant que *SLY1* et *SNE* ont des affinités variables selon leur cible (Ariizumi et al., 2011). Si *SLY1* est exprimé dans toute la plante, alors que *SNE*, moins abondant, et exprimé plus spécifiquement dans les inflorescences, ce qui permet d'affirmer que *SLY1* est la F-Box majeure chez *Arabidopsis*, où *SNE* est plus spécialisée (Strader et al., 2004).

In vitro, *SLY1* interagit avec *GAI* via le domaine GRAS (Dill et al., 2004). Des expériences en levure et chez le riz mettent également en évidence l'importance du complexe GA-GID1 dans cette interaction puisque sa présence améliore sensiblement l'interaction entre *SLY1* et

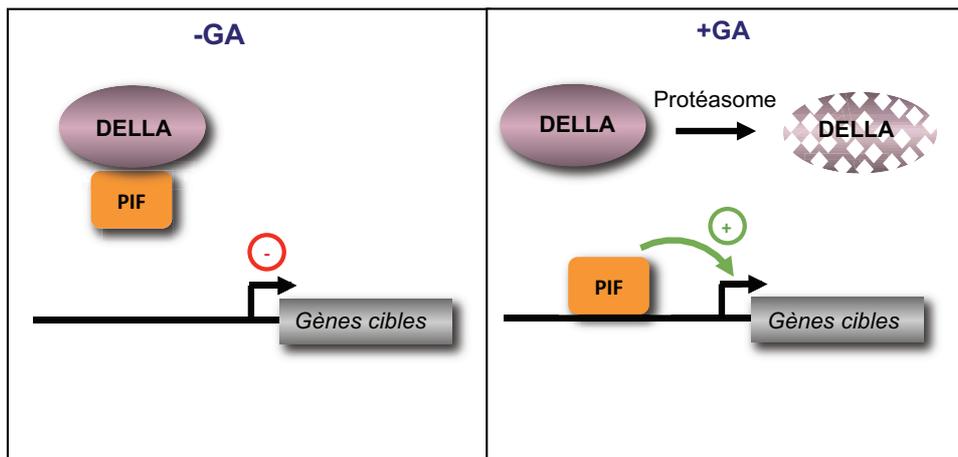


Figure 39 : La séquestration de protéines régulatrices par les DELLA

En absence de GA (à gauche), les DELLA interagissent avec, et séquestrent des facteurs de transcription (exemple : PIFs), empêchant ces derniers de se lier au promoteur de gènes cibles. En présence de GA (à droite), les DELLA sont dégradées et les PIFs sont libres de se fixer aux régions promotrices des gènes cibles. (Adapté de Davière et Achard, 2013).

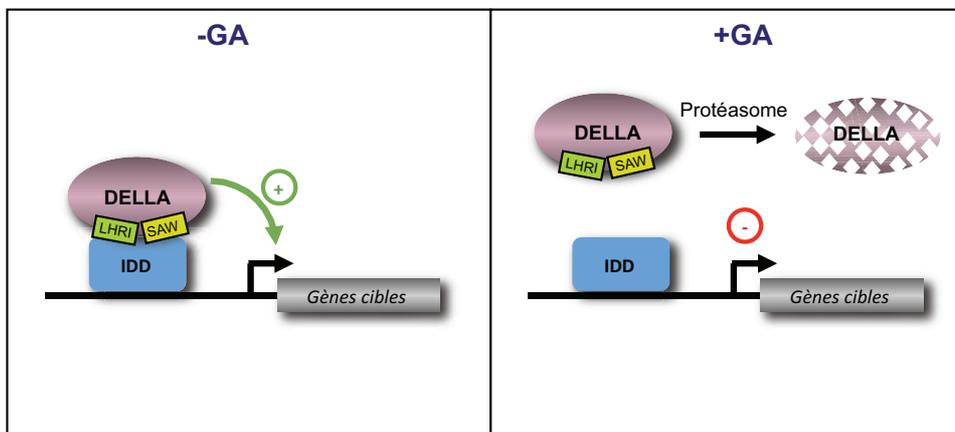


Figure 40 : L'activité transactivatrice des DELLA

En absence de GA (à gauche), les DELLA interagissent avec les facteurs de transcription de type INDETERMINATE DOMAIN (IDD). Ce complexe associé au promoteur de gènes cibles active leur transcription. En présence de GA (à droite), les protéines DELLA sont dégradées, levant ainsi leur activité transactivatrice. (Adapté de Davière et Achard, 2013).

RGA (Griffiths et al., 2006 ; Hirano et al., 2010).

1.5.4 Mécanismes d'action et cibles des protéines DELLA

D'une façon générale, les protéines DELLA agissent comme des régulateurs transcriptionnels influençant l'expression de gènes cibles, comme l'atteste différentes analyses transcriptomiques (Ogawa et al., 2003 ; Cao et al., 2006 ; Zentella et al., 2007). En raison de l'absence d'un domaine de liaison à l'ADN, la présence de facteurs de transcriptions interagissant avec les protéines DELLA est nécessaire. De nouveaux interactants aux protéines DELLA sont régulièrement découverts, parmi lesquels des régulateurs clés impliqués dans diverses fonctions biologiques (figure 38). Ainsi, de nombreux travaux récents mettent en évidence deux mécanismes principaux permettant d'expliquer comment les protéines DELLA agissent et répriment croissance et développement des plantes (de Lucas et al., 2008 ; Feng et al., 2008, Hirano et al., 2012).

Le premier mécanisme décrit consiste en la séquestration de facteurs de transcription ou de régulateurs transcriptionnels (figure 39). En l'absence de GA, les protéines DELLA libres et abondantes interagissent avec ces protéines et les séquestrent en formant un complexe inactif, les empêchant ainsi d'interagir avec l'ADN. En présence de GA bioactives, les protéines DELLA sont dégradées, laissant libre ces protéines qui peuvent alors exercer leur fonction. Un tel mécanisme a été rapporté pour les protéines PIF (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR), mais également et dans deux autres études auxquelles j'ai participé, pour les protéines JAZ (Jasmonate ZIM-domain) et pour les TCP [TEOSINTE BRANCHED1 (TB1), CYCLOIDEA (CYC), and PROLIFERATING CELL FACTOR (PCF)] (De Lucas et al., 2008 ; Feng et al., 2008 ; Wild et al., 2012 ; Davière et al., 2014, annexes 4 et 5).

La transactivation constitue le deuxième mécanisme d'action des protéines DELLA (figure 40). En absence de GA bioactives, les protéines DELLA interagissent via leurs domaines LHRI et SAW à des facteurs de transcription fixés à l'ADN et activent l'expression de gènes cibles (Hirano et al., 2012). En présence de GA bioactives, les DELLA sont dégradées inhibant ainsi leur activité transactivatrice (Hirano et al., 2012). Un tel mécanisme a été démontré récemment et implique cinq membres de la famille des facteurs de transcription IDD (INDETERMINATE DOMAIN) (Yoshida et al., 2014).

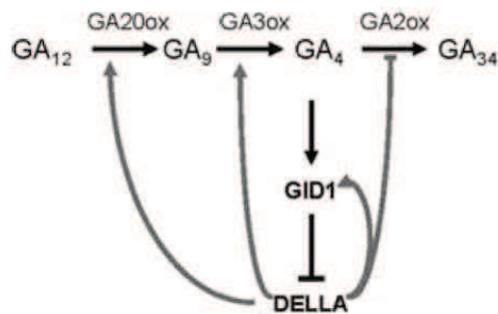


Figure 41 : Rétrocontrôle des protéines DELLA sur la voie de biosynthèse et de signalisation des GA
 Une forte accumulation de protéines DELLA stimule la synthèse de GA bioactives via une augmentation de l'expression des *GA20-oxydases* et des *GA3-oxydases*, associé à une diminution de l'expression des *GA2-oxydases*. Les protéines DELLA opèrent également une régulation positive sur des gènes de la voie de signalisation comme *GID1*. Ces mécanismes contribuent de façon importante à l'homéostasie des GA chez les plantes (Adapté de Hedden et Thomas, 2012).

1.5.5 Influence de la voie de signalisation sur l'homéostasie des GA

Si les concentrations en GA bioactives influencent les gènes de biosynthèse et de catabolisme, et principalement les ODD, afin de maintenir l'homéostasie des GA *in planta* (voir introduction 1.3.7), les éléments clés de la voie de signalisation contribuent également à cet équilibre (figure 41). D'une façon générale, les mutants nains de la voie de signalisation, insensibles aux GA et accumulant les protéines DELLA, contiennent de fortes concentrations en GA bioactives dues à la hausse d'expression des *GA20-oxydases* et *GA3-oxydases* (Sasaki et al., 2003 ; Ueguchi-Tanaka et al., 2005 ; Griffiths et al., 2006). Chez le riz par exemple, le mutant *gid1* présente ainsi de hauts niveaux de GA₁ et une surexpression de *OsGA20ox1* (Sasaki et al., 2003). Chez *Arabidopsis*, le mutant *sly* surexprime fortement *AtGA3ox1* (McGinnis et al., 2003 ; Sasaki et al., 2003 ; Ueguchi-Tanaka et al., 2005). L'application exogène de GA bioactives sur ces mutants de signalisation, et à l'inverse d'un mutant de biosynthèse, n'a aucun effet sur ces hauts niveaux d'expression illustrant le rétrocontrôle positif des protéines DELLA sur les gènes de biosynthèse (Sasaki et al., 2003 ; Ueguchi-Tanaka et al., 2005 ; Griffiths et al., 2006). Les gènes de catabolismes sont également impliqués dans ces processus, il a par exemple été démontré chez le pois que *PsGA2ox1* et *PsGA2ox2* étaient surexprimés dans un mutant perte de fonction pour les protéines DELLA (*la cry*) (Weston et al., 2008). Le mécanisme précis de la régulation des gènes de biosynthèse par les DELLA reste à élucider. Des expériences utilisant la technique du TAP-TAG (Tandem affinity purification) ont échoué à démontrer une fixation directe de RGA sur le promoteur de *AtGA3ox1* et *AtGA20ox2* (Zentella et al., 2008). Ces résultats suggèrent cependant que d'autres acteurs sont impliqués (Zentella et al., 2007 ; Hedden et Thomas, 2012).

Le récepteur des GA, *GID1*, est également sujet à un rétrocontrôle positif par les protéines DELLA (figure 41). Un traitement de GA bioactives baisse sensiblement les niveaux de transcrits de *AtGID1a*, *-b* et *-c* (Griffiths et al., 2006). Des expériences d'immuno-précipitation de la chromatine (ChIP) montrent également que RGA s'associe directement sur le promoteur de *AtGID1a* et *AtGID1b*, suggérant un rétrocontrôle positif direct des protéines DELLA sur *GID1* (Zentella et al., 2007) (figure 41).

Position of stem section	Gibberellic acid content ($\mu\text{g}/\text{block}$)				Gibberellic acid ($\mu\text{g}/\text{stem hr}$)	
	Donor		Receiver		Disappear- ing from donor	Trans- ported into receiver
	Initial	Final	Initial	Final		
Normal	11.1	7.0	0	0.87	1.37	0.29
Inverted	11.1	6.4	0	1.02	1.57	0.34

Figure 42 : Les GA sont transportées de façon non polaire dans les tiges de pois

Quelle que soit l'orientation de la tige, la GA_1 (Gibberellic acid) présente dans le bloc donneur est mobilisée à travers la tige jusqu'au bloc receveur (d'après Kato, 1958).

1. 6 Transport des GA

Dans les années 1950, le transport polarisé de l'auxine était déjà connu et bien étudié. A l'aide d'expériences sur des coléoptiles et l'utilisation de blocs d'agar (voir préambule), il était admis que l'auxine synthétisée dans les apex des tiges, dans les méristèmes et dans les bourgeons terminaux, était ensuite transportée de façon polarisée de l'apex vers la base des tiges. La découverte des GA *in planta* par Margaret Radley en 1956 a permis d'ouvrir le champ d'investigation du transport des phytohormones aux GA. Depuis leur découverte, de nombreux travaux ont été réalisés, intégrant diverses approches, afin d'étudier le transport des GA. Les indices suggérant une mobilité des GA dans les plantes sont multiples, cependant, le mécanisme précis de ce transport reste à l'heure actuelle encore méconnu.

1.6.1 Le transport non polaire des GA

En 1958, et sur le même principe que les expériences concernant l'auxine, Jiro Kato utilise des blocs d'agar et des segments de tige de pois afin de déterminer d'une part si les GA sont mobiles *in planta*, et d'autre part si ce transport est polarisé ou non. Pour cela, un bloc d'agar « donneur » contenant de la GA₁ est placé à une extrémité de la tige, et un bloc d'agar « receveur », pur, à l'autre extrémité. Après 3h d'exsudation à 25°C, les quantités de GA dans chaque bloc sont mesurées. Ainsi, quelle que soit l'orientation de la tige dans ces travaux, des GA sont retrouvées dans le bloc receveur avec une baisse significative dans le bloc donneur, illustrant un mouvement aussi bien acropète (de la base vers le sommet) que basipète (du sommet vers la base) et suggérant un transport non polarisé des GA (Kato, 1958) (figure 42). Ce résultat a été confirmé par Mahmood Clor, toujours chez le pois et grâce à l'utilisation de GA marquées radioactivement (formes non précisées), où aucune différence de translocation de GA n'a pu être observée (Clor, 1967) (figure 43). Dans ces deux travaux, les sections d'entre-nœuds utilisées sont relativement courtes (de 2 à 2,5 cm), ce qui a amené une autre étude à s'intéresser au transport de GA radioactives sur des sections plus longues, allant jusqu'à 8cm en utilisant le modèle du haricot (*Phaseolus coccineus*) (Phillips et Hartung, 1974). Autre aspect intrigant de cette étude, les GA agissant dans les jeunes tissus, les auteurs ont utilisé des entre-nœuds d'âges différents, soit jeunes et en élongation, soit matures. Le protocole utilisé est le même que précédemment, avec un bloc d'agar donneur contenant de la [³H]GA₁, et un bloc d'agar receveur pur. Sur des segments de 6mm, encore une fois, aucune différence significative n'est observée selon l'orientation de la tige, avec des niveaux équivalents de radioactivité

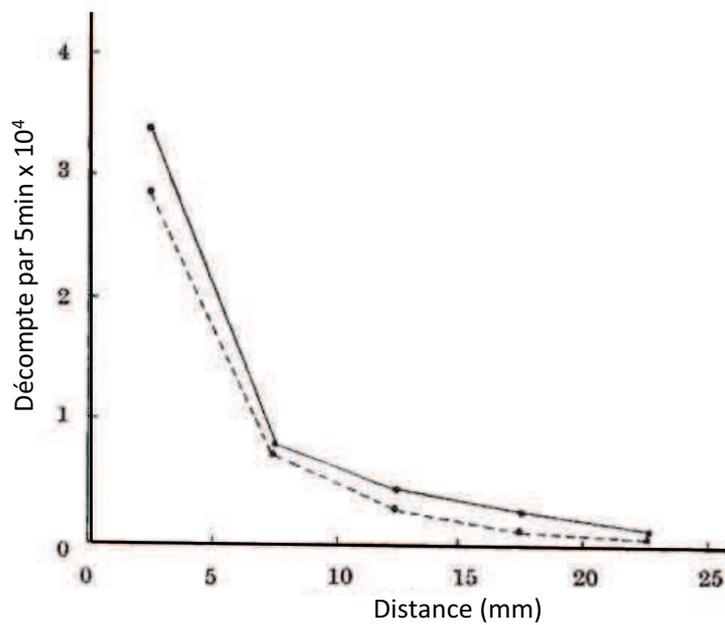


Figure 43 : Mouvement de $[^3\text{H}]\text{GA}$ dans des coupes de tige de pois

Le graphique représente l'intensité de l'activité radioactive $[^3\text{H}]\text{GA}$ retrouvée dans la tige en fonction de la distance parcourue depuis la source (12h après incubation). La ligne continue représente un transport acropète (de la base de la tige vers le sommet), et la ligne en pointillée illustre un transport basipète (du sommet de la tige vers la base) (d'après Clor, 1966).

retrouvés dans le bloc receveur. Par ailleurs, les niveaux de radioactivité retrouvés dans les blocs receveurs provenant d'entre-nœuds matures sont 4 fois plus élevés que ceux de blocs receveurs provenant d'entre-nœuds jeunes et en élongation (Phillips et Hartung, 1974). Une observation confirmée par la quantification de la radioactivité présente dans les sections, qui est 50% plus importante dans les entre-nœuds jeunes par rapport aux entre-nœuds matures suggérant que les GA sont plus facilement mobiles dans des tissus matures, les tissus jeunes les utilisant afin de se développer. De même, sur des segments de 8cm matures, aucune différence significative n'est observée concernant les niveaux de radioactivité selon l'orientation des entre-nœuds. Toutefois, sur des segments de 8cm et 4cm jeunes, le transport acropète semble favorisé par rapport au transport basipète, mais la présence d'une zone de croissance vigoureuse au début du segments pour l'orientation basipète et inversement à la fin du segments pour une orientation acropète biaise le résultat. Cette étude confirme ainsi les résultats précédents, à savoir que le transport des GA est non polarisé. Elle illustre également la nécessité en GA des entre-nœuds jeunes en élongation, qui pourraient éventuellement les retenir via un système de transport.

Sur le même principe, des GA ont également été apportées de manière exogène sur des plantes entières. Ainsi si des [¹⁴C]GA (formes non précisées) sont appliquées directement sur des feuilles matures de plantules de pois, elles sont ensuite retrouvées dans les jeunes feuilles immatures, preuve d'un transport de [¹⁴C]GA, des feuilles âgées vers ces parties en élongation (McComb, 1964). Dans cette expérience, la vitesse de translocation mesurée est estimée à 5cm/h, une vitesse identique à celle de la translocation du sucrose (Canny, 1962), suggérant un potentiel transport par le phloème des [¹⁴C]GA (McComb, 1964). De plus, lorsque cette forme de GA radioactive est appliquée directement sur une jeune feuille, elle ne se propage pas tant que la feuille n'a pas terminé son expansion. Un modèle est proposé où les GA appliquées sur la plante sont transportées des feuilles matures vers les feuilles jeunes, en passant par les tissus en élongation de la tige qui en prélèvent une partie, selon les disponibilités (McComb, 1964). Des travaux similaires sur la vigne montrent que des GA exogènes appliquées sur une feuille migrent vers l'apex des parties aériennes. A l'inverse, si les fruits sont traités, cet apport n'a aucun effet sur l'apex (Weaver et McCune, 1959 ; Weaver, 1960). De même, si l'apex d'une branche latérale est traité avec des GA exogènes, ces dernières ne migrent pas dans la ramification opposée (Weaver, 1960).

Plus récemment, une autre étude a rapporté que les niveaux de GA bioactives augmentaient considérablement juste avant la floraison, et la régulation des gènes impliqués dans le métabolisme des GA suggère que cette augmentation est due à un transport de GA₄ à partir de sources extérieures au méristème apical (Eriksson et al., 2006). Chez *Arabidopsis*, un mutant de biosynthèse des GA cultivé en jours courts est incapable de fleurir. Dans ses

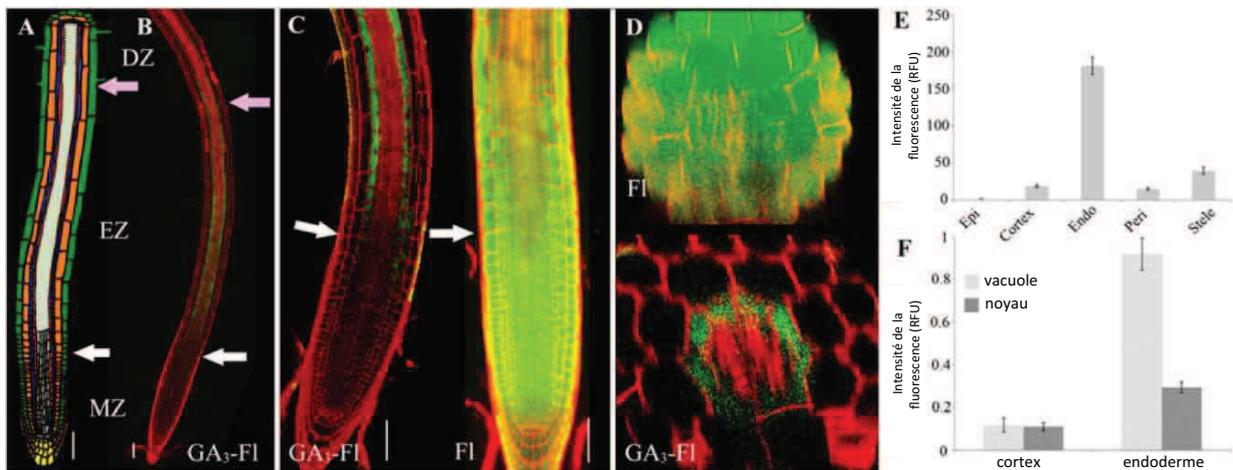


Figure 44 : la GA₃-fluorescente s'accumule spécifiquement dans l'endoderme de la racine

(A) Organisation des tissus de la racine chez *Arabidopsis*, en vert l'épiderme, en orange le cortex, en violet l'endoderme et en rouge le pericycle (DZ= zone de différenciation, EZ= zone d'élongation, MZ= zone méristématique). **(B, C gauche)** Image en microscopie confocale montrant la distribution de la fluorescence retrouvée dans une racine traitée avec la GA₃-fluorescente. **(C droite)** Racine traitée avec la fluorescéine. **(D)** Coupe transversale de racine dans la zone d'élongation, traitée avec la fluorescéine (haut) ou la GA₃-fluorescente (bas). **(E)** Quantification de la fluorescence (GA₃-FI) dans différents tissus cellulaires de la racine. **(F)** Quantification de la fluorescence (GA₃-FI) dans le noyau et la vacuole de cellules du cortex et de l'endoderme. (d'après Shani et al., 2013).

travaux, Eriksson traite une feuille unique de mutants *ga1-3* deux fois par semaine avec de la GA₄. Cette application exogène de GA₄ permet à la plante de fleurir en jours courts en 90 jours, suggérant un transport de la GA₄ des feuilles vers le méristème caulinaire végétatif (Eriksson et al., 2006). L'application de GA₃ et de GA₅ ont également permis à la plante de fleurir en jours courts, en 94 et 120 jours respectivement, ce qui n'est pas le cas suite à l'application de GA₁, GA₆ ou GA₈ (Eriksson et al., 2006).

Chez *Arabidopsis*, l'endoderme des racines régulant la croissance racinaire, est un tissu clé dans la réponse aux GA (Ubeda-Tomás et al., 2008 ; Heo et al., 2011 ; Zhang et al., 2011). Par exemple, un mutant de biosynthèse de GA présente une forte accumulation en protéines DELLA dans ce tissu racinaire, réprimant ainsi sa croissance (Ubeda-Tomás et al., 2008). A l'aide de GA bioactives fusionnées à la fluorescéine, des travaux récents démontrent que des racines traitées avec cette forme de l'hormone présentent une accumulation de fluorescence spécifique à l'endoderme (Shani et al., 2013) (figure 44). Les gènes de biosynthèse des GA étant particulièrement exprimés dans le méristème racinaire, cette étude suppose que les GA bioactives synthétisées dans cette zone sont ensuite mobilisées vers l'endoderme pour y réguler la croissance de la racine, sur le principe d'un transport de courte distance (Shani et al., 2013). De plus, une forte accumulation de fluorescence est observée dans les vacuoles des cellules de l'endoderme suggérant que ce compartiment joue un rôle tampon en stockant les GA bioactives et permettant de réguler la concentration intracellulaire de l'hormone dans le cytoplasme et le noyau ou elle interagit avec le récepteur (Shani et al., 2013) (figure 44). Un transport de cellule à cellule concernant les GA bioactives est donc potentiellement présent dans la racine, et la régulation d'un tel mécanisme laisse à penser que des transporteurs pourraient être impliqués dans ces processus.

1.6.2 Transport endogène des GA

Dans les expériences précédentes, le transport des GA est toujours observé en utilisant des applications exogènes de GA, à des concentrations le plus souvent élevées par rapport aux concentrations présentes dans la plante et avec des molécules modifiées, comme les formes radioactives ou fluorescentes. Il n'est par conséquent pas certain que les GA endogènes se comportent de la même façon, et d'autres approches permettent d'étudier ce transport sans des apports exogènes.

Le caractère non polaire du transport de GA, illustré par les expériences vues précédemment, indique que le xylème et le phloème peuvent jouer un rôle dans ce transport.

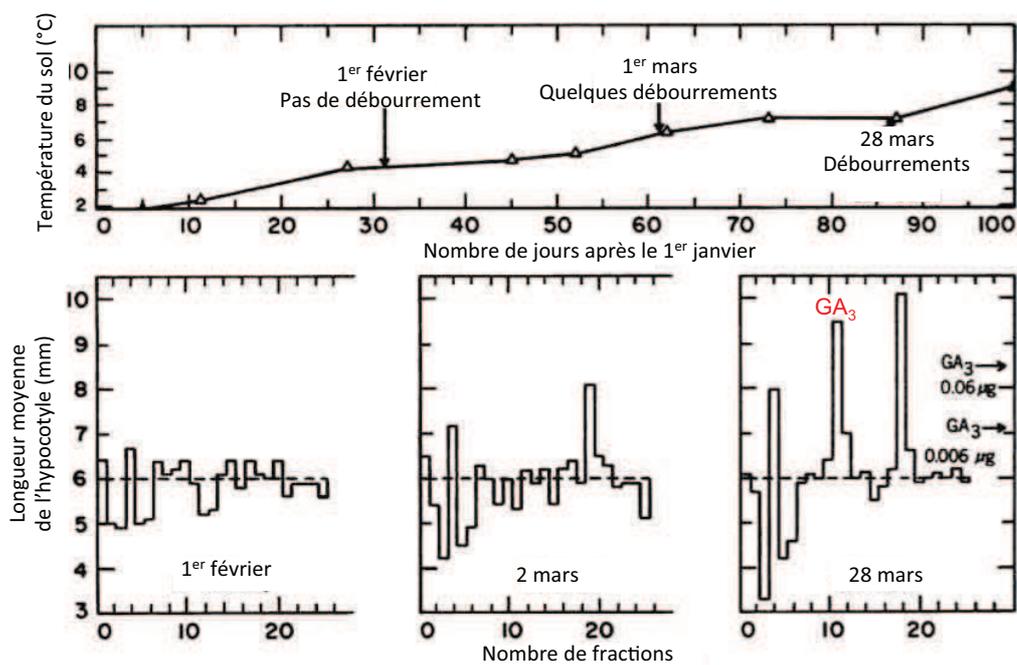


Figure 45 : La température du sol influe sur la concentration en GA₃ dans le xylème du pin Douglas
Trois exsudats de xylème sont récoltés à trois périodes différentes: 1^{er} février, 2 mars et 28 mars. Des GA sont retrouvées dans les fractions 1 (GA₄), 2 (GA₉), 5 (GA₇), 6 (GA₅), et 11 (GA₃). La concentration en GA₃ augmente en fonction de l'avancée de la saison et de la température du sol. (Lavender et al., 1973).

La sève xylémienne transporte principalement de l'eau et des nutriments du sol vers les parties aériennes. Le phloème contient des glucides issus de la photosynthèse, les transportant depuis les feuilles vers les autres organes de la plante. Des travaux sur le tournesol (*Helianthus annuus*) montrent qu'en prélevant de la sève ascendante par incision de la tige, et après purification de celle-ci, l'application du concentré sur des épicotyles de pois nains permet de restaurer leur croissance (Phillips et Jones, 1964). Ces résultats suggèrent que des GA sont produites dans les racines du tournesol, puis mobilisées par le xylème vers les parties aériennes. Des résultats identiques sont également obtenus avec du xylème de pois (*Pisum sativum*), de lupin (*Lupinus albus*) et de balsamine (*Impatiens glandulifera*) (Carr et al., 1964). Les exsudats récupérés dans ces expériences étaient riches en sels minéraux, acides aminés et composés organiques et aucun sucre n'y était détecté, une composition spécifique de la sève brute (xylémienne) (Carr et al., 1964). Chez la tomate, il était connu que la culture de plants dans un sol présentant un excès d'eau inhibait la croissance de la tige. Ainsi, de tels exsudats ont également été réalisés en présence ou non d'un excès d'eau au niveau des racines (Reid et al., 1969). Sans ce stress hydrique, des GA sont retrouvées dans la sève ascendante des plants, tandis qu'en présence du stress les quantités retrouvées sont drastiquement réduites. Les GA jouant un rôle prépondérant dans l'élongation de la tige, ce résultat démontre que la perte de croissance suite à un excès d'eau chez la tomate est la conséquence, au moins en partie, d'une baisse du transport de GA des racines vers les parties aériennes (Reid et al., 1969). Sur le même principe, un tel transport des racines vers les parties aériennes est également rapporté comme étant affecté selon la température du sol chez le pin Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) (Lavender et al., 1973). En effet chez cette espèce, l'activité des bourgeons est fortement réduite lorsque la température du sol est basse (5°C). L'application exogène de GA sur des plantules cultivées à 5°C élimine cette baisse d'activité, alors qu'à 20°C l'application n'a aucun effet sur le phénotype des plantules. En collectant des exsudats de xylème dans les plantes à différentes températures, les résultats démontrent une corrélation entre la concentration en GA retrouvées dans les exsudats et la température: plus celle-ci augmente, plus les quantités de GA₃ présentes sont importantes (Lavender et al., 1973) (figure 45). Ainsi, la température du sol joue un rôle majeur dans l'initiation des bourgeons du pin Douglas, en réduisant les quantités de GA transportées des racines vers les parties aériennes (Lavender et al., 1973).

Concernant le phloème, un premier travail y rapporte la présence de GA endogènes dans des exsudats de tubes criblés collectés dans des coupes au niveau de l'écorce de robinier (*Robinia pseudoacacia*) et de chêne (*Quercus robur*) (Kluge et al., 1964). L'utilisation de pucerons, qui se nourrissent de sève élaborée, déployés sur différentes espèces d'arbre, a

Identification de GA dans des exsudats de phloème
prélevés sur des plants de lupin 20 jours après anthèse

6-14	GA ₂₃
15-18	GA ₃ , GA ₁₈
19-22	GA ₈₂ , GA ₁₈
23-24	GA ₂₀
25-29	GA ₄₄ , GA ₁₉ , GA ₃₆ , GA ₇ , GA ₁₇
30-31	GA ₅₃ , GA ₄
32-35	GA ₉ , GA ₁₅ , GA ₂₄
36-40	GA ₁₂

Identification de GA dans des exsudats de phloème
prélevés sur des plants de ricin commun en floraison

HPLC fraction	Gibberellin
15-19	GA ₃ [*] , GA ₃₅ [*] , GA ₁ [*]
24-26	GA ₂₀
27-29	GA ₁₉ , GA ₅₁ [*]
33-36	GA ₉ , GA ₁₅ , GA ₂₄
37-40	GA ₁₂

* Weak GC-MS spectra.

Figure 46 : Composition en GA de deux exsudats de sève élaborée provenant du ricin et du lupin (d'après Hoad et al., 1993)

également permis de détecter des GA dans le phloème de pissenlits (*Taraxacum officinale*), de haricots (*Phaseolus vulgaris L.*) et de saules (*Salix*) (Hoad et Bowen, 1968). Une fois nourris, les pucerons sont recueillis et broyés afin d'y détecter par spectrométrie de masse des métabolites présents dans le phloème. De façon intéressante pour le saule, la concentration en GA retrouvée dans le phloème est dépendante de la durée du jour : en jours courts, la quantité de GA mesurée est plus faible qu'en jours longs (Hoad et Bowen, 1968).

Dans tous ces travaux, l'identification d'une ou plusieurs forme(s) précise(s) était difficile, due à la très faible concentration endogène des GA. Un essai radio-immunologique s'intéressant au phloème de différentes espèces d'arbres démontre toutefois la présence de GA₃ et de GA₇ bioactives, aux structures très proches, dans les exsudats (Weiler et Ziegler, 1981). Néanmoins, c'est finalement l'essor des techniques de spectrométrie de masse qui a permis d'analyser plus finement les teneurs en GA dans les différents tissus de la plante. Par GC-MS (Gas Chromatography – Mass Spectrometry), l'analyse d'exsudats de phloème provenant de lupins (*Lupinus*) et de haricots (*Phaseolus vulgaris L.*) montre qu'un spectre assez large de composés de type GA y sont détectés, représentant à la fois la voie des composés hydroxylée en C-13 (aboutissant à la formation de la GA₁) et la voie des composés non hydroxylée (aboutissant à la formation de la GA₄) (Hoad et al., 1993) (figure 46). Des formes conjuguées de GA ont également été retrouvées dans un grand nombre d'espèces, principalement avec le glucose et ceci laisse à penser un rôle potentiel de ces formes dans le transport de l'hormone (Schneider et Schliemann, 1994).

Les greffes constituent une approche différente des analyses des exsudats pour étudier le transport endogène des GA. Ainsi, des travaux réalisés en 1970 procèdent à la greffe de deux génotypes différents, l'un appartenant aux racines et l'autre aux parties végétatives. Il s'agit dans cette étude d'un pois sauvage de grande taille, et d'un pois nain. Lorsque les racines utilisées sont de génotype nain, et les parties aériennes de génotype sauvage, aucune différence n'est observée concernant la longueur de la tige. De même, lorsque des parties aériennes naines sont greffées sur des racines sauvages, la longueur de la tige reste courte, identique à la tige d'une plante naine (Lockard et Grunwald, 1970). Ces résultats suggèrent que les GA bioactives synthétisées dans la tige sont le facteur déterminant pour la croissance de celle-ci. Mais ce résultat n'exclut pas que des précurseurs venant de la racine soient transformés en formes bioactives dans la tige (Lockard et Grunwald, 1970). A l'inverse, toujours chez le pois, le mutant nain *na1*, dans lequel la conversion de l'acide ent-kaurénoïque en GA₁₂ est bloquée (équivalent au mutant *kao* chez *Arabidopsis*), voit sa croissance restaurée lorsqu'il est greffé sur un porte-greffe sauvage (Reid et al., 1983 ; Proebsting et al., 1992 ; Yaxley et al., 2001) (figure 47). Ce résultat suggère d'une part

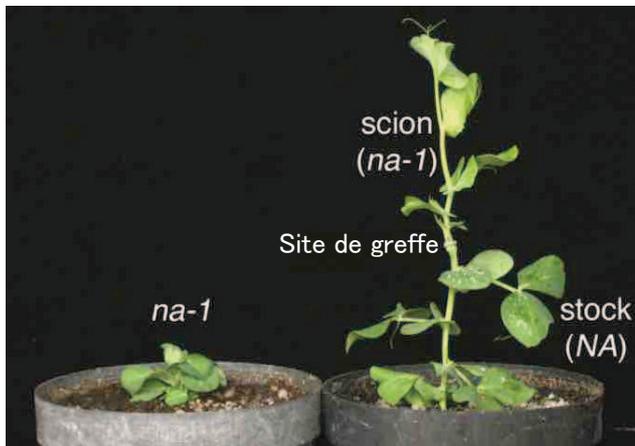


Figure 47 : Greffe chez le pois

Lorsqu'un mutant nain déficient en GA *na-1* (mutant de l'enzyme acide *ent*-kaurénoïque oxydase) est greffé sur un porte-greffe sauvage *NA*, le greffon se développe normalement. (d'après Reid et al., 1983).

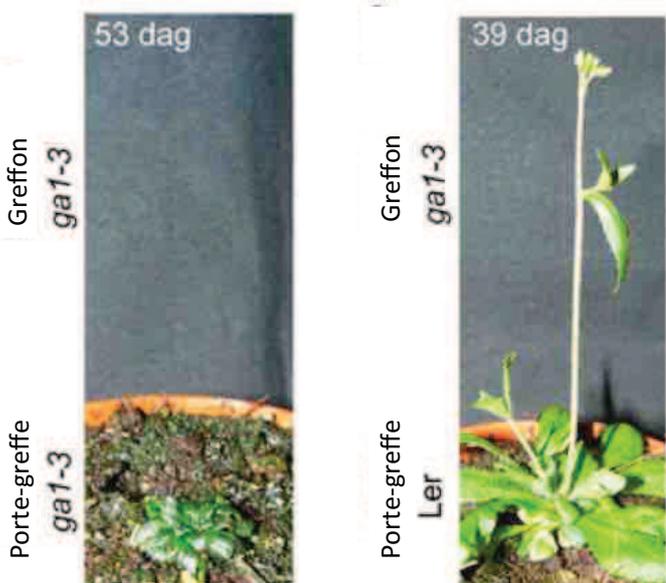


Figure 48 : Expériences de micro-greffes chez *Arabidopsis*

L'utilisation d'un porte-greffe sauvage (Ler) permet de restaurer la croissance d'un greffon *ga1-3* déficient dans la biosynthèse des GA, au contraire d'un porte-greffe de génotype *ga1-3* (Ragni et al., 2011). (dag = jours après germination)

qu'une forme de GA est transportée du porte-greffe vers le greffon et d'autre part que cette forme est localisée, dans la voie de biosynthèse, en aval de l'enzyme mutée chez le greffon. De telles greffes ont également été réalisées chez *Arabidopsis*, avec le mutant *ga1-3*. Une combinaison où Ler (sauvage) constitue le porte greffe et *ga1-3* le greffon a permis de restaurer la croissance du mutant *ga1-3* (figure 48 ; Ragni et al., 2011). Cette observation illustre une nouvelle fois que des GA endogènes sont transportées sur de longues distances dans la plante, de façon acropète.

A l'heure actuelle, les études concernant les GA s'orientent également vers l'identification d'un, ou plusieurs transporteurs de GA. La présence de GA dans les tissus conducteurs de nombreuses espèces suggère que des protéines sont potentiellement impliquées dans le chargement ou déchargement des GA dans ces tissus, constituant un niveau supplémentaire de régulation. Le fait qu'un transporteur n'ait jamais pu être identifié lors de cribles génétiques suppose la présence de plusieurs transporteurs à l'action redondante. Des tests d'imports de GA₁ et de GA₃ menés sur des cultures cellulaires d'épinard (*Spinacia oleracea*) suggèrent que si de la diffusion est possible pour ces GA bioactives, toutefois, l'import peut être saturé par un composant de type transporteur ayant pour substrat ces mêmes GA (Nour et Rubery, 1984). L'auxine, les cytokinines et l'ABA mis en compétition avec la GA₁ n'altèrent pas son transport, optimal à pH4 et non détectable à pH7 (Nour et Rubery, 1984). Plus récemment, une étude a démontré par une approche d'expression hétérologue en levure que ABA-IMPORTING TRANSPORTER 3 (AIT3), un transporteur d'ABA appartenant à la famille des transporteurs de nitrate NRT1/PTR, pouvait également transporter la GA₃ (Kanno et al., 2012). Enfin, les travaux de Shani, qui illustrent un éventuel transport de cellule à cellule de GA bioactives dans la racine, suggèrent également l'implication d'un ou plusieurs transporteurs de GA dans ce mécanisme (Shani et al., 2013).

1. 7 Objectifs de la thèse

Des études pionnières réalisées au 19^{ème} siècle par Julius Von Sachs et Charles Darwin ont démontré que les mécanismes de régulation de la croissance des végétaux étaient régis par des “substances” qui se déplacent d’une partie de la plante à une autre. Plus d’un siècle après, nous savons que ces substances en question sont de petites molécules appelées phytohormones provenant de diverses voies métaboliques essentielles.

A l’instar des autres phytohormones, les GA sont essentielles pour de nombreux processus du développement comme la germination de la graine, l’allongement de la tige, l’expansion des feuilles, la maturation du pollen et l’induction de la floraison (Achard et Genschik, 2009). Comme nous l’avons vu dans l’introduction, les mutants de biosynthèse des GA sont nains et observent un retard de floraison, tandis qu’un excès de GA cause une croissance excessive et la stérilité. Il est donc important que les plantes produisent et maintiennent un niveau optimal de GA pour assurer une croissance et un développement normal. Pour cela la plante a mis en place une régulation fine de la biosynthèse et du catabolisme de l’hormone, qui est désormais bien caractérisée chez de nombreuses espèces végétales.

Néanmoins, un niveau supplémentaire de régulation peut reposer sur le transport de l’hormone, de nombreuses études évoquant une mobilité des GA chez les plantes. Il devient clair que les GA sont l’un des principaux régulateurs de la croissance et du développement des plantes, et que ces dernières ne sont généralement synthétisées que dans certains organes ou tissus. De plus, une séparation spatiale entre les étapes précoces et les étapes tardives de la biosynthèse est observée à certains stades (Yamaguchi et al., 2001). Cependant, le mécanisme assurant le transport des GA depuis leur lieu de synthèse vers leur lieu d’action reste à élucider. Le but principal de ma thèse est la caractérisation de ce transport en utilisant la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Afin d’étudier ce transport, je me suis intéressé à trois questions biologiques majeures :

- Quelle(s) forme(s) de GA est/sont mobile(s) chez *Arabidopsis* ?
- Quel est le mécanisme impliqué dans le transport de cette/ces forme(s) ?
- Quels sont les lieux de production de cette/ces forme(s) transportée(s) ?

Alors que le transport d’une autre phytohormone, l’auxine, est reconnu et bien caractérisé depuis une dizaine d’année, mon projet de thèse a pour but de faire la lumière sur les bases moléculaires assurant le transport des GA sur de longues distances chez les plantes.

Résultats

Chapitre 1 : Mise en évidence d'un transport de GA chez *Arabidopsis*

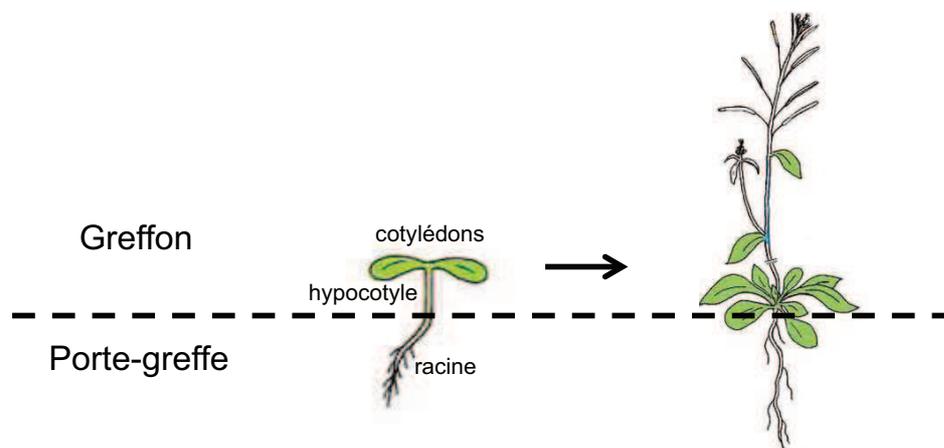


Figure 49 : Nomenclature des greffes utilisées dans la thèse

Les micro-greffes sont réalisées sur des plantules d'*Arabidopsis* âgées de 7 jours au niveau de leurs hypocotyles. Après une semaine en chambre de culture (16h lumière /8h obscurité (22°C), et une intensité lumineuse de $90 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, les plantes greffées sont transférées en terre. Les racines forment alors le porte-greffe et la rosette (et toutes les parties aériennes qui en découlent) le greffon. La nomenclature utilisée dans la thèse sera la suivante : porte-greffe / greffon.

Chapitre 1 : Mise en évidence d'un transport de GA chez *Arabidopsis*

1. 1 Introduction

Différentes stratégies peuvent être utilisées pour identifier un transport de métabolites *in planta*. Par exemple, l'application de formes exogènes radioactives ou fluorescentes permet de suivre la mobilité d'une molécule donnée à travers la plante. Ces approches, bien qu'informatives, ont l'inconvénient de s'éloigner du mécanisme endogène. En effet, ce que l'on observe est un mouvement d'une molécule modifiée, pas forcément appliquée sur son site exact de production et le plus souvent à des concentrations très importantes. La greffe constitue une bonne alternative à ces stratégies, permettant d'étudier un transport dans des conditions plus naturelles.

La greffe représente une méthode simple pour générer des plantes chimères possédant des organes et tissus composés de génotypes différents, et permet ainsi d'étudier facilement des mécanismes tels que la floraison, la ramification des parties aériennes, la résistance aux stress, ou encore le transport d'hormones. L'exemple des expériences sur le pois l'illustre parfaitement : la greffe du mutant nain de biosynthèse de GA *na1* sur un porte-greffe sauvage permet de rétablir la croissance du greffon, démontrant l'existence d'un transport de GA sur de longues distances (Reid et al., 1983 ; Proebsting et al., 1992). Toutefois, cette technique ne permet pas de visualiser un transport sur de très courtes distances, comme d'une cellule à une autre. Si la greffe est largement utilisée avec de nombreuses espèces végétales, elle reste limitée chez *Arabidopsis thaliana*, conséquence de la petite taille de la plante. Cependant certaines méthodes de greffe fonctionnent parfaitement, et les jeunes plantules d'*Arabidopsis* constituent généralement dans ces protocoles un excellent support. C'est le cas des micro-greffes où la racine forme le porte-greffe et les parties aériennes de la plantule, le greffon. La zone de greffe se situe au niveau de l'hypocotyle (figure 49).

Le premier objectif de ma thèse est d'étudier le transport de GA sur de longues distances chez la plante modèle *Arabidopsis* par des expériences utilisant la technique des micro-greffes. Pour valider cette stratégie, les parties aériennes ou les racines de plantes sauvages d'éco-type Columbia (Col-0) sont utilisées comme tissus donneurs de GA, et les tissus receveurs de GA sont issus de plantes naines déficientes pour la biosynthèse de GA. Ainsi, si des GA sont mobiles et stimulent la croissance sur de longues distances, le phénotype sauvage des tissus receveurs de GA doit être restauré. Le challenge de ce premier objectif sera d'identifier quelle(s) GA intermédiaire(s) ou bioactive(s) est/sont mobile(s), grâce à différentes combinaisons de greffes avec des mutants impliqués dans chacune des étapes

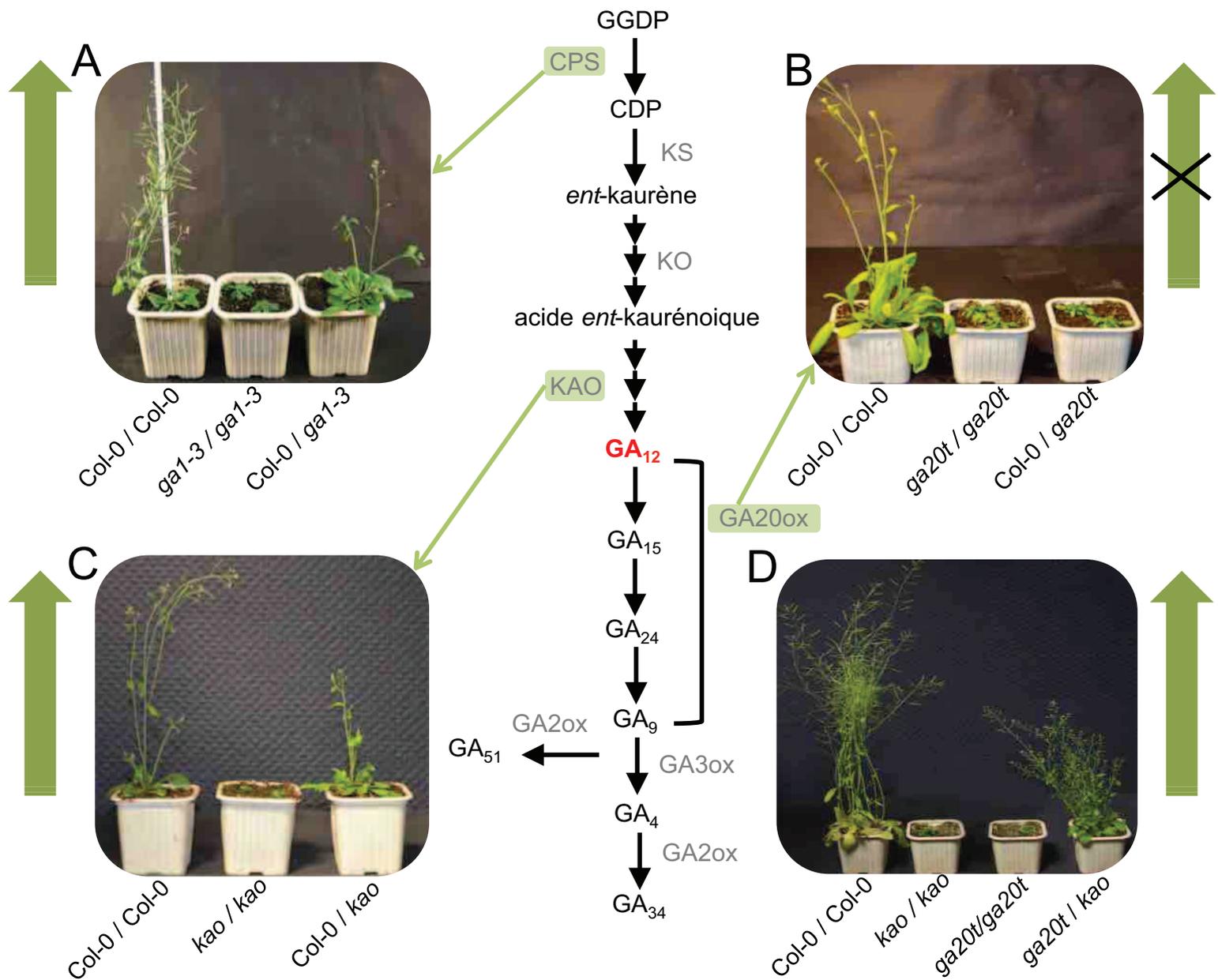


Figure 50 : Mise en évidence par micro-greffes d'un transport acropète de GA₁₂ chez *Arabidopsis*

Les photographies illustrent la croissance de plantes représentatives de différentes combinaisons de greffes. Les greffes sont réalisées sur des plantules âgées de 7 jours, puis repiquées en terre (16h de lumière à 90 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ / 8h d'obscurité ; 22°C). Les photographies sont prises 5 (A, B et C) et 7 (D) semaines après repiquage. Les paramètres phénotypiques mesurés sont représentés en tableau 1.

Le porte-greffe sauvage (Col-0) rétablit la croissance des greffons de génotype *ga1-3* et *kao* (A et C) mais pas ceux de génotype *ga20t* (B), démontrant l'existence d'un transport acropète de GA₁₂. Ces résultats sont confirmés par le phénotype d'une combinaison *ga20t* / *kao* (D). *kao* = *kao1 kao2* ; *ga20t* = *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3*.

de la voie de biosynthèse des GA. D'autre part, il s'agira de comprendre comment ce transport agit sur la croissance de la partie altérée dans la synthèse de l'hormone. Enfin, un autre aspect intéressant sera de déterminer s'il existe une transmission de GA à la descendance, au cours des générations. Associées à ces expériences de micro-greffe, une validation génétique de ce transport ainsi que des quantifications de GA par GC- et LC-MS seront effectuées sur les différents matériels générés.

Tout au long de la thèse, la nomenclature utilisée pour les combinaisons de greffes sera la suivante : le premier génotype énoncé représente le porte-greffe, le second génotype représente le greffon (figure 49). Par exemple, une greffe Col-0 / *ga1-3* signifie que le porte-greffe est constitué de racines sauvages (Col-0), alors que les parties aériennes sont issues du mutant de biosynthèse de GA (*ga1-3*).

1. 2 Résultats

1.2.1 La GA₁₂ est transportée sur de longues distances chez *Arabidopsis*

1.2.1.1 Etude d'un transport acropète de GA

Dans le but de mettre en évidence le transport longue distance de GA chez *Arabidopsis*, j'ai effectué différentes combinaisons de micro-greffes en utilisant des mutants de production de GA altérés pour chacune des étapes de la synthèse. Afin d'identifier la ou les GA transportée(s), différents paramètres phénotypiques contrôlés par les GA ont été mesurés comme la hauteur finale de la plante, la taille du diamètre de la rosette (à 44 jours), et le temps de floraison en jours longs (représenté par le nombre de feuilles lors de l'induction florale).

La première combinaison testée est une greffe entre les génotypes Col-0 et *ga1-3*, dont le greffon correspond au mutant de la première enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse des GA (la *ent-copalyl* diphosphate synthase ou CPS, figure 50 ; tableau 1). Au contraire des plantes greffées *ga1-3* / *ga1-3* qui montrent un sévère nanisme et un retard de floraison caractéristiques des mutants de biosynthèse de GA, les plantes greffées Col-0 / *ga1-3* sont significativement plus grandes et fleurissent plus tôt. En effet, les plantes greffées Col-0 / *ga1-3* présentent un diamètre moyen au stade rosette de 12 cm, un nombre de feuilles lors de l'induction de la floraison de 18,9 et une hauteur finale de 29,5 cm. Ce résultat confirme qu'une forme de GA (soit un intermédiaire de biosynthèse ou une forme active) est transporté *in planta*, depuis les racines vers les parties aériennes de la plante. Par ailleurs,

Tableau 1. Paramètres phénotypiques des plantes greffées pour les combinaisons indiquées. Les mesures représentent la moyenne \pm l'erreur standard (n=25). Le diamètre de la rosette a été mesuré sur des plantes âgées de 44 jours. Le nombre de feuilles a été déterminé après la floraison.

Greffes	Diamètre de la rosette (cm)	Nombre de feuilles rosettes	Hauteur finale (cm)
Col-0 / Col-0	14.55 \pm 0.35	20.30 \pm 0.49	58.67 \pm 0.84
<i>ga1-3</i> / <i>ga1-3</i>	3.81 \pm 0.32	38.64 \pm 0.95	0.95 \pm 0.04
<i>kao1 kao2</i> / <i>kao1 kao2</i>	2.57 \pm 0.17	33.86 \pm 0.91	0.63 \pm 0.80
<i>ga20t</i> / <i>ga20t</i>	3.50 \pm 0.26	35.57 \pm 0.90	0.94 \pm 0.10
Col-0 / <i>ga1-3</i>	12.01 \pm 0.31	18.88 \pm 0.33	29.50 \pm 0.64
Col-0 / <i>kao1 kao2</i>	11.46 \pm 0.44	18.42 \pm 0.61	25.07 \pm 0.73
Col-0 / <i>ga20t</i>	3.41 \pm 0.17	32.67 \pm 0.52	3.21 \pm 0.21
<i>ga20t</i> / <i>kao1 kao2</i>	7.14 \pm 0.26	20.09 \pm 0.62	16.43 \pm 0.69

ga20t = *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3*

ce résultat indique que la forme transportée n'est pas le GGPP, le substrat de la CPS. En effet, si le GGPP était transporté dans le greffon muté pour la CPS, ce dernier ne pourrait être converti en *ent*-copalyl diphosphate puis en GA₄ et ainsi rétablir une croissance normale de la plante. Il est intéressant de noter cependant que les caractéristiques phénotypiques des plantes greffées Col-0 / *ga1-3* sont inférieures à celles des plantes Col-0 / Col-0, indiquant que ce transport de GA n'est pas optimal ou que la greffe elle-même altère l'efficacité de ce transport (tableau 1).

La deuxième combinaison étudiée est une greffe entre les génotypes Col-0 et *kao1 kao2*, mutant de l'enzyme qui catalyse la conversion de l'acide *ent*-kaurénoïque en GA₁₂ (figure 50 ; tableau 1). Ces plantes greffées ont un diamètre moyen au stade rosette de 11,5 cm, un nombre moyen de feuilles lors de l'induction de la floraison de 18,4, et une hauteur finale de 25,1 cm. Ces plantes sont statistiquement différentes des plantes greffées *kao1 kao2 / kao1 kao2*, dont le diamètre moyen de la rosette est de 2,6 cm, un nombre moyen de feuilles au moment de l'induction florale de 33,9, et une hauteur finale de 0,6 cm. Toutefois, là aussi, la croissance des plantes Col-0 / *kao1 kao2* est significativement différente (plantes plus petites, retard de floraison) par rapport aux plantes contrôles Col-0 / Col-0. La forme transportée est par conséquent située en aval de l'action de l'enzyme KAO.

Afin de réduire le champ d'investigation, une troisième combinaison a été testée, entre les génotypes Col-0 et *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3*. Pour cette combinaison, le greffon est muté pour l'enzyme GA20-oxydase, avant-dernière étape de la synthèse de GA₄ (figure 50 ; tableau 1). Les plantes Col-0 / *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3* présentent un diamètre rosette de 3,4 cm, un nombre de feuilles à l'induction florale de 32,7 et une hauteur finale de 3,2 cm. Ces paramètres phénotypiques ne sont pas statistiquement différents de ceux du mutant greffé *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3 / ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3*, dont le diamètre rosette est de 3,5 cm, avec en moyenne 35,6 feuilles à l'induction florale et une hauteur finale de 0,9 cm.

Pris dans leur ensemble, ces résultats indiquent que la molécule transportée depuis les racines vers les parties aériennes est un intermédiaire de biosynthèse produit entre l'action de la KAO et de la GA20-oxydase, soit la GA₁₂ (figure 50). Cependant, étant donné que la GA20-oxydase catalyse la conversion de la GA₁₂ en GA₉ en trois étapes successives (figure 16), il est possible que la GA₁₅ et/ou la GA₂₄ soient également transportées.

Afin de valider, toujours par la stratégie de greffes, que la GA₁₂ est bien la molécule transportée sur de longues distances, une dernière greffe a été réalisée entre les mutants *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3* et *kao1 kao2* (figure 50 ; tableau 1). Pour cette combinaison de greffe, le porte-greffe est muté pour l'enzyme GA20-oxydase et le greffon est muté pour

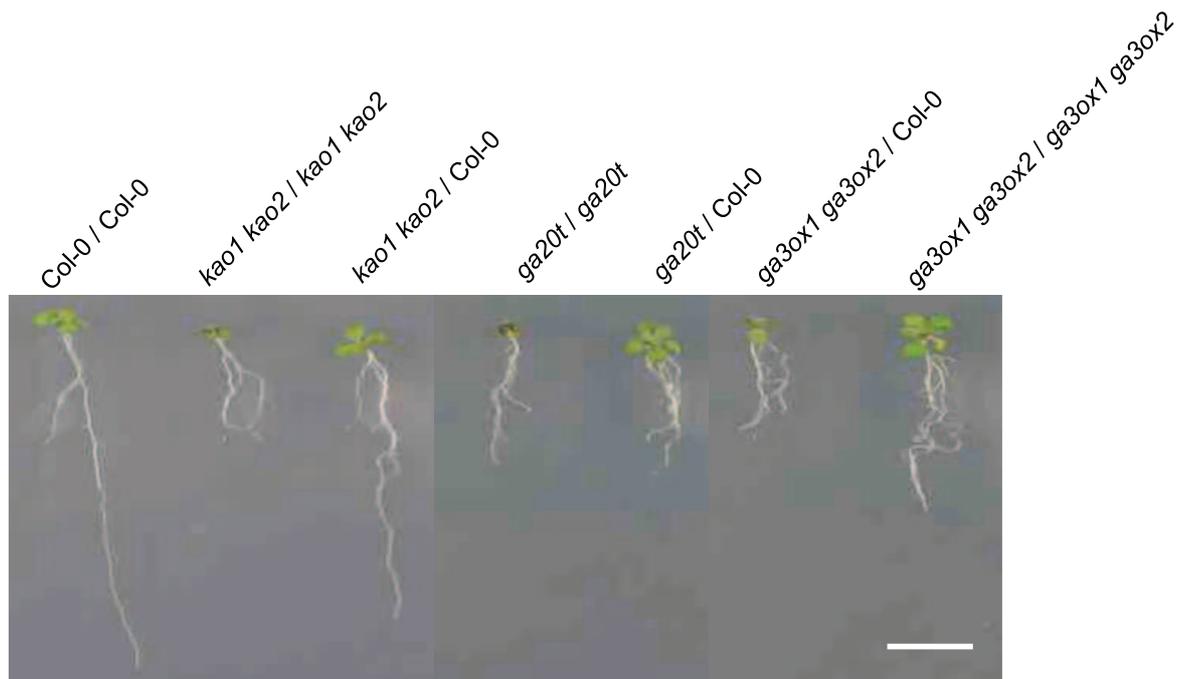


Figure 51 : Mise en évidence par micro-greffes d'un transport basipète de GA_{12} chez *Arabidopsis*

La photographie illustre la croissance de plantes représentatives de différents génotypes 7 jours après la greffe (16h de lumière à $90 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ / 8h d'obscurité ; 22°C). La longueur moyenne des racines est indiquée en tableau 2. Le greffon (Col-0) rétablit fortement la croissance des racines (porte-greffe) de génotype *kao*. *ga20t* = *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3*. (barre d'échelle = 1cm)

Tableau 2. Paramètres phénotypiques concernant les différentes combinaisons de greffes utilisées pour l'étude du transport basipète de GA. Les plantes sont âgées de 15 jours. Les mesures représentent la longueur totale moyenne de la racine \pm l'erreur standard (n=15).

Greffes	Longueur racine (mm)
Col-0 / Col-0	3.68 ± 0.2
<i>kao1 kao2</i> / <i>kao1 kao2</i>	1.34 ± 0.1
<i>ga20ox1-2-3</i> / <i>ga20ox1-2-3</i>	2.09 ± 0.1
<i>ga3ox1 ga3ox2</i> / <i>ga3ox1 ga3ox2</i>	2.70 ± 0.2
<i>kao1 kao2</i> / Col-0	2.69 ± 0.2
<i>ga20ox1-2-3</i> / Col-0	2.56 ± 0.2
<i>ga3ox1 ga3ox2</i> / Col-0	2.78 ± 0.2

l'enzyme KAO. Ainsi, les racines de ces plantes greffées produisent de la GA₁₂ (mais ne peuvent la convertir en GA₁₅) au contraire du greffon qui est incapable de produire de la GA₁₂, mais qui exprime toutes les enzymes nécessaires pour catalyser la conversion de la GA₁₂ en GA₄. Alors que ces deux mutants sont nains séparément, leur combinaison chez la plante greffée *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3 / kao1 kao2* permet de récapituler la synthèse de GA et la croissance des parties aériennes. Les plantes *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3 / kao1 kao2* ont un diamètre rosette de 7,1 cm, 20 feuilles en moyenne au moment de l'induction florale, et une hauteur finale de 16,4 cm. Cette dernière combinaison appuie les observations précédentes, à savoir que la GA₁₂ est transportée chez *Arabidopsis* des racines vers les parties aériennes.

1.2.1.2 Etude d'un transport basipète de GA

Pour étudier le transport basipète de GA, c'est à dire des parties aériennes vers les racines, de nouvelles greffes ont été réalisées, dans le sens contraire du paragraphe précédent. Pour cette étude, les parties aériennes de la plante (le greffon) sont les tissus donneurs de GA, et les racines déficientes en GA (le porte-greffe), les tissus receveurs.

Les GA sont essentielles à la croissance de la racine (Fu et al., 2004). En effet, les mutants de biosynthèses de GA ont une racine plus courte que celles de plantes sauvages. En accord avec la littérature, les racines de plantes greffées *kao1 kao2 / kao1 kao2* ont une longueur de racine à 15 jours plus courte que celles de plantes greffées contrôle Col-0 / Col-0 (1,3 et 3,7 cm, respectivement ; figure 51 ; tableau 2). Donc la longueur de la racine est un bon indicateur de la présence ou pas de GA bioactives dans la racine.

Afin de déterminer si la GA₁₂ était également transportée des feuilles vers les racines, des greffes entre mutant *kao1 kao2* et Col-0 ont été effectuées. Ces plantules ont une racine d'une longueur moyenne de 2,7 cm, soit une augmentation de 100% par rapport aux racines issues de plantules *kao1 kao2 / kao1 kao2* (figure 51, tableau 2). Cette différence confirme l'existence d'un transport basipète de GA₁₂ chez *Arabidopsis*.

Afin de valider ce résultat et d'étudier si d'autres GA intermédiaires peuvent également être transportés, les mutants des enzymes GA20-oxydase et GA3-oxydase (qui catalyse la conversion de la GA₉ en GA₄ bioactive) ont été testés par micro-greffes. Les plantules *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3 / ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3* présentent également une racine plus courte (une longueur moyenne de 2,1 cm) comparée à celles de greffes contrôles Col-0 / Col-0. De manière intéressante, la longueur moyenne des racines des plantules greffées *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3 / Col-0* est plus grande de 22% par rapport aux racines des

Tableau 3. Concentrations en GA (en ng par g de matière sèche) dans différents greffons au stade rosette (30 jours). Les mesures représentent la moyenne de deux à trois réplicats biologiques \pm l'erreur standard (n.d = non déterminé, la concentration étant trop faible pour être détectée).

(a) La GA₁₂ transportée depuis les racines est retrouvée dans le greffon d'une combinaison Col-0 / *ga1-3* :

Greffes	GA ₁₂	GA ₁₅	GA ₂₄	GA ₉	GA ₄	GA ₅₃	GA ₁
Col-0 / Col-0	34.70 \pm 1.60	7.03 \pm 0.21	29.68 \pm 1.79	0.68 \pm 0.19	1.56 \pm 0.17	3.55 \pm 0.35	0.39 \pm 0.03
<i>ga1-3</i> / <i>ga1-3</i>	0.85 \pm 0.07	0.04 \pm 0.03	0.05 \pm 0.06	n.d	0.02 \pm 0.03	0.32 \pm 0.01	0.14 \pm 0.01
Col-0 / <i>ga1-3</i>	15.05 \pm 1.72	1.91 \pm 0.11	8.58 \pm 1.30	0.12 \pm 0	0.51 \pm 0.08	1.28 \pm 0.14	0.37 \pm 0

(b) La GA₂₄ est également transportée du porte-greffe au greffon :

Greffes	GA ₁₂	GA ₁₅	GA ₂₄
Col-0 / <i>ga20ox1-2-3</i>	65.30 \pm 1.79	n.d	1.93 \pm 0.02
<i>ga20ox1-2-3</i> / <i>ga20ox1-2-3</i>	71.05 \pm 4.90	n.d	0.86 \pm 0.12

plantules greffées *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3 / ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3*, mais restent significativement beaucoup plus courtes que celles du contrôle (tableau 2). Ce résultat suggère que la GA₉ pourrait également être mobilisée des feuilles aux racines, mais probablement dans des quantités moindres par rapport à la GA₁₂; la récupération de croissance racinaire étant plus faible qu'avec la combinaison *kao1 kao2 / Col-0*.

Enfin concernant les plantules greffées *ga3ox1 ga3ox2 / Col-0*, nous n'observons qu'une très légère augmentation de 2,9 % de la longueur moyenne de la racine par rapport aux plantules *ga3ox1 ga3ox2 / ga3ox1 ga3ox2*. Si cette augmentation est significativement différente, elle reste cependant négligeable comparée à celle obtenue avec la combinaison *kao1 kao2 / Col-0*.

1.2.1.3 Validation biochimique du transport de GA₁₂

Dans l'optique de confirmer les résultats obtenus par micro-greffes, des dosages de GA par spectrométrie de masse GC-MS ont été réalisés sur les différentes combinaisons de greffes en collaboration avec le groupe de Peter Hedden (Rothamsted Research, Harpenden, UK). Les analyses ont à chaque fois été réalisées par extraction et purification des GA sur le greffon uniquement.

Ainsi pour les greffes Col-0 / *ga1-3*, la présence de GA₁₂, GA₁₅ et GA₂₄ mais aussi de GA₄ bioactive est détectée dans des quantités plus importantes que chez le mutant *ga1-3* (tableau 3a). Concernant la GA₁₂, les concentrations sont 17 fois plus élevées dans le greffon d'une combinaison Col-0 / *ga1-3* par rapport au mutant, avec 15,05 ng/g MS (matière sèche) et 0,85 ng/g MS respectivement. Le greffon d'une combinaison Col-0 / Col-0 contient environ 2 fois plus de GA₁₂ que celui d'une combinaison Col-0 / *ga1-3* avec 34,70 ng/g MS. Si le mutant *ga1-3* nain, ne contient pas de GA₄ bioactive, le greffon d'une combinaison Col-0 / *ga1-3* en contient 0,51 ng/g MS expliquant le rétablissement de la croissance. Cette concentration est toutefois plus faible par rapport à des greffes Col-0 / Col-0 où la concentration est de 1,56 ng/g MS.

Concernant la GA₁, une autre forme de GA bioactives, les concentrations retrouvées à la fois dans les greffons de plantes Col-0 / Col-0 et Col-0 / *ga1-3* sont identiques et relativement faibles en comparaison aux niveaux détectés de GA₄. Ce résultat confirme que l'étape d'hydroxylation en C-13, fréquente chez les monocotylédones comme le riz, est plutôt rare chez *Arabidopsis* qui favorise la voie de production de la GA₄ (Sponsel, 2010).

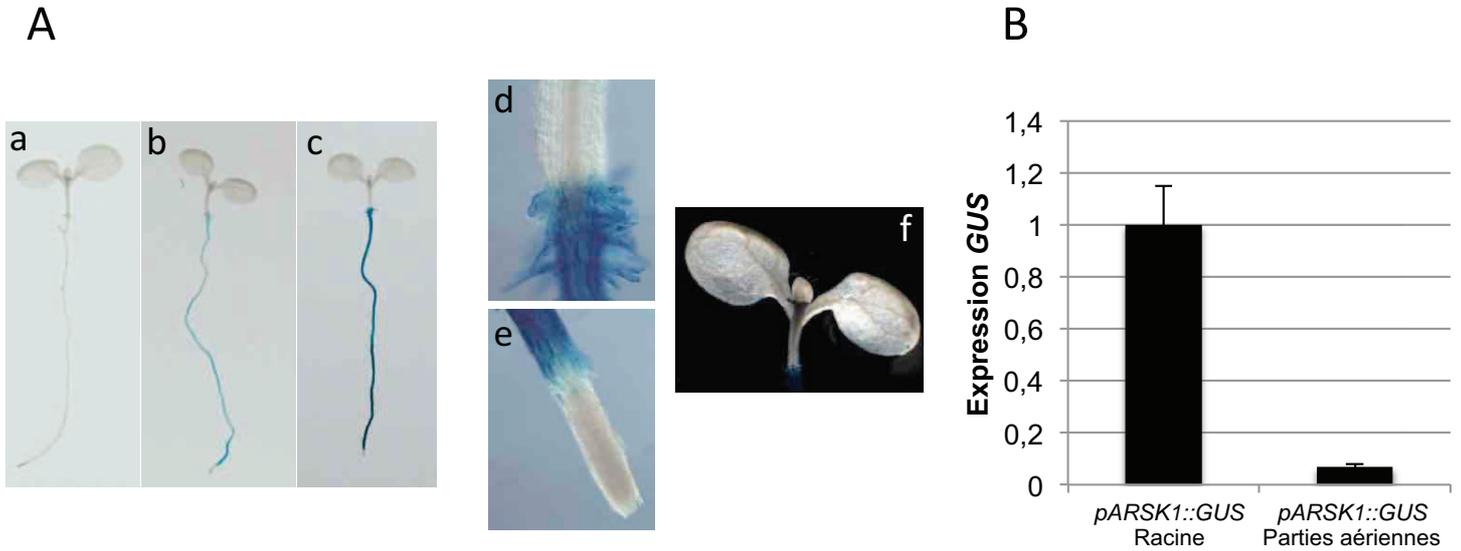


Figure 52 : le promoteur du gène codant la kinase ARSK1 est spécifique à la racine

(A) Coloration GUS de plantules d'*Arabidopsis* sauvages (a, Col-0) et *pARSK1::GUS* (b-f) âgées de 7 jours. a = Col-0, b = coloration GUS 2h; c = coloration GUS 4h; d = interface hypocotyle (haut) / racine (bas); e = pointe racinaire; f = parties aériennes. **(B)** Analyse par RT-qPCR de l'expression du gène rapporteur *GUS* dirigé par le promoteur du gène *ARSK1* dans la racine et les parties aériennes de plantules *pARSK1::GUS* âgées de 7 jours. La normalisation est faite sur les gènes de référence *EXP* et *TIP41-like* et le niveau d'expression est arbitrairement fixé à 1 pour l'expression dans la racine. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard, et le même résultat a été obtenu dans trois expériences indépendantes.

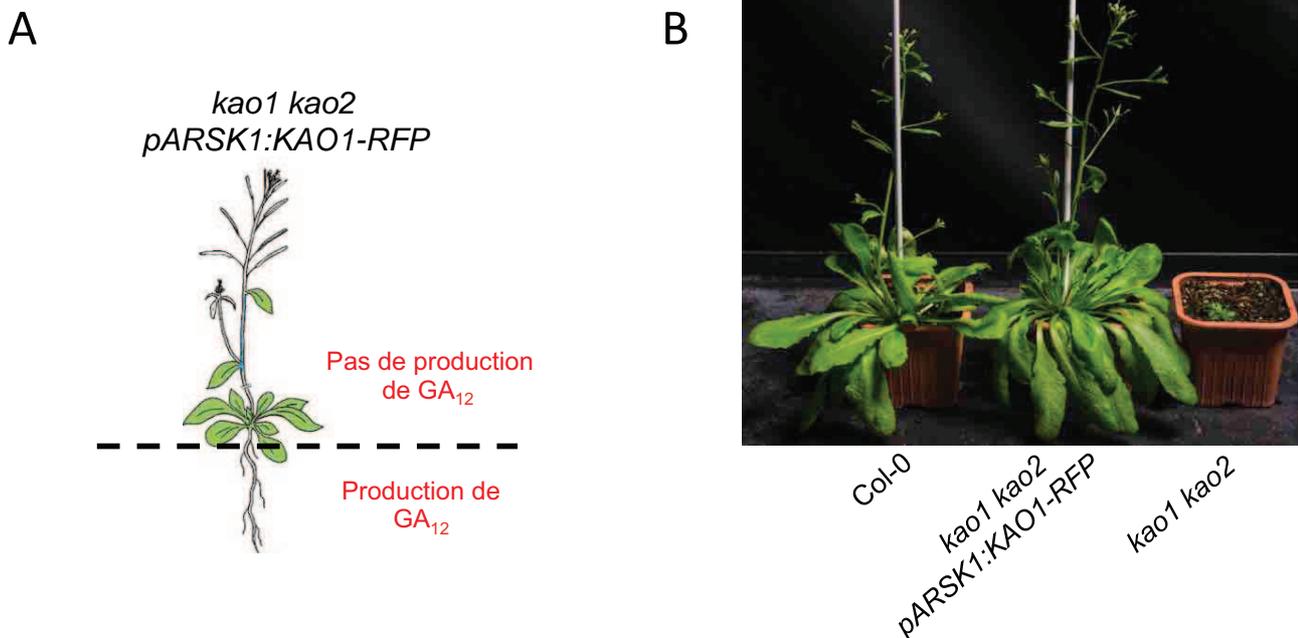


Figure 53 : Validation génétique du transport de la GA_{12} chez *Arabidopsis*

(A) La construction *pARSK1:KAO1-RFP* est introduite chez le mutant *kao1 kao2*. Le gène *KAO1* s'exprime uniquement dans les parties racinaires et restaure la production de GA_{12} . **(B)** Phénotypes représentatifs d'une plante sauvage Col-0 (à gauche), du mutant *kao1 kao2* complémenté avec la construction *pARSK1:KAO1-RFP* (au milieu), et du mutant *kao1 kao2* (à droite). Les plantes sont âgées de 35 jours.

Un deuxième dosage a été effectué afin de discriminer si la GA₁₂ était la seule GA mobile ou si la GA₁₅ et/ou GA₂₄ étaient également transportées (voir paragraphes précédents) (tableau 3b). En effet, la GA20ox catalyse trois étapes dans la voie de biosynthèse. Par conséquent, nous avons dosé la quantité de GA₁₂, GA₁₅ et GA₂₄ dans le greffon de plantes Col-0 / *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3* par rapport au triple mutant *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3*. Nous détectons en très grande quantité la GA₁₂, avec 65,30 ng/g MS dans la greffe Col-0 / *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3* et 71,05 ng/g MS dans le mutant *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3*. Concernant la GA₂₄, sa concentration dans les deux combinaisons est relativement faible comparée à celle de la GA₁₂. On remarque cependant que la concentration de GA₂₄ est 2 fois plus élevée dans les greffons de plantes Col-0 / *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3* (1,93 ng/g MS) que chez le mutant *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3* (1,93 ng/g MS). Enfin, chez ces deux plantes, la GA₁₅ n'a pu être détectée, signe d'une conversion rapide de cette forme en GA₂₄ *in planta*.

L'ensemble de ces résultats confirme la mobilité de la GA₁₂, depuis les racines vers les parties aériennes. Dans le greffon mutant, la GA₁₂ est alors convertie en GA₄ bioactive par les GA20ox et les GA3ox, où elle stimule la croissance de la plante. Ces données suggèrent également que la GA₂₄ est aussi transportée sur de longues distances, mais dans des proportions plus faibles que la GA₁₂.

1.2.1.4 Confirmation génétique du transport de GA₁₂

Une stratégie complémentaire aux micro-greffes a été menée afin de valider génétiquement le transport de GA₁₂ sur de longues distances. Cette stratégie consiste à introgresser chez une plante mutée pour l'enzyme KAO (enzyme produisant la GA₁₂) une construction exprimant le gène *KAO1* uniquement dans la racine, grâce à l'utilisation d'un promoteur de gène qui est actif uniquement dans cet organe. Nous imaginons par ce moyen « mimer » génétiquement une greffe Col-0 / *kao1 kao2*, où la GA₁₂ serait produite uniquement dans les racines, et ainsi compléter le double mutant *kao1 kao2* avec une restauration complète ou partielle de la croissance des parties aériennes.

La recherche d'un tel promoteur dans la littérature nous a amené à nous intéresser au gène *ARSK1* (*Arabidopsis root-specific kinase 1*), qui exprime dans la racine une protéine possédant des similarités structurales aux sérine/thréonine kinases (Hwang et Goodman, 1995). Afin de valider la spécificité « racinaire » du promoteur du gène *ARSK1*, des lignées *pARSK1::GUS* ont été obtenues et le profil d'expression GUS déterminé grâce à des tests histochimiques. Chez des plantules âgées de 7 jours, la coloration GUS est restreinte à la racine ; aucune coloration GUS n'est détectable dans les parties aériennes (figure 52). Ce

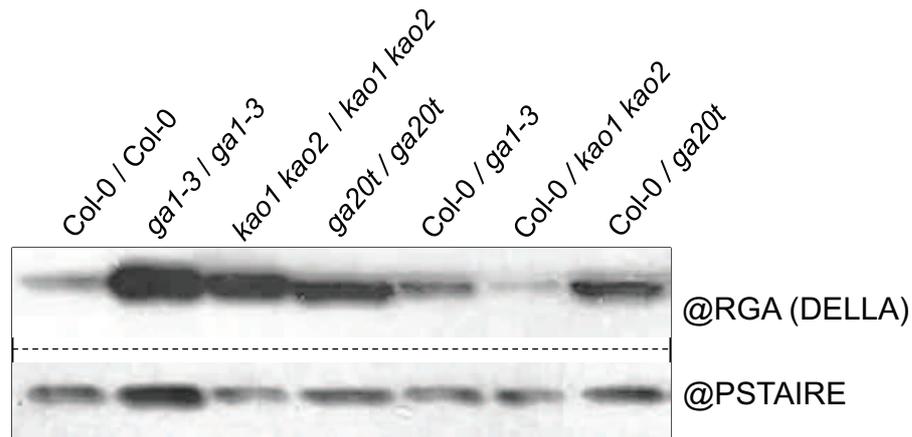
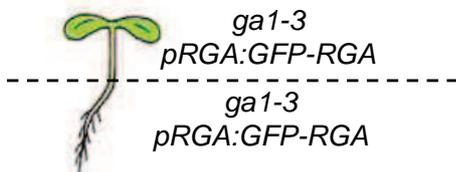


Figure 54 : Les protéines DELLA sont dégradées dans les tissus receveurs de GA_{12}

Immunodétection de la protéine DELLA RGA dans les greffons issus de différentes combinaisons de plantes greffées âgées de 30 jours, comme indiqué. L'anticorps dirigé contre le motif PSTAIRE sert de contrôle de charge. Des résultats similaires ont été obtenus dans trois expériences indépendantes. *ga20t* = *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3*.

Combinaison 1 :



Combinaison 2 :

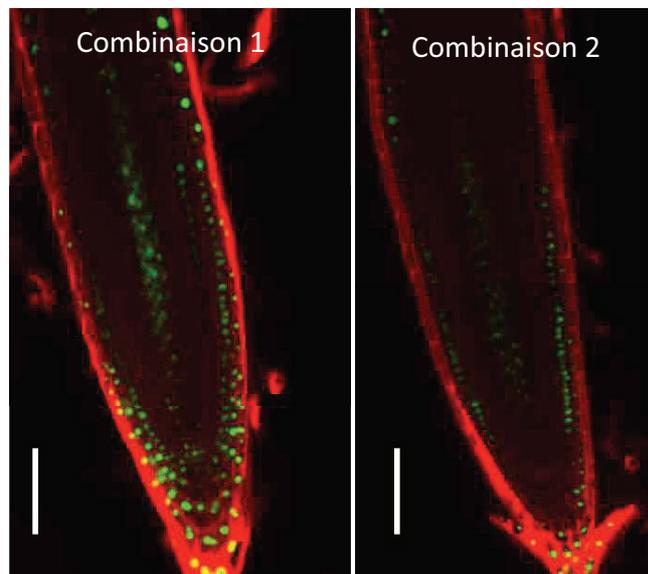
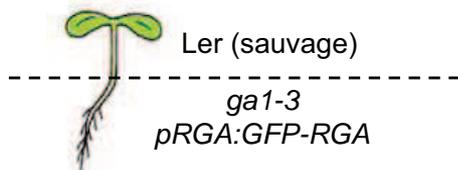


Figure 55 : Les protéines DELLA sont dégradées dans les racines des tissus receveurs de GA_{12}

Observation par microscopie confocale de l'accumulation de la protéine GFP-RGA dans des racines de plantules âgées de 15 jours, et colorées à l'iodure de propidium.

La protéine DELLA RGA s'accumule plus fortement dans les racines de greffes *ga1-3 pRGA:GFP-RGA / ga1-3 pRGA:GFP-RGA* (combinaison 1) que dans celles de greffes *ga1-3 pRGA:GFP-RGA / Ler* (combinaison 2). Barre d'échelle = 50 μ M.

résultat confirme donc les travaux de Hwang et Goodman, qui par une stratégie identique, ont démontré que le gène *ARSK1* est exprimé uniquement dans la racine (Hwang et Goodman, 1995). De manière intéressante, *ARSK1* est exprimé plus fortement dans l'épiderme et le cortex que dans le système vasculaire de la racine (Hwang et Goodman, 1995). Par ailleurs, le niveau d'expression général du gène *ARSK1* augmente graduellement le long de la racine (Hwang et Goodman, 1995). Le promoteur *ARSK1* a donc été choisi pour conduire l'expression du gène *KAO1* dans les racines du mutant *kao1 kao2*, afin de simuler une greffe Col-0 / *kao1 kao2*. Dans ce but, la construction *pARSK1::KAO1-RFP* a été réalisée puis introduite dans le double mutant *kao1 kao2*. Les plantes homozygotes *kao1 kao2 pARSK1::KAO1-RFP* ont une croissance normale, similaire à celle d'une plante sauvage (figure 53). Ce résultat valide génétiquement les observations faites sur les plantes greffées Col-0 / *kao1 kao2*, à savoir que la GA₁₂ produite par les racines est transportée dans les parties aériennes, permettant ainsi la croissance et le développement de ces tissus.

Si l'analyse des colorations GUS des plantules *pARSK1::GUS* indique clairement une spécificité racinaire de l'expression du gène *ARSK1*, nous ne pouvons pas exclure qu'une faible expression du gène puisse avoir lieu dans les feuilles ou les inflorescences. Afin d'exclure cette possibilité, une construction *pARSK1::GA20ox1-RFP* a été générée puis introgressée chez le triple mutant *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3*. Si le promoteur *ARSK1* est uniquement actif dans les racines, les plantes *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3 pARSK1::GA20ox1-RFP* doivent avoir un phénotype nain similaire aux plantes issues d'une greffe Col-0 / *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3* (la GA₁₂ ne peut être convertie en GA₄). Dans le cas contraire, si les plantes transgéniques montrent un phénotype sauvage, alors le promoteur n'est pas strictement spécifique aux racines. L'obtention de plantes *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3 pARSK1::GA20ox1-RFP* homozygotes est en cours au laboratoire.

1.2.2 Le transport longue-distance de la GA₁₂ active la signalisation GA dans les tissus receveurs

1.2.2.1 Le transport de la GA₁₂ active la dégradation des répresseurs

DELLA dans les tissus receveurs

Afin d'évaluer les conséquences du transport de GA₁₂ sur la voie de signalisation des GA dans les tissus receveurs, j'ai évalué par western-blot le niveau d'accumulation de la protéine DELLA RGA dans les greffons de plantes greffées (figure 54). De manière consistante, les plantes naines greffées *ga1-3 / ga1-3*, *kao1 kao2 / kao1 kao2* et *ga20ox1*

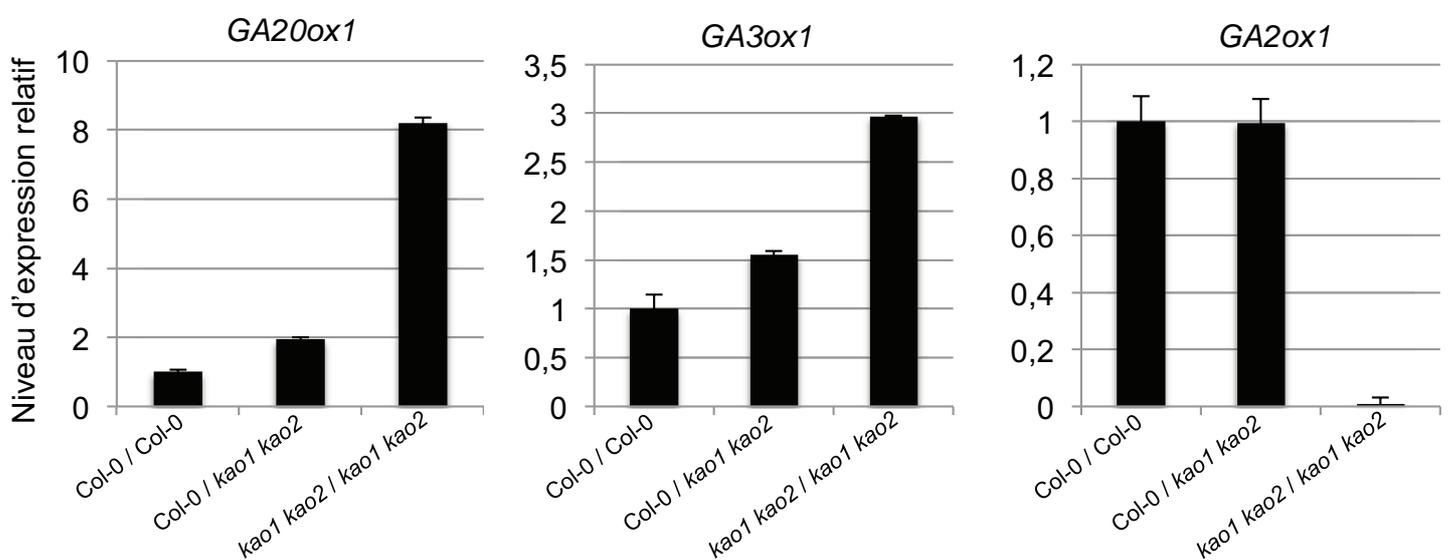


Figure 56 : Analyse par qRT-PCR de l'expression des gènes de biosynthèse et de catabolisme des GA dans les greffons issus de différentes combinaisons de plantes greffées

L'expression de deux gènes de biosynthèse, *GA20ox1* et *GA3ox1* et d'un gène de catabolisme des GA, *GA2ox1*, est analysée par RT-qPCR sur des ARN totaux extraits à partir de greffons de trois plantes, au stade rosette (25 jours). La normalisation est faite sur les gènes de référence *EXP* et *TIP41-like* et le niveau d'expression est arbitrairement fixé à 1 pour la combinaison Col-0 / Col-0. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard, et le même résultat a été obtenu dans trois expériences indépendantes.

ga20ox2 ga20x3 / ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3 accumulent toutes abondamment la protéine RGA, au contraire des plantes greffées Col-0 / *ga1-3* et Col-0 / *kao1 kao2* dont leur croissance a été restaurée suite au transport de la GA₁₂ du porte greffe au greffon (figure 54). A l'inverse, le niveau d'accumulation de RGA reste inchangé dans les greffons de plantes Col-0 / *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3* et *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3 / ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3*. Ces résultats démontrent ainsi que le transport de GA₁₂ des racines vers les parties aériennes stimule la croissance des plantes en promouvant la dégradation des protéines DELLA.

Précédemment, nous avons observé que des plantes greffées *kao1 kao2 / Col-0* présentaient une racine plus longue que les plantes greffées *kao1 kao2 / kao1 kao2*. Cela signifie que la GA₁₂ est également mobilisée des parties aériennes vers les racines, promouvant ainsi la croissance de la racine. Afin de démontrer que ce transport basipète de GA₁₂ favorisait également la dégradation des protéines DELLA dans les racines, une greffe a été réalisée entre les génotypes *ga1-3 pRGA::RGA-GFP* (porte greffe) et sauvage (Ler ; greffon) (figure 55). Les racines issues de plantes greffées *ga1-3 pRGA::RGA-GFP / ga1-3 pRGA::RGA-GFP* montrent une forte accumulation de la fluorescence, due à l'accumulation de RGA-GFP en l'absence de GA bioactives. A l'inverse, les racines plus longues de plantes greffées *ga1-3 pRGA::RGA-GFP / Ler*, montrent une fluorescence RGA-GFP plus faible, preuve que le transport de GA₁₂ des parties aériennes vers les racines stimule la croissance racinaire via la dégradation des protéines DELLA (figure 55).

1.2.2.2 *Le rétrocontrôle exercé par les protéines DELLA est atténué par le transport de la GA₁₂*

Les protéines DELLA exercent un rétrocontrôle important sur les gènes de biosynthèse et de catabolisme des GA (voir introduction 1.5.5). Un mutant de biosynthèse accumulant les protéines DELLA va chercher à pallier son manque constitutif en GA bioactives par l'augmentation de l'expression des gènes de biosynthèse (principalement les *GA20-oxydases* et *GA3-oxydases*) et par une diminution de l'expression des gènes de catabolisme (*GA2-oxydases*). Afin d'étudier l'effet du transport de GA₁₂ sur ce rétrocontrôle, j'ai analysé par qRT-PCR les niveaux d'expression de gènes *GA20ox1*, *GA3ox1* et *GA2ox1* dans les greffons issus de plantes mutées décrites précédemment. Consistent aux résultats précédents, les niveaux d'expression des gènes *GA20ox1* et *GA3ox1* sont réduits dans les greffons de plantes Col-0 / *kao1 kao2* en comparaison de ceux obtenus à partir de plantes *kao1 kao2 / kao1 kao2* (figure 56). Les niveaux d'expression n'atteignent cependant pas

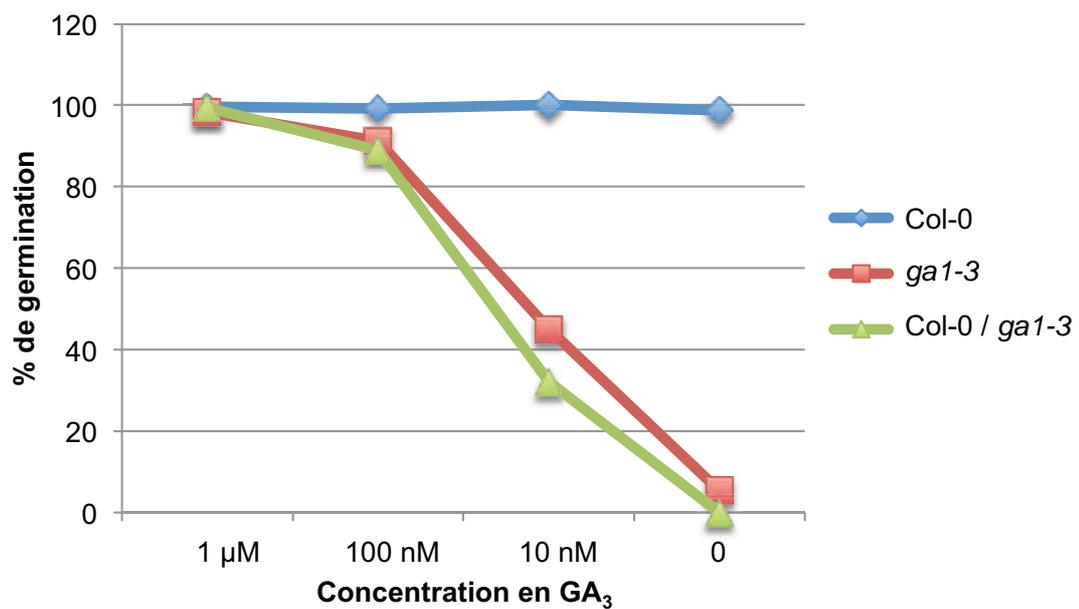


Figure 57 : Les GA ne sont pas transportées de la plante mère aux graines

Des graines issues de plantes Col-0, du mutant *ga1-3* et de plantes greffées Col-0 / *ga1-3* sont placées sur du papier Whatman imbibé avec 0, 10 nM, 100 nM, ou 1 μM de GA₃. Après 4 jours en armoire de culture (16h de lumière à 90 μmol s⁻¹ m⁻²/ 8h d'obscurité; 22°C), le taux (%) de germination est déterminé. Une graine est considérée comme ayant germée lorsque le radicule a percé la cuticule. Les plantes de génotype *ga1-3* (stériles en absence de GA) sont traitées deux fois par semaine avec 1 μM de GA₃ jusqu'à la floraison (30 jours). Des résultats similaires ont été obtenus dans trois expériences indépendantes.

ceux de plantes Col-0 / Col-0. Concernant *GA2ox1*, son expression est fortement diminuée dans les greffons de plantes *kao1 kao2 / kao1 kao2*, mais reste à des niveaux équivalents à ceux de plantes Col-0 / Col-0 et Col-0 / *kao1 kao2* (Figure 56). Ce résultat illustre bien l'influence des protéines DELLA sur la voie de biosynthèse des GA. Dans les plantes *kao1 kao2 / kao1 kao2*, les protéines DELLA s'accumulent du fait de l'absence de GA bioactives, et exercent ainsi un rétrocontrôle positif sur *GA20ox1* et *GA3ox1* et un rétrocontrôle négatif sur *GA2ox1*. Dans le cas d'une greffe Col-0 / *kao1 kao2*, la GA_{12} provenant du porte-greffe est convertie en GA_4 bioactive dans le greffon. Le niveau d'accumulation des protéines DELLA diminue, d'où un rétrocontrôle moins important sur les gènes de biosynthèse chez cette plante. Précédemment, nous avons remarqué que la concentration en GA_4 était supérieure dans les greffons de plantes Col-0 / Col-0 que pour les plantes Col-0 / *kao1 kao2* (tableau 3). Cette différence peut expliquer au moins en partie pourquoi le rétrocontrôle sur les niveaux d'expression de *GA20ox1* et *GA3ox1* est différent entre les plantes Col-0 / Col-0 et Col-0 / *kao1 kao2* (figure 56).

1.2.3 La GA_{12} transportée n'est pas transmise à la descendance

Un autre aspect intéressant du transport de GA est de déterminer s'il existe une potentielle transmission de GA à la descendance, au cours des générations. Avec l'importance et le rôle clé des GA dans la germination (un mutant de biosynthèse de GA ne germe pas sans un apport exogène de GA bioactives), on peut imaginer qu'un transport de GA de la plante mère à la graine en formation peut jouer un rôle important pour le développement de la graine et au cours de la germination.

Pour étudier ce transport, les graines issues de combinaisons de greffes suivantes ont été récoltées : Col-0 / Col-0, *ga1-3 / ga1-3* et Col-0 / *ga1-3*. Des tests de germination ont ensuite été effectués en présence de différentes concentrations de GA_3 bioactive, allant de 10 nM à 1 μ M. Comme attendu, avec 1 μ M de GA_3 , les graines provenant des trois combinaisons germent de façon optimale avec environ 100% de germination (figure 57). A 100 nM, le taux de germination baisse à 90% pour les graines provenant des combinaisons *ga1-3 / ga1-3* et Col-0 / *ga1-3* (figure 57). A 10 nM, le taux de germination n'est plus que de 44% pour les graines issues de plantes *ga1-3 / ga1-3* et de 33% pour les graines issues de plantes Col-0 / *ga1-3*. Enfin, sans apport de GA_3 , le taux de germination est de 5,3% pour les graines issues de plantes *ga1-3 / ga1-3* et de 1,9% pour les graines issues de plantes Col-0 / *ga1-3*.

Le résultat de ces tests démontre que le transport de GA_{12} , des racines vers les parties aériennes de la plante, ne permet pas de restaurer le défaut de germination du mutant *ga1-3*

suggérant qu'un transport de cette forme de la plante mère vers la graine n'a pas lieu *in planta*. Un dosage de GA dans les graines issues de ces plantes greffées permettrait de conforter ces résultats.

1. 3 Discussion

L'analyse de différentes combinaisons de micro-greffes, validée par des approches génétiques et biochimiques, indique que la GA₁₂ est mobile des racines vers les parties aériennes et inversement chez la plante modèle *Arabidopsis*. A l'inverse de métabolites la précédant dans la voie de biosynthèse, comme le GGPP, l'*ent*-kaurène ou l'acide *ent*-kaurénoïque, la GA₁₂ a pour avantage, dans le cadre d'un transport, de n'être ni compartimentée dans le plaste ou le réticulum endoplasmique ni utilisée comme précurseurs dans des voies métaboliques autres que celle des GA. Première molécule composée d'un noyau de type *ent*-gibbéréllane, c'est également à partir de la GA₁₂ que vont être formées *in planta* les autres formes de GA. La GA₁₂, GA de type C-20, constitue d'ailleurs un point important de branchement dans la voie de biosynthèse, pouvant être ou non hydroxylée en position C-13 et ainsi orienter cette voie dans la synthèse de GA₁ ou de GA₄ bioactives, respectivement.

Les résultats obtenus avec les micro-greffes chez *Arabidopsis* sont comparables à ceux obtenus par Ragni et al. (2011), qui observent également une restauration de la croissance du greffon *ga1-3* chez une plante Col-0 / *ga1-3*. Par ailleurs, ces résultats sont similaires à ceux obtenus chez le pois, où la croissance du greffon *na1* (mutant de l'enzyme KAO) est rétablie lorsque le porte-greffe est issu d'une plante sauvage (Reid et al., 1983). A l'inverse, la croissance du greffon *le* (mutant de l'enzyme GA3-oxydase) n'est pas restaurée chez la plante greffée LE / *le*. Ces observations suggèrent que la forme transportée chez le pois est un intermédiaire situé entre l'action de la KAO et de la GA3-oxydase (Reid et al., 1983). Chez le pois, l'étape d'hydroxylation en C-13 de la GA₁₂ est fréquente, aboutissant à des niveaux élevés de GA₁ et relativement faibles en GA₄ (Yamaguchi, 2008). Afin de déterminer si la GA₁₂ est également la forme mobile chez le pois, il serait intéressant de réaliser des greffes en utilisant un mutant de l'enzyme responsable de la conversion de la GA₁₂ en GA₅₃, une enzyme encore inconnue chez le pois, mais qui serait probablement une P450 monooxygénase (Davidson et al., 2003). Ainsi, un transport conservé de cette forme à la fois chez *Arabidopsis*, privilégiant la voie non-hydroxylée de la GA₁₂, et chez le pois, privilégiant l'hydroxylation de la GA₁₂, illustrerait la position idéale de la GA₁₂ dans le cadre du transport de GA.

A l'opposé, nos résultats contredisent les récents travaux de Shani et al. (2013), qui affirment l'existence d'un transport de GA bioactives dans les racines, des couches externes vers l'endoderme. Dans ces travaux, Shani et al. appliquent de manière exogène des concentrations très élevées de GA₃-fluorescente (5 µM, pendant 2h), bien plus importantes que celles métabolisées par la plante (qui sont de l'ordre du ng/g de matière sèche pour les formes bioactives ; Tableau 3). La différence entre cette application exogène de GA bioactives et leurs concentrations biologiques est donc non négligeable. Par ailleurs, et même si la GA₃ fluorescente utilisée active toujours la voie de signalisation des GA, on peut s'interroger sur les propriétés physico-chimiques d'une telle molécule fusionnée à la fluoresceine, dont la taille n'est pas anodine, notamment dans le cadre d'un transport *in vivo*. Ces points soulevés concernent également les travaux de Eriksson et al. (2006), qui rapportent eux aussi l'existence d'un transport de GA₄ bioactives des feuilles adultes de la rosette vers le méristème végétatif chez *Arabidopsis*. Dans cette étude, le mutant de biosynthèse de GA (*ga1-3*) est traité deux fois par semaine par application de 5 µL d'une solution à 10 µM de GA₄ à l'extrémité des feuilles, un tissu où la synthèse endogène de GA bioactives est pourtant relativement faible. Toutes ces études demandant l'application de GA de manière exogène sont à prendre avec beaucoup de précaution. L'avantage d'étudier le transport de GA par une approche de micro-greffe est de pouvoir observer un mécanisme endogène à la plante, dans des conditions naturelles. Ceci étant, nos travaux s'intéressent à un transport de GA sur de longues distances, nous ne pouvons pas exclure que des formes actives de GA puissent être transportées de cellule à cellule sur de courtes distances, dans un tissu ou organe donné. De plus, l'analyse du transport basipète de GA suggère que même si la GA₁₂ est la principale forme mobilisée, la croissance rétablie de la racine, observée dans les combinaisons de greffe *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3* / Col-0 et *ga3ox1 ga3ox2* / Col-0, n'exclut pas que de faibles quantités de GA₉ et/ou de GA₄ soient également transportées sur de longues distances.

Autre observation intéressante, la croissance restaurée des plantes concernant les combinaisons de greffe Col-0 / *ga1-3* et Col-0 / *kao1 kao2* n'est jamais équivalente à celle d'une plante Col-0 / Col-0 (figure 49). Par exemple, la hauteur finale des plantes Col-0 / *ga1-3* et Col-0 / *kao1 kao2* est en moyenne de 25 à 30 cm contre 60 cm pour les plantes Col-0 / Col-0 (tableau 1). On retrouve sensiblement les mêmes différences pour les quantités de GA₁₂ et de GA₄ retrouvés dans les greffons de ces plantes. Cette différence peut être expliquée par une synthèse limitée de GA₁₂ dans la racine, n'étant pas produite et transportée dans des quantités suffisantes pour permettre une restauration totale du phénotype du greffon mutant. Dans une combinaison Col-0 / Col-0, la biosynthèse de la GA₁₂ a également lieu dans les parties aériennes. Cette production semble suffisante pour

assurer une croissance optimale à la greffe. Par ailleurs, les plantes *kao1 kao2 pARSK1::KAO1-RFP* ont une croissance identique à une plante sauvage (figure 53B). Ce dernier résultat suggère fortement que la KAO est limitante dans la racine. En effet, en exprimant fortement *KAO1* dans toute la racine (par rapport aux *KAO* endogènes, voir chapitre 3), la croissance du mutant est rétablie, semblable au contrôle Col-0 / Col-0. Ainsi, l'analyse du patron d'expression des *KAO* chez *Arabidopsis*, afin de localiser les sites précis de production de la GA_{12} , pourrait apporter des informations essentielles permettant d'expliquer ces différences de croissance (voir chapitre 3).

Le transport d'un intermédiaire comme la GA_{12} n'est pas chose commune dans le transport longue distance des phytohormones. Si certaines hormones ne sont tout simplement pas transportées sur de longues distances, comme les brassinostéroïdes (Symons et Reid, 2004), la plupart des phytohormones transportées le sont sous leur forme bioactive. Le transport des cytokinines par exemple, se fait aussi dans un sens acropète et basipète, mais ce sont des composés biologiquement actifs comme la trans- et la cis-zéatine, ou la N6-(Δ^2 -isopentenyl) adénine qui sont transportés pour agir directement sur leur site d'action (Kudo et al., 2010). C'est également le cas de l'ABA (Boursiac et al., 2013), et des strigolactones où l'orochranchol et le solanacol, des formes possédant une activité biologique, qui sont mobiles *in planta* (Ruyter-Spira et al., 2013). De même pour l'auxine, dont le transport polarisé depuis les méristèmes apicaux concerne également les formes bioactives telles que l'acide indole-3-acétique (Blakeslee et al., 2005). Une seule réelle exception concerne l'éthylène, où chez la tomate, c'est l'un des précurseurs de biosynthèse, l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC), qui est transporté suite à un stress hydrique des racines vers les parties aériennes où il est alors converti en éthylène (Bradford et Yang, 1980).

Chapitre 2 : Mécanisme du transport de la GA₁₂

Chapitre 2 : Mécanisme du transport de la GA₁₂

2. 1 Introduction

Suite à l'identification de la forme intermédiaire GA₁₂ transportée, la question soulevée était de savoir quel mécanisme pouvait régir son transport. Comme pour d'autres phytohormones, divers travaux rapportent la présence de composés de type GA dans des exsudats des vaisseaux conducteurs de la plante (Hoad et Bowen, 1968 ; Lavender et al., 1973 ; Weiler et Ziegler, 1981 ; Hoad et al., 1993). La sève xylémienne transporte principalement de l'eau et des nutriments du sol vers les parties aériennes. Chez les angiospermes, le xylème est formé par des cellules mortes d'aspect très allongé et dont les parois sont épaissies par des dépôts de lignine permettant d'assurer un rôle de soutien, interrompus par endroit pour permettre le passage de la sève. Le xylème présente deux types de cellules conductrices de sève : les trachées, constitués de cellules mortes et dont les parois transversales ont disparu, et les trachéides, moins riches en lignines. Le phloème contient des glucides issus de la photosynthèse, les transportant depuis les feuilles vers les autres organes de la plante, on parle alors de sève élaborée. Ce tissu conducteur est constitué de tubes criblés c'est à dire des cellules vivantes allongées sans noyau mais possédant des parois transversales perforées de pores, appelés cribles, permettant le passage de la sève. Ces tubes criblés sont accompagnés de cellules compagnes plus petites et possédant un noyau, qui participent au contrôle de la circulation de la sève dans les tubes criblés. Afin d'étudier le transport éventuel de la GA₁₂ par le xylème et le phloème, des exsudats de sève ascendante et de sève élaborée ont été prélevés chez *Arabidopsis* pour ensuite rechercher cette molécule par LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry).

Le transport potentiel de façon acropète et basipète de la GA₁₂ par les vaisseaux conducteurs suggère l'intervention éventuelle de protéines impliquées dans le chargement et le déchargement de cette forme dans la sève xylémienne et phloémienne, et plus généralement dans son transport sur de longues distances. Ces protéines ont par conséquent été recherchées.

Deux familles de protéines susceptibles de comporter des candidats au transport de GA, les transporteurs ABC (ATP-binding cassette) et la famille des NRT1/PTR (NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER) ont particulièrement été analysées.

Les transporteurs ABC constituent une classe très large de protéines présentes dans de nombreux organismes, des bactéries à l'homme, (Henikoff et al., 1997 ; Kang et al., 2011).

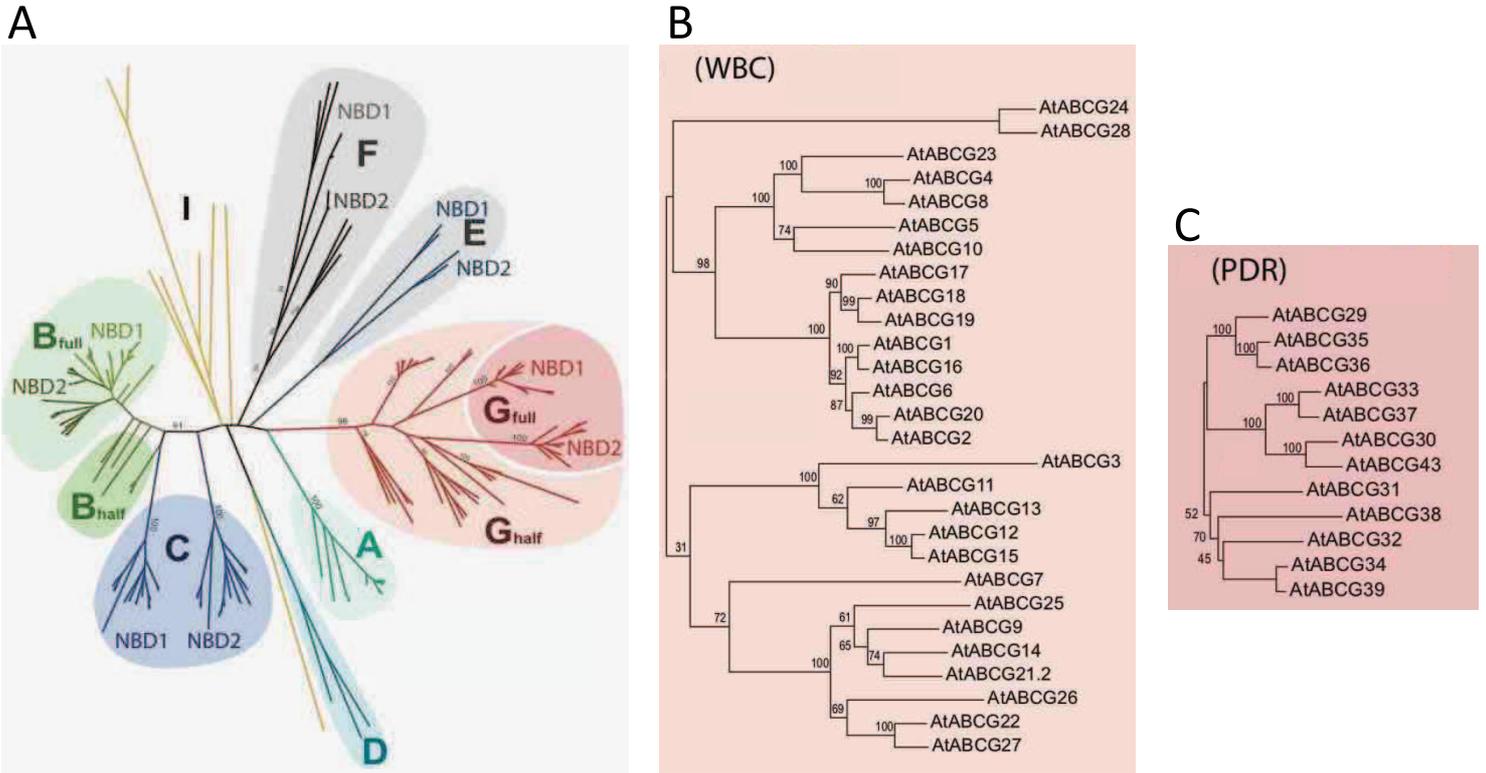


Figure 58 : Phylogénie des protéines ATP-Binding cassette (ABC) chez *Arabidopsis* (Kang et al., 2011)
(A) Phylogénie (arbre non-enraciné) basée sur le domaine NBD (nucleotide-binding domain) commun à toutes les protéines ABC. **(B)** Représentation phylogénique (arbre enraciné) de la sous-famille G des protéines ABC de type WBC (white-brown complex homolog). **(C)** Arbre phylogénique enraciné de la sous-famille G des protéines ABC de type PDR (pleiotropic drug resistance family). Pour l'ensemble de ces arbres, la phylogénie a été étudiée avec le logiciel PhyML3.0 et l'alignement généré avec le logiciel MUSCLE3.8.



Figure 59 : Arbre phylogénique non enraciné représentant la famille des NRT1/PTR chez *Arabidopsis* (d'après Nour-Eldin et al., 2012)

D'une façon générale, les transporteurs ABC fonctionnent comme des pompes à protons, utilisant l'hydrolyse de l'ATP comme énergie afin d'importer ou exporter des métabolites depuis la cellule. Chez *Arabidopsis*, on compte 130 membres classés en 8 sous-familles selon leur structure et leurs relations phylogéniques, A, B, C, D, E, F, G et I (figure 58A). Les protéines ABC sont formées par quatre sous-unités majeures : deux domaines transmembranaires ou TMD (transmembrane domain) et deux domaines de liaison à un nucléotide, ou NBD (nucleotide-binding domain), qui interagissent au cours de l'hydrolyse de l'ATP pour diriger le transport (Higgins, 1992 ; Kang et al., 2011). Les transporteurs ABC peuvent être exprimés soit sous la forme d'un polypeptide unique comprenant à la fois les deux domaines TMD et les deux domaines NBD (on parle aussi de full-size ABC, « full » en figure 58), soit comme des demi-transporteurs comportant un domaine TMD et un domaine NBD (ou half-size ABC, « half » en figure 58). Dans ce cas, pour former un transporteur ABC fonctionnel, ces demi-transporteurs doivent former des homo- ou hétérodimères. Jouant un rôle clé dans la croissance et le développement de la plante, sa nutrition, et son interaction avec l'environnement, les transporteurs ABC sont connus pour être impliqués dans des processus biologiques variés tels que la réponse aux pathogènes, la formation de la cuticule ou du pollen, la tolérance aux métaux, mais également le transport de phytohormones comme l'auxine et l'ABA (Noh et al., 2001 ; Santelia et al., 2005 ; Kang et al., 2010 ; Kuromori et al., 2010). Si l'auxine est transportée majoritairement par des transporteurs ABC de la sous-famille B, l'ABA dont la structure chimique de type sesquiterpénoïde rappelle celle des GA est principalement transporté par des transporteurs de la sous-famille G (Kang et al., 2011). Cette sous-famille G comporte 28 membres exprimés sous la forme de demi-transporteurs nécessitant une dimérisation pour former un transporteur fonctionnel aussi nommés WBC (White Brown Complex Homolog Family) (figure 58B) (Crouzet et al., 2006). Elle contient également 12 membres codant un transporteur totalement fonctionnel appelés PDR (Pleiotropic Drug Resistance Family) (figure 58C) (Kang et al., 2011). L'ABA étant une hormone antagoniste aux GA (Gómez-Cadenas et al., 2001), l'étude a naturellement été focalisée premier lieu sur la sous-famille G des transporteurs ABC, afin d'y identifier un ou des candidat(s) potentiel(s) au transport de la GA₁₂.

L'autre famille susceptible de comporter des candidats au transport de la GA₁₂ est la famille des NRT1/PTR (figure 59). Des travaux relativement récents démontrent en effet par des expériences d'expression hétérologue en levure que l'un des membres de cette famille connu pour transporter de l'ABA, AIT3 (ABA-IMPORTING TRANSPORTER 3), transporte également de la GA₃ (Kanno et al., 2012). La famille des NRT1/PTR chez les plantes présente des homologies de séquences protéiques avec la famille SCL15/PepT/PTR/POT, des transporteurs de peptides chez l'animal (Leran et al., 2014). Chez *Arabidopsis*, on

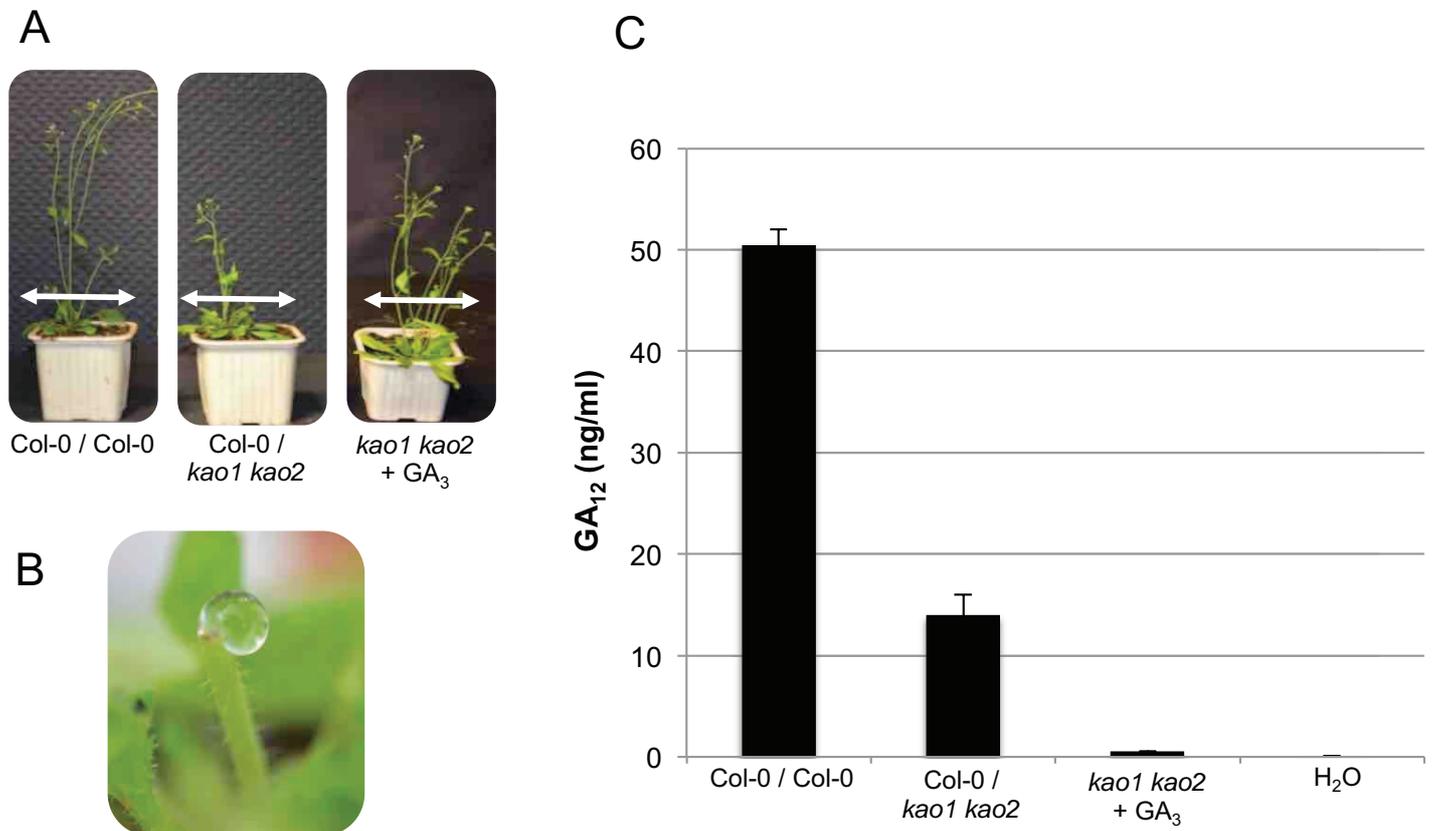


Figure 60 : La GA₁₂ est transportée des racines vers les parties aériennes par le xylème

Une section transversale de la tige (2 cm au dessus de la rosette, indiqué par une flèche en **A**) est effectuée sur des plantes âgées de 35 jours (5 jours après floraison). Des exsudats de sève xylémienne (**B**) sont collectés à partir des greffons de combinaisons de greffes Col-0 / Col-0, Col-0 / *kao1 kao2*, et du mutant *kao1 kao2* (traité à la GA₃ deux fois par semaine jusqu'à la floraison). (**C**) La concentration de GA₁₂ dans la sève brute (en ng / ml) est déterminée par spectrométrie de masse (LC-MS). Les concentrations sont des moyennes de deux réplicats biologiques.

dénombrer 52 membres transportant une variété assez large de métabolites comme le nitrate, des glucosinolates, des peptides, de l'auxine et de l'ABA (Leran et al., 2014). Certains membres comme NRT1.1 sont capables de transporter deux composés différents, comme le nitrate et l'auxine en l'occurrence pour celui-ci (Krouk et al., 2010). D'une façon générale, la structure de ces transporteurs se compose de 12 domaines transmembranaires, connectés par de courtes boucles peptidiques (Leran et al., 2014). Dans cette thèse, j'utiliserai la nouvelle nomenclature des NRT1/PTR telle que décrite par Leran et al. (2014), ainsi par exemple, AIT3 se nomme désormais NPF4.1 (NRT1/PTR FAMILY 4.1).

2. 2 Résultats

2.2.1 La GA₁₂ est transportée via le xylème des racines vers les parties aériennes de la plante

Afin de tester si la GA₁₂ était véhiculée par le xylème, des exsudats de sève ascendante sont collectés au niveau des tiges de plantes greffées Col-0 / Col-0 et Col-0 / *kao1 kao2* et de plantes mutées *kao1 kao2* traitées à la GA₃ (pour assurer un développement normal de la plante, malgré l'absence de biosynthèse de l'intermédiaire GA₁₂ chez ce double mutant). Les plantes sont âgées de 35 jours et à ce stade, les tiges sont du génotype du greffon. Par spectrométrie de masse, la présence de GA₁₂ a été quantifiée dans ces exsudats en collaboration avec Dimitri Heintz (Plate-forme métabolomique, IBMP) (figure 60). Ainsi, les résultats montrent que la sève xylémienne issue de plantes contrôles greffées Col-0 / Col-0 contient une quantité importante de GA₁₂ (50 ng/ml). Les échantillons provenant des greffons des combinaisons Col-0 / *kao1 kao2* contiennent également une quantité substantielle de GA₁₂ (15 ng/ml), au contraire de ceux issus des plantes *kao1 kao2* pour lesquelles la GA₁₂ n'a pas été détectée (figure 60). Ces résultats corroborent ceux obtenus dans le chapitre précédent, et démontrent ainsi qu'une partie de la GA₁₂ produite par les racines peut être transportée vers les parties aériennes à travers la sève xylémienne.

2.2.2 La GA₁₂ est transportée via le phloème de la plante

Sur le même principe, sachant que la GA₁₂ est également transportée des parties aériennes de la plante vers les racines (voir chapitre 1, 1.2.1.2), de la sève phloémienne a été collectée sur des plantes sauvages et sur le mutant *kao1 kao2* (stade rosette, 25 jours) dans le but

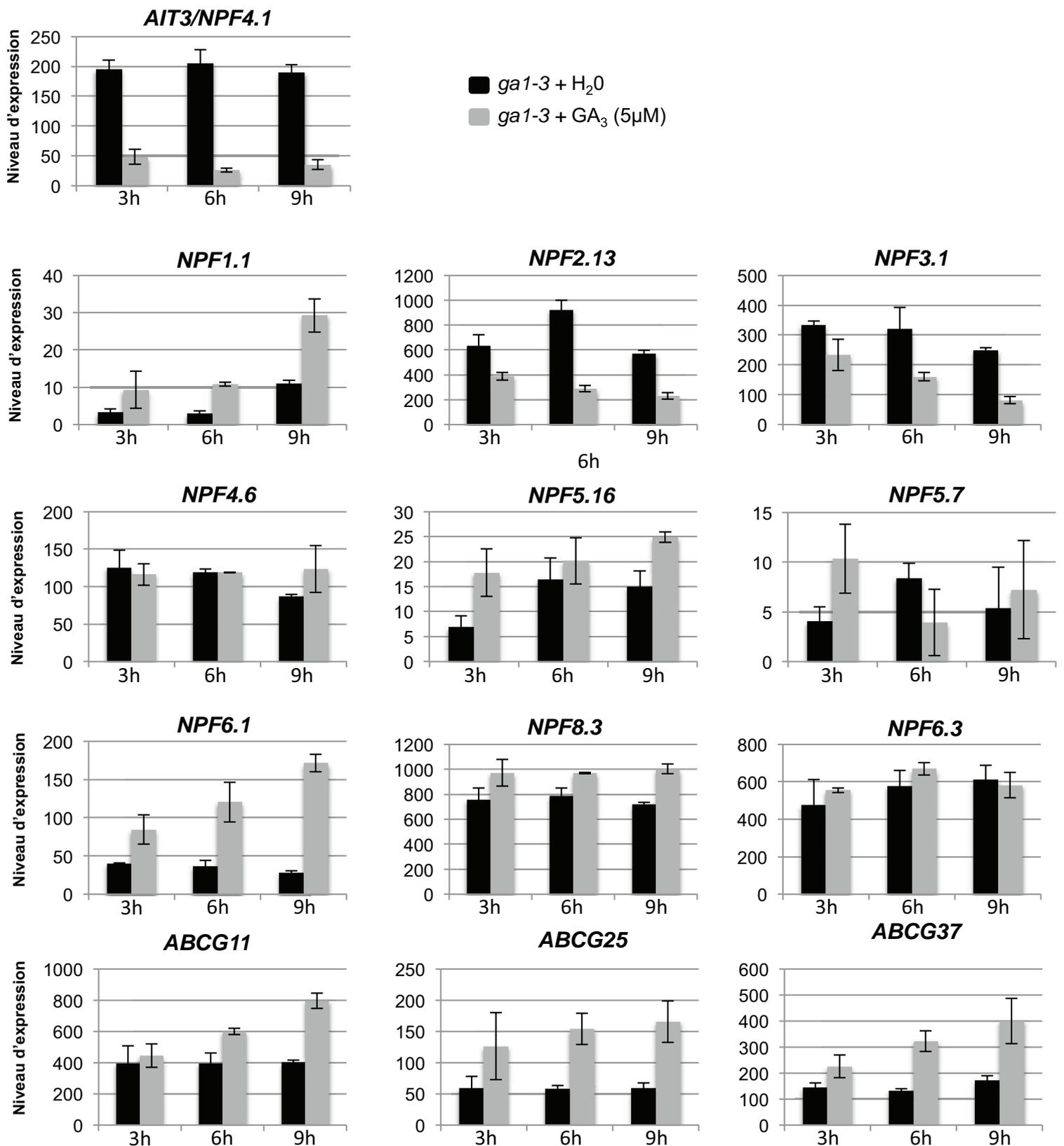


Figure 61 : Niveau d'expression de gènes codant pour des transporteurs NRT1/PTR et ABCG en réponse à un traitement aux GA (analyse affymétrix, S. Yamaguchi)

Les ARN sont extraits de graines imbibées avec 5 μM de GA₃ ou de l'eau (contrôle, H₂O) pendant 3, 6 ou 9h à 22°C. Après hybridation des ARN sur une puce GeneChip, les valeurs obtenues issues de duplicats biologiques (en ordonnée ici) ont été normalisées par le programme d'affymétrix (GCOS). Ces analyses sont disponibles sur le site <http://bar.utoronto.ca/efp/cqi-bin/efpWeb.cgi>.

d'identifier la présence ou l'absence de GA₁₂ par LC-MS. Différents échantillons ont déjà été analysés en collaboration avec Patrick Wehrung (Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg), cependant le seuil de détection de l'appareil était trop élevé pour ce type de dosage. D'autres échantillons ont été produits et envoyés pour analyse, initiant une nouvelle collaboration avec Dr Esther Carrera-Berguas (IBMCP Valencia, Espagne). Ces analyses sont en cours.

2.2.3 Recherche de transporteurs potentiels de la GA₁₂ chez *Arabidopsis*

2.2.3.1 Sélection de gènes candidats par analyse *in silico*

Nous avons vu dans les points précédant que la GA₁₂ était transportée par la sève, dans les tissus conducteurs. Aussi, l'identification d'éventuels transporteurs facilitant le chargement ou le déchargement de la GA₁₂ des vaisseaux conducteurs a été entreprise. Comme précisé auparavant, un premier transporteur de GA a été caractérisé chez *Arabidopsis*. Ce transporteur, appelé AIT3 et appartenant à la famille des transporteurs de type NRT1/PTR, transporte avec des affinités différentes l'ABA et la GA₃ (Kanno et al., 2012). Dans le but d'identifier un transporteur de GA₁₂, l'étude a d'abord été focalisée sur cette famille de transporteurs. Par ailleurs, le niveau d'expression des gènes codant des régulateurs clés de la signalisation GA (comme les récepteurs de GA, GID1) sont finement régulés selon le niveau d'accumulation de GA bioactives (voir introduction 1.3.7). Afin de caractériser des transporteurs candidats, le profil d'expression des gènes codant l'ensemble des transporteurs de type NRT1/PTR ont été analysés pour leur réponse à une application de GA, à partir des banques de données publiques de microarrays (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) (figure 61). Cette analyse est réalisée sur des graines du mutant de biosynthèse *ga1-3*. Parmi les 52 gènes qui composent la famille NRT1/PTR, 10 ont montré une expression dépendante du niveau en GA. Ainsi, l'expression de 7 transporteurs NRT1/PTR est induite en réponse à un traitement GA₃. Il s'agit de *NPF1.1* (induit jusqu'à 3 fois), *NPF4.6* (jusqu'à 1,5 fois), *NPF5.16* (jusqu'à 2,5 fois), *NPF5.7* (jusqu'à 2,5 fois), *NPF6.1* (jusqu'à 5,6 fois), *NPF6.3* (jusqu'à 1,2 fois) et *NPF8.3* (jusqu'à 1,4 fois) (figure 61). A l'opposé, l'expression de 3 transporteurs NRT1/PTR est réprimée avec ce traitement, il s'agit de *NPF2.13* (réprimé jusqu'à 3 fois), *NPF3.1* (jusqu'à 3 fois), et *NPF4.1* (jusqu'à 6,5 fois) (Figure 61).

En utilisant une stratégie identique, le profil d'expression a été analysé pour 40 gènes codant les transporteurs de la famille des ABC de classe G, qui constituent également une cible privilégiée pour la recherche d'un transporteur de GA₁₂. Trois d'entre eux sont induits suite à

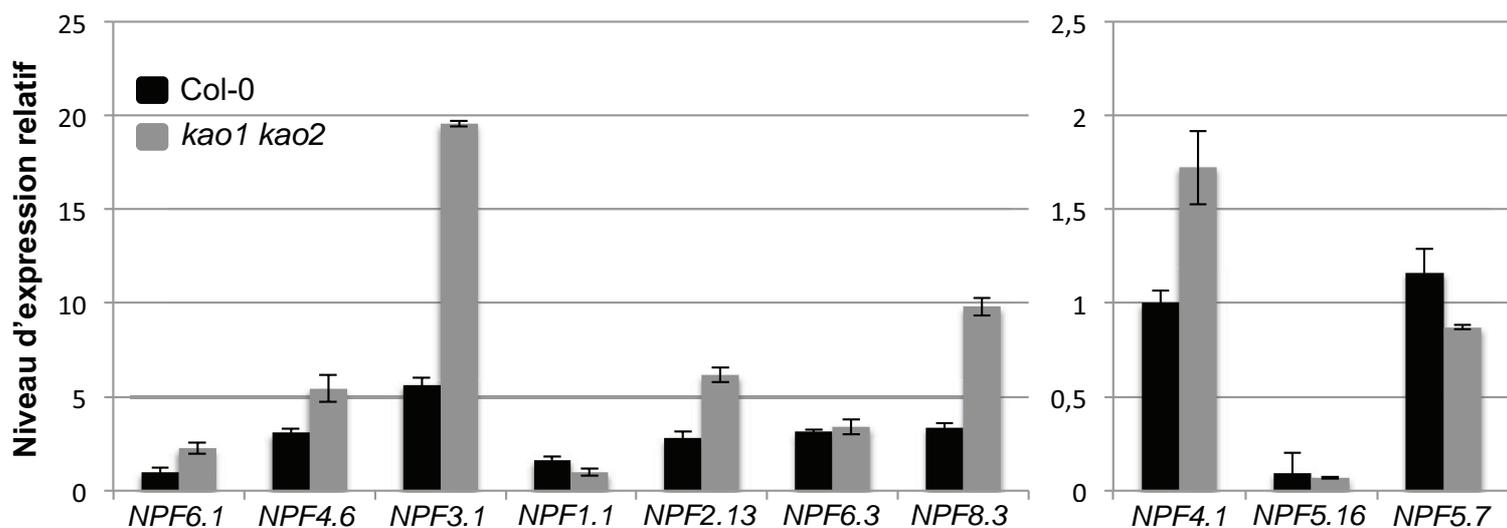


Figure 62 : Analyse par RT-qPCR de l'expression des transporteurs NRT1/PTR sélectionnés

Les dix gènes codant pour des transporteurs potentiellement impliqués dans le transport des GA sont analysés par RT-qPCR sur des ARN totaux de plantules Col-0 et *kao1 kao2* âgés de 7 jours en culture *in-vitro*. Le niveau d'expression est arbitrairement fixé à 1 pour *NPF6.1* (graphique de gauche) et *NPF4.1* (graphique de droite) chez Col-0. L'erreur standard (moyenne de trois réplicats techniques) est indiquée pour chaque analyse. L'expérience a été reproduite deux fois avec des résultats similaires.

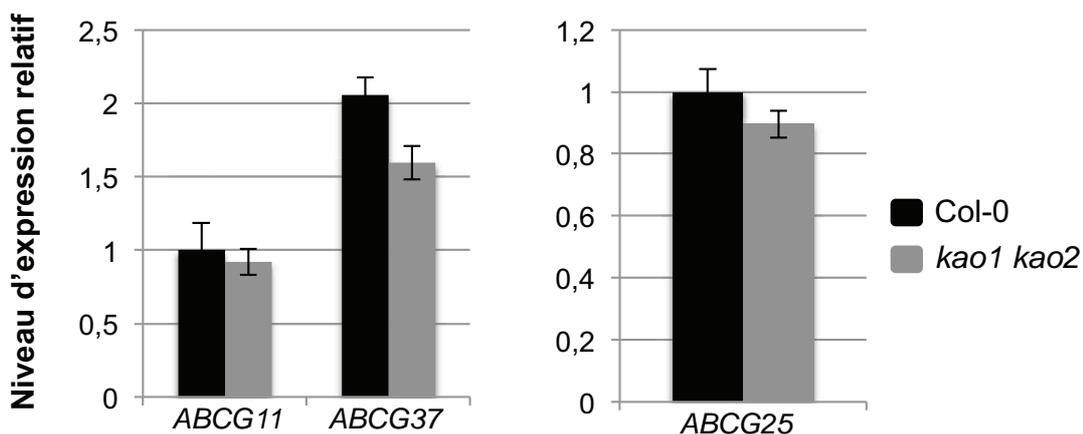


Figure 63 : Analyse par RT-qPCR de l'expression des transporteurs ABCG sélectionnés

Les trois gènes codant pour des transporteurs ABCG potentiellement impliqués dans le transport des GA sont analysés par RT-qPCR sur des ARN totaux de plantules Col-0 et *kao1 kao2* âgées de 7 jours, en culture *in-vitro*. Le niveau d'expression est arbitrairement fixé à 1 pour *ABCG11* (graphique de gauche) et pour *ABCG25* (graphique de droite) chez Col-0. L'erreur standard est indiquée pour chaque analyse. L'expérience a été répétée deux fois avec des résultats similaires.

un traitement aux GA bioactives. Il s'agit de *ABCG11* (induit jusqu'à 2 fois), *ABCG25* (jusqu'à 3 fois) et *ABCG37* (jusqu'à 2,2 fois) (figure 61).

Afin de vérifier que les différents gènes sélectionnés sont bien régulés transcriptionnellement par les GA, le niveau d'expression des 10 gènes *NRT1/PTR* et 3 gènes *ABCG* a été déterminé par qRT-PCR sur des plantules sauvages (*Col-0*) et mutantes *kao1 kao2* âgées de 7 jours (figure 62). En effet, un transporteur de GA_{12} peut être potentiellement surexprimé dans ce mutant, afin d'accroître le transport de GA et palier à la déficience en hormone, ou à l'inverse sous-exprimé lorsque la GA_{12} est absente. Les résultats obtenus montrent que les gènes *NPF2.13*, *NPF3.1*, *NPF4.1*, *NPF4.6*, *NPF6.1*, et *NPF8.3* ont un niveau d'expression qui augmente respectivement de 2,1, 3,5, 1,7, 1,7, 2,2 et 2,9 fois chez le mutant *kao1 kao2* par rapport à *Col-0*. Inversement, les gènes *NPF1.1* et *NPF5.7* sont réprimés respectivement d'un facteur 1,6 et 1,3 chez le mutant de biosynthèse de GA. Le niveau d'expression des gènes *NPF5.16* et *NPF6.3* est identique dans les deux fonds génétiques étudiés. Concernant *ABCG11*, *ABCG25* et *ABCG37*, tous trois sont très légèrement réprimés chez le mutant *kao1 kao2*, avec une réduction d'expression de 1,3 fois pour *ABCG37*, et sans que la différence ne soit significative concernant *ABCG11* et *ABCG25* (figure 63). Cette analyse par qRT-PCR diffère des analyses transcriptomiques, réalisées sur des graines du mutant *ga1-3* traitées ou non avec de la GA_3 . Il est donc difficile de faire un parallèle entre les données obtenues par ces deux méthodes, le stade de développement, le génotype et la technique d'analyse étant différents.

Les résultats obtenus par analyse de banques de données de microarrays, ainsi que par qRT-PCR suggèrent que la majorité des gènes retenus sont modulés à différents degrés par les GA. Bien entendu, cette stratégie a ses limites, et elle n'assure pas d'isoler de façon certaine le(s) transporteur(s) recherché(s).

2.2.3.2 Patron d'expression des gènes candidats

L'étude du patron d'expression global de ces gènes candidats est une information importante. En effet, puisque la GA_{12} est transportée à travers les vaisseaux conducteurs, un transporteur potentiel impliqué dans le chargement ou le déchargement de cette molécule dans ces tissus devrait en conséquence être localisé plus spécifiquement à proximité des vaisseaux conducteurs. L'analyse des données de transcriptomique disponibles sur <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi> permet d'avoir un aperçu du patron d'expression d'un gène donné, et représente un support d'analyse visuelle intéressant et rapide avant une caractérisation génétique classique. La valeur absolue de l'expression (v.a) du gène est

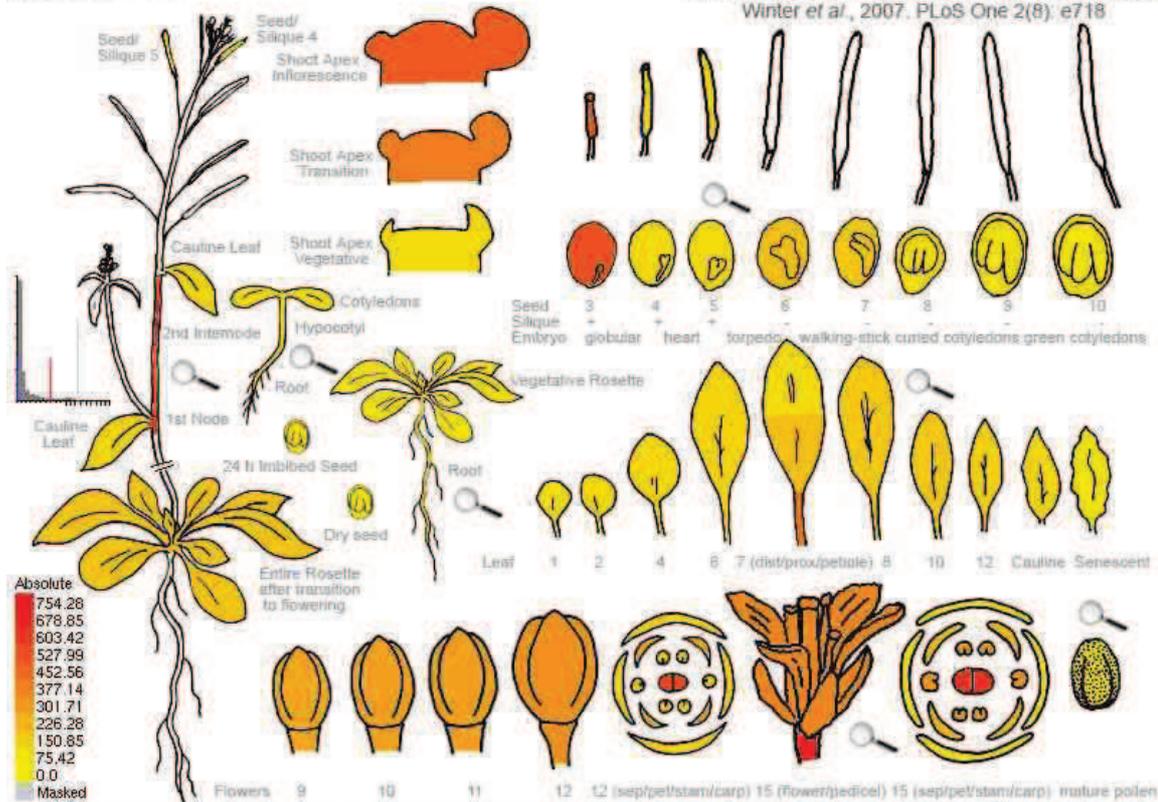
NPF1.1

At3g16180 258332_at

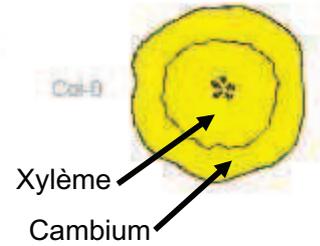


Arabidopsis eFP Browser at bar.utoronto.ca

Winter et al., 2007. PLoS One 2(8): e718



Coupe transversale de l'hypocotyle



eFP Browser by B. Vinograd, drawn by J. Ails and N. Provart. Data from Gene Expression Map of Arabidopsis Development: Schmid et al., 2005, Nat. Gen. 37: 501, and the Nambara lab for the imbibed and dry seed stages. Data are normalized by the GCOS method, TGT value of 100. Most tissues were sampled in triplicate.

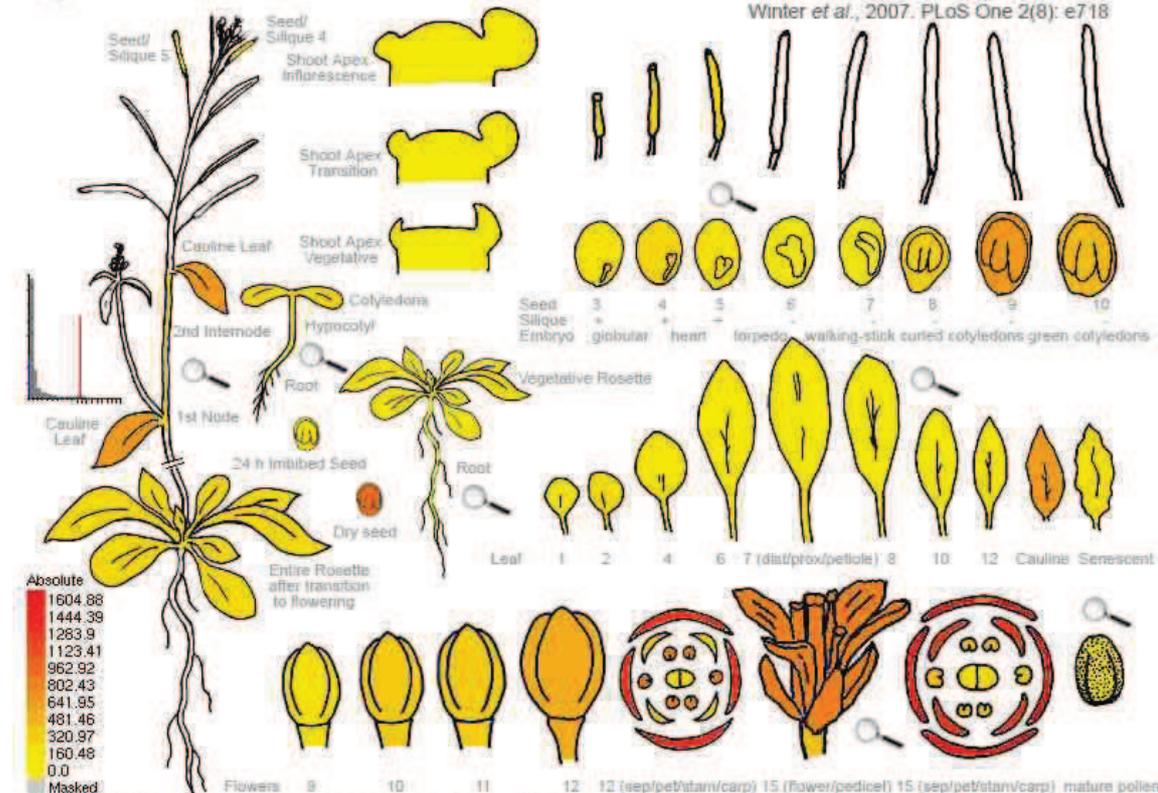
NPF3.1

At1g68570 262281_at



Arabidopsis eFP Browser at bar.utoronto.ca

Winter et al., 2007. PLoS One 2(8): e718

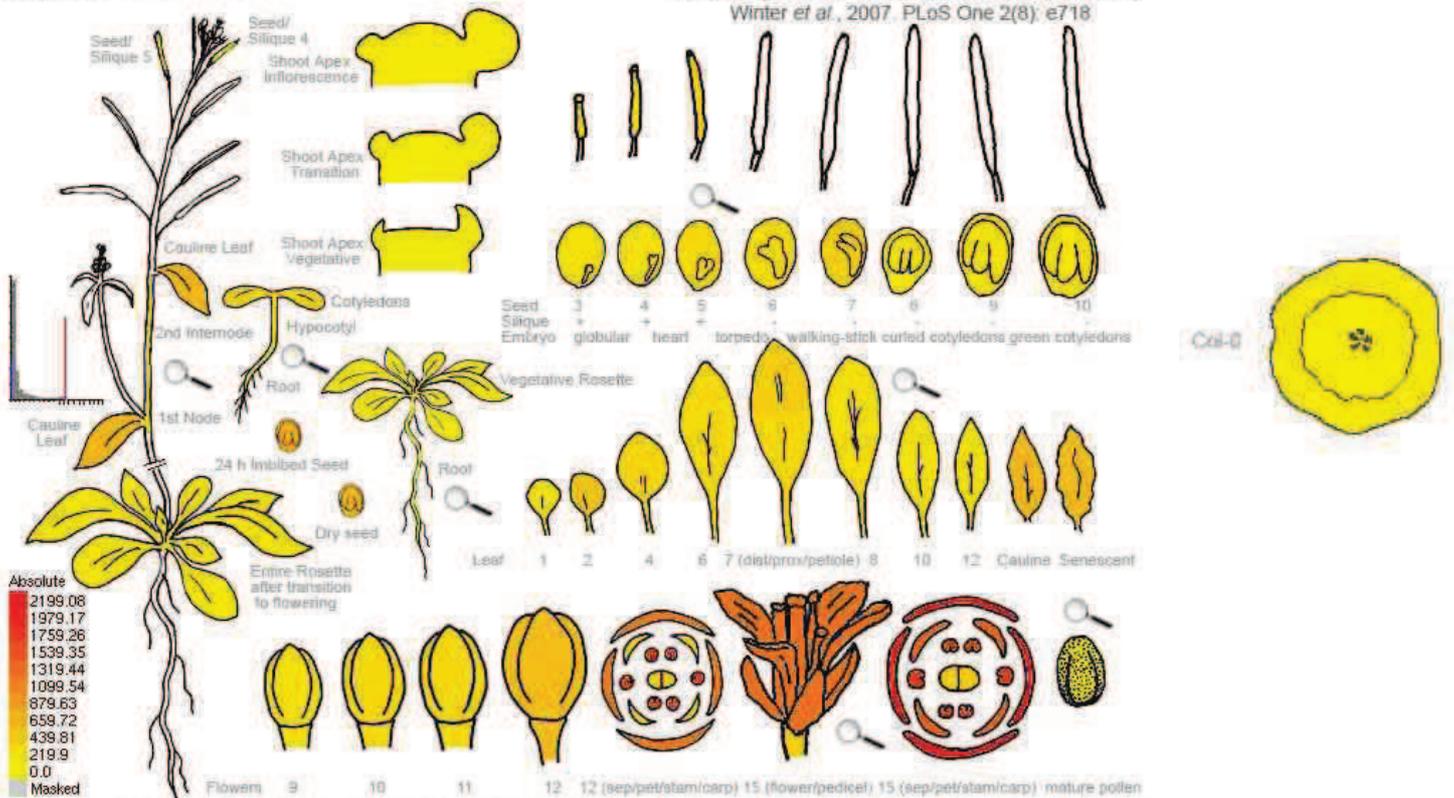


eFP Browser by B. Vinograd, drawn by J. Ails and N. Provart. Data from Gene Expression Map of Arabidopsis Development: Schmid et al., 2005, Nat. Gen. 37: 501, and the Nambara lab for the imbibed and dry seed stages. Data are normalized by the GCOS method, TGT value of 100. Most tissues were sampled in triplicate.

NPF2.13

At1g69870 268418_at NRT1.7

Arabidopsis eFP browser at bar.utoronto.ca
Winter et al., 2007. PLoS One 2(8): e718

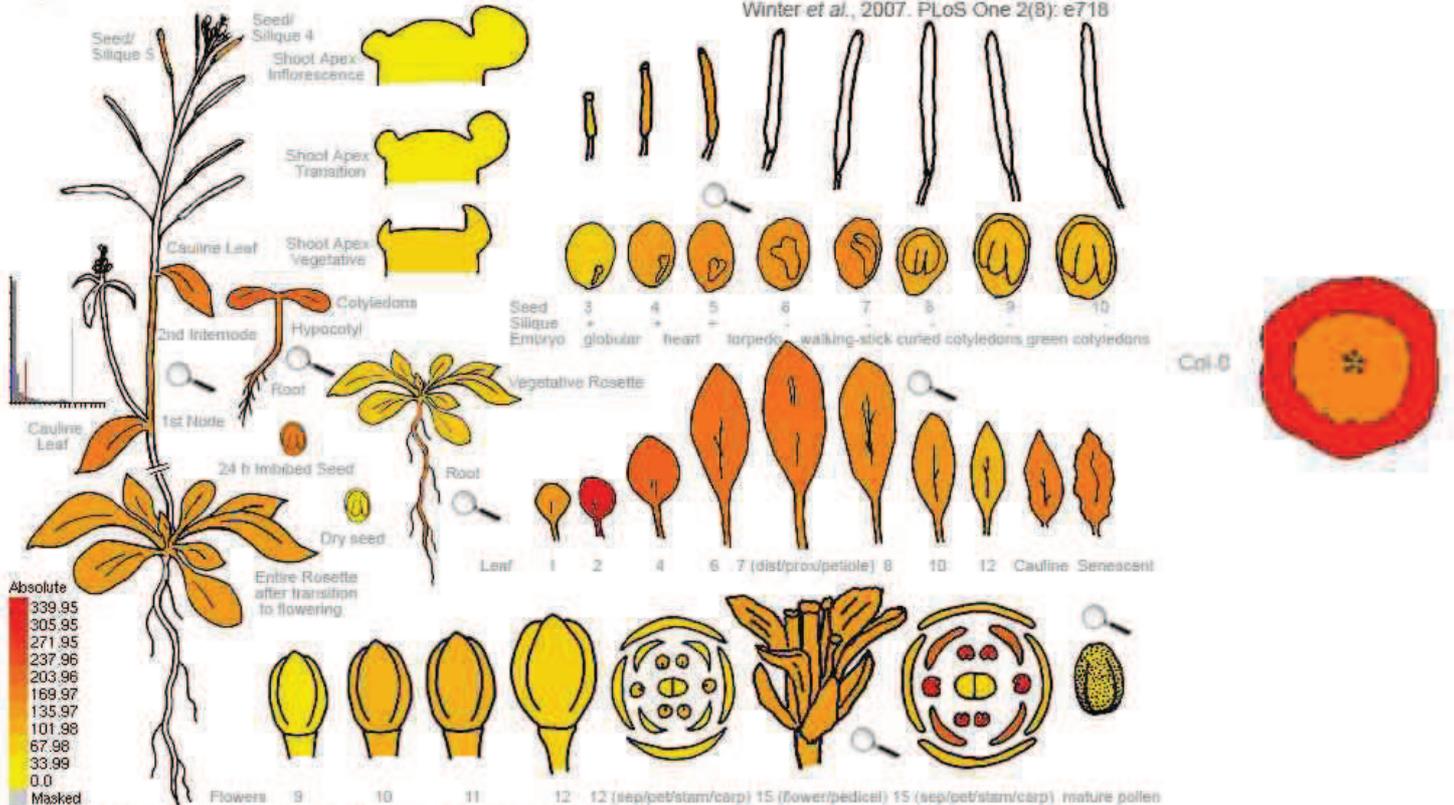


eFP Browser by B. Vinograd, drawn by J. Aili and N. Provost. Data from Gene Expression Map of Arabidopsis Development: Schmid et al., 2005, Nat. Gen. 37:501, and the Nambara lab for the imbibed and dry seed stages. Data are normalized by the GCOS method, TGT value of 100. Most tissues were sampled in triplicate.

NPF4.6

At1g69850 268414_at ATHRT1.2

Arabidopsis eFP Browser at bar.utoronto.ca
Winter et al., 2007. PLoS One 2(8): e718

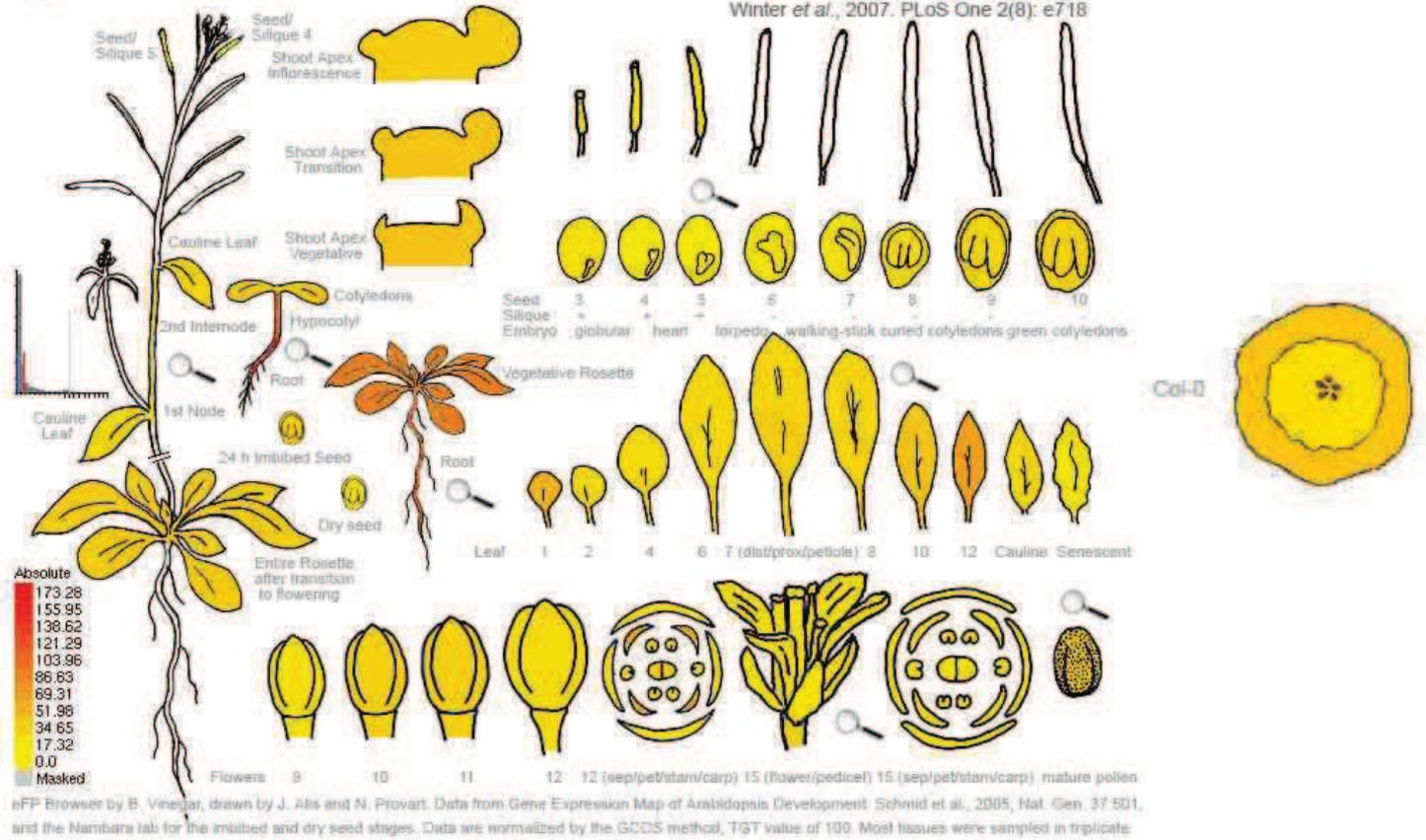


eFP Browser by B. Vinograd, drawn by J. Aili and N. Provost. Data from Gene Expression Map of Arabidopsis Development: Schmid et al., 2005, Nat. Gen. 37:501, and the Nambara lab for the imbibed and dry seed stages. Data are normalized by the GCOS method, TGT value of 100. Most tissues were sampled in triplicate.

NPF5.16

At1g22550 281924_at

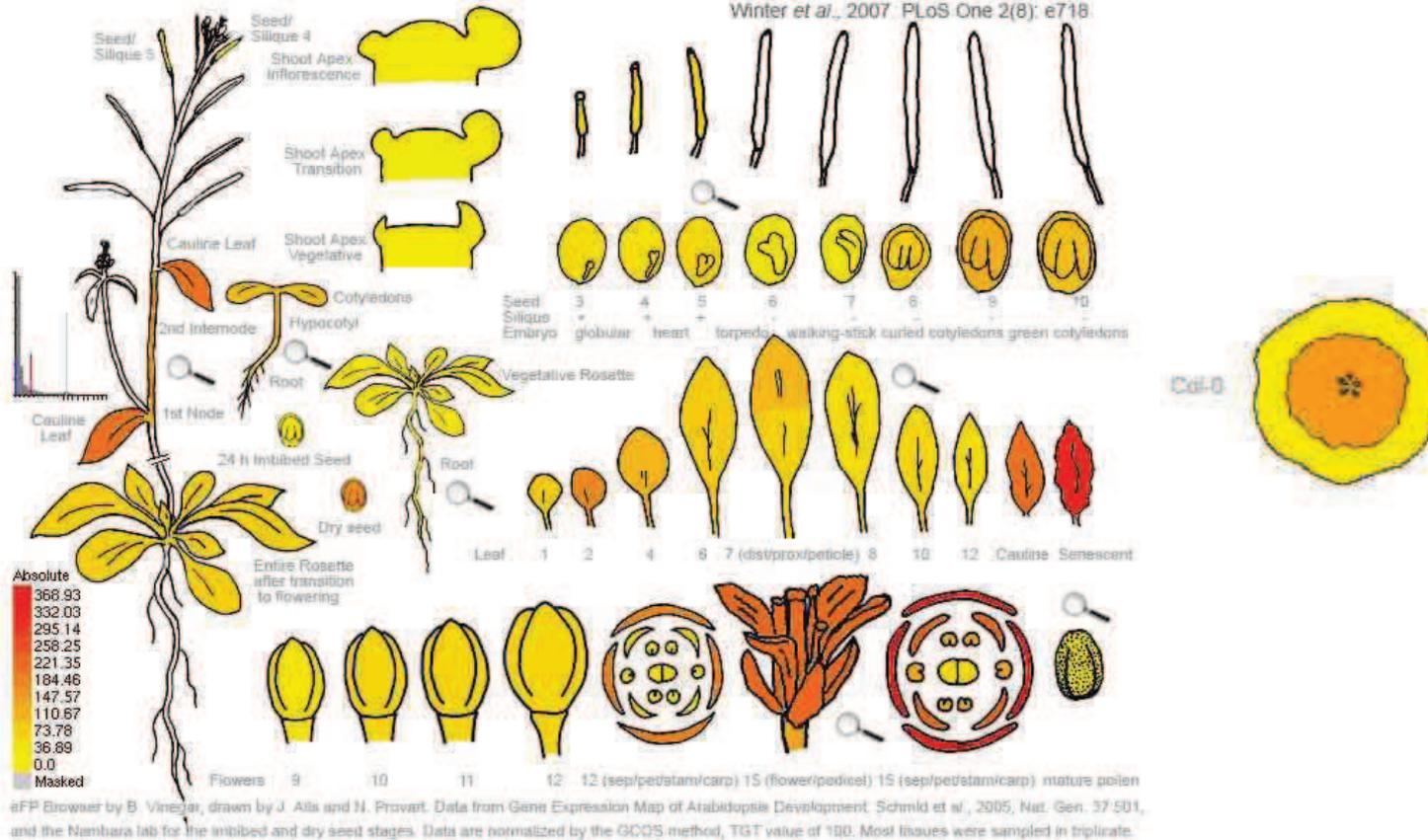
Arabidopsis eFP Browser at bar.utoronto.ca
Winter et al., 2007. PLoS One 2(8): e718



NPF5.7

At3g53960 251916_at

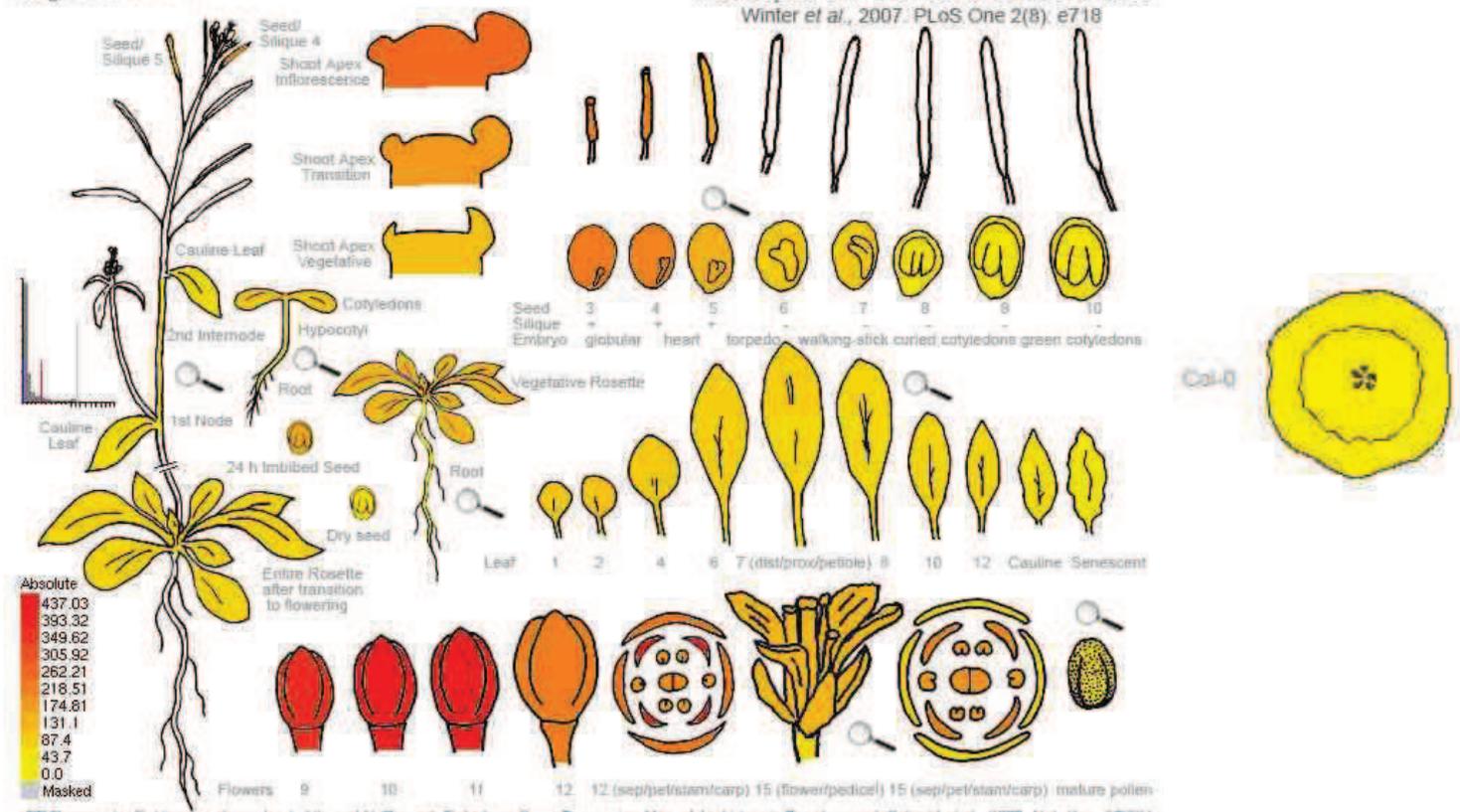
Arabidopsis eFP Browser at bar.utoronto.ca
Winter et al., 2007. PLoS One 2(8): e718



NPF6.1

At5g13400.258261_at

Arabidopsis eFP browser at bar.utoronto.ca
Winter et al., 2007. PLoS One 2(8): e718

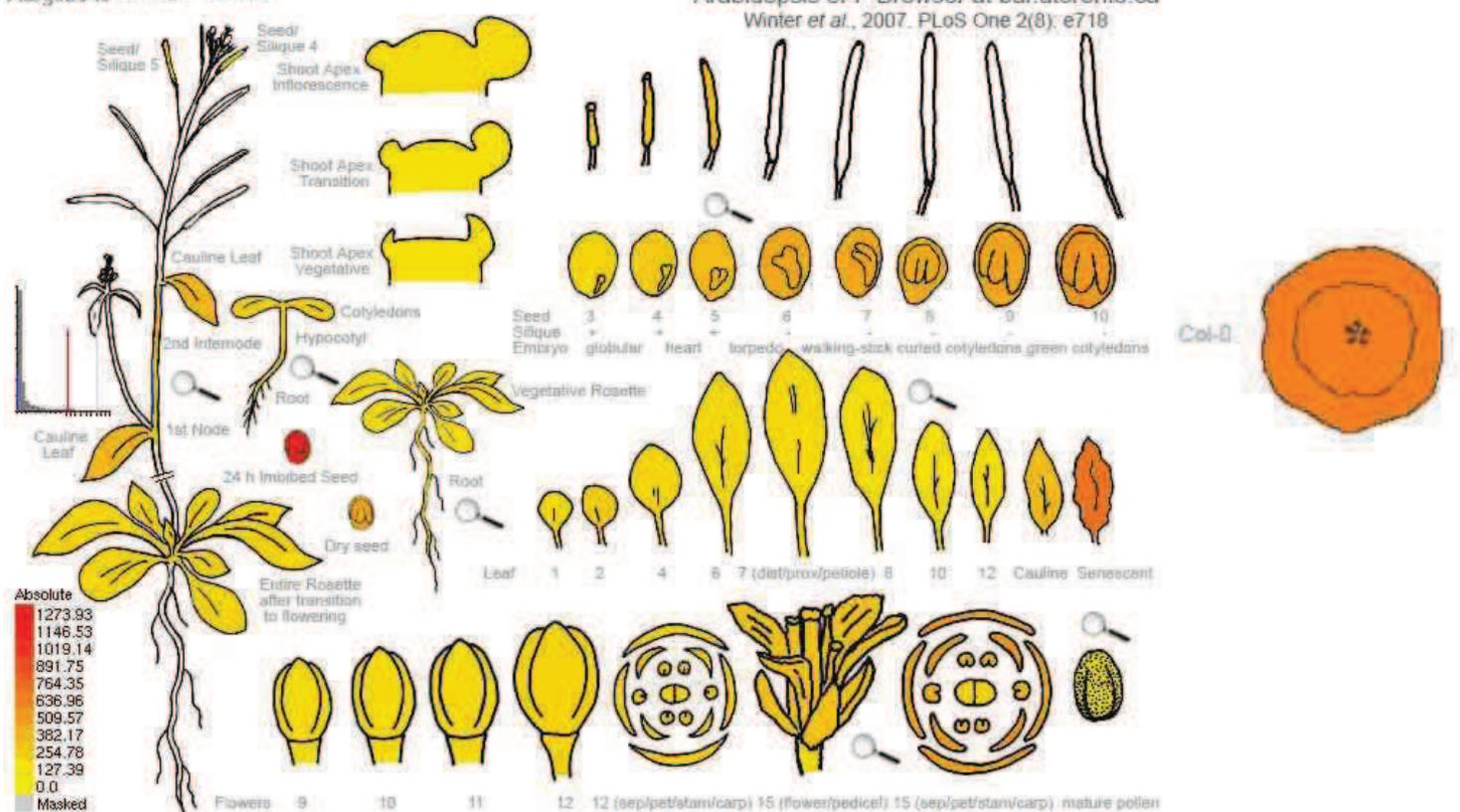


eFP Browser by B. Vinograd, drawn by J. Allen and N. Provart. Data from Gene Expression Map of Arabidopsis Development: Schmid et al., 2005, Nat. Gen. 37:501, and the Nambara lab for the imbibed and dry seed stages. Data are normalized by the GCOS method, TGT value of 100. Most tissues were sampled in triplicate.

NPF8.3

At2g02040.265228_at

Arabidopsis eFP Browser at bar.utoronto.ca
Winter et al., 2007. PLoS One 2(8): e718

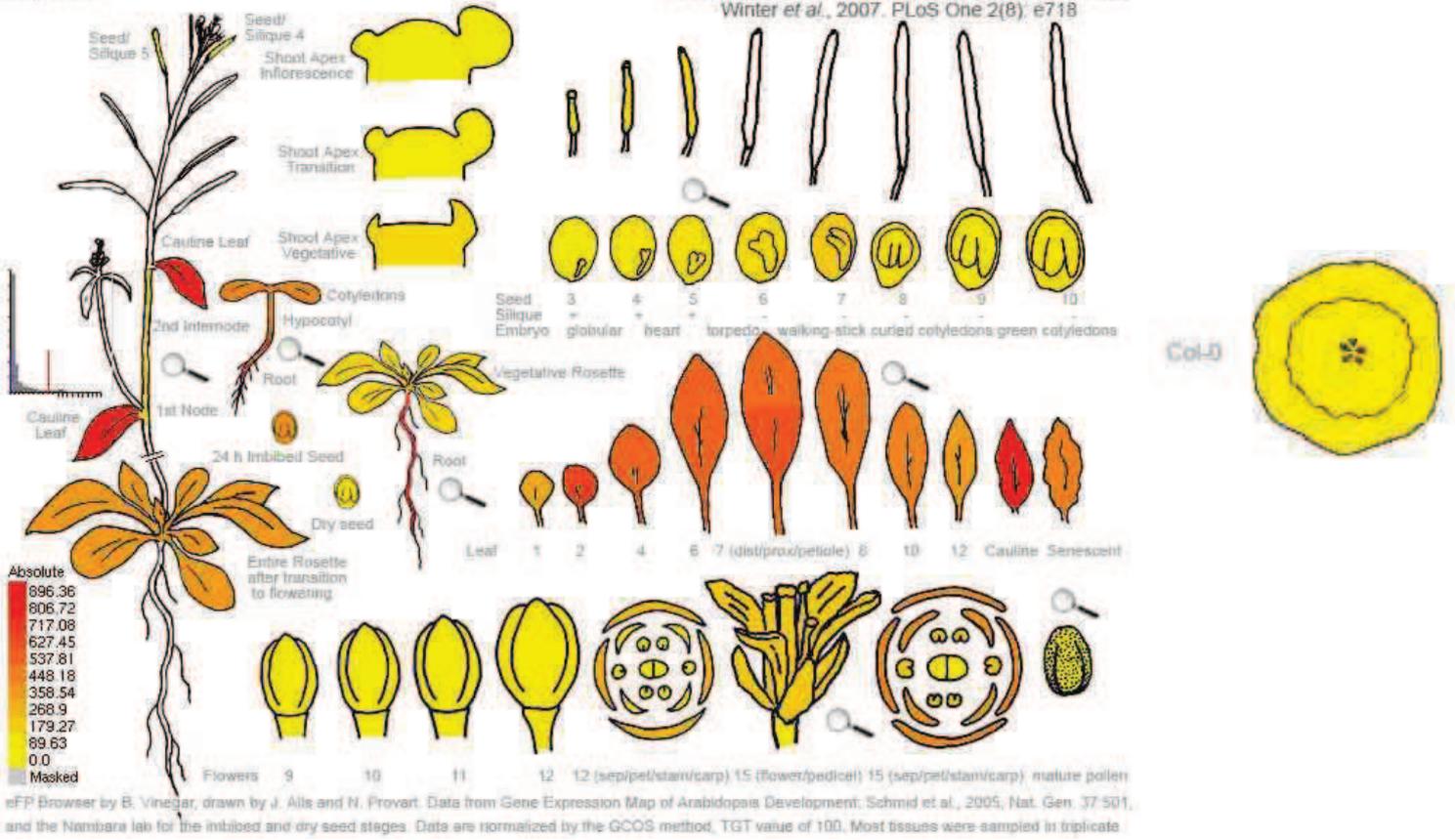


eFP Browser by B. Vinograd, drawn by J. Allen and N. Provart. Data from Gene Expression Map of Arabidopsis Development: Schmid et al., 2005, Nat. Gen. 37:501, and the Nambara lab for the imbibed and dry seed stages. Data are normalized by the GCOS method, TGT value of 100. Most tissues were sampled in triplicate.

NPF6.3

At1g12110 264346_at ATNRT1

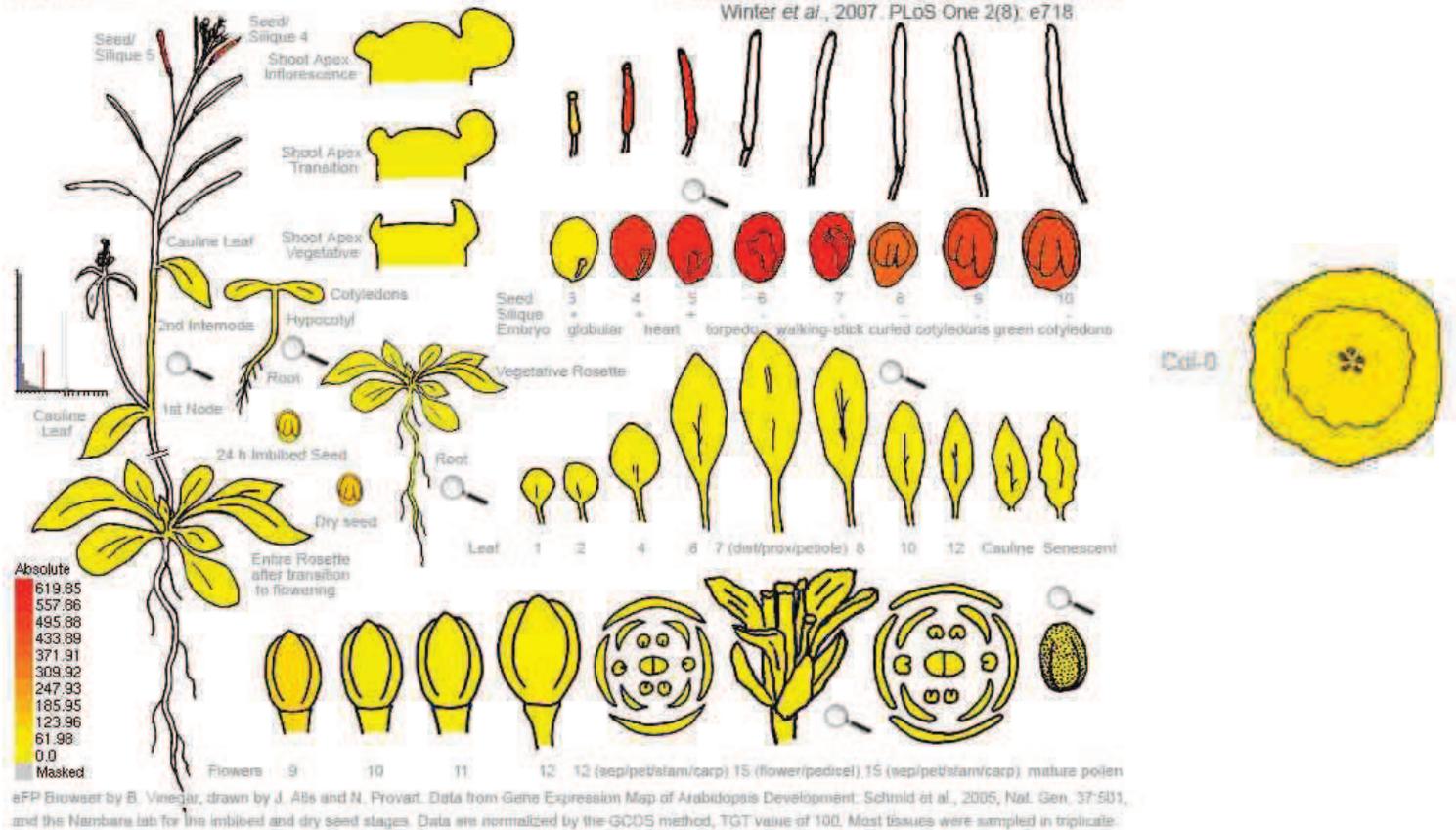
Arabidopsis eFP Browser at bar.utoronto.ca
Winter et al., 2007. PLoS One 2(8): e718



AIT3 / NPF4.1

At3g25260 257841_at

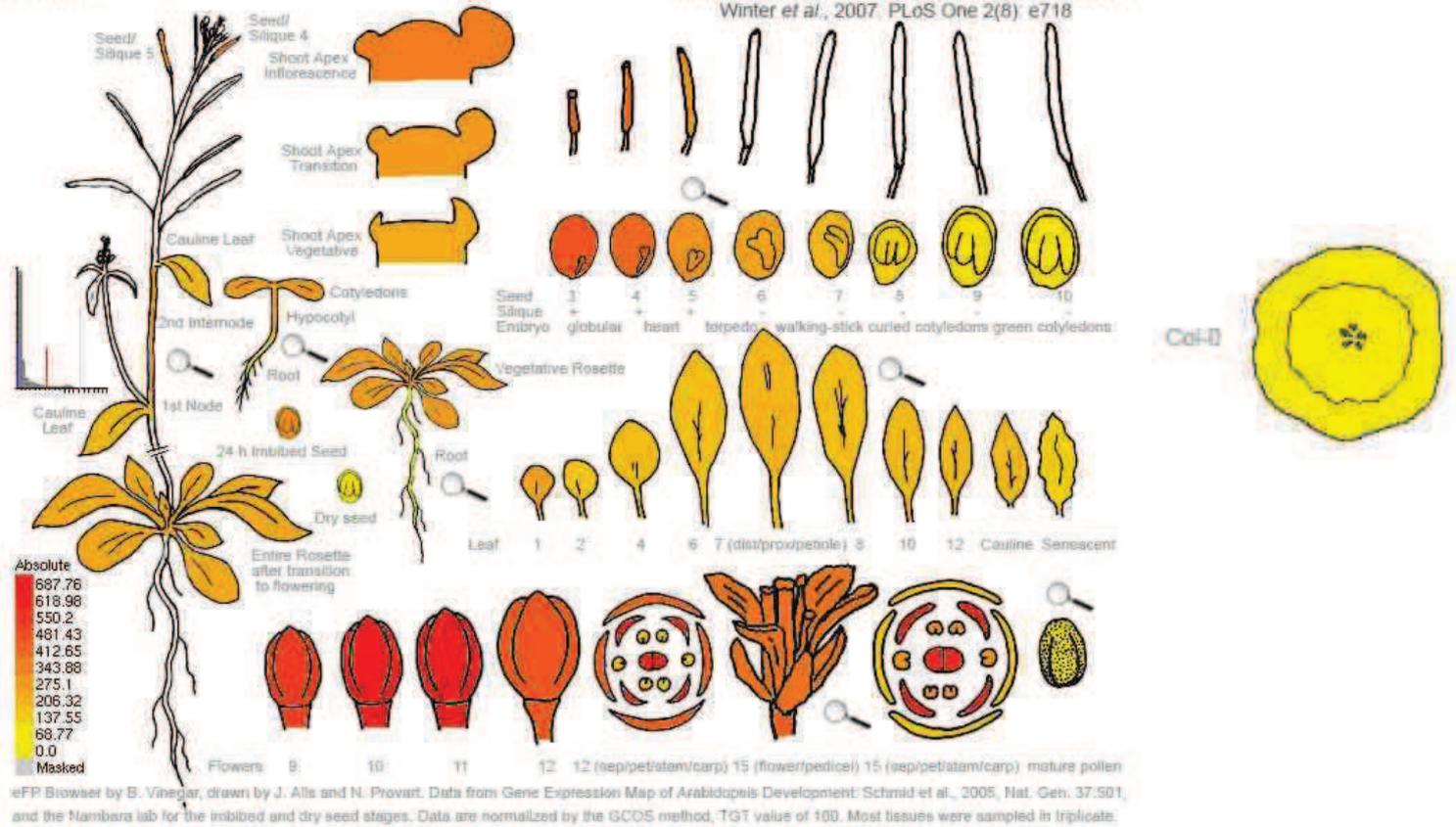
Arabidopsis eFP Browser at bar.utoronto.ca
Winter et al., 2007. PLoS One 2(8): e718



ABCg11

At1g17840 255889_at ABCG11

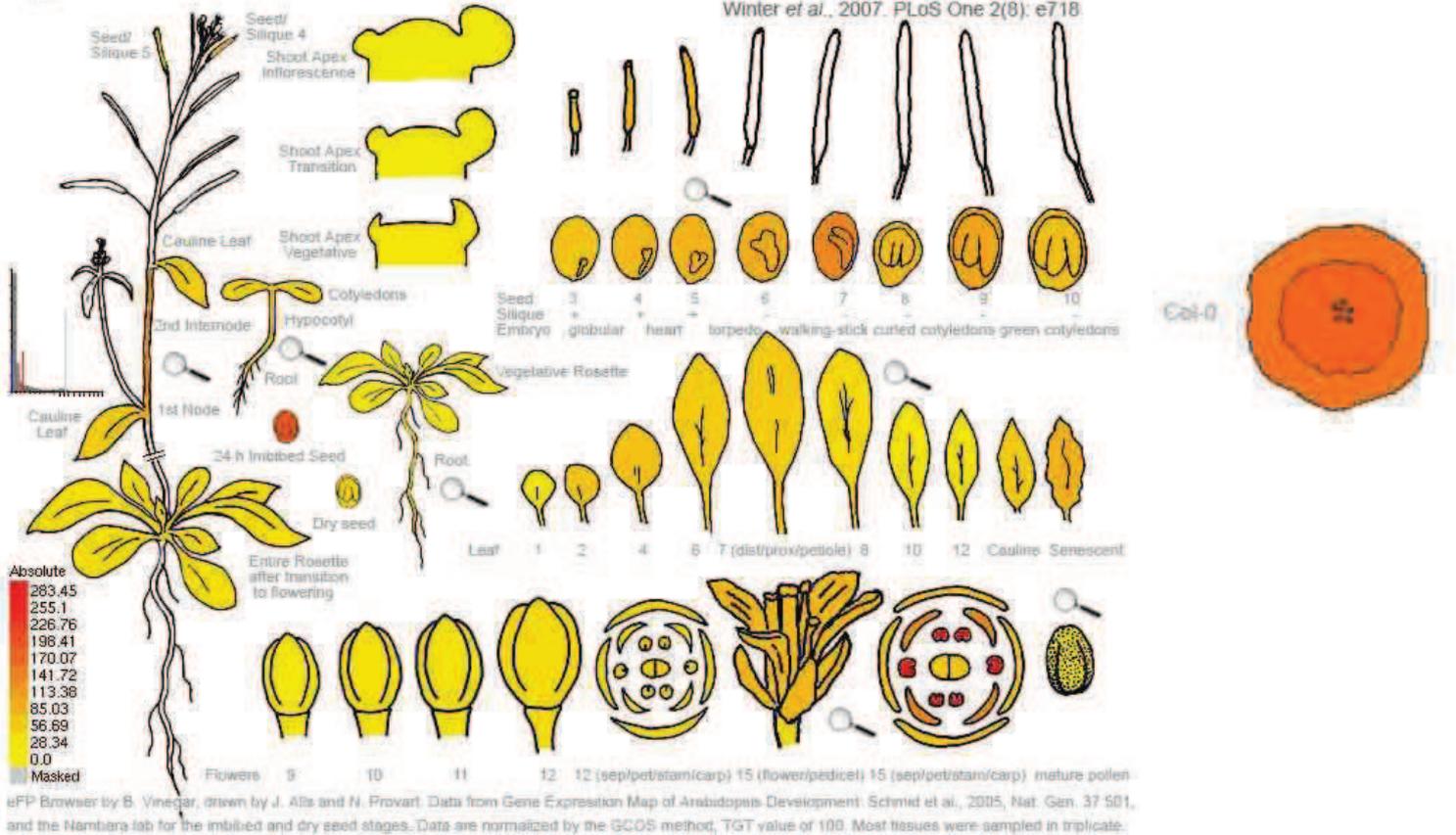
Arabidopsis eFP Browser at bar.utoronto.ca
Winter et al., 2007. PLoS One 2(8): e718



ABCg25

At1g71960 258144_at ABCG25

Arabidopsis eFP Browser at bar.utoronto.ca
Winter et al., 2007. PLoS One 2(8): e718



ABCG37

At3g53480 251942_at ABCG37

Arabidopsis eFP Browser at bar.utoronto.ca
Winter et al., 2007, PLoS One 2(8): e718

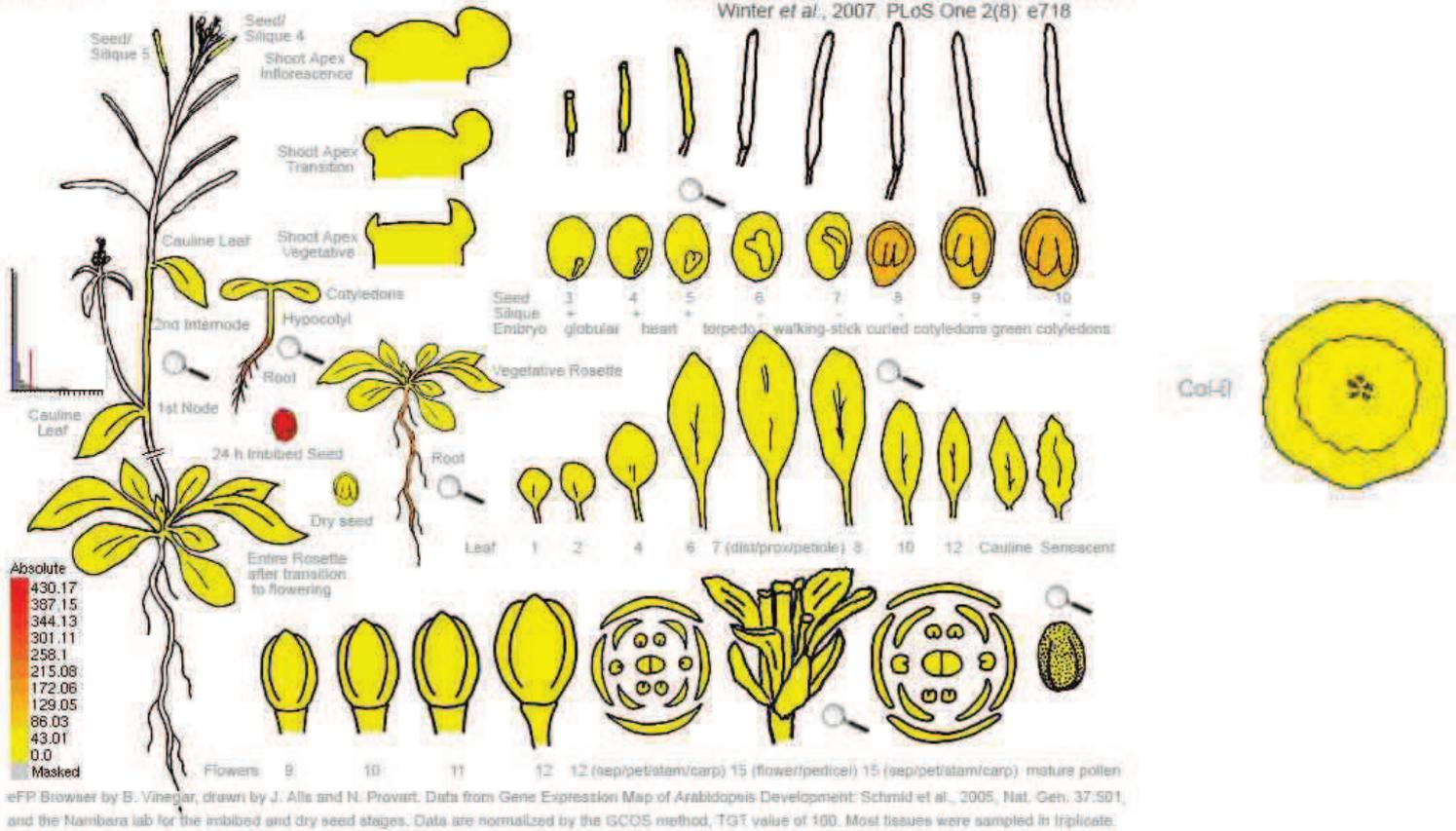


Figure 64 : Patron d'expression des 13 gènes candidats sélectionnés

Le patron d'expression des 10 transporteurs appartenant à la famille NRT1/PTR et des 3 transporteurs de la famille ABCG est présenté, à différents stades du développement de la plante:

- A gauche, la plante entière au stade floraison
- En bas, la fleur à différents stades de développement
- Au milieu à gauche, la plantule et la plante au stade rosette
- Au milieu à droite, la feuille à différents stades de développement
- En haut au milieu, le méristème apical du développement végétatif à l'inflorescence
- En haut à droite, la graine, l'embryon et les siliques à différents stades du développement
- À droite, une coupe l'hypocotyle avec le xylème au centre, et le cambium en périphérie

L'échelle de couleur représente la valeur absolue de l'expression du gène, d'une faible expression (jaune) à forte expression (rouge). Les données de transcriptomiques sont disponible sur le site <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi> et reposent sur les données publiées par Schmid et al., 2005 et Brady et al., 2007.

également disponible permettant de préciser le niveau d'expression du gène, et de pouvoir évaluer les changements d'expression à divers stade du développement de la plante, et dans certains tissus précis comme le xylème issu de coupes de tiges (figure 64).

Parmi les dix gènes candidats appartenant à la famille NRT1/PTR, quatre sont exprimés au voisinage des tissus xylémiens. Il s'agit de *NPF3.1*, *NPF4.6*, *NPF5.7* et *NPF8.3* :

- ***NPF3.1*** est un gène exprimé de façon homogène à tout stade de la vie de la plante, avec une expression maximale dans la graine sèche (922 v.a), les feuilles caulinaires (640 v.a) et inflorescences (827 v.a), et une expression plus faible au stade plantule et rosette. *NPF3.1* est également exprimé dans le xylème de la tige (292 v.a), et dans le cambium qui l'entoure (493 v.a).
- ***NPF4.6*** est fortement exprimé dans les étamines (336 v.a) et les jeunes feuilles au stade rosette (339 v.a) mais aussi dans le xylème de la tige (457 v.a) et le cambium qui l'entoure (924 v.a). Par ailleurs, son niveau d'expression est également relativement élevé au stade plantule (210 v.a).
- ***NPF5.7*** est exprimé fortement dans le xylème de la tige (575 v.a) en comparaison à son niveau d'expression dans les autres tissus. Présent à des niveaux moyens au stade plantule et au stade rosette (entre 30 et 100 v.a), il est exprimé un peu plus fortement dans la graine sèche (170 v.a), les feuilles caulinaires et sénescents (222 v.a) et les inflorescences (sépales).
- ***NPF8.3*** est exprimé de manière homogène à différents stades du développement de la plante, avec un niveau d'expression moyen (environ 200 v.a), y compris dans le xylème. Toutefois, dans la graine imbibée depuis 24h, son niveau d'expression est très élevé (1273 v.a).

Les six autres candidats de la famille NRT1/PTR présentent une expression faible dans le xylème. Il n'en reste pas moins que leur patron d'expression peut également s'avérer intéressant (figure 64) :

- ***NPF1.1*** est exprimé faiblement dans les plantules et au stade rosette (entre 62 et 130 v.a). *NPF1.1* est plus fortement exprimé après la floraison, dans la tige (653 v.a), le méristème apical (491 v.a) et les inflorescences, plus particulièrement le pédicelle (750 v.a) et le carpelle (553 v.a).
- ***NPF2.13*** présente de très hauts niveaux de transcrits dans les inflorescences, plus précisément les sépales (2199 v.a), les pétales (1409 v.a) et les étamines (1806 v.a). A

un degré moindre, *NPF2.13* est également assez fortement exprimé dans les feuilles caulines. Pour le restant des tissus, l'expression de ce gène est relativement moyenne et homogène (entre 100 et 300 v.a).

- ***NPF4.1*** (*AIT3*) s'exprime principalement dans les siliques et dans les graines à différents stades du développement de l'embryon (600 v.a). Le niveau de transcrits de *NPF4.1* dans le restant des tissus étudiés est très faible (10 à 20 v.a).
- ***NPF5.16*** est globalement faiblement exprimé *in planta*. C'est dans la racine des plantules que l'on trouve sa plus forte expression (173 v.a) mais également au stade rosette (120 v.a)
- Les plus hauts niveaux de transcrits concernant ***NPF6.1*** sont retrouvés dans les fleurs fermées (437 v.a) et dans les pétales (406 v.a). Faiblement exprimé dans le reste des tissus, *NPF6.1* s'exprime également principalement dans les parties aériennes de plantules (101 v.a) et de plantes au stade rosette (126 v.a).
- ***NPF6.3*** (*NRT1*) est exprimé fortement dans les plantules (racine 752 v.a, parties aériennes 451 v.a), dans la racine de plantes au stade rosette (896 v.a), mais également dans les feuilles caulines (842 v.a) et à un degré moindre les inflorescences (441 v.a dans les sépales et 378 v.a dans les pétales) et la rosette après la transition florale (366 v.a)

Parmi les trois transporteurs de la famille ABCG, un seul est exprimé dans les tissus xylémiens, il s'agit de ABCG25 (figure 64) :

- ***ABCG25*** est exprimé dans la graine imbibée pendant 24h (199 v.a), mais plus faiblement dans les plantules (46 v.a). De façon intéressante ce gène s'exprime également principalement dans la racine de plantes au stade rosette (56 v.a), présentant une expression plus faible dans les parties aériennes (14 v.a). A des stades plus avancés, on retrouve les plus hauts niveaux de transcrits dans la tige (137 v.a), les étamines des inflorescences (283 v.a). On le retrouve également exprimé dans le xylème (134 v.a).
- ***ABCG11*** présente des niveaux de transcrits relativement élevés à tout stade du développement de la plante. Au stade plantule et au stade rosette, ce sont les parties aériennes dans lesquelles *ABCG11* s'exprime majoritairement (270 v.a contre 24 v.a dans les racines). Et c'est dans les inflorescences que l'expression est la plus forte, dans les fleurs fermées (687 v.a), les pétales (641 v.a) et le carpelle (612 v.a).
- ***ABCG37***, est exprimé dans les racines de plantules (304 v.a) et de plantes au stade rosette (230 v.a) ainsi que dans les graines imbibées depuis 24h (430 v.a).

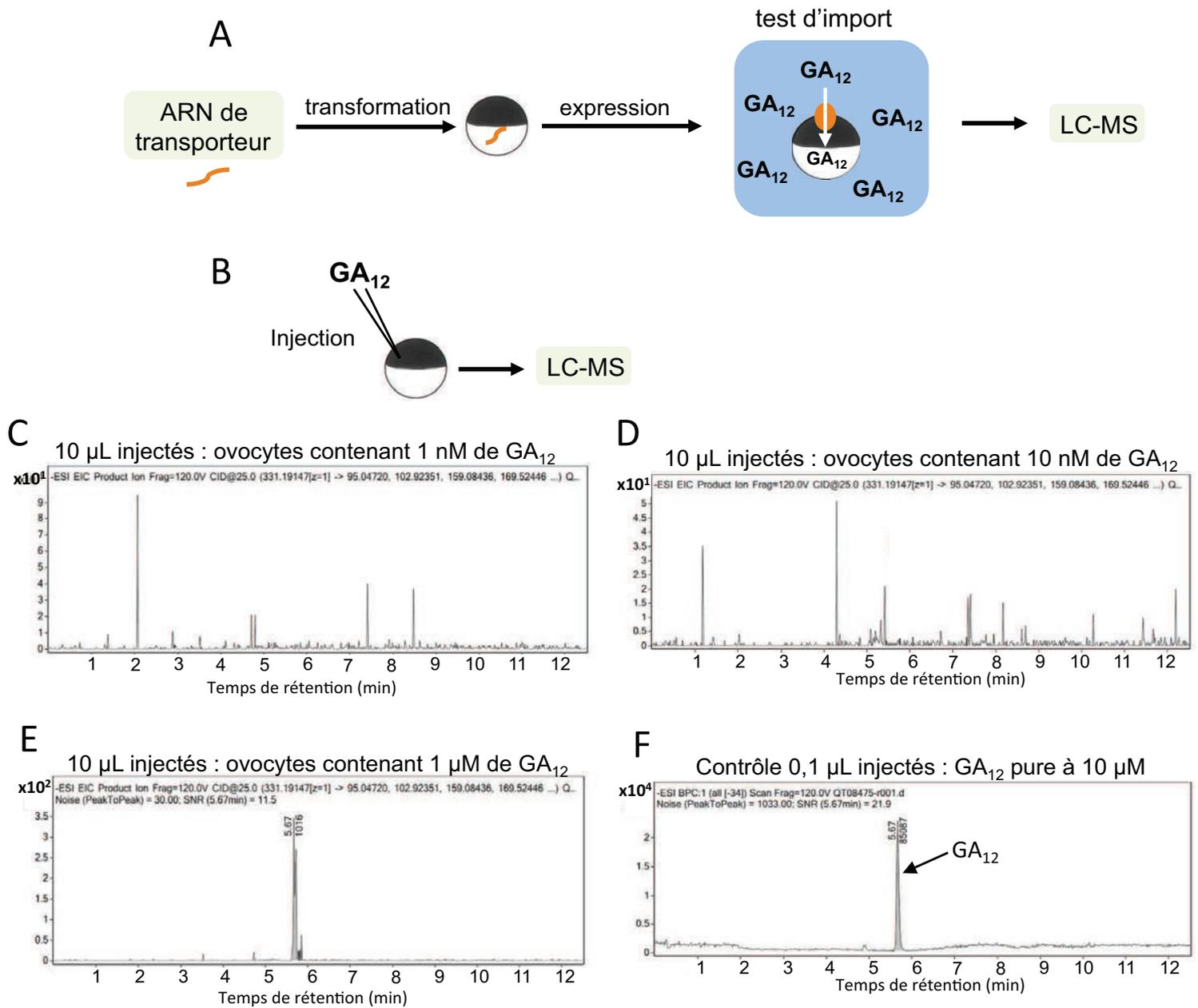


Figure 65 : Test d'import de GA₁₂ dans des ovocytes de xénope

(A) Principe du test d'import : l'ARN de transporteurs sélectionnés (en orange) est injecté dans des ovocytes de xénope. Après expression des transporteurs, la capacité d'import de GA₁₂ est évaluée en incubant les ovocytes dans une solution contenant une concentration déterminée de GA₁₂. Les ovocytes sont broyés et analysés par LC-MS. (B-F) Evaluation de la sensibilité du spectromètre de masse (LC-UV-MS/MS, Agilent 1200). (B) Une gamme de concentration croissante de GA₁₂ (1 nM / 10 nM / 1 μ M) est injectée dans les ovocytes, puis analysée par LC-MS. (C-E) Résultats de l'injection de 10 μ L de broyat de 3 ovocytes préalablement infiltrés avec 1 nM (C), 10 nM (D) ou 1 μ M (E) de GA₁₂. L'ordonnée représente l'intensité relative au pic le plus abondant, et l'abscisse le temps de rétention (en minutes). (F) Injection contrôle de 0,1 μ L de GA₁₂ pure à une concentration de 10 μ M. ESI = source d'ionisation par électrospray ; BPC = Base Peak Chromatogram, représente l'ensemble des ions identifiés ; EIC = Extracted Ion Chromatogram, où le spectromètre se focalise sur un seul ion extrait du BPC, ici la GA₁₂.

Sur l'ensemble des 13 gènes candidats sélectionnés, 5 présentent un patron d'expression au niveau des tissus xylémiens. Une telle localisation est intéressante, la GA₁₂ étant mobilisée à travers les tissus vasculaires. Toutefois, cette observation n'exclue pas les 8 autres gènes sélectionnés, d'autant plus qu'aucune donnée n'est disponible concernant les tissus phloémiens.

2.2.3.3 Expression hétérologue des transporteurs

Afin de déterminer si l'un ou plusieurs des 13 transporteurs préalablement sélectionnés est impliqué dans le transport de GA₁₂, la détermination de leurs propriétés fonctionnelles a été entreprise par des expressions en système d'expression hétérologue couplées à des tests d'import de GA₁₂, mais également de GA₃ bioactive. L'étude a été en premier lieu focalisée sur les candidats présélectionnés de la famille des NRT1/PTR, au nombre de 10. De plus, NPF4.1/AIT3 ayant déjà été caractérisé comme transporteur de GA₃ par ces approches, il constitue un contrôle utile.

Expression hétérologue dans des ovocytes de Xénope :

Cette première approche a été réalisée en collaboration avec l'équipe d'Alain Gojon à Montpellier (BPMP). Le *Xenopus laevis* est un amphibien appartenant à l'ordre des anoures et à la famille des pipidés dont les ovocytes sont couramment utilisés pour l'expression d'ARN exogènes. Leur diamètre (1mm) est idéal pour l'injection de substances et leur manipulation. Leurs conductances endogènes sont faibles, et ces ovocytes possèdent toute la machinerie moléculaire nécessaire à la traduction d'ARN ou d'ADNc injectés. Ils peuvent également effectuer certaines modifications post-traductionnelles sur les protéines ainsi exprimées (Goldin, 2006). Ces ovocytes constituent par conséquent un excellent système d'expression hétérologue utilisable pour l'étude des 13 transporteurs à tester. Le but est donc d'exprimer *in-vivo* et individuellement chaque transporteur dans un ovocyte, et de réaliser un test d'import utilisant la GA₃ et la GA₁₂. La GA₃ est un contrôle permettant de valider la stratégie, AIT3 ayant été caractérisé comme transporteur de cette forme (Kanno et al., 2012). Ainsi, les candidats appartenant à la famille des NRT1/PTR ont été analysés en premier lieu.

L'échelle de grandeur estimée concernant la concentration en GA retrouvée dans le cadre de tests d'import dans les ovocytes est de l'ordre du nanomolaire. Une gamme étalon a été réalisée afin de déterminer au préalable si la sensibilité de l'appareil (LC-UV-MS/MS, Agilent 1200) est adaptée à cette analyse en mode MS et en mode MS/MS (figures 65B-F). Ainsi, des concentrations allant de 1 nM à 1 µM de GA₁₂ et de GA₃ ont été injectées *in vivo* dans

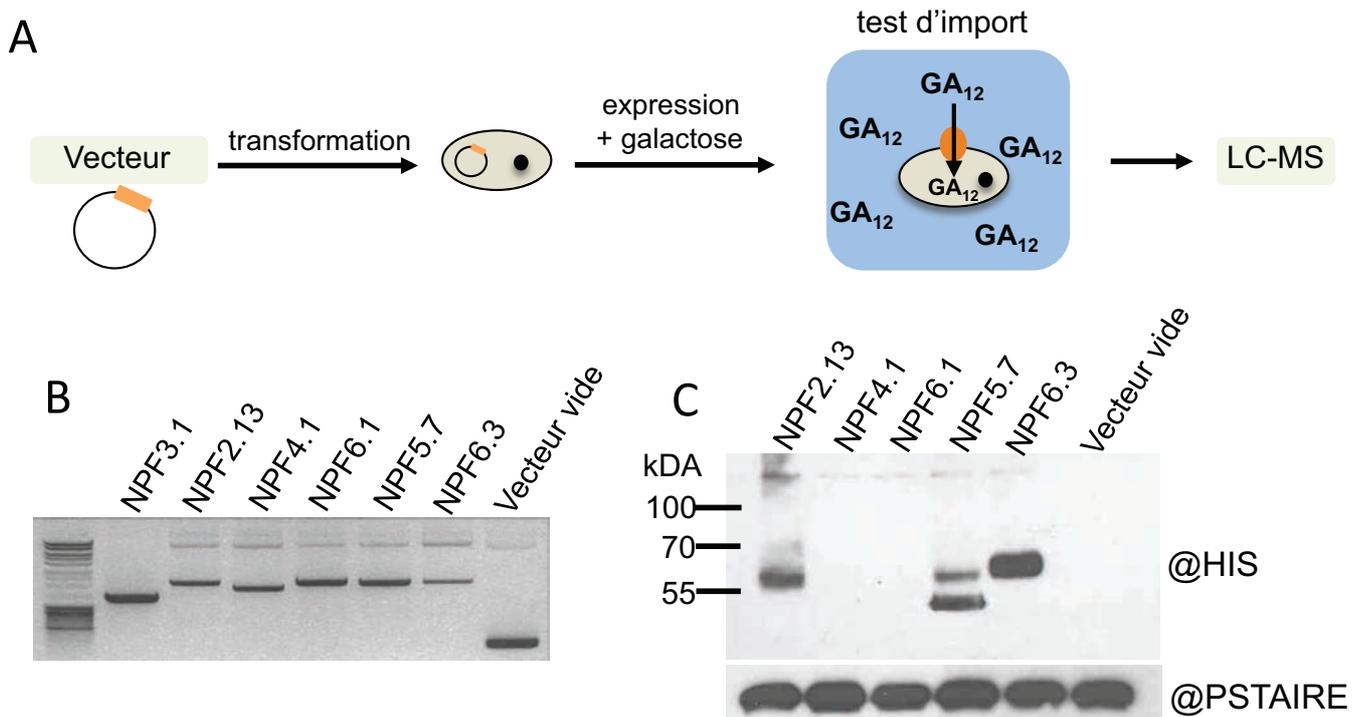


Figure 66 : Expression hétérologue des transporteurs sélectionnés en levure

(A) Schéma conducteur de l'analyse des tests d'import chez la levure. Les gènes des transporteurs candidats (en orange) sont clonés dans le vecteur d'expression en levure pYEDP60, fusionnés à une étiquette 6 histidines, et conduits par un promoteur inducible au galactose. **(B)** Vérification par PCR de l'insertion des gènes candidats dans le vecteur d'expression pYEDP60. **(C)** Expression des gènes candidats en levure déterminée par western-blot (anticorps anti-histidine) après induction au galactose. Une signal est détectée aux tailles attendues pour NPF2.13 (68,4 kDA), NPF5.7 (67,1 kDA) et NRT1.1 (67,9 kDA). L'anticorps anti-PSTAIRES est utilisé comme contrôle de charge.

les ovocytes, analysés ensuite par LC-MS. La GA₁₂ pure injectée à raison de 0,1 µL d'une concentration de 10 µM donne un pic correspondant à un temps de rétention de 5,67 min et une aire de 85087 (figure 65F). L'injection de 10 µL résultant du broyat de 3 ovocytes contenant 1 µM de GA₁₂ permet de détecter cette molécule, un pic correspondant à la GA₁₂ étant observé à un temps de rétention de 5,67min, avec une aire de 1016 (figure 65E). A l'inverse, la GA₁₂ n'est pas détectée dans des broyats d'ovocytes contenant 10 et 1 nM de GA₁₂ (figures 65C et D). Le seuil de détection de la GA₁₂ observé pour cette expérience est par conséquent supérieur à 10 nM. Par conséquent, la LC-MS à notre disposition n'est pas assez sensible pour déceler la GA₁₂ importée dans les ovocytes.

L'analyse des tests d'import de la GA₁₂ par expression hétérologue dans des ovocytes de xénope s'effectue selon la méthode schématisée en figure 65A. Pour cela, les ARN spécifiques provenant d'une collection déjà établie (Equipe de Alain Gojon, Montpellier) et correspondant aux 10 NRT1/PTR sélectionnés sont injectés dans les ovocytes 48h avant les tests d'import à l'aide d'un micro-injecteur. Les tests d'import consistent ensuite à incuber les ovocytes injectés (24 par transporteur) dans une solution contenant la GA₁₂ (10 µM) ou la GA₃ (10 µM) pendant 30 min suivie de 3 lavages, afin d'éliminer tout résidu de l'hormone à l'extérieur des ovocytes. Il s'agit d'un protocole standard utilisé pour les hormones (Yang et al., 2006). En parallèle, des ovocytes non-transformés, servant de contrôles négatifs dans l'expérience, sont également incubés dans ces mêmes solutions contenant la GA₁₂ ou la GA₃. Les ovocytes sont ensuite broyés dans une solution de méthanol 80% et analysés par LC-MS (en collaboration avec Patrick Wehrung, Faculté de Pharmacie, Illkirch) pour rechercher de la GA₁₂ ou de la GA₃ éventuellement importée. L'ensemble de ces échantillons n'a pas encore été analysé et nous recherchons activement une plateforme adaptée pour cette étude.

Clonage et expression hétérologue en levure :

En parallèle de l'expression hétérologue dans les ovocytes de xénope, les transporteurs sélectionnés ont également été clonés et exprimés en levure. La famille NRT1/PTR, a été analysée en premier, AIT3, caractérisé comme transporteur de GA₃ par un système d'expression hétérologue en levure, étant utilisé comme contrôle. De plus, les transporteurs ABCG sont présents de façon endogène dans la levure (au nombre de 9), ce qui nécessite l'utilisation d'une souche mutée pour ces derniers dans le cadre des tests d'import. A l'aide d'amorces spécifiques les gènes candidats (*NPF3.1*, *NPF2.13*, *NPF4.1*, *NPF6.1*, *NPF5.7* et *NPF6.3*) ont été amplifiés, puis clonés dans le vecteur d'expression en levure pYEDP60 (figure 66A). *NPF3.1* n'étant pas observé à la taille attendue lors de la vérification de

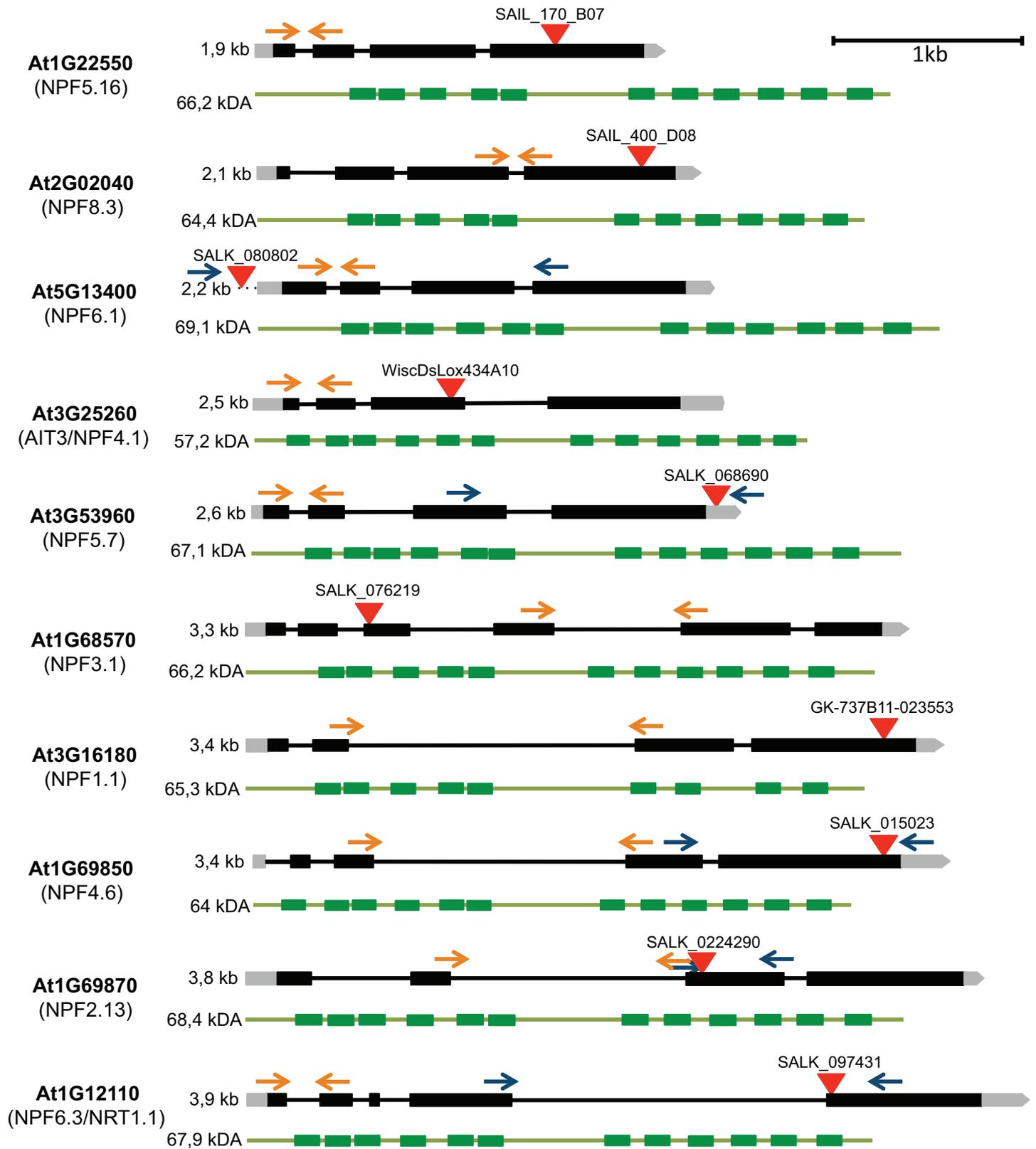


Figure 67A : Représentation schématique des transporteurs de la famille NRT1/PTR sélectionnés

Les transporteurs sélectionnés (gènes et protéines) sont représentés schématiquement de la façon suivante : boîte noire = exon, tiret = intron, triangle rouge = insertion T-DNA, boîte grise = région 5' et 3' UTR, flèches oranges = amorces utilisées pour la RT-qPCR, flèches bleues = amorces utilisées pour le génotypage, boîtes vertes = domaines transmembranaires. Le numéro d'accèsion, la taille du gène (kb) et de la protéine (kDa) sont indiqués. Les données structurales et génétique sont issues de la base de donnée <http://www.arabidopsis.org/>, et les informations concernant le nombre de domaines transmembranaires correspondent à des prédictions d'après la base de donnée <http://aramemnon.uni-koeln.de/>.

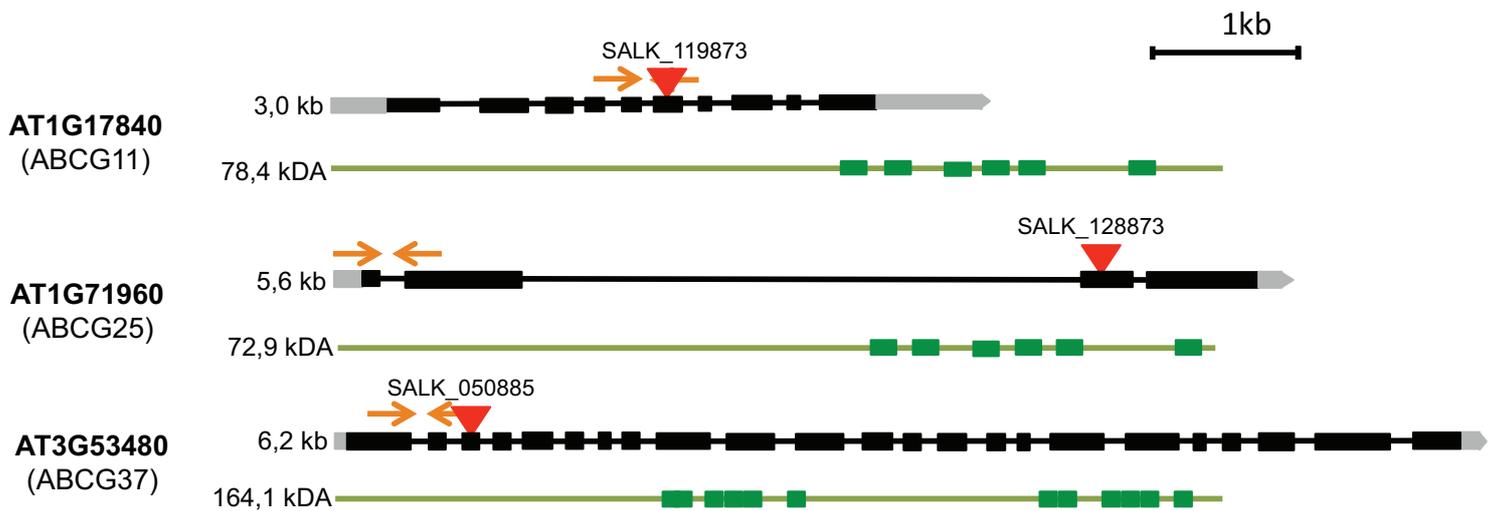


Figure 67B : Représentation schématique des transporteurs de la famille ABCG sélectionnés

Les transporteurs sélectionnés (gènes et protéines) sont représentés schématiquement de la façon suivante : boîte noire = exon, tiret = intron, triangle rouge = insertion T-DNA, boîte grise = région 5' et 3' UTR, flèches oranges = amorces utilisées pour la RT-qPCR, flèches bleues = amorces utilisées pour le génotypage, boîtes vertes = domaines transmembranaires. Le numéro d'accèsion, la taille du gène (kb) et de la protéine (kDa) sont indiqués. Les données structurales et génétiques sont issues de la base de donnée <http://www.arabidopsis.org/>, et les informations concernant le nombre de domaines transmembranaires correspondent à des prédictions d'après la base de donnée <http://aramemnon.uni-koeln.de/>.

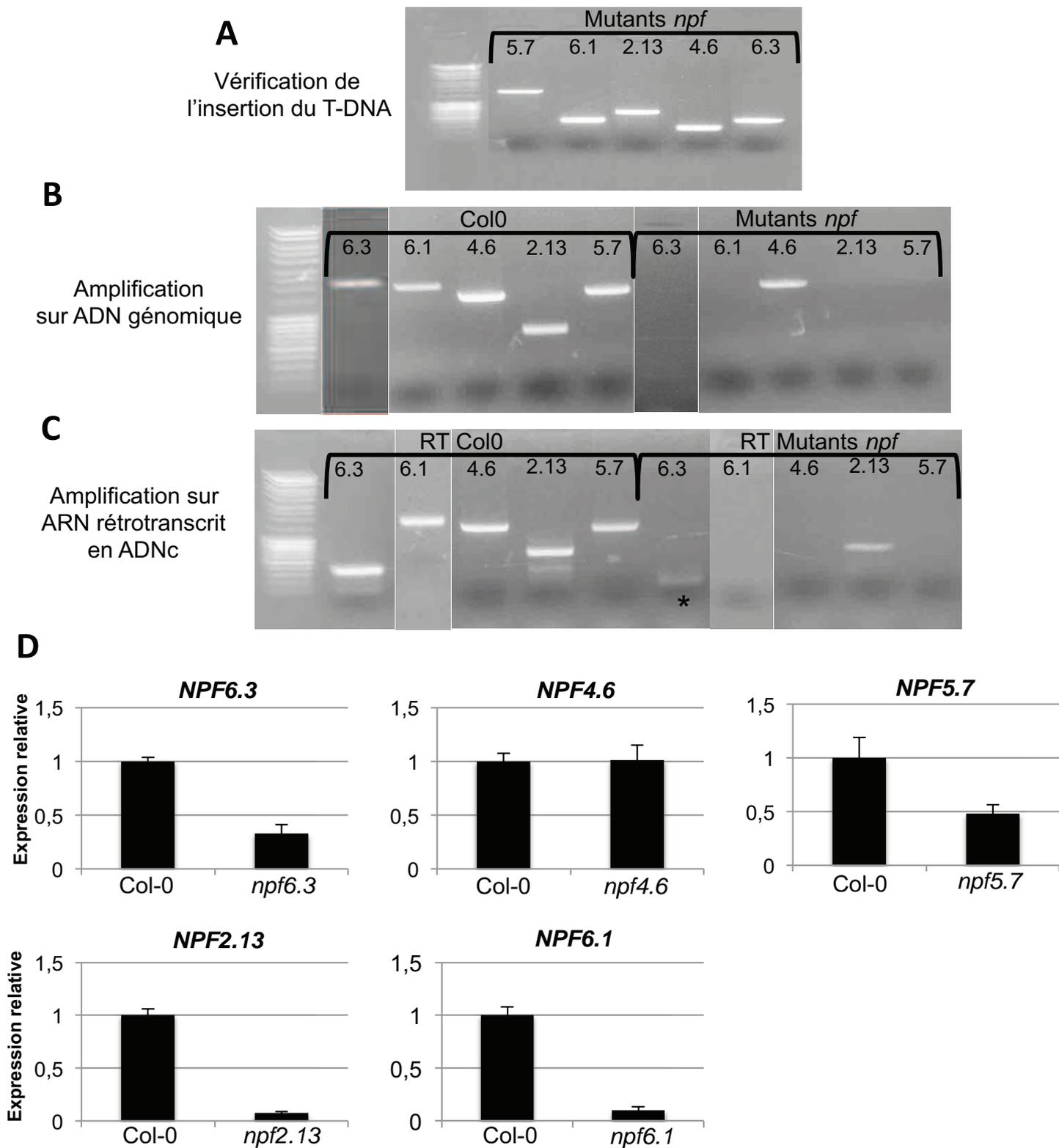


Figure 68 : Validation génétique des mutants correspondant aux transporteurs sélectionnés

Analyse des mutants d'insertion *npf2.13*, *npf4.6*, *npf5.7*, *npf6.1* et *npf6.3* (A) Vérification par PCR de la présence d'un insert T-DNA dans les gènes des mutants correspondants à l'aide d'amorces spécifiques. (B) Amplification par PCR des 5 gènes candidats à partir d'ADN génomique issu de plantes sauvages (Col-0) et mutées (*npf*). (C) Amplification par PCR des 5 gènes candidats à partir d'ADNc issu d'ARN rétrotranscrits de plantes sauvages (Col-0) et mutées (*npf*). (D) Analyse du niveau d'expression relative des gènes candidats dans leur mutant respectif en comparaison à la plante sauvage (Col-0) par RT-PCR quantitative. L'erreur standard (moyenne de trois réplicats techniques) est indiquée pour chaque analyse, et l'expérience a été répétée deux fois avec des résultats similaires. (6.3 = *NPF6.3*, 6.1 = *NPF6.1*, 4.6 = *NPF4.6*, 2.13 = *NPF2.13*, 5.7 = *NPF5.7*, * = amplification aspécifique)

l'insertion dans le vecteur d'expression (1,5 kb au lieu de 2,0 kb), sa transformation en levure a été écartée (figure 66B). La souche de levure WAT11 a été transformée avec les 5 transporteurs restant, et leur expression dans ce système hétérologue a été vérifiée par western-blot en utilisant un anticorps anti-HIS (figure 66C). Les transporteurs NPF2.13, NPF5.7 et NPF6.3 s'expriment en levure, fortement pour NPF6.3, et plus faiblement avec un probable produit de dégradation pour NPF5.7. Ces trois transporteurs sont prêts à faire l'objet d'un test d'import de GA₁₂ en suivant le même protocole que celui décrit par Kanno et al., 2012.

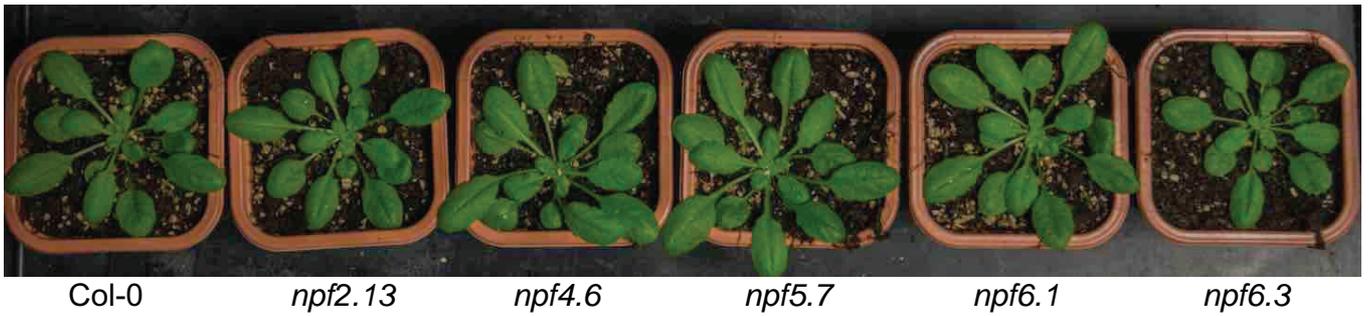
Les difficultés des dosages rencontrées lors des expériences d'expression hétérologue ne permettent pas de tester les différents candidats par cette stratégie. L'utilisation d'une GA₁₂ radioactive (³H-GA₁₂ ou ¹⁴C-GA₁₂) pourrait éventuellement faciliter cette analyse.

2.2.3.4 Vérification des mutants d'insertion des transporteurs sélectionnés chez *Arabidopsis*

Afin de corrélérer un phénotype éventuel avec une déficience dans le transport de GA₁₂, une approche de génétique inverse a débutée au laboratoire. Les mutants d'insertions des 13 transporteurs putatifs ont été commandés auprès du NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre) en privilégiant autant que possible les insertions T-DNA dans les exons en milieu de gène (figures 67A et 67B). Après vérification auprès du NASC, cinq sont déjà disponibles à l'état homozygote et prêt à être étudiés, il s'agit de *npf2.13* (SALK_022429), *npf4.6* (SALK_015023), *npf5.7* (SALK_068690), *npf6.1* (SALK_080802), et *npf6.3* (SALK_097431).

Afin de vérifier que les différences d'expressions observées sont bien liées à la présence d'une insertion T-DNA chez ces mutants, des analyses PCR à partir ADN génomique (ADNg) et d'ADN rétrotranscrit ont été réalisées (figures 68A, B et C). L'insertion du T-DNA à l'endroit prévu a été confirmée à l'aide d'amorces sens spécifiques dans le gène concerné et anti-sens dans le T-DNA. Ainsi, les 5 mutants analysés présentent bien une telle insertion (figures 67A et 68A). Par l'utilisation d'amorces situées de part et d'autre du T-DNA, chaque gène a pu être amplifié dans un fond génétique sauvage (figure 67A et 68B). A l'inverse, dans le fond génétique de leurs mutants respectifs, l'amplification de ces gènes n'a pas fonctionné, confirmant une nouvelle fois la présence d'un T-DNA à l'état homozygote, à l'exception du mutant *npf4.6* (figure 67A et 68B). A partir d'ADN rétrotranscrit, l'ensemble des gènes a pu être amplifié dans le fond génétique Col-0, et seul *NPF2.13* présente une légère amplification dans son mutant respectif (Figure 67A et 68C).

A



B

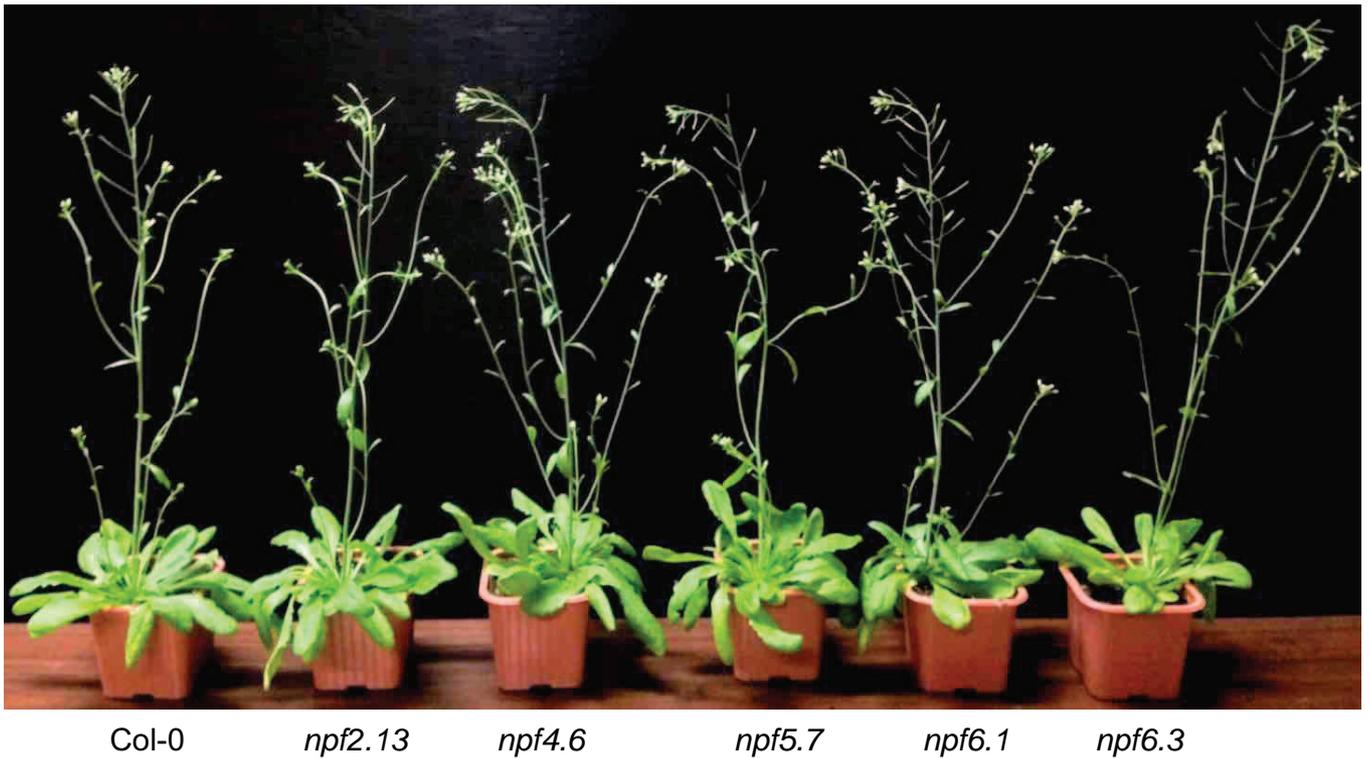


Figure 69 : Phénotype des mutants *nrt1/ptr* sélectionnés

Phénotypes des mutants d'insertion (T-DNA) *npf2.13*, *npf4.6*, *npf5.7*, *npf6.1* et *npf6.3* en comparaison à la plante sauvage Col-0 à 25 jours (A) et à 40 jours (B) de croissance.

Tableau 4. Paramètres phénotypiques des différents mutants. Les mesures représentent la moyenne \pm l'erreur standard (n=8). Le diamètre de la rosette a été mesuré sur des plantes âgées de 50 jours. Le nombre de feuilles a été déterminé après la floraison.

Mutant	Diamètre de la rosette (cm)	Nombre de feuilles rosettes	Hauteur (cm)
Col-0	12.81 \pm 0.23	11.25 \pm 0.16	45.2 \pm 0.64
<i>npf2.13</i>	12.68 \pm 0.37	11.37 \pm 0.32	46.5 \pm 0.94
<i>npf4.6</i>	12.12 \pm 0.38	11.37 \pm 0.18	45.4 \pm 0.53
<i>npf5.7</i>	12.43 \pm 0.42	11.75 \pm 0.25	46.1 \pm 0.47
<i>npf6.1</i>	12.06 \pm 0.25	12.25 \pm 0.31	45.8 \pm 0.75
<i>npf6.3</i>	12.12 \pm 0.94	11.25 \pm 0.16	45.3 \pm 0.70

Pour valider ces lignées mutantes, le niveau d'expression du gène ciblé par le T-DNA dans le mutant et dans la plante sauvage Col-0 a été quantifié par qRT-PCR (figure 68D). *NPF2.13* et *NPF6.1* présentent une très forte réduction d'expression dans leurs mutants respectifs. Les niveaux de transcrits de *NPF6.3* et *NPF5.7* sont également réduits, mais moins fortement dans les mutants *npf6.3* et *npf5.7*. Enfin, aucune différence d'expression n'est observée pour *NPF4.6* entre la plante sauvage et le mutant *npf4.6*. Les données de RT-qPCR ne montrent aucune variation entre l'expression de *NPF4.6* dans Col-0 et dans le mutant *npf4.6*. Ce gène est également amplifié sur l'ADN génomique du mutant *npf4.6*. Cependant, l'insertion du T-DNA est présente, suggérant que ce mutant est encore à l'état hétérozygote. En résumé, sur les 5 mutants déjà disponibles à l'état homozygote, 4 présentent une réduction d'expression. Les 8 autres mutants commandés et encore à l'état hétérozygote sont en cours de sélection.

2.2.3.5 Phénotype des mutants d'insertion (résultats préliminaires)

Les mutants précédemment vérifiés (3.2.3.4) ont été repiqués en terre et placés en culture dans les serres de l'IBMP sous une photopériode de 16h lumière / 8h obscurité (21°C/17°C). Trois paramètres phénotypiques contrôlés par les GA ont été mesurés : la hauteur finale de la plante, le diamètre de la rosette (à 50 jours), et le temps de floraison (représenté par le nombre de feuilles lors de l'induction florale). En effet, si l'un des transporteurs candidats mobilise effectivement la GA₁₂, il est possible qu'une plante présentant une mutation pour ce transporteur, le rendant non-fonctionnel, soit affectée dans l'un de ces trois paramètres.

D'une façon générale, les cinq mutants étudiés (*npf2.13*, *npf4.6*, *npf5.7*, *npf6.1* et *npf6.3*) présentent un phénotype identique à celui d'une plante sauvage Col-0 (figure 69, tableau 4). Le nombre de plantes est inférieur à 10 pour chaque génotype, très peu de graines ayant été reçues par le NASC. Il s'agit par conséquent d'un résultat préliminaire et l'expérience doit être répétée avec une population plus grande. Il serait toutefois intéressant de traiter ces plantes avec un inhibiteur de GA comme le paclobutrazol, afin d'étudier si l'un de ces mutants présente une hypersensibilité à cette application, soulignant un lien avec les GA.

2.2.3.6 Expériences de micro-greffes (résultats préliminaires)

Dans le but d'étudier un éventuel transport de GA₁₂ par *NPF2.13*, *NPF4.6*, *NPF5.7*, *NPF6.1* et/ou *NPF6.3*, différentes combinaisons de micro-greffes ont été réalisées. Il s'agit dans cette

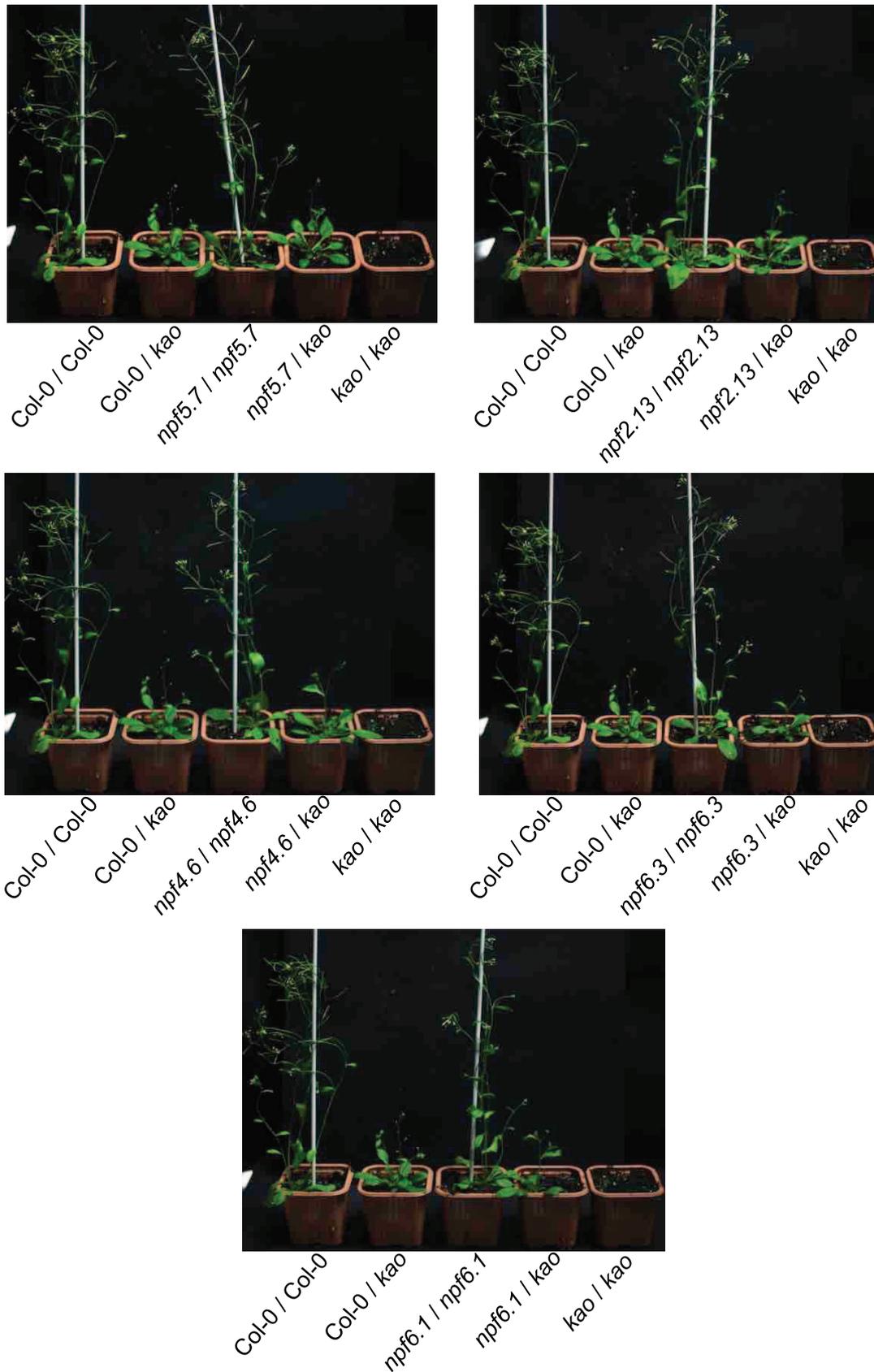


Figure 70 : Recherche d'un transporteur de GA_{12} par des expériences de micro-greffes

Pour ces expériences, les mutants *npf* sont utilisés comme porte-greffe (donneur de GA_{12}) et le mutant *kao1 kao2* comme greffon (receveur de GA_{12}). Les greffes sont effectuées sur des plantules âgées de 7 jours, puis repiquées en terre (16h de lumière à $90 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ / 8h d'obscurité; 22°C). Les photographies sont prises à 5 semaines après le repiquage des plantes en terre et sont représentatives de 8 plantes greffées. (*kao* = *kao1 kao2*).

expérience de comparer la restauration de croissance d'un greffon *kao1 kao2* lorsque celui-ci est greffé sur un porte-greffe Col-0, ou sur un mutant « *npf* » (*npf2.13*, *npf4.6*, *npf5.7*, *npf6.1* ou *npf6.3*). En effet, le transport de GA₁₂ est potentiellement affecté dans les racines des combinaisons où le porte-greffe est un mutant *npf*, et il est possible que la restauration de croissance du greffon observée pour une greffe *npf / kao1 kao2* soit réduite par rapport à une greffe Col-0 / *kao1 kao2*. Ainsi, la hauteur de la plante, le diamètre de la rosette (à 40 jours), et le temps de floraison (représenté par le nombre de feuilles lors de l'induction florale) ont été mesurés sur ces combinaisons. Des greffes contrôles Col-0 / Col-0, *kao1 kao2 / kao1 kao2*, et *npf / npf* ont également été réalisées.

D'une façon générale, la croissance du greffon est équivalente quelque soit le porte-greffe (Col-0 ou *npf*) (figure 70 ; tableau 5). Le diamètre de la rosette est de 8,21 cm en moyenne pour la greffe Col-0 / *kao1 kao2*, et de respectivement 8,35, 8,00, 8,07, 8,07, et 8,00 cm pour les combinaisons où le porte-greffe est *npf2.13*, *npf4.6*, *npf5.7*, *npf6.1* et *npf6.3*. De même, la greffe Col-0 / *kao1 kao2* présente 8,5 feuilles en moyenne au moment de l'induction florale, pour respectivement 8,5, 8,58, 8,33, 8,34 et 8,58 feuilles concernant les combinaisons où le porte-greffe est *npf2.13*, *npf4.6*, *npf5.7*, *npf6.1* et *npf6.3*. Enfin, la hauteur de la plante à 40 jours est de 15,1 cm en moyenne pour la greffe Col-0 / *kao1 kao2*, et de respectivement 14,6, 15,1, 14,0, 14,3, et 14,3 cm pour les combinaisons où le porte-greffe est *npf2.13*, *npf4.6*, *npf5.7*, *npf6.1* et *npf6.3*. Par ailleurs, aucune différence significative n'est observée entre les greffes *npf / npf* et la greffe Col-0 / Col-0, confirmant par ailleurs les phénotypes des mutants observés précédemment (3.2.1.4). Cependant, ces résultats sont préliminaires, le nombre de microgreffes réalisées est faible et cette expérience doit être répétée avec une population de microgreffes plus grande.

Par cette méthode, aucun transporteur de GA₁₂ parmi les cinq mutant testés n'a pu être identifié. Toutefois, cela ne signifie pas que *NPF2.13*, *NPF4.6*, *NPF5.7*, *NPF6.1* et/ou *NPF6.3* ne transporte(nt) pas de GA₁₂. En effet, la redondance fonctionnelle d'un transporteur de GA₁₂ est possible chez *Arabidopsis* et l'inactivation d'un transporteur est alors compensée par un autre. Si tel est le cas, il est difficile par cette approche d'identifier un transporteur de GA₁₂.

3. 1 Discussion

Le transport des principales classes de phytohormones commence désormais à être largement étudié. La plus détaillée, l'auxine, est mobilisée de façon polarisée à travers la membrane plasmique par des transporteurs sélectifs. Les transporteurs d'influx qui

Tableau 5. Paramètres phénotypiques des plantes greffées pour les combinaisons indiquées Les mesures représentent la moyenne \pm l'erreur standard (n=7). Le diamètre de la rosette a été mesuré sur des plantes âgées de 40 jours. Le nombre de feuilles a été déterminé après la floraison.

Greffes	Diamètre de la rosette (cm)	Nombre de feuilles rosettes	Hauteur (cm)
Col-0 / Col-0	9.07 \pm 0.31	10.10 \pm 0.40	36.0 \pm 1.31
<i>kao1 kao2 / kao1 kao2</i>	1.77 \pm 0.09	n.d	0.48 \pm 0.04
<i>npf2.13 / npf2.13</i>	9.64 \pm 0.30	9.42 \pm 0.78	36.5 \pm 0.99
<i>npf4.6 / npf4.6</i>	9.57 \pm 0.22	9.28 \pm 0.74	36.5 \pm 0.88
<i>npf5.7 / npf5.7</i>	9.14 \pm 0.35	10.10 \pm 0.30	35.3 \pm 0.80
<i>npf6.1 / npf6.1</i>	9.07 \pm 0.22	10.08 \pm 0.32	36.5 \pm 0.56
<i>npf6.3 / npf6.3</i>	9.21 \pm 0.30	9.66 \pm 0.33	36.3 \pm 0.95
Col-0 / <i>kao1 kao2</i>	8.21 \pm 0.26	8.50 \pm 0.34	15.1 \pm 0.70
<i>npf2.13 / kao1 kao2</i>	8.35 \pm 0.28	8.50 \pm 0.34	14.6 \pm 0.55
<i>npf4.6 / kao1 kao2</i>	8.00 \pm 0.32	8.58 \pm 0.37	15.1 \pm 0.54
<i>npf5.7 / kao1 kao2</i>	8.07 \pm 0.47	8.33 \pm 0.21	14.0 \pm 0.63
<i>npf6.1 / kao1 kao2</i>	8.07 \pm 0.36	8.33 \pm 0.33	14.3 \pm 0.66
<i>npf6.3 / kao1 kao2</i>	8.00 \pm 0.32	8.58 \pm 0.55	14.3 \pm 0.84

contrôlent l'entrée de l'auxine dans la cellule appartiennent à une famille de perméases nommée AUX1/LAX (auxin resistant 1 / like aux1) (Bennett et al., 1996). On ne retrouve pas ces transporteurs dans toutes les cellules et ils semblent être associés à la fois au chargement de l'auxine vers le phloème, mais également à des redistributions localisées de l'hormone nécessaires à la croissance et au développement des plantes (Yang et al., 2006). Les transporteurs d'efflux appartiennent à plusieurs types de protéines dont les PIN (PIN-FORMED) localisés de façon polaire sur la membrane plasmique afin d'orienter le flux d'auxine, mais également certains MDR (MultiDrug Resistant) et les ABC qui eux ne sont pas localisés de façon polaire dans la cellule (Chen et al., 1997 ; Geisler et al., 2005 ; Yang et Murphy, 2009). Ces transporteurs jouent un rôle primordial dans le contrôle de l'homéostasie, dans l'établissement de gradient de concentration et dans le transport « longue distance » de l'auxine des régions apicales aux racines.

A l'inverse de l'auxine, l'hormone antagoniste aux GA, l'ABA, qui possède une structure chimique similaire de type terpénoïde, n'est pas transporté de façon polaire. La synthèse de l'ABA a lieu principalement autour des vaisseaux vasculaires des parties végétatives de la plante. L'ABA est ensuite chargé dans les vaisseaux xylémiens et phloémiens par des exporteurs puis capté dans ses sites d'actions par des importeurs (Kang et al., 2011). Alors que son transport est étudié depuis les années 60, il faut attendre 2010 pour l'identification des premiers transporteurs d'ABA, ABCG25 et ABCG40, étendue plus récemment à NPF4.1 et NPF4.6 (Kuromori et al., 2010 ; Kang et al., 2010 ; Kanno et al., 2012). L'importance du transport d'ABA est en cours d'étude, un rôle en tant que molécule signal (notamment pour la fermeture des stomates) ainsi que dans le maintien homéostatique de l'hormone étant pour l'instant privilégié (Kang et al., 2011 ; Boursiac et al., 2013). Le transport d'ABA pourrait présenter des similitudes avec celui des GA, étant lui aussi non polaire.

Après avoir identifié la GA mobile *in planta*, la GA₁₂, l'étude du mécanisme moléculaire impliqué dans ce transport a été entreprise. Comme l'auxine ou l'ABA, il est fort probable que les GA bénéficient d'un transport sélectif. La présence de GA₁₂ dans le xylème appuie cette hypothèse, suggérant en effet qu'elle est transportée depuis un autre type cellulaire, le xylème étant composé de cellules mortes incapables de la produire.

D'après l'observation des mécanismes de transport de l'auxine et de l'ABA, mais également d'après l'identification d'un transporteur de GA₃ par Kanno et al. (2012), deux familles de gènes susceptibles de comporter un ou plusieurs candidats, les NRT1/PTR et les ABCG, ont été étudiées. Parmi l'ensemble des gènes appartenant à ces grandes familles, 13 transporteurs potentiels (10 candidats appartenant à la famille NRT1/PTR et 3 à la famille ABCG) ont été sélectionnés, du fait de leur régulation transcriptionnelle suite à une

application exogène de GA₃. De plus, 4 des NRT1/PTR retenus ont déjà été caractérisés comme transporteurs d'autres molécules : NPF2.13, NPF3.1, NPF4.6 et NPF6.3. Ainsi, NPF2.13 est un transporteur de nitrate. Exprimé dans les tissus phloémiens des feuilles matures, il permet de charger le nitrate dans ces vaisseaux conducteurs. Le mutant *npf2.13* n'a pas de phénotype visible particulier dans des conditions normales, mais il présente de hautes teneurs en nitrates dans les feuilles matures en comparaison avec la plante sauvage (Fan et al., 2009). NPF3.1 est également un transporteur de nitrate et de nitrites, présent principalement au niveau de l'enveloppe chloroplastique. Le mutant *npf3.1* présente une croissance plus lente que la plante sauvage, avec une floraison retardée d'une semaine (Sugiura et al., 2007). NPF4.6 quant à lui est un transporteur d'ABA exprimé dans les tissus vasculaires de la racine, des feuilles, de la tige, et des inflorescences. Le mutant *npf4.6* présente une température endogène plus basse que la plante sauvage, due aux pertes en eau liées à l'ouverture des stomates (Kanno et al., 2012). Enfin, NPF6.3 est un transporteur d'auxine et d'ABA exprimé principalement dans les primordia des racines latérales, dans la pointe de la racine, les feuilles immatures et au stade plantule, ainsi que dans les inflorescences (Guo et al., 2001 ; Krouk et al., 2010). Le mutant *npf6.3* présente une inhibition de croissance ainsi qu'un retard de floraison (Guo et al. 2001). Comme nous pouvons le remarquer, ces NRT1/PTR possèdent le plus souvent la capacité de transporter des molécules différentes. Ainsi, ces 4 transporteurs sont déjà impliqués dans le transport d'une ou plusieurs molécules, et constituent des candidats privilégiés pour l'étude du transport des GA. Cependant, NPF3.1 présente moins d'intérêt dans le cadre d'un transport de GA₁₂ sa localisation étant chloroplastique. A l'inverse, les 3 autres protéines sont situées sur la membrane plasmique et possèdent des caractéristiques intéressantes, notamment NPF2.13 et NPF4.6 qui sont exprimées au niveau des tissus vasculaires.

Concernant les 3 transporteurs ABCG sélectionnés, des travaux ont démontré que ABCG11 est un composant clé dans l'export de composés lipidiques indispensables à la formation de la cuticule. Le mutant *abcg11* présente des inclusions lipidiques dans les cellules épidermiques caractéristiques et semblables à un autre transporteur de composés similaires, *cer5 (abcg12)* (Bird et al., 2007). Ce mutant est également affecté dans sa croissance, et présente une fusion des tiges. Exprimé dans la pointe racinaire, les inflorescences et la tige, ABCG11 devient fonctionnel en formant des homo- ou hétérodimères avec d'autres ABCG, comme ABCG12 régulant ainsi la formation de la cuticule (Bird et al., 2007 ; McFarlane et al., 2010).

De même, une étude montre que ABCG25, exprimé principalement dans les tissus vasculaires, est un exporteur d'ABA. Si le mutant *abcg25* n'a pas de phénotype particulier dans des conditions normales, il est hypersensible à un traitement ABA. A l'opposé un

surexpresser présente une température foliaire plus importante (Kuromori et al., 2010). Ce transporteur, à l'instar de ABCG11, doit également former des homo- ou hétérodimères pour être fonctionnel.

Enfin, ABCG37 a été caractérisé comme exporteur cellulaire d'un précurseur de l'auxine, l'acide indole-3-butyrique, de façon redondante avec ABCG36, mais également de la scopoletine, une coumarine (Ruzicka et al., 2010 ; Fourcroy et al., 2014). Le mutant *abcg37* ne présente pas de phénotype particulier dans des conditions optimales, mais est hypersensible à l'application exogène d'auxine (Ruzicka et al., 2010). Contrairement à ABCG11 et ABCG25, ABCG37 est totalement fonctionnel sans formation de dimères.

Il est difficile de prédire si la perte d'un transporteur de GA implique forcément l'observation d'un phénotype précis, comme une perte de croissance. La nécessité de dimérisation de certains transporteurs, mais également leur redondance fonctionnelle est chose commune chez *Arabidopsis* et l'inactivation d'un transporteur est alors compensée par un autre. Ceci peut expliquer qu'un crible génétique n'ait jamais permis d'isoler un transporteur de GA et complique l'identification de tels acteurs *in planta*.

Récemment, des travaux présentés lors d'un congrès démontrent par une approche d'expression hétérologue en ovocyte de xénope que NPF2.10 est capable de transporter d'une part du glucosinolates, mais aussi la forme bioactive du jasmonate (Jasmonate-Isoleucine) et de la GA₃ (Nour-Eldin et al., 2012 ; Saito et al., 2014). Le mutant *npf2.10* présente un défaut d'élongation du filament des étamines qui est aboli si la plante est traitée avec des GA bioactives, suggérant un possible rôle de ce transporteur dans la régulation du développement de cet organe (Saito et al., 2014). Lors de mon analyse des données de transcriptomique, *NPF2.10* n'a pas été retenu car ne variant que très légèrement lors d'une application de GA₃. Sa récente identification démontre que ma sélection de transporteurs potentiels de GA par cette analyse présente des limites, et il faut envisager que d'autres membres non retenus puissent également transporter l'hormone. Là encore, et comme pour AIT3, NPF2.10 serait un transporteur de GA bioactives. On peut toutefois se demander si un transporteur capable de mobiliser des molécules aussi diverses que des glucosinolates, du jasmonate-isoleucine, et de la GA₃ est capable de discriminer la GA₃ (une gibbérelline de type C-19) de la GA₁₂ (une gibbérelline de type C-20).

Un autre point important concerne le caractère diffusible des GA. En effet, quel serait l'avantage d'un transport si la molécule est capable de diffuser seule à travers les membranes lipidiques? Une telle question s'est également posée pour l'ABA, dont le transport a longtemps été expliqué suivant un modèle basé sur la diffusion des acides faibles *in planta* (Boursiac et al., 2013). Un acide faible comme l'ABA ou la GA₄ est en équilibre

entre deux formes, l'une protonée et l'autre anionique, variant selon le pH environnant. La forme protonée n'est pas chargée et est donc capable de diffuser facilement à travers les membranes lipidiques, quand à l'opposé la forme anionique y diffuse difficilement. Le pKa de la molécule caractérise cet équilibre, il constitue le pH à partir duquel chacune des formes est à la même concentration. Ainsi, le pKa de la GA₄ étant de 4.28, cela signifie qu'à pH 4.28, 50% de la GA₄ est sous forme protonée (GA₄-H) et 50% sous forme anionique (GA₄⁻). A un pH plus acide, c'est la forme GA₄-H qui prédomine et à un pH plus basique c'est la forme GA₄⁻ qui est favorisée. La moyenne du pH apoplastique (espace extracellulaire compris entre la membrane plasmique et la paroi) varie de 5.0 à 6.1 (Boursiac et al., 2013). Dans ces conditions, une fraction significative de GA₄ est encore présente sous sa forme GA₄-H ce qui favorise son entrée dans la cellule, à la faveur du gradient de pH. Dans le cytosol, le pH est plus élevé (pH7.5) et la GA₄-H entrant dans la cellule est alors convertie en forme anionique non diffusible GA₄⁻ qui est alors largement en excès par rapport à la forme protonée.

Dans le cadre de l'ABA (pKa 4.7), et suivant ce modèle basé sur la diffusion, l'exemple présenté par Boursiac et al., (2013), montre dans des conditions normales que le xylème, entouré de cellules du parenchyme et de cellules du mésophyle, se retrouve progressivement vidé de son contenu en hormone jusqu'à ce qu'il n'en reste quasiment plus à son arrivée sur son site d'action, les cellules de garde. Lors d'un stress, le pH de la sève xylémienne augmente jusqu'à 6.7, ce qui réduit la réserve d'ABA-H diffusible. Cela réduit par conséquent son import dans les cellules du mésophyle et du parenchyme, aboutissant à une quantité plus importante d'ABA transportée vers les cellules de garde, et suffisante pour induire la fermeture des stomates (Boursiac et al., 2013). Quel avantage alors pour la plante d'avoir des transporteurs ? Premièrement, la présence de transporteurs permet d'importer dans la cellule une quantité optimale d'hormones pour activer la voie de signalisation, même dans les conditions d'une faible diffusion (Boursiac et al., 2013). Deuxièmement, les transporteurs constituent un niveau de régulation supplémentaire des concentrations endogènes d'hormone pour la plante (Boursiac et al., 2013). Dans le cas des GA, les concentrations endogènes étant relativement faibles, contrastant avec leurs effets importants sur la croissance de la plante, on imagine qu'une telle régulation peut avoir son importance. Enfin, la présence de transporteurs facilite grandement l'export de l'hormone, notamment dans le xylème et l'apoplaste pour l'ABA, permettant de contrôler et d'atteindre une concentration suffisante pour activer la voie de signalisation dans d'autres types cellulaires plus éloignés (Boursiac et al., 2013). La récente découverte de transporteurs d'ABA illustre et valide cet avantage.

Si une diffusion des GA n'est donc pas à exclure, la présence de transporteurs peut cependant jouer un rôle majeur, influençant et facilitant les processus régulés par l'hormone. Par exemple, lorsque la concentration en GA est forte, pour accroître son importation dans les cellules. Ou à l'inverse lorsque la concentration en GA est faible et la diffusion alors négligeable, pour faciliter l'import des GA environnantes vers les cellules demandeuses.

Enfin, il serait intéressant d'étudier si la GA₁₂ transportée l'est seule ou conjuguée avec un autre élément (un sucre, un acide-aminé, etc.). La recherche de telles formes dans le phloème ou le xylème par spectrométrie de masse constitue par conséquent une perspective intéressante. De telles conjugaisons pourraient avoir différents rôles, dans le transport par exemple, mais également dans la compartimentation et le stockage de l'hormone, qui reste pour l'heure méconnu. Elles impliquent nécessairement la présence d'enzymes capable de cliver ces associations. Des exemples de GA conjuguées ont déjà été rapportés dans la littérature, principalement avec le glucose, mais pas chez *Arabidopsis*, et ne concernant pas la GA₁₂ (Schneider et Schliemann, 1994). Des exemples de transport d'hormones conjuguées existent également pour l'ABA, dont une forme particulière, l'ABA-glucose ester, qui est retrouvé à des niveaux abondants dans la sève du xylème lors d'un stress (Hansen et al., 1999 ; Boursiac et al., 2013). Sa synthèse et sa dissociation impliquent deux types d'enzymes : des glucosyl-transferases et des β -glucosidases. L'activité des glucosyl-transferases est restreinte au cytosol et l'activité des β -glucosidases est retrouvée à la fois dans le cytosol et l'apoplasme suggérant que ce conjugué serait synthétisé dans le cytosol (Dietz et al., 2000 ; Xu et al., 2002 ; Boursiac et al., 2013). L'importance d'une telle molécule reste encore à être déterminée ; l'hypothèse principale consistant en un rôle de signal en présence de stress ou d'adaptation à des changements de conditions environnementales.

Chapitre 3 : Sites de production de la GA₁₂

Chapitre 3 : Sites de production de la GA₁₂

3. 1 Introduction

L'enzyme KAO (l'acide *ent*-kaurenoïque oxydase) est une P450 monooxygénase appartenant à la sous-famille CYP88A et permettant la conversion de l'acide *ent*-kaurénoïque en GA₁₂ par trois réactions successives *via* deux intermédiaires, l'acide *ent*-7 α -hydroxy-kaurénoïque et la GA₁₂-aldéhyde (Helliwell et al., 2001). Elle est située à l'interface entre les étapes précoces (CPS, KS et KO) et les étapes tardives (GA20ox, GA3ox et GA2ox) de la voie de biosynthèse des GA (figure 16), et les mutants *kao* caractérisés chez l'orge, le riz, le maïs, le pois et le tournesol présentent tous un phénotype nain sévère typique d'une déficience dans la production de GA (Winkler et Helentjaris, 1995 ; Helliwell et al., 2001 ; Davidson et al., 2003 ; Sakamoto et al., 2004 ; Fambrini et al., 2011). Chez *Arabidopsis*, la KAO est codée par deux gènes, *KAO1* (*CYP88A3*) et *KAO2* (*CYP88A4*) résultant d'une récente duplication (Helliwell et al., 2001). L'absence d'un mutant équivalent à ceux retrouvés dans les espèces précédemment citées suggère que ces deux gènes ont un rôle redondant (Helliwell et al., 2001).

La GA₁₂ est transportée sur de longues distances chez *Arabidopsis*, des racines vers les parties aériennes et inversement. En conséquence, il est indispensable de connaître les sites de production de cet intermédiaire *in planta*, en étudiant les gènes impliqués dans sa formation. Dans ce chapitre les profils d'expression de *KAO1* et *KAO2* au cours du développement seront déterminés à l'aide de deux approches différentes. En premier, des analyses moléculaires (RT-qPCR) et histochimiques avec lignées transgéniques qui expriment des fusions transcriptionnelles et traductionnelles avec le gène rapporteur GUS seront réalisées. Ensuite, ces résultats seront confrontés à ceux obtenus par une approche de génétique inverse, en étudiant le phénotype des simples et doubles mutants *kao*.

Si la biosynthèse des GA a été largement analysée et approfondie chez *Arabidopsis*, cette étape clé produisant la première forme des GA (et à l'origine de toutes les autres) *in planta* restait méconnue. La caractérisation de *KAO1* et *KAO2* présentée dans le manuscrit d'article ci-dessous participe à la compréhension de la biosynthèse des GA, et le contrôle par l'hormone de la croissance et du développement de la plante. Dans le contexte d'un transport endogène de la GA₁₂, cette étude apporte également les informations nécessaires permettant de connaître les sites de production de cet intermédiaire mobile.

3. 2 Manuscrit d'article présentant la localisation de l'expression des gènes *KAO1* et *KAO2* et leurs rôles dans la production de la GA₁₂ mobile *Arabidopsis thaliana*

The gibberellin biosynthetic genes *AtKAO1* and *AtKAO2* have overlapping roles throughout *Arabidopsis* development

Thomas Regnault¹, Jean-Michel Davière¹, Dimitri Heintz¹, Theo Lange² and Patrick Achard^{1,*}

¹Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, UPR2357, conventionné avec l'Université de Strasbourg, 67084 Strasbourg, France.

²Institut for Plant Biology, Technical University of Braunschweig, D-38106 Braunschweig, Germany.

Accepté pour publication dans *The plant Journal* (2014)

Dans cette publication, j'ai participé à l'ensemble des expériences présentées à l'exception des dosages de GA, effectués en collaboration avec Theo Lange (Technical University of Braunschweig).

Received Date : 01-May-2014

Revised Date : 14-Aug-2014

Accepted Date : 14-Aug-2014

Article type : Original Article

The gibberellin biosynthetic genes *AtKAO1* and *AtKAO2* have overlapping roles throughout *Arabidopsis* development

Thomas Regnault¹, Jean-Michel Davière¹, Dimitri Heintz¹, Theo Lange² and Patrick Achard^{1,*}

¹Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, UPR2357, conventionné avec l'Université de Strasbourg, 67084 Strasbourg, France.

²Institut for Plant Biology, Technical University of Braunschweig, D-38106 Braunschweig, Germany.

*Correspondence:

Dr Patrick Achard (patrick.achard@ibmp-cnrs.unistra.fr)

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes du CNRS

12, rue Général Zimmer,

67084 Strasbourg Cedex

France

Phone: +33 (0)3 67155299

Fax: +33 (0)3 88614442

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as an 'Accepted Article', doi: 10.1111/tpj.12648

This article is protected by copyright. All rights reserved.

156

Running title: Developmental roles of *AtKAO1* and *AtKAO2*

Key words: *Arabidopsis thaliana*, GA biosynthesis, *ent*-kaurenoic acid oxidase, *AtKAO1*, *AtKAO2*, CYP88A, growth, development.

Summary

Ent-kaurenoic acid oxidase (KAO), a class of cytochrome P450 monooxygenases of the subfamily CYP88A, catalyzes the conversion of *ent*-kaurenoic acid (KA) to gibberellin (GA) GA₁₂, the precursor of all GAs, thereby playing an important role in determining GA concentration in plants. Past work has demonstrated the importance of KAO activity for growth in various plant species. In *Arabidopsis*, this enzyme is encoded by two genes designated *KAO1* and *KAO2*. In this study, we used various approaches to determine the physiological roles of *KAO1* and *KAO2* throughout plant development. Analysis of gene expression pattern reveals that both genes are mainly expressed in germinating seeds and young developing organs, thus suggesting functional redundancy. Consistent with this, *kao1* and *kao2* single mutants are indistinguishable from wild-type plants. By contrast, *kao1 kao2* double mutant exhibits typical non-germinating GA-dwarf phenotypes, similar to those observed in the severely GA-deficient *ga1-3* mutant. Phenotypic characterization and quantitative analysis of endogenous GA contents of single and double *kao* mutants further confirm an overlapping role of *KAO1* and *KAO2* throughout *Arabidopsis* development.

Introduction

Gibberellins (GAs) are a class of diterpenoid plant hormones that regulate various developmental processes throughout plant lifecycle including seed germination, vegetative growth, flowering and seed set (Fleet and Sun, 2005; Pimenta Lange and Lange, 2006). Mutant plants impaired in GA production exhibit altered seed germination and, at the adult stage, show a characteristic dwarf and late flowering phenotype and sterility. Physiological and biochemical analyses of these mutants have contributed to the elucidation of the GA biosynthetic pathway, particularly in *Arabidopsis*, for which GA₄ is the main bioactive GA (Eriksson *et al.*, 2006; Yamaguchi, 2008).

In higher plants, GA biosynthesis involves a multistep pathway separated into three distinct subcellular compartments (Yamaguchi, 2008; Figure 1a). The production of bioactive GA₄ is initiated

in plastids, where the geranylgeranyl diphosphate (GGDP) is converted to *ent*-kaurene in a two-step process catalyzed by two terpene cyclases, the *ent*-copalyl diphosphate synthase (CPS) and the *ent*-kaurene synthase (KS), respectively (Sun and Kamiya, 1994; Yamaguchi *et al.*, 1998). In *Arabidopsis*, both CPS and KS are encoded by single genes (*GA1* and *GA2*, respectively), loss of function of which results in severe dwarfism and complete loss of fertility (Koornneef and van der Veen, 1980; Yamaguchi *et al.*, 1998). The *ent*-kaurene is then converted to GA₁₂ by sequential oxidation steps catalyzed by two membrane-associated cytochrome P450 monooxygenases. The first three P450-mediated steps from *ent*-kaurene to *ent*-kaurenoic acid are catalyzed in the plastid envelope by the *ent*-kaurene oxidase (KO), belonging to the CYP701A subfamily and encoded by the single gene *GA3* in *Arabidopsis* (Helliwell *et al.*, 1998; Helliwell *et al.*, 1999; Helliwell *et al.*, 2001a). The next three steps, from *ent*-kaurenoic acid to GA₁₂, are catalyzed in the endoplasmic reticulum by the *ent*-kaurenoic acid oxidase (KAO1 and KAO2 in *Arabidopsis*), belonging to the CYP88A subfamily of cytochrome P450 enzymes (Helliwell *et al.*, 2001a; Helliwell *et al.*, 2001b). In the final stages of GA biosynthesis, GA₁₂ is converted to bioactive GA₄ by soluble 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases (ODDs), which catalyze 20-oxidation (GA20-oxidases) and 3β-hydroxylation (GA3-oxidases) reactions (Mitchum *et al.*, 2006; Rieu *et al.*, 2008; Plackett *et al.*, 2012). Bioactive GAs and their precursors may be inactivated by 2β-hydroxylation, which is catalyzed by a third class of ODDs, the GA2-oxidases, providing a means to regulate GA homeostasis (Schomburg *et al.*, 2003; Rieu *et al.*, 2008). In contrast with the earlier enzymes of the GA biosynthetic pathway, the ODDs are encoded by small multigene families (Hedden and Thomas, 2012). Although these enzymes show some degree of redundancy, they have also distinct patterns of expression and may thus be involved in providing GA for different developmental processes (Mitchum *et al.*, 2006; Rieu *et al.*, 2008; Plackett *et al.*, 2012). Accordingly, expression of *GA20ox*, *GA3ox* and *GA2ox* gene families are regulated by a number of intrinsic and environmental factors (Hedden and Thomas, 2012).

Although almost all GA biosynthetic genes and their relative mutants have been isolated from *Arabidopsis*, the developmental roles of *KAO1* and *KAO2* producing the first-formed GA, GA₁₂, and thus the precursor of all other GAs, remain unclear. Mutations in *KAO* have been shown to be the cause of severe dwarfism in several plant species including barley, rice, maize, pea and sunflower (Winkler and Helentjaris, 1995; Helliwell *et al.*, 2001b; Davidson *et al.*, 2003; Sakamoto *et al.*, 2004; Fambrini *et al.*, 2011). The lack of equivalent mutants in *Arabidopsis* strongly suggests an overlapping role of the two *KAO* genes throughout plant development. Phylogenetic analysis comparing known examples of *KAO* protein sequences from monocot and dicot species shows that *Arabidopsis* *KAO1* and *KAO2* are closely related to each other (74% identity at the amino acid level), defining two

groups only with members within the *Brassicaceae* family (Figure 1b). Consistent with this sequence similarity, the two paralogs are able to catalyze *in vitro* all three steps in the conversion of the *ent*-kaurenoic acid to GA₁₂ (Helliwell *et al.*, 2001b; Figure 1a). Taken together, these results suggest that *Arabidopsis KAO1* and *KAO2* are functionally redundant, and illustrate the importance of determining precisely the function of these two genes in plant development.

To investigate the physiological roles of *Arabidopsis KAO* genes throughout plant lifecycle and thus to determine the potential sites of GA₁₂ synthesis in the plant, we examined the developmental expression profile and the level of expression of *KAO1* and *KAO2* in selected organs by quantitative real-time PCR. Furthermore, we generated promoter:β-glucuronidase (GUS) and green fluorescent protein (GFP) translational fusion transgenic reporter lines to map the tissue-specific expression profiles of each *KAO* gene. Comparison analyses revealed that *KAO1* and *KAO2* have mostly overlapping but also distinct patterns of expression, especially in root and floral tissues. We also used a reverse genetic approach to determine the contributions to development of the two *KAO* genes. Phenotypic, molecular and biochemical analyses of *kao1* and *kao2* single and double mutants demonstrated that *KAO1* and *KAO2* equally contribute to GA biosynthesis in multiple developmental processes.

Results

Developmental expression profile of the *Arabidopsis KAO1* and *KAO2* genes

Previous work has shown by ribonuclease protection assay that *Arabidopsis KAO1* and *KAO2* are expressed in all body parts of the plant, with the highest expression in inflorescences and siliques (Helliwell *et al.*, 2001b). To assess in which organs these enzymes act and to determine the function of each of the *KAO* genes in plant development, we analyzed their expression in different tissues and organs, and at different developmental stages by real-time quantitative RT-PCR. In general, *KAO2* was the most highly expressed gene, especially in germinating seeds and in flowers and siliques, where its transcript was two to five fold more abundant than that of *KAO1* (Figure S1). *KAO1* was also expressed in all organs examined, with highest mRNA levels in 12h-imbibed seeds and siliques, and low levels in young seedlings and vegetative tissues (Figure S1). To confirm our results, we also analyzed the expression of *KAO1* and *KAO2* genes on publicly available microarray databases (<https://www.genevestigator.com>). Although these data are not absolutely quantitative between genes, they confirmed that both *KAO* genes are mainly expressed in germinating seeds, flowers and siliques. On the basis of their expression patterns, we can predict that *KAO1* and *KAO2* are involved

in the production of GA₁₂ in all the organs where bioactive GAs are needed to ensure seed germination, vegetative growth and reproductive development.

To further investigate the tissue-specific expression patterns of *KAO1* and *KAO2*, we generated promoter:GUS and GFP translational fusion reporter lines (*pKAO1:KAO1-GUS/GFP* and *pKAO2:KAO2-GUS/GFP*). For all the transgenic lines, the GUS and GFP patterns were consistent with the qRT-PCR data shown in Figure S1; the expression of *KAO2* was much stronger than that of *KAO1* (Figure 2).

In 24-h germinating embryos, *KAO1-GUS* and *KAO2-GUS* expressions were restricted to the tip of the embryo axis (Figure 2a,n). This observation is consistent with previous studies indicating that *de novo* GA synthesis is required for the growth and the protrusion of the radicle during seed germination (Ogawa *et al.*, 2003; Mitchum *et al.*, 2006). Noteworthy, no GUS staining was detected in the cotyledons (Figure 2a,n).

Although *KAO1-GUS* and *KAO2-GUS* exhibited the same expression patterns in germinating seeds, they were differentially expressed at later developmental stages. In 7-day-old *pKAO2:KAO2-GUS* seedlings, GUS staining was observed predominantly in the hypocotyl and petioles of the cotyledons, in the vegetative shoot apical meristem (SAM) and leaf primordia, and in the meristematic zone of the root and lateral roots (Figure 2o-q). By contrast, *KAO1-GUS* was almost exclusively restricted to the SAM, the leaf primordia and the root meristem (Figure 2b-d). To determine cell-type-specific expression of *KAO1* and *KAO2* in roots, we examined the distribution of GFP signal in the root apex of 7-day-old *pKAO1:KAO1-GFP* and *pKAO2:KAO2-GFP* transgenic seedlings. Confocal microscopy revealed that *KAO1-GFP* was expressed in the quiescent center (QC) and neighboring cells, and in the columella root cap (Figure 2e). In agreement with the GUS staining, *KAO2-GFP* was more expressed than *KAO1-GFP* at the root apex. *KAO2-GFP* was expressed to high levels in a large population of cells surrounding the QC, in the columella cells, and in both cortical and endodermal cells in the meristematic zone of the root (Figure 2r). Strikingly, *KAO2-GFP* expression closely matched with the preferential accumulation of bioactive GAs in root endodermis and the specific role of endodermal cells in regulating root growth (Ubeda-Tomás *et al.*, 2008 and 2009; Shani *et al.*, 2013).

In rosette leaves, strong *KAO2-GUS* expression was observed in the petioles and the vasculature of the leaves (Figure 2s). By contrast, the expression of *KAO1-GUS* was very weak and restricted to the vasculature of the youngest leaves (Figure 2f). In flowers, *KAO1:GUS* and *KAO2:GUS* had distinct GUS expression patterns (Figure 2g,h,t,u). In pistils, *KAO1-GUS* expression was predominantly observed in the stigmatic papillae and in ovules (Figure 2i,j), while *KAO2-GUS* expression was mainly detected in

the style (Figure 2v). In stamens, *KAO1-GUS* was restricted to the pollen grains (Figure 2k), while *KAO2-GUS* was observed in the stamen filament, anther and pollen grains (Figure 2x). *KAO2-GUS* staining was also observed in sepals (Figure 2t). In developing siliques, *KAO2-GUS* expression was detected in the valves, seeds, septum and receptacle tissues (Figure 2y,z). Weak expression of *KAO1-GUS* was also detected in the seeds and funiculi (Figure 2l,m).

Characterization of loss-of-function mutants defective in *KAO1* and *KAO2*

Our expression analyses suggest that *KAO1* and *KAO2* have redundant functions throughout plant lifecycle except in root and floral organs where both genes have different expression patterns (Figure 2). To better define the physiological roles of *KAO* genes in plant development, we characterized two insertion lines for *KAO1* (SAIL line 798A12 and SALK line 136249C; hereafter named *kao1-1* and *kao1-2*, respectively) and one line for *KAO2* (SAIL line 634E12; hereafter called *kao2-1*) (Figure S2a). Using gene-specific primers spanning the insertion sites, we were not able to detect correctly spliced transcripts from *kao1-1*, *kao1-2* and *kao2-1* alleles by RT-PCR, thus confirming that these mutants are null alleles (Figure S2b). Noteworthy, we also showed that there is no obvious compensation resulting in increased transcription of one *KAO* “homolog” in the other mutant background (Figure S2c). To study possible redundancy functions of *KAO1* and *KAO2*, *kao1-1 kao2-1* and *kao1-2 kao2-1* double mutants were generated by genetic crossing between *kao1-1* or *kao1-2* and *kao2-1*, respectively (Figure S2b). Whereas *kao1* and *kao2* single mutants were indistinguishable from wild-type plants, *kao1-1 kao2-1* and *kao1-2 kao2-1* double mutants displayed severe GA-deficient phenotypes, which are presented in details in the rest of this article.

Loss of *KAO1* and *KAO2* function affects seed germination

GAs act as positive regulator of seed germination, as GA-deficient mutant seeds cannot germinate without exogenous GA (Koornneef and Van der Veen, 1980; Peng and Harberd, 2002). Under favorable conditions (including light, moisture and transient exposure to cold), GA biosynthesis is induced, and in turn, the *de-novo* GAs activate the expression of genes encoding enzymes hydrolyzing the endosperm to facilitate the embryo growth and radicle protrusion (Olszewski *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2006). Both *KAO1* and *KAO2* are expressed at relatively high levels in imbibed seeds, especially in the embryo axis of germinating seeds (Figures 2 and S1). Germination of *kao1* and *kao2* single mutants was indistinguishable from the wild-type (Table S1). Both mutants exhibited similar sensitivity to the GA biosynthesis inhibitor, paclobutrazol (PAC; Table S1). In contrast to the single

mutants, *kao1 kao2* double mutant failed to germinate under permissive conditions, similarly to the severe GA-deficient *ga1-3* and *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3* triple mutants, thus indicating that KAO1 and KAO2 are functionally redundant during seed germination (Table 1; Koornneef and Van der Veen, 1980; Plackett *et al.*, 2012). Consistent with the role of GA in promoting seed germination, the germination behavior of *kao1 kao2* embryos was substantially increased when the seed coat was mechanically open. Furthermore, exogenous application of GA₁₂ (the end-product of the KAO) and bioactive GA₄, but not *ent*-kaurenoic acid (KA; the substrate of the KAO), was able to rescue the germination defect of *kao1 kao2* double mutant in a dose-dependent manner (Table 1). These results are consistent with the premise that the conversion of KA to GA₁₂ is blocked in the *kao1 kao2* double mutant. As control, GA₄ was the only GA to recover the germination defect of *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3* mutant seeds, while all GA intermediates tested induced germination of *ga1-3*, which is defective in the first step of GA biosynthesis (Table 1).

Lack of KAO1 and KAO2 alters plant growth and reproductive development

GAs are known to promote growth of most vegetative tissues such as root, leaf, hypocotyl and stem (Achard and Genschik, 2009). To investigate the roles of *KAO1* and *KAO2* in this process, we examined the effect of the *kao1* and *kao2* mutations on the growth of different organs, including hypocotyl and primary root length of 7-day-old seedlings, rosette radius of five-week-old plants and the final plant height (Table 2). For all phenotypic characters tested, *KAO1* and *KAO2* appeared to be fully redundant. Indeed, whereas *kao1* and *kao2* single mutants were not significantly different from the wild-type, the growth of *kao1 kao2* double mutant plants was substantially affected (Table 2; Figure 3a,b; Figure S3). Both *kao1-1 kao2-1* and *kao1-2 kao2-1* mutants exhibited shorter seedling root and hypocotyl length, phenocopying the seedling phenotype of *ga1-3* (Table 2; Figure S4). At vegetative stage, the double mutant also displayed reduced growth, including the rosette size and final height, in comparison with the wild-type (Table 2; Figure 3a,b). Treatment with exogenous bioactive GA₃ rescued all these phenotypic characters, such there were no significant differences from the wild-type (Table 2; Figure 3c).

As previously, we also examined the effect of treatment with the substrate (KA) and the end product (GA₁₂) of the KAO on the growth of 14-day-old *kao1 kao2* double mutant plants to deduce the degree of inhibition of the KAO activity at the vegetative stage (Figure 4). We found that GA₁₂ was as effective as GA₄ in rescuing the dwarf phenotype of *kao1 kao2* double mutant, in contrast to *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3* triple mutant, which is unable to convert GA₁₂ to bioactive GA₄ (Plackett *et al.*, 2012). On the other hand, exogenous application of KA was able to recover the growth of *ga1-*

3 but not of *kao1 kao2* double mutant, thus confirming that the conversion of KA to GA₁₂ is fully blocked in the *kao* double mutant.

In *Arabidopsis*, bioactive GA₄ stimulates the transition from vegetative to reproductive development in a day-length-dependent manner (Wilson *et al.*, 1992; Eriksson *et al.*, 2006). Whereas severe GA-deficient mutants fail to flower when grown under short-day (SD) conditions, flowering is only moderately delayed under long-day (LD) conditions. Flowering of *kao1* and *kao2* single mutants was not significantly different from the wild-type under LD conditions (as evidenced by the number of rosette leaves) (Table 2). By contrast, flowering of *kao1 kao2* double mutant was substantially delayed, with the same trend to that observed for the *ga1-3*. Moreover, bioactive GA₃ treatment restored the flowering time of each genotype to that of the wild-type (Table 2). Under SD conditions, both *kao1 kao2* and *ga1-3* mutants failed to flower during the experimental period (8 months; Figure S5).

Severely GA-deficient *Arabidopsis* mutants, such as *ga1-3*, exhibit altered floral development and complete loss of fertility (Cheng *et al.*, 2004). Typically, the mature flowers of GA-deficient mutant plants display reduced elongation growth of petals and stamens, while anther development is arrested, resulting in male sterility (Cheng *et al.* 2004; Plackett *et al.*, 2012). The relatively high expression levels of *KAO1* and *KAO2* in flowers suggest that the production of GA₁₂ is critical for flower development and fertility (Figure 2). However, despite that *KAO1* and *KAO2* are mostly expressed in distinct tissues in the flower, no observable phenotype was noted in the flowers and the fertility (silique length and number of seeds per silique) of the *kao1* and *kao2* mutant plants, thus suggesting that expression of a single *KAO* gene is sufficient to support flower development (Figure 5). By contrast, flowers of *kao1 kao2* double mutant plants failed to open and exhibited very short anther filaments and petals, similar to those observed in *ga1-3* (Figure 5a). In consequence, *kao1 kao2* double mutant plants were sterile, throughout their lifecycle. Taken together, these results indicate that *KAO1* and *KAO2* have major and overlapping functions in providing GA₁₂ during flower development.

Endogenous GA contents in *kao* mutants

To evaluate the effect of *kao* mutations on the production of GAs, we determined concentrations of products and substrates of the KAO in 7-day-old wild-type, *kao1-2*, *kao2-1* and *kao1-2 kao2-1* mutant seedlings. Consistent with the growth parameters (Table 2), the levels of bioactive GA₄ in *kao1-2* and

kao2-1 mutants were similar to those in wild-type (Table 3). By contrast, the amounts of GA₄ in *kao1-2 kao2-1* double mutant were substantially reduced (less than 15% of those in wild-type). Similarly, the concentration of the immediate product of the KAO, GA₁₂, was absent in *kao1-2 kao2-1* compared with the wild-type (Table 3). Unlike GA₁₂, the level of KA was increased in *kao1-2* and *kao2-1* seedlings, and more drastically in *kao1-2 kao2-1* double mutants, relative to that in wild-type seedlings. Thus KAO activity is blocked in *kao1 kao2* double mutant plants. Interestingly, the concentration of GA₁₂ was also significantly reduced in the *kao2-1* single mutant (in contrast to *kao1-2*), hence suggesting that KAO2 contributes substantially in the production of GA₁₂ in young seedlings. These data are in agreement with the relatively high expression of *KAO2* (compared to *KAO1*) during the early stages of development (Figure 2 and S1). The GA₄ present in *kao2-1* seedlings may be attributed to relatively high expression of *KAO1* in germinating seeds, which might provide GA₄ to young seedlings.

In higher plants, GA₁₂ is also substrate for GA13-oxidase for the production of GA₅₃, which is precursor for the bioactive GA₁ in the 13-hydroxylated pathway (Figure 1a, Yamaguchi, 2008). The 13-hydroxylated products GA₅₃, GA₄₄, GA₂₀ and GA₁ were present at very low concentrations in both wild-type and *kao* mutants. However, the concentration of GA₁₉ was reduced in *kao1-2 kao2-1* mutant compared with the wild-type, indicating that loss of *KAO1* and *KAO2* activity also alters the 13-hydroxylated pathway (Table 3).

Effects of the *kao* mutations on GA signaling and on feedback regulation of GA-metabolism gene expression

Bioactive GAs stimulate plant growth and development by relieving the restraint of a family of nuclear growth repressors, the DELLA proteins (DELLAs) (Davière and Achard, 2013). Hence DELLAs restrain GA responses, whilst GA signal relieves this repression by triggering degradation of the DELLAs via the SCF^{SLY1}-dependent ubiquitin proteasome pathway (McGinnis *et al.*, 2003; Dill *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2004). Thus reduced bioactive GA levels cause an increase in DELLA accumulation and consequent growth inhibition (Silverstone *et al.*, 2001; Davière and Achard, 2013). The *Arabidopsis* genome contains five DELLA genes, amongst which *REPRESSOR OF GA1-3 (RGA)* and *GA-INSENSITIVE (GAI)* are the major repressors controlling GA-stimulated vegetative growth and the transition to the reproductive phase (Dill and Sun, 2001; King *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2004; Davière and Achard, 2013). To investigate the effects of *kao* mutations on the activation of the GA signaling, we determined the accumulation levels of RGA protein in 7-day-old wild-type, *ga1-3*, *kao* single and double mutant seedlings (Figure 6). We found that both *ga1-3* and *kao1 kao2* double mutants

accumulated higher amounts of RGA protein than wild-type. In contrast, there was no significant difference in RGA accumulation between the wild-type and the *kao1* and *kao2* single mutants, consistent with the levels of GA₄ found in these genotypes (Table 3). Thus lack of KAO activity (and thus GA₁₂ synthesis) severely affects GA signaling by allowing the accumulation of DELLAs, which in turn restrain plant growth.

The levels of bioactive GAs in plants are maintained via DELLA-dependent feedback regulation of GA metabolism gene expression (Yamaguchi, 2008). Previous work has shown that increased DELLA activity (e.g. as seen in the GA-deficient *ga1-3* mutant) results in increased levels of GA biosynthesis *GA20ox1* and *GA3ox1* transcripts and in decreased levels of GA deactivating *GA2ox1* transcripts (Hedden and Kamiya, 1997; Cowling *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1999; Silverstone *et al.*, 2001). Consistent with these reports, *kao1 kao2* double mutant exhibited increased levels of *GA20ox* and *GA3ox* transcripts and reduced levels of *GA2ox* transcripts in comparison to wild-type plants (Figure S6). Noteworthy, this feedback regulation did not operate on *KAO1* and *KAO2*, as the expression levels of both genes were not significantly different in *ga1-3* versus wild-type plants (Figure S7).

Discussion

The *ent*-kaurenoic acid oxidase (KAO) is a multifunctional cytochrome P450 monooxygenase catalyzing three sequential oxidation steps in the GA biosynthetic pathway from *ent*-kaurenoic acid (KA) to GA₁₂, via *ent*-7 α -hydroxy kaurenoic acid and GA₁₂-aldehyde (Helliwell *et al.*, 2001b; Figure 1a). In *Arabidopsis*, KAO is encoded by two related genes, *KAO1* and *KAO2*. Phylogenetic analysis indicates that *Arabidopsis* KAO are grouped with members of the brassica family, suggesting that they evolved from a recent gene duplication (Figure 1b). Previous work has shown that *Arabidopsis* KAO have similar patterns of expression in vegetative tissues, and that both KAO enzymes have equivalent activities in yeast expression systems (Helliwell *et al.*, 2001b). To further examine the physiological roles of KAO to *Arabidopsis* development, we have taken here a molecular genetic approach throughout the lifecycle of the plant. Overall our results have demonstrated that *KAO1* and *KAO2* have overlapping function during plant growth, and that loss of KAO activity (in *kao1 kao2* double mutant) causes profound changes in GA synthesis as well as GA responses, similar as those exhibited by severe GA-deficient mutants.

***KAO1* and *KAO2* exhibit overlapping and distinct tissue-specific expression patterns**

To assess the functional roles of *KAO1* and *KAO2* throughout plant development, we initially analyzed their developmental expression profiles using real-time quantitative qRT-PCR. Transcript analysis revealed that each *KAO* gene has a quantitatively different expression profile (*KAO2* is in general more expressed than *KAO1*), but the degree of overlap between expression patterns was such that it was not possible to link specific GA-regulated developmental processes with individual genes. Indeed, both *KAO* genes were predominantly expressed in germinating seeds and reproductive organs, although they were expressed in all organs examined (Figure S1).

To precisely map the tissue-specific expression patterns of each *KAO* gene, we generated transgenic *Arabidopsis* *pKAO1:KAO1-GUS* and *pKAO2:KAO2-GUS* reporter lines. GUS expression analysis indicated that *KAO1* and *KAO2* expression is restricted to specific rapidly growing tissues and organs undergoing cell division and elongation, including embryo axis, shoot and root meristems, leaf primordia and stamens (Figure 2). This pattern of expression essentially coincides with those displayed by early (*CPS*) and late (*GA20ox* and *GA3ox*) GA biosynthesis genes, confirming that *de novo* GA synthesis is critical for seed germination, growth and fertility (Silverstone *et al.*, 1997; Mitchum *et al.*, 2006; Plackett *et al.*, 2012).

To further address the expression patterns of *KAO1* and *KAO2* in *Arabidopsis* root, we also followed the GFP fluorescence in the primary root of *pKAO1:KAO1-GFP* and *pKAO2:KAO2-GFP* seedlings. Previous studies indicate that the expression of GA biosynthetic genes is particularly high in root meristem with lower levels in other cell types (Silverstone *et al.*, 1997; Mitchum *et al.*, 2006; Band *et al.*, 2012). Consistent with these studies, *KAO1* and *KAO2* were highly expressed in root meristem, especially in the QC and neighboring cells (Figure 2e,r). Noteworthy, we also observed a striking accumulation of *KAO2* transcripts in dividing endodermal cells, which have previously been shown to play a unique role in GA-mediated regulation of root growth (Ubeda-Tomás *et al.*, 2009). Moreover, comparison of expression patterns of late GA biosynthesis genes with both *KAO* genes reveals that translocation of GA intermediates may occur in non-elongating region of the root, as previously noticed (Hu *et al.*, 2008). Indeed, whereas *GA20ox* and *GA3ox* show a strong expression in the root differentiation zone, the *KAO* (which overlap with the expression of the *CPS* in root) are not expressed in this region, thus suggesting that local transport of GA₁₂ is required for the synthesis of bioactive GAs in differentiated tissues of the root (Silverstone *et al.*, 1997; Mitchum *et al.*, 2006; Plackett *et al.*, 2012).

In flowers, GAs have long been known to promote stamen and petal development (Koornneef and van der Veen, 1980). Accordingly, *KAO2* was strongly expressed in all stamen tissues such as most of the GA biosynthesis genes. By contrast, *KAO1* expression was concentrated in the pollen grains (Figure 2k). On the other hand, none of the *KAO* genes was expressed in petals. This last observation supports the current model that bioactive GAs made in stamens not only function locally but are also transported to neighboring tissues including petals (Hu *et al.*, 2008; Pimenta Lange *et al.* 2012). In pistils, *KAO1* and *KAO2* displayed differential expression patterns. While *KAO1* was expressed in the stigma (such as the *CPS*; Silverstone *et al.*, 1997), *KAO2* was only expressed in the style (Figure 2i,v). Because *kao1* and *kao2* single mutants produce normal pistils (Figure 5), it is likely that intermediate or bioactive GAs are transported throughout the pistil or from nearby tissues, like stamens, to support their development. Interestingly, *KAO1* was also strongly expressed in ovules, which overlaps with the expression patterns of the late GA biosynthesis genes, but not with the *CPS*, whose expression is restricted to the funiculus (Silverstone *et al.*, 1997; Dorcey *et al.*, 2009; Plackett *et al.*, 2012).

Physiological role of *KAO1* and *KAO2* in plant growth and development

We also used a genetic approach to determine the contributions to development of *KAO1* and *KAO2* by isolating knockout mutants in each of these genes. Because *Arabidopsis KAO1* and *KAO2* are expressed redundantly during most phases of development, we predicted that loss of function of both *KAO* would confer typical non-germinating GA-dwarf phenotypes. Indeed, whereas *kao1* and *kao2* single mutants had no obvious phenotype under normal growth conditions, *kao1 kao2* double mutant exhibited severe defects in seed germination, growth, flowering and fertility, similar to those displayed by the GA-deficient *ga1-3* mutant (Table 2, Figures 3). Exogenous GA_3 treatment was however able to rescue all these phenotypic characters, thus indicating that loss of *KAO1* and *KAO2* activity severely affects the synthesis of bioactive GAs. Consistent with this observation, the amount of bioactive GA_4 , as well as the immediate product of the *KAO*, GA_{12} , was considerably reduced in *kao1 kao2* double mutant, whereas the substrate KA accumulated (Table 3). Accordingly, exogenous application of GA_{12} , but not KA, was able to rescue the growth and germination defects of *kao1 kao2* double mutant (Table 1, Figure 4). Taken together, these results demonstrate that *KAO1* and *KAO2* have overlapping roles in the synthesis of GA_{12} throughout plant development. Furthermore, the fact that *kao1* and *kao2* single mutants are morphologically indistinguishable from wild-type indicates that the reaction catalyzed by *KAO* is not rate limiting, consistent with previous work showing that *CPS* overexpression leads to increased accumulation of GA_{12} without significantly modulating the

level of *KAO1* and *KAO2* transcripts (Fleet *et al.*, 2003). Therefore, each KAO is able to compensate for the loss of the other, even though these genes have distinct tissue-specific expression patterns in root meristem and floral organs, as previously discussed. Nevertheless, it is noteworthy that roots of *kao2* mutants are more sensitive to PAC than those of *kao1*, consistent with the respective expression levels of *KAO1* and *KAO2* in roots (Figure S1b; Figure 2).

In conclusion, we have shown that *Arabidopsis KAO1* and *KAO2* are functionally redundant throughout plant lifecycle, and that their activity is essential for the synthesis of GA_{12} , and therefore the accumulation of biologically active GA_4 . This redundancy throughout the development seems specific to the *Brassicaceae* family, as the *KAO* genes from other families have most often acquired some degrees of specificity (Davidson *et al.*, 2003; Fambrini *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2012). However, since GA metabolism is tightly regulated by environmental signals (including light conditions, temperature and nutrient status) to allow plants to adapt their growth and development to their surrounding growth conditions, further investigation will be needed to evaluate the responsiveness of *Arabidopsis KAO1* and *KAO2* genes to changing environmental conditions (Hedden and Thomas, 2012).

Experimental procedures

Plant material

Arabidopsis thaliana accession Columbia-0 (Col-0) is the genetic background for all mutant lines. The *ga1-3* mutant, originally in Landsberg *erecta* and backcrossed six successive times to Col-0, and *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3-1* triple mutant were as previously described (Tyler *et al.*, 2004; Plackett *et al.*, 2012). *kao1-1* (SAIL 798A12/Stock N835691), *kao1-2* (SALK 136249C/Stock N677047) and *kao2-1* (SAIL 634E12/Stock N827299) mutant lines were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre resource center. *kao1-1 kao2-1* and *kao1-2 kao2-1* double mutants were generated by crossing of corresponding single mutant lines (PCR-based screening and sequencing were used for confirmation).

Growth conditions

Plants were grown on soil (16 h light/ 8 h dark; 22°C) or on plates containing 1x Murashige-Skoog (MS) medium (Duchefa Biochemical), 0.5% sucrose, and 1% agar under a 16 h photoperiod at 22°C. As GA-deficient mutants do not germinate without exogenous GA, all seeds including *ga1-3* and *kao1*

kao2 mutants were pretreated at 4°C with 5 μ M GA₃ (Sigma-Aldrich) for 3 days to synchronize germination, washed thoroughly 3 times, then surface sterilized before sowing.

For seed germination assay, 150-200 seeds were spread on wet 3MM Whatman filter paper containing increasing concentration of KA (OChemim), GA₁₂ (Prof L. Mander, University of Canberra), GA₄ (Sigma-Aldrich) or PAC (Sigma-Aldrich) as indicated. Seed germination was scored by counting all seeds with radicle protrusion after 7 days of incubation (16 h light/ 8 h dark; 22°C).

For hypocotyl and root length measurements, seeds were sown on MS agar square Petri dishes (containing 10 μ M GA₃ and controls), and the plates were then placed vertically in a controlled environment chamber (16 h light at 90 μ mol s⁻¹ m⁻²/ 8 h dark; 22°C). After 7 days, plates were scanned and hypocotyl and root length was measured using Image J software (public domain; <http://rsb.info.nih.gov/ij>). For each experiment, hypocotyls and roots from at least 15 seedlings were measured for each genotype.

Plant height, rosette diameter and flowering time (expressed as the number of vegetative leaves produced before flowering) were determined at 5 weeks (except for *ga1-3* and *kao1 kao2* double mutants, which were measured at 8 weeks) on a population of 20 plants grown on soil (GA-treated twice a week with 100 μ M GA₃, and controls) in controlled environment chambers (16h photoperiod; 22°C).

For silique characterization, the length of about 20 fully elongated siliques (chosen from silique number 10-30 on the main stem) was measured, and the number of seeds per silique was counted. Because *ga1-3* and *kao1 kao2* double mutants were sterile, silique length and number of seeds per silique were not determined.

Plasmid construction and plant transformation

To generate *pKAO1:KAO1-GUS/GFP* and *pKAO2:KAO2-GUS/GFP* constructs, *pKAO1:KAO1* and *pKAO2:KAO2* fragments were PCR amplified from Col-0 genomic DNA with appropriate primers encompassing 1.6-kb promoter region of *KAO1* and *KAO2*, respectively. Subsequently, the fragments were inserted into pDONR207 (Invitrogen) by Gateway cloning methods and then recombined with the plant binary vectors pGWB633 for GUS fusion and with pGWB650 for GFP fusion (Nakamura *et al.*, 2010). The plant binary vectors were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 strain by electroporation and *Arabidopsis* Col-0 plants were transformed by floral dip. Primer pairs used for the cloning are listed in Table S2.

Gene expression analyses

RNA extraction from seeds and siliques was performed as previously described (Onate-Sanchez *et al.* 2008). Briefly, tissues were ground in liquid nitrogen, and resuspended in extraction buffer (4 M LiCl, 1 M Tris pH 8, 10% SDS and 0.5 M EDTA) supplemented with chloroform (v/v). Total RNA from other tissues was extracted using NucleoSpin RNA Plant kit (Macherey Nagel) following the user manual. 2 µg of total RNA were treated first with 2 units of DNase I (Promega) and then reverse transcribed in a total volume of 40 µL with 2 µM oligo(dT)₂₀, 0.5 mM deoxynucleotide triphosphate (dNTP), 5 mM DTT, and 200 units of Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). qRT-PCR was performed using gene-specific primers (listed in Table S2) in a total volume of 10 µL SYBR Green Master mix (Roche) on a Lightcycler LC480 apparatus (Roche) according to manufacturer's instructions. AT4G34270 (*TIP41-LIKE*) and AT4G26410 genes were used as internal reference genes. The relative expression level of each gene was calculated using Lightcycler 480 software, release 1.5.0 SP3, and averaged over three biological replicates. For RT-PCR analyses (Figure S2b), reverse transcribed RNA was amplified (30 cycles) with 0.5 µL of Phire Hot Start II DNA polymerase (Thermo Scientific), 0.2 mM dNTP and 0.2 µM primer mix. Primers for PCR amplification are listed in Table S2.

Immunoblot analyses

7-day-old seedlings from different genotype as indicated were ground in 2x SDS-PAGE buffer followed by boiling for 5 min. After centrifugation, the protein extracts were fractionated on a 10% SDS-PAGE gel and blotted onto membrane. Immunoblots were performed using a 2000-fold dilution of anti-RGA antibody (gift of C. Schwechheimer) and a 5000-fold dilution of peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes). Signals were detected by film (within linear range of detection) using the Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore). The blot was subsequently probed with anti-cdc2 (PSTAIRE) antibody (Santa Cruz Biotechnology) for loading control.

GUS analyses

Histochemical detection of GUS activity was carried out on 24-h germinating embryo, 7-day-old seedling, 14-day-old plantlet, inflorescence and silique. Plant material was first fixed for 10 min in 90% (v/v) acetone on ice, washed, then infiltrated in GUS solution (500 µg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (X-Gluc); 50 mM sodium phosphate pH 7; 1 mM potassium ferricyanide; 1 mM potassium ferrocyanide; 10 mM EDTA; 0.01% triton X-100) for 15 min and incubated at 37°C for

8 h. Then, the GUS solution was replaced with 100% (v/v) ethanol during 6 h at room temperature and kept in 70% (v/v) ethanol at 4°C.

Observation of GFP fluorescence

Confocal microscopy images were obtained with a Zeiss LSM510 inverted confocal laser microscope with 40x objectives. The excitation wavelength for GFP detection was 488 nm. All images were obtained with the same modifications and intensity parameters. GFP fluorescence was determined on 7-day-old *pKAO1:KAO1-GFP* and *pKAO2:KAO2-GFP* root tip.

GA determinations

GAs were extracted from 7-day-old seedlings and analyzed using a Turbo-Mass MS system (Perkin-Elmer) equipped with a Perkin-Elmer Auto System XL gas chromatograph as described in Methods S1.

Phylogenetic analysis

The phylogram was generated using Phylogeny (<http://www.phylogeny.fr/>; Dereeper *et al.*, 2008) from putative amino acids of full-length genes obtained from Phytozome (<http://www.phytozome.net/>) and National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/) databases using *Arabidopsis thaliana* KAO1 protein as query sequence, and default program options. Alignments of protein sequences were generated using MUSCLE (Edgar, R.C., 2004; Dereeper *et al.*, 2010), using Gblocks program to eliminate poorly aligned positions and divergent regions. Numbers shown in the tree represent the bootstrap support values (%), and the indicated accession numbers are those available in www.ncbi.nlm.nih.gov/.

Statistical analysis

All statistic analyses were performed using XLSTAT software package (Microsoft, edition 2014). Phenotypic characterization experiments were analyzed by analysis of variance (ANOVA). Fisher's Least Significant Difference (LSD) was used to compare between genotypes using a significance threshold of 5%. GA determinations were analyzed by using the restricted maximum likelihood approach on a transformed scale (natural log), for fitting a linear mixed model, making pairwise

comparisons of means ($P < 0.05$). For qRT-PCR data, statistical analysis was performed using Student's t -test ($P < 0.05$).

Accession Numbers

Sequence data from this article can be found in the Arabidopsis Genome Initiative or GenBank/EMBL databases under the following accession numbers: *At1g05160* (*KAO1*), *At2g32440* (*KAO2*), *At4g25420* (*GA20ox1*), *At1g15550* (*GA3ox1*), *At1g78440* (*GA2ox1*), *At4g02780* (*CPS* or *GA1*), *At2g01570* (*RGA*), *At1g14920* (*GAI*).

Acknowledgements

We thank Valérie Cognat for help with phylogenetic analysis, Jérôme Mutterer for help with the imaging, Maxime Lecorbeiller for the statistical analysis, Anja Liebrandt for help with GC-MS analysis, Tai-ping Sun for the *ga1-3* (Col-0) mutant line, Peter Hedden for the *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3-1* mutant line, and Claus Schwechheimer for the RGA antibody. We also thank Michael Wild for helpful discussion. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and the French ministry of research and higher education.

Supporting Information

Figure S1. Developmental expression profiles of *Arabidopsis* *KAO1* and *KAO2* genes.

Figure S2. Characterization of *Arabidopsis* mutants defective in *KAO1* and *KAO2*.

Figure S3. *kao1* and *kao2* single mutants display no vegetative growth phenotype.

Figure S4. Loss of *KAO1* and *KAO2* function affects root elongation.

Figure S5. Flowering time of the *kao* mutants in short-day (SD) conditions.

Figure S6. Effect of *kao* mutations on the feedback regulation of GA metabolism gene expression.

Figure S7. The feedback regulation of GA biosynthesis does not operate at the level of *KAO* gene expression.

Table S1. Phenotypic parameters for *Arabidopsis kao1-2* and *kao2-1* mutants in presence of paclobutrazol.

Table S2. Primer list.

Methods S1. GA determinations.

References

Achard, P. and Genschik, P. (2009) Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *J. Exp. Bot.* **60**, 1085-1092.

Band, L.R., Ubeda-Tomás, S., Dyson, R.J., Middleton, A.M., Hodgman, T.C., Owen, M.R., Jensen, O.E., Bennett, M.J. and King, J.R. (2012) Growth-induced hormone dilution can explain the dynamics of plant root cell elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 7577-7582.

Cao, D., Cheng, H., Wu, W., Soo, H.M. and Peng, J. (2006) Gibberellin mobilizes distinct DELLA-dependent transcriptomes to regulate seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **142**, 509-525.

Cheng, H., Qin, L., Lee, S., Fu, X., Richards, D.E., Cao, D., Luo, D., Harberd, N.P. and Peng, J. (2004) Gibberellin regulates *Arabidopsis* floral development via suppression of DELLA protein function. *Development*, **131**, 1055-1064.

Cowling, R.J., Kamiya, Y., Seto, H. and Harberd, N.P. (1998) Gibberellin dose-response regulation of *GA4* gene transcript levels in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **117**, 1195-1205.

Davidson, S.E., Elliott, R.C., Helliwell, C.A., Poole, A.T. and Reid, J.B. (2003) The pea gene *NA* encodes *ent*-kaurenoic acid oxidase. *Plant Physiol.* **131**, 335-344.

Davière, J.M. and Achard, P. (2013) Gibberellin signaling in plants. *Development*, **140**, 1147-1151.

Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.M. and Gascuel O. (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* **36**, W465-W469.

Dereeper, A., Audic, S., Claverie, J.M. and Blanc, G. (2010) BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC Evol. Biol.* **12**, 10:8.

Dill, A. and Sun, T-p. (2001) Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, **159**, 777-785.

Dill, A., Thomas, S.G., Hu, J., Steber, C.M. and Sun, T-p. (2004) The *Arabidopsis* F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell*, **16**, 1392-1405.

Dorcey, E., Urbez, C., Blazquez, M.A., Carbonell, J. and Perez-Amador, M.A. (2009) Fertilization-dependent auxin response in ovules triggers fruit development through the modulation of gibberellin metabolism in *Arabidopsis*. *Plant J.* **58**, 318-332.

Eriksson, S., Böhlenius, H., Moritz, T. and Nilsson, O. (2006) GA₄ is the active gibberellin in the regulation of LEAFY transcription and *Arabidopsis* floral initiation. *Plant Cell*, **18**, 2172-2181.

Edgar, RC. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1792-1797.

Fambrini, M., Mariotti, L., Parlanti, S., Picciarelli, P., Salvini, M., Ceccarelli, N. and Pugliesi, C. (2011) The extreme dwarf phenotype of the GA-sensitive mutant of sunflower, *dwarf2*, is generated by a deletion in the *ent*-kaurenoic acid oxidase1 (*HaKAO1*) gene sequence. *Plant Mol. Biol.* **75**, 431-450.

Fleet, C.M., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kawaide, H., David, C.J., Kamiya, Y. and Sun, T-p. (2003) Overexpression of *AtCPS* and *AtKS* in *Arabidopsis* confers increased *ent*-kaurene production but no increase in bioactive gibberellins. *Plant Physiol.* **132**, 830-839.

Fleet, C.M. and Sun, T-p. (2005) A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 77-85.

Fu, X., Richards, D.E., Fleck, B., Xie, D., Burton, N. and Harberd, N.P. (2004) The *Arabidopsis* mutant sleepy1^{gar2-1} protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCF^{SLY1} E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. *Plant Cell*, **16**, 1406-1418.

Hedden, P. and Kamiya, Y. (1997) Gibberelin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 431-460.

Hedden, P. and Thomas, S.G. (2012) Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem J.* **444**, 11-25.

Helliwell, C.A., Sheldon, C.C., Olive, M.R., Walker, A.R., Zeevaart, J.A., Peacock, W.J. and Dennis, E.S. (1998) Cloning of the *Arabidopsis ent*-kaurene oxidase gene *GA3*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 9019-9024.

Helliwell, C.A., Poole, A., Peacock, W.J. and Dennis, E.S. (1999) *Arabidopsis ent*-kaurene oxidase catalyzes three steps of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiol.* **119**, 507-510.

Helliwell, C.A., Sullivan, J.A., Mould, R.M., Gray, J.C., Peacock, W.J. and Dennis, E.S. (2001a) A plastid envelope location of *Arabidopsis ent*-kaurene oxidase links the plastid and endoplasmic reticulum steps of the gibberellin biosynthesis pathway. *Plant J.* **28**, 201-208.

Helliwell, C.A., Chandler, P.M., Poole, A., Dennis, E.S. and Peacock, W.J. (2001b) The CYP88A cytochrome P450, *ent*-kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellin biosynthesis pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 2065-2070.

Hu, J., Mitchum, M.G., Barnaby, N., Ayele, B.T., Ogawa, M., Nam, E., Lai, W.C., Hanada, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Swain, S.M., Yamaguchi, S., Kamiya, Y. and Sun, T-p. (2008) Potential sites of bioactive gibberellin production during reproductive growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **20**, 320-336.

Huang, Y., Yang, W., Pei, Z., Guo, X., Liu, D., Sun, J. and Zhang, A. (2012) The genes for gibberellin biosynthesis in wheat. *Funct. Integr. Genomics*, **12**, 199-206.

King, K.E., Moritz, T. and Harberd, N.P. (2001) Gibberellins are not required for normal stem growth in *Arabidopsis thaliana* in the absence of GAI and RGA. *Genetics*, **159**, 767-776.

Koorneef, M. and van der Veen, J.H. (1980) Induction and analysis of gibberellin-sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theor. Appl. Genet.* **58**, 257-263.

McGinnis, K.M., Thomas, S.G., Soule, J.D., Strader, L.C., Zale, J.M., Sun, T-p. and Steber, C.M. (2003) The *Arabidopsis SLEEPY1* gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell*, **15**, 1120-1130.

Mitchum, M.G., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kuwahara, A., Yoshioka, Y., Kato, T., Tabata, S., Kamiya, Y. and Sun, T-p. (2006) Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in *Arabidopsis* development. *Plant J.* **45**, 804-818.

Nakamura, S., Mano, S., Tanaka, Y., Ohnishi, M., Nakamori, C., Araki, M., Niwa, T., Nishimura, M., Kaminaka, H., Nakagawa, T., Sato, Y. and Ishiguro, S. (2010) Gateway binary vectors with the bialaphos resistance gene, bar, as a selection marker for plant transformation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 1315-1319.

Ogawa, M., Hanada, A., Yamauchi, Y., Kuwahara, A., Kamiya, Y. and Yamaguchi, S. (2003) Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Cell*, **15**, 367-378.

Olszewski, N., Sun, T-p. and Gubler, F. (2002) Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell*, **14**, S61-S80.

Oñate-Sánchez, L. and Vicente-Carbajosa, J. (2008) DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques. *BMC Res. Notes*, **1:93**.

Peng, J. and Harberd, N.P. (2002) The role of GA-mediated signalling in the control of seed germination. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 376-381.

Pimenta Lange, M.J., Knop, N. and Lange, T. (2012) Stamen-derived bioactive gibberellin is essential for male flower development of *Cucurbita maxima* L. *J. Exp. Bot.* **63**, 2681-2691.

Pimenta Lange, M.J., Lange, T. (2006) Gibberellin biosynthesis and the regulation of plant development. *Plant Biol.* **8**, 281-290.

Plckett, A.R., Powers, S.J., Fernandez-Garcia, N., Urbanova, T., Takebayashi, Y., Seo, M., Jikumaru, Y., Benlloch, R., Nilsson, O., Ruiz-Rivero, O., Phillips, A.L., Wilson, Z.A., Thomas, S.G. and Hedden, P. (2012) Analysis of the developmental roles of the *Arabidopsis* gibberellin 20-oxidases demonstrates that *GA20ox1*, *-2*, and *-3* are the dominant paralogs. *Plant Cell*, **24**, 941-960.

Rieu, I., Eriksson, S., Powers, S.J., Gong, F., Griffiths, J., Woolley, L., Benlloch, R., Nilsson, O., Thomas, S.G., Hedden, P. and Phillips, A.L. (2008) Genetic analysis reveals that C19-GA 2-oxidation is a major gibberellin inactivation pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **20**, 2420-2436.

Sakamoto, T., Miura, K., Itoh, H., Tatsumi, T., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Agrawal, G.K., Takeda, S., Abe, K., Miyao, A., Hirochika, H., Kitano, H., Ashikari, M. and Matsuoka, M. (2004) An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiol.* **134**, 1642-1653.

Schomburg, F.M., Bizzell, C.M., Lee, D.J., Zeevaart, J.A. and Amasino, R.M. (2003) Overexpression of a novel class of gibberellin 2-oxidases decreases gibberellin levels and creates dwarf plants. *Plant Cell*, **15**, 151-163.

Shani, E., Weinstain, R., Zhang, Y., Castillejo, C., Kaiserli, E., Chory, J., Tsien, R.Y. and Estelle, M. (2013) Gibberellins accumulate in the elongating endodermal cells of *Arabidopsis* root. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 4834-4839.

Silverstone, A.L., Chang, C., Krol, E. and Sun, T-p. (1997) Developmental regulation of the gibberellin biosynthetic gene *GA1* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **12**, 9-19.

Silverstone, A.L., Jung, H.S., Dill, A., Kawaide, H., Kamiya, Y. and Sun, T-p. (2001) Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **13**, 1555-1566.

Sun, T-p. and Kamiya, Y. (1994) The *Arabidopsis* *GA1* locus encodes the cyclase *ent*-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell*, **6**, 1509-1518.

Thomas, S.G., Phillips, A.L. and Hedden, P. (1999) Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 4638-4703.

Tyler, L., Thomas, S.G., Hu, J., Dill, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R. and Sun, T-p. (2004). DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **135**, 1008-1019.

Ubeda-Tomás, S., Swarup, R., Coates, J., Swarup, K., Laplaze, L., Beemster, G.T., Hedden, P., Bhalerao, R. and Bennett, M.J. (2008) Root growth in *Arabidopsis* requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. *Nat. Cell Biol.* **10**, 625-628.

Ubeda-Tomás, S., Federici, F., Casimiro, I., Beemster, G.T., Bhalerao, R., Swarup, R., Doerner, P., Haseloff, J. and Bennett, M.J. (2009) Gibberellin signaling in the endodermis controls *Arabidopsis* root meristem size. *Curr. Biol.* **19**, 1194-1199.

Wilson, R.N., Heckman, J.W. and Somerville, C.R. (1992) Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. *Plant Physiol.* **100**, 403-408.

Winkler, R.G. and Helentjaris, T. (1995) The maize *Dwarf3* gene encodes a cytochrome P450-mediated early step in gibberellin biosynthesis. *Plant Cell*, **7**, 1307-1317.

Xu, Y.L., Li, L., Gage, D.A. and Zeevaart, J.A. (1999) Feedback regulation of *GA5* expression and metabolic engineering of gibberellin levels in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **11**, 927-936.

Yamaguchi, S., Sun, T-p., Kawaide, H. and Kamiya, Y. (1998) The *GA2* locus of *Arabidopsis thaliana* encodes *ent*-kaurene synthase of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiol.* **116**, 1271-1278.

Yamaguchi, S. (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 225-251.

Table 1. Germination characteristics of *Arabidopsis kao1 kao2* double mutant seeds.

(a) KA treatment

Genotype	KA [0 M]	[10 ⁻⁹ M]	[10 ⁻⁸ M]	[10 ⁻⁷ M]
Col-0	99.9	98.5	99.2	99.3
<i>gal-3</i>	1.3	7.2	27.2	25.5
<i>kao1-1 kao2-1</i>	6.1	4.3	6.6	5.8
<i>ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3-1</i>	0.5	2.7	7.0	2.1

(b) GA₁₂ treatment

Genotype	GA ₁₂ [0 M]	[10 ⁻⁹ M]	[10 ⁻⁸ M]	[10 ⁻⁷ M]	[10 ⁻⁶ M]
Col-0	99.1	99.2	98.3	98.2	99.0
<i>gal-3</i>	0.9	2.3	7.8	38.5	96.0
<i>kao1-1 kao2-1</i>	1.2	8.6	27.6	85.8	98.8
<i>ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3-1</i>	5.0	2.6	2.0	1.3	2.0

(c) GA₄ treatment

Genotype	GA ₄ [0 M]	[10 ⁻⁹ M]	[10 ⁻⁸ M]	[10 ⁻⁷ M]	[10 ⁻⁶ M]
Col-0	99.5	99.4	98.2	99.5	99.4
<i>gal-3</i>	0	2.0	24.7	78.2	96.0
<i>kao1-1 kao2-1</i>	1.6	8.6	27.6	85.8	98.8
<i>ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3-1</i>	1.3	4.1	10.1	65.7	98.2

Effect of exogenous *ent*-kaurenoic acid (KA) (a), GA₁₂ (b) and GA₄ (c) on seed germination of wild-type (Col-0), *gal-3*, *kao1-2 kao2-1* and *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3-1* mutant seeds. 150 to 200 seeds per genotype were imbibed in the light at 22°C for 7 days. Values represent the percentage of germinated seeds. Similar results were obtained in at least two independent biological experiments.

Table 2. Phenotypic parameters for *Arabidopsis kao1* and *kao2* single and double mutants.(a) without GA₃ treatment

Genotype	Hypocotyl length (mm)	Root length (mm)	Rosette radius (mm)	No. rosette leaves	Plant height (cm)
Col-0	1.70 ± 0.23	25.4 ± 3.0	113.8 ± 9.3	11.0 ± 0.9	48.6 ± 2.7
<i>gal-3</i>	0.81 ^a ± 0.15	12.6 ^a ± 1.6	38.2 ^a ± 4.0	40.2 ^a ± 1.8	3.7 ^a ± 0.5
<i>kao1-1</i>	1.70 ± 0.22	24.3 ± 2.5	112.5 ± 11.4	10.6 ± 0.9	49.4 ± 3.6
<i>kao1-2</i>	1.70 ± 0.19	23.2 ± 4.6	107.5 ± 11.4	11.2 ± 0.9	48.9 ± 1.7
<i>kao2-1</i>	1.71 ± 0.19	24.2 ± 5.1	110.4 ± 11.3	11.1 ± 0.8	46.0 ± 3.0
<i>kao1-1 kao2-1</i>	0.93 ^a ± 0.14	8.0 ^b ± 2.2	28.5 ^b ± 5.3	34.4 ^b ± 2.6	2.6 ^a ± 0.7
<i>kao1-2 kao2-1</i>	0.89 ^a ± 0.15	8.9 ^b ± 2.1	27.5 ^b ± 6.8	33.5 ^b ± 2.1	2.5 ^a ± 0.5

(b) with GA₃ treatment

Genotype	Hypocotyl length (mm)	Root length (mm)	Rosette radius (mm)	No. rosette leaves	Plant height (cm)
Col-0	2.48 ± 0.24	27.0 ± 2.1	124.2 ± 12.5	8.3 ± 0.5	52.6 ± 1.9
<i>gal-3</i>	2.54 ± 0.33	27.3 ± 2.9	116.0 ^a ± 12.4	7.7 ^a ± 0.4	35.4 ^a ± 2.0
<i>kao1-1</i>	2.44 ± 0.36	26.7 ± 2.8	116.7 ^a ± 12.3	7.6 ^a ± 0.5	55.9 ^b ± 2.0
<i>kao1-2</i>	2.45 ± 0.36	23.0 ^a ± 2.9	124.5 ± 14.6	7.6 ^a ± 0.5	58.4 ^b ± 1.9
<i>kao2-1</i>	2.53 ± 0.29	23.1 ^a ± 2.5	115.8 ^a ± 12.7	7.3 ^a ± 0.5	57.7 ^b ± 2.9
<i>kao1-1 kao2-1</i>	2.43 ± 0.24	23.4 ^a ± 1.7	123.3 ± 16.1	7.7 ^a ± 0.4	36.3 ^a ± 2.3
<i>kao1-2 kao2-1</i>	2.45 ± 0.23	22.9 ^a ± 2.7	122.0 ± 9.5	7.6 ^a ± 0.4	36.2 ^a ± 2.1

See Experimental procedures for details on design. The measurements are the means ± SD (n > 20). Superscript letters indicate significant difference ($P < 0.05$) from the wild-type. Genotypes marked with different letters are significantly different from each other.

Table 3. Concentrations of gibberellins (GAs) in 7-day-old wild-type, *kao1-2*, *kao2-1* and *kao1-2 kao2-1* mutant seedlings from two biological replicates (in ng g⁻¹ fresh weight).

Genotype	KA	7OHKA	GA ₁₂ ald	GA ₁₂	GA ₁₅	GA ₂₄	GA ₉	GA ₄	GA ₅₁	GA ₃₄	GA ₁₉
Col-0	0.19	0.08	0.07	0.21	0.24	0.35	0.09	0.77	0.11	0.24	0.26
	0.16	0.14	n.d.	0.22	0.30	0.32	0.08	1.15	0.09	0.23	0.21
<i>kao1-2</i>	0.35 ^a	0.05	0.06	0.25	0.26	0.34	0.08	0.96	0.09	0.16 ^a	0.26
	0.34 ^a	0.08	0.09	0.17	0.20	0.21	0.09	1.13	0.07	0.16 ^a	0.20
<i>kao2-1</i>	0.50 ^a	0.05 ^a	n.d.	n.d. ^a	0.11 ^a	0.04 ^a	0.04 ^a	0.78	n.d. ^a	0.09 ^a	0.09
	0.54 ^a	n.d. ^a	n.d.	n.d. ^a	0.12 ^a	n.d. ^a	0.05 ^a	0.72	n.d. ^a	0.08 ^a	0.11
<i>kao1-2 kao2-1</i>	1.72 ^a	n.d. ^a	n.d.	n.d. ^a	n.d. ^a	n.d. ^a	0.05 ^a	0.12 ^a	n.d. ^a	n.d. ^a	0.10 ^a
	1.71 ^a	n.d. ^a	n.d.	n.d. ^a	n.d. ^a	n.d. ^a	0.04 ^a	0.14 ^a	n.d. ^a	n.d. ^a	0.08 ^a

Statistical analysis was performed following linear model analysis allowing pairwise comparison of means on the transformed scale. Superscript letters indicate significant difference ($P < 0.05$) from the wild-type. In samples marked “n.d.,” endogenous GA was not detected, but internal standard was recovered. GA₅₃, GA₄₄, GA₂₀, GA₁ and GA₈ were also analyzed, but endogenous levels were n.d. KA, *ent*-kaurenoic acid; 7OH-KA, *ent*-7 α -hydroxy kaurenoic acid; GA₁₂ald, GA₁₂-aldhyde.

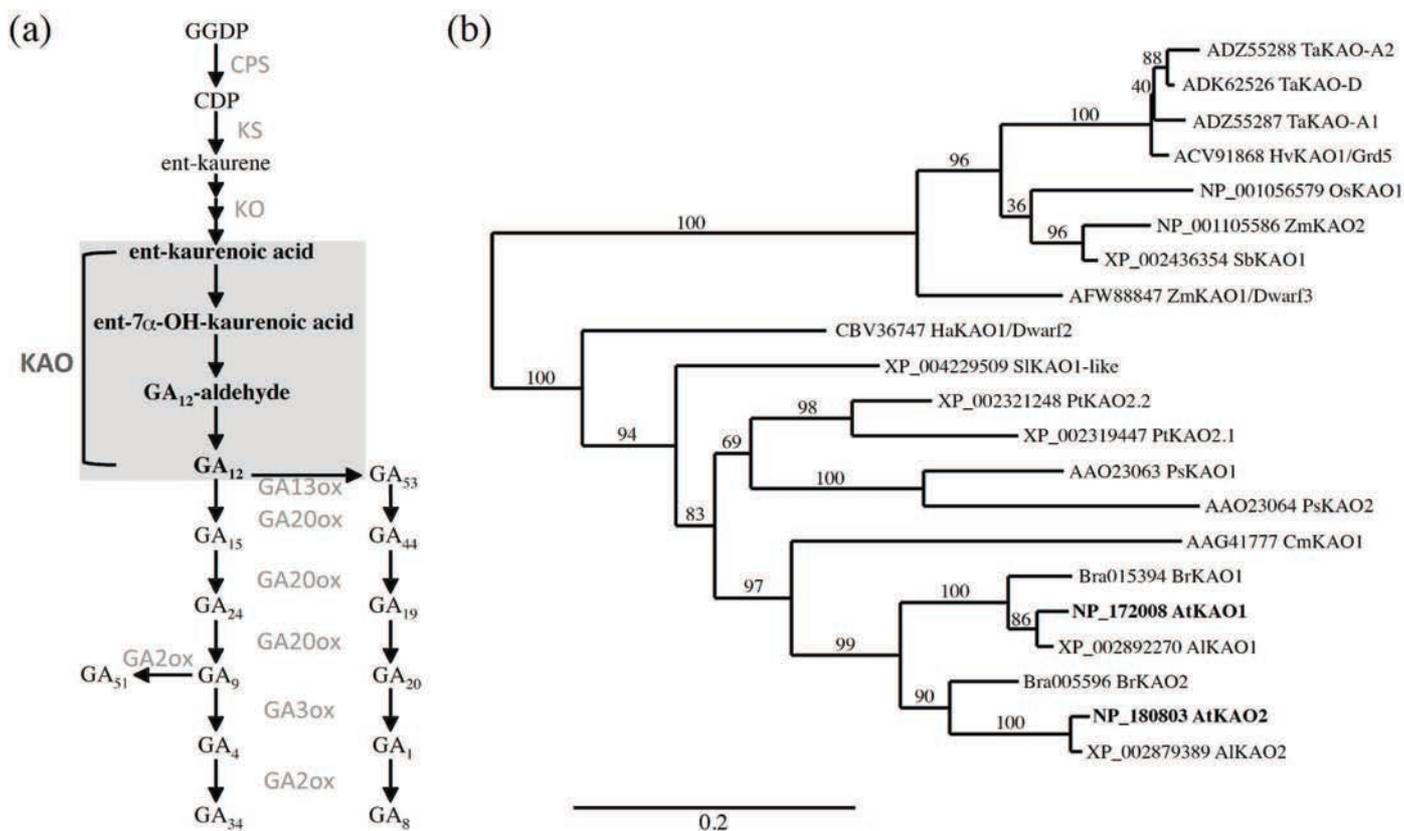
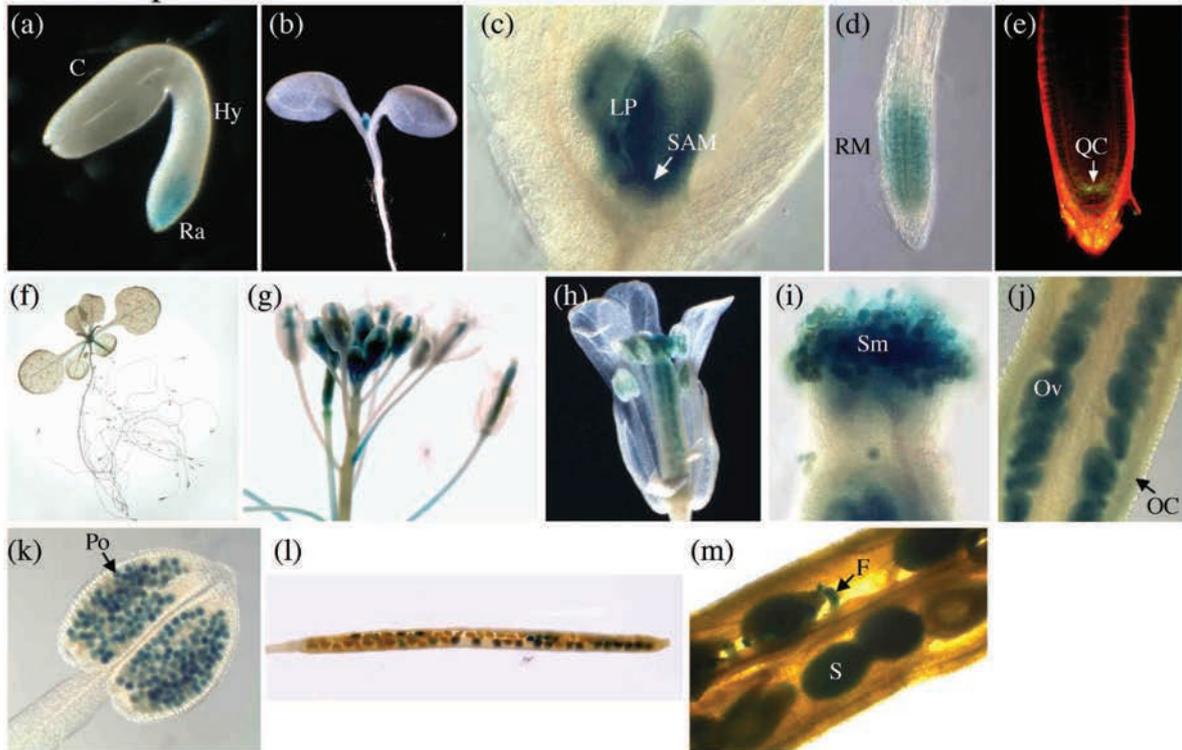


Figure 1. GA biosynthesis and the *KAO* gene family.

(a) Simplified schematic of the GA biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. Biosynthetic enzymes are marked in grey. GGDP, geranylgeranyl diphosphate; CDP, *ent*-copalyl diphosphate; CPS, *ent*-copalyl diphosphate synthase; KS, *ent*-kaurene synthase; KO, *ent*-kaurene oxidase; KAO, *ent*-kaurenoic acid oxidase.

(b) Phylogenetic analysis of selected *KAO* protein sequences encompassing all known paralogs from the species *Arabidopsis thaliana* (AtKAO1 and AtKAO2, highlighted in black-bold), *Arabidopsis lyrata* (AlKAO1 and AlKAO2), *Brassica rapa* (BrKAO1 and BrKAO2), *Curcubita maxima* (CmKAO1), *Helianthus annuus* (HaKAO1 or Dwarf2), *Hordeum vulgare* (HvKAO1 or Grd5), *Oryza sativa* (OsKAO1), *Pisum sativum* (PsKAO1 and PsKAO2), *Populus trichocarpa* (PtKAO2.1 and PtKAO2.2), *Solanum lycopersicum* (SIKAO2-like), *Sorghum bicolor v1.4* (SbKAO1), *Triticum aestivum* (TaKAO-A1, TaKAO-A2 and TaKAO-D) and *Zea mays* (ZmKAO1 or Dwarf3 and ZmKAO2) are included. The tree was generated by Phylogeny (<http://www.phylogeny.fr>) from a MUSCLE alignment, using Gblock program to eliminate poorly aligned positions and divergent regions. Numbers shown in the tree represent the bootstrap support values (%), and the indicated accession numbers are those available in www.ncbi.nlm.nih.gov. Scale represents 0.2 amino acid substitutions per site.

KAO1 expression



KAO2 expression

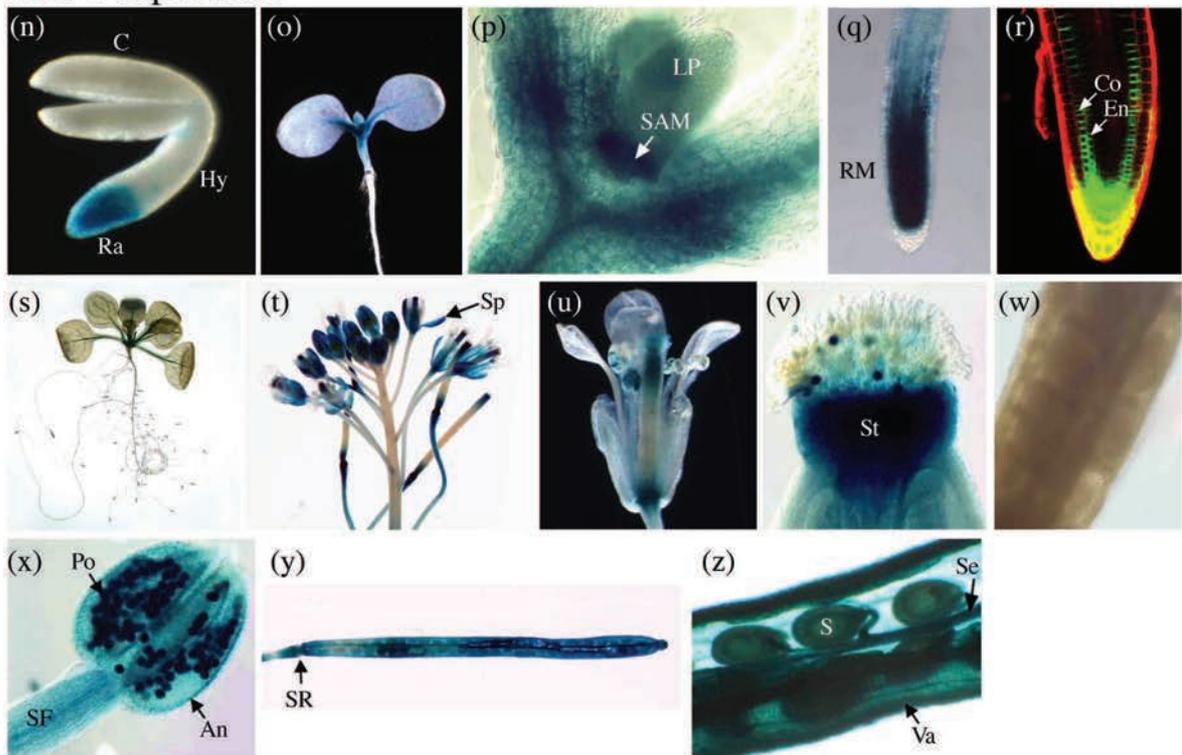


Figure 2. Tissue-specific expression patterns of *Arabidopsis* *KAO1* and *KAO2*.

The following tissues and developmental stages of the *pKAO1:KAO1-GUS* and *pKAO2:KAO2-GUS* reporter lines were assayed: (a,g) 24 h germinating embryo, (b,o) 7-d-old seedling, (c,p) 7-d-old shoot apex, (d,q) 7-d-old root apex, (f,s) 21-d-old plantlet, (g,t) inflorescence, (h,u) dissected flower, (i,v) gynoecium apex, (j,w) ovary, (k,x) stamen, (l,y) mature silique, (m,z) open silique. (e,r) GFP fluorescence (viewed by fluorescence confocal microscopy) in the root tips of 7-d-old seedling of the *pKAO1:KAO1-GFP* and *pKAO2:KAO2-GFP* reporter lines. An, anther; C, cotyledon; Co, cortex cells; En, endodermal cells; F, funiculus; Hy, hypocotyl; LP, leaf primordia; OC, ovary chamber; Ov, ovule; QC, quiescent center; Po, pollen grain; Ra, Radicle; RM, root meristem; S, seed; SAM, shoot apical meristem; Se, septum; SF, stamen filament; SR, silique receptacle; Sm, stigma; Sp, sepal; St, style; Va, valve.

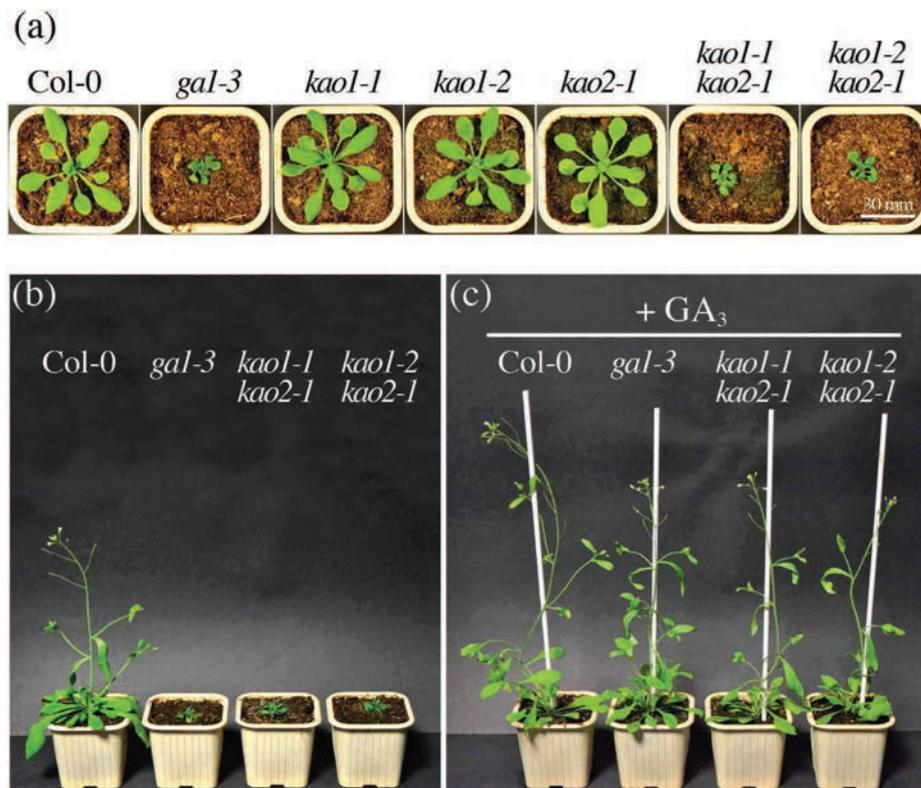


Figure 3. Loss of KAO1 and KAO2 function affects plant growth.

(a) Phenotypic comparison of 21-day-old rosettes of single and double mutant combinations of *kaol-1*, *kaol-2* and *kaol-1* *kaol-2* compared with the wild-type (Col-0) and *gal-3*. All pictures were taken with the same magnification. Scale bar represents 30 mm.

(b, c) Phenotypic comparison of 40-day-old wild-type (Col-0), *gal-3* and *kaol-1* *kaol-2* double mutant plants treated with GA₃ (c) or control (b).

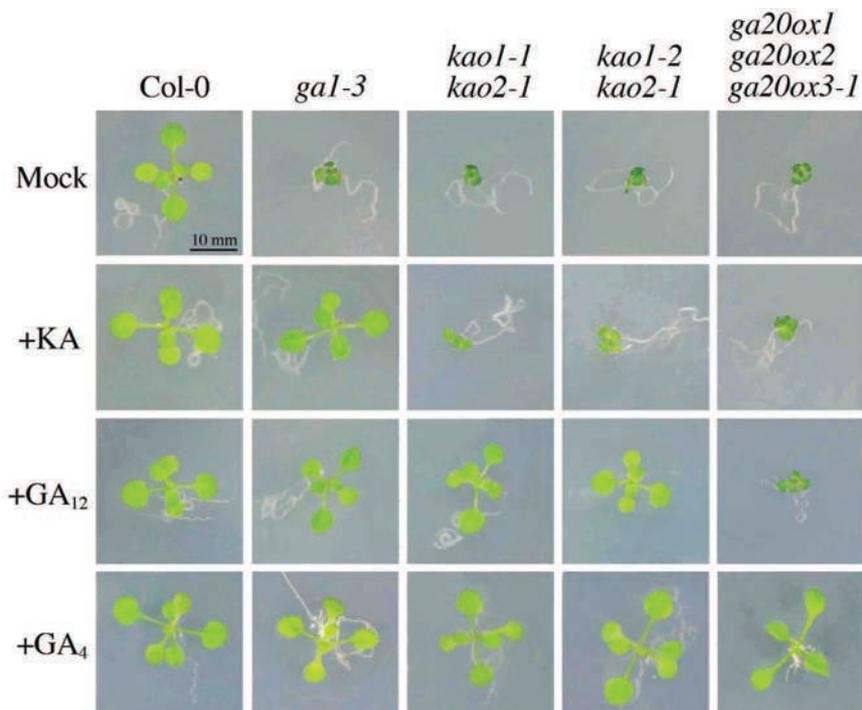


Figure 4. Effect of exogenous KA, GA₁₂ and GA₄ on the vegetative growth of *kaol-1* *kaol-2* double mutant plants.

Representative 14-day-old wild-type (Col-0), *gal-3*, *kaol-1* *kaol-2*, *kaol-1* *kaol-2* *kaol-2* and *ga20ox1* *ga20ox2* *ga20ox3-1* seedlings grown on GA-free MS agar (Mock) or supplemented with 10 μM of *ent*-kaurenoic acid (KA), GA₁₂, or GA₄. All pictures were taken with the same magnification. Scale bar represents 10 mm.

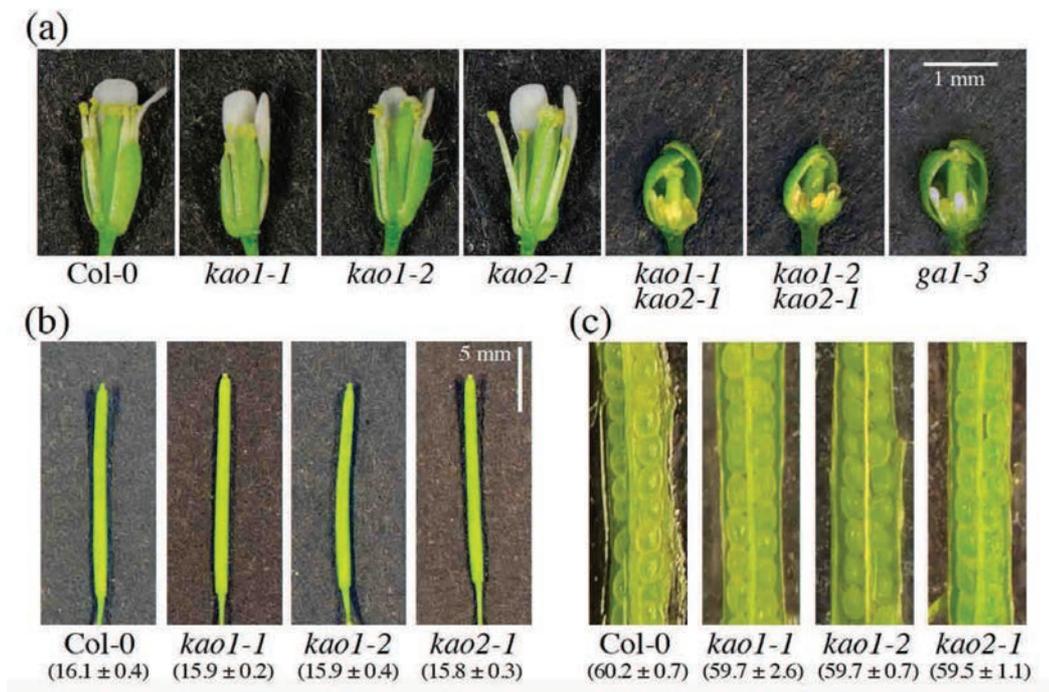


Figure 5. Loss of KAO1 and KAO2 function alters flower development

(a) Representative open flowers of wild-type (Col-0), *kao1-1*, *kao1-2*, *kao2-1*, *kao1-1 kao2-1*, *kao1-2 kao2-1*, and *gal-3*. Some of the floral organs were removed to show the anther phenotype. All pictures were taken with the same magnification. Scale bar represents 1 mm.

(b and c) Silique length (in mm) and number of seeds per silique (mean ± SD; n > 20) of wild-type (Col-0), *kao1-1*, *kao1-2* and *kao2-1*. Statistical analysis ($P < 0.05$) revealed no significant differences between genotypes. Scale bar represents 5 mm.

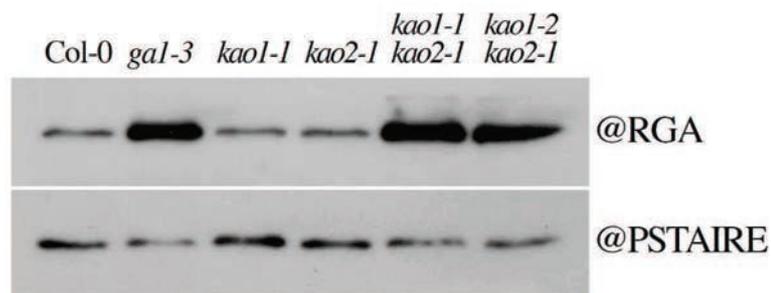


Figure 6. Loss of KAO1 and KAO2 function enhances DELLA accumulation.

Immunodetection of RGA in 7-day-old wild-type (Col-0), *gal-3*, *kao1-1*, *kao2-1*, *kao1-1 kao2-1*, and *kao1-2 kao2-1* seedlings. PSTAIRE serves as sample loading control. Similar results were obtained in three independent experiments.

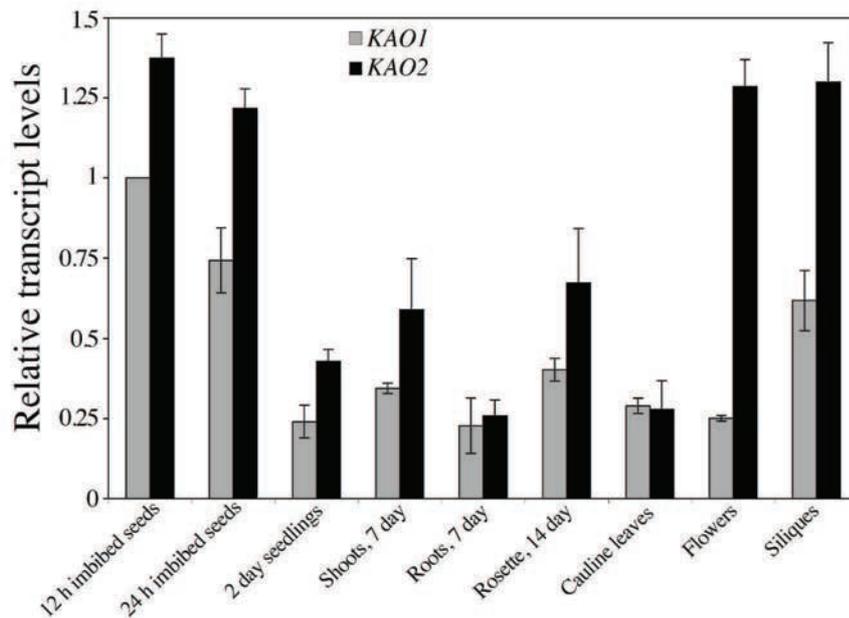


Figure S1. Developmental expression profiles of *Arabidopsis* *KAO1* and *KAO2* genes.

Relative mRNA levels were determined using real-time quantitative RT-PCR on three biological replicates for each tissue. Standard curves were used to calculate the numbers of *KAO* cDNA molecules in each cDNA sample, which were then normalized against two reference genes (see Experimental Procedures). Expression (mean \pm SD) is represented as fold-induction relative to *KAO* levels in 12 h imbibed seeds that was set to 1.

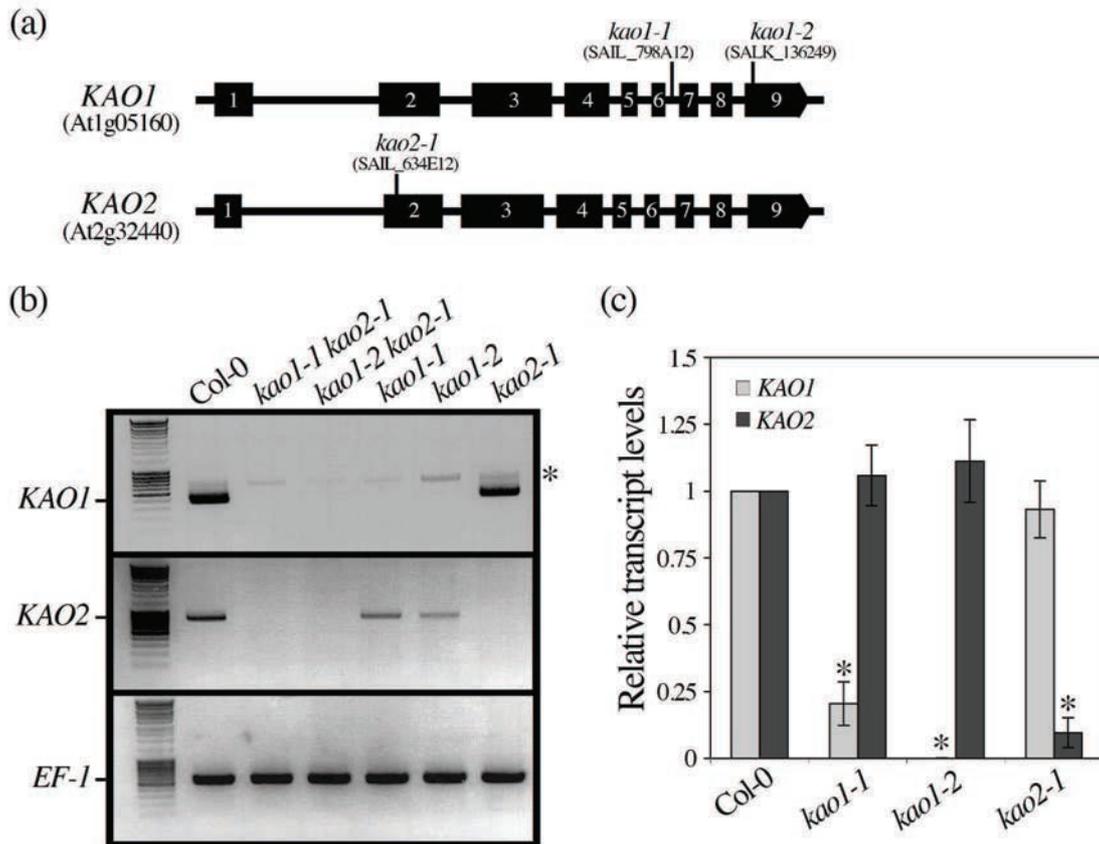


Figure S2. Characterization of *Arabidopsis* mutants defective in *KAO1* and *KAO2*.

(a) Gene model of *KAO1* and *KAO2* indicating the T-DNA insertion site of mutant alleles. Black boxes denote exons, and horizontal lines between exons denote introns.

(b) RT-PCR to confirm null status of *kao1-1*, *kao1-2* and *kao2-1* mutant alleles. Asterisk, unspecific PCR amplification.

(c) Loss-of-function of one KAO is not compensated by increased transcription of the other KAO gene. Expression levels of *KAO1* and *KAO2* gene transcripts (determined by quantitative RT-PCR) in 7-day-old wild-type (Col-0), *kao1-1*, *kao1-2* and *kao2-1* seedlings. Expression in mutant lines is calculated relative to wild-type levels set to 1. Data are mean \pm SD from three biological samples. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test at $P < 0.05$. Asterisk (*) indicates statistically significant differences in comparison to the corresponding control (Col) plants.

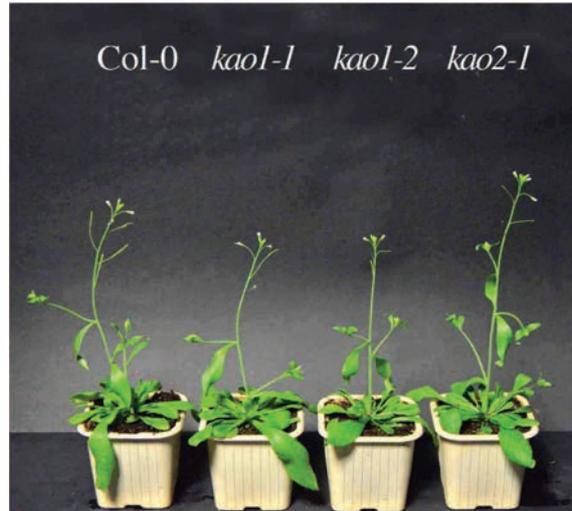


Figure S3. *kao1* and *kao2* single mutants display no vegetative growth phenotype. Representative 40-day-old wild-type (Col-0), *kao1-1*, *kao1-2* and *kao2-1* mutant plants.



Figure S4. Loss of KAO1 and KAO2 function affects root elongation. Representative 7-day-old wild-type (Col-0), *gal-3*, *kao1* and *kao2* single and double mutant roots. Numbers indicate the length of the roots (mean in mm ± SD; n > 20). Superscript letters indicate significant differences ($P < 0.05$) from the wild-type. Genotypes marked with different letters are significantly different from each other. .

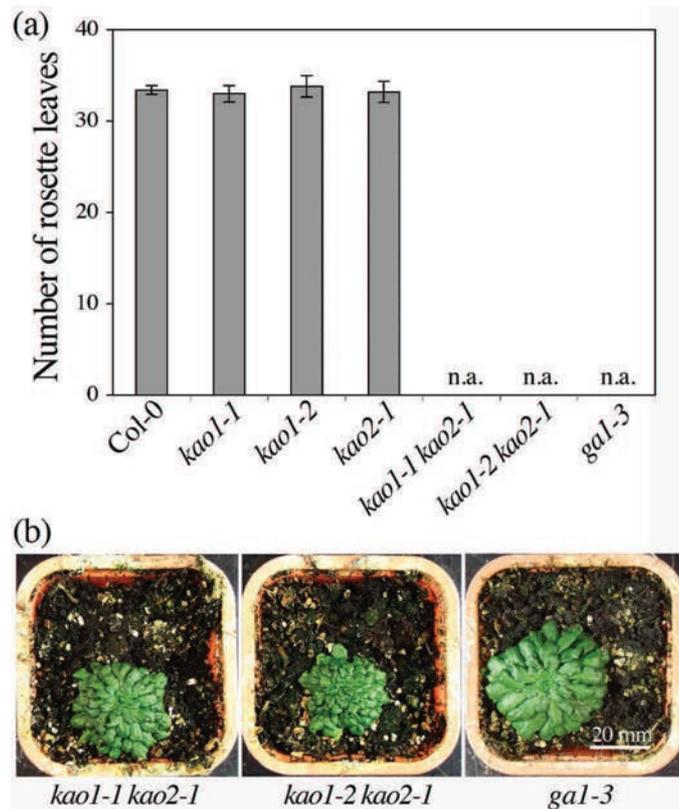


Figure S5. Flowering time of the *kao* mutants in short-day (SD) conditions.

(a) Time to flowering was determined as the total number of rosette leaves produced before bolting. Values shown are the means \pm SD ($n > 5$). n.a., not available. *kao1-1 kao2-1* and *kao1-2 kao2-1* did not flower in SD during the course of the experiment (8 months). Statistical analysis ($P < 0.05$) revealed no significant differences between Col-0 and *kao1-1*, *kao1-2* or *kao2-1*.

(b) Representative 8-month-old *kao1-1 kao2-1*, *kao1-2 kao2-1* and *gal-3* mutant plants grown in SD conditions. All pictures were taken with the same magnification. Scale bar represents 20 mm.

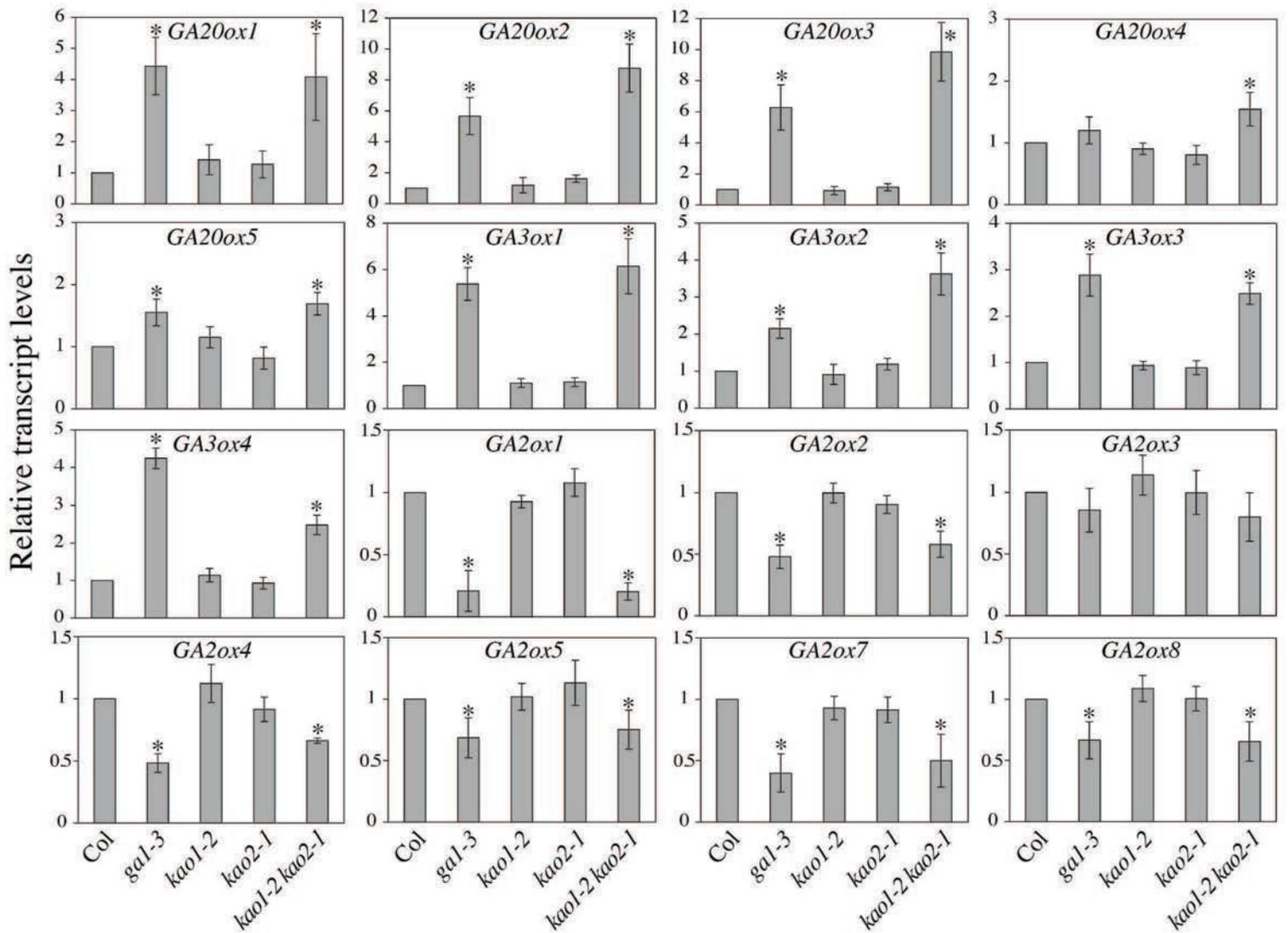


Figure S6. Effect of *kao* mutations on the feedback regulation of GA metabolism gene expression.

Relative levels of selected *GA20ox*, *GA3ox* and *GA2ox* gene transcripts (determined by quantitative RT-PCR) in 7-day-old wild-type (Col-0), *gal1-3*, *kao1* and *kao2* single and double mutant seedlings. Expression is represented as fold-induction relative to wild-type (Col-0) level, which is set to 1 for each gene. Data are mean \pm SD from three biological samples. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test at $P < 0.05$. Asterisk (*) indicates statistically significant differences in comparison to the corresponding control (Col) plants.

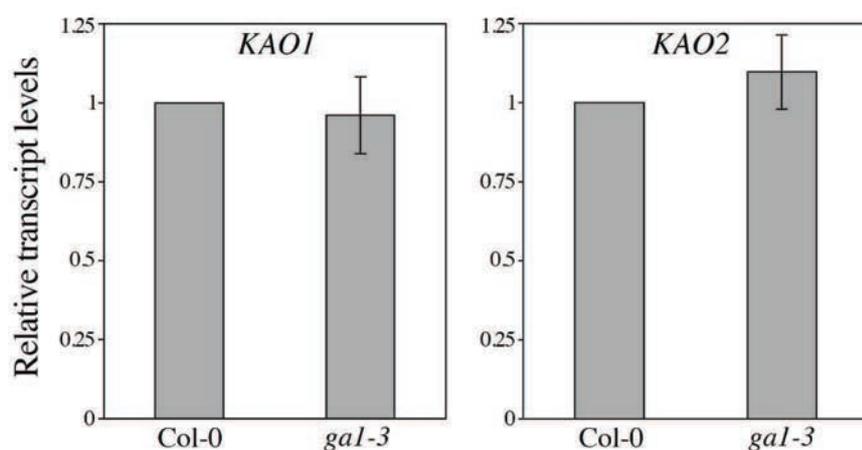


Figure S7. The feedback regulation of GA biosynthesis does not operate at the level of *KAO* gene expression. Relative levels (mean \pm SD) of *KAO1* and *KAO2* gene transcripts (determined by quantitative RT-PCR) in 7-day-old wild-type (Col-0) and *gal-3* mutant seedlings. Expression in mutant lines is calculated relative to wild-type levels set to 1. Data are mean \pm SD from three biological samples. Statistical analysis ($P < 0.05$) revealed no significant differences between Col-0 and *gal-3*. Similar results were obtained in four independent experiments.

Table S1. Phenotypic parameters for *Arabidopsis kao1-2* and *kao2-1* mutants in presence of paclobutrazol (PAC).

(a) Germination efficiency (%)

Genotype	Mock	PAC [0.01 μ M]	PAC [0.1 μ M]	PAC [1 μ M]
Col-0	97.5	95.1	78.5	14.7
<i>kao1-2</i>	97.9	94.0	79.3	15.0
<i>kao2-1</i>	95.8	92.6	82.5	11.7

(b) Root length (mm)

Genotype	Mock	PAC [0.01 μ M]	PAC [0.1 μ M]	PAC [1 μ M]
Col-0	1.72 \pm 0.16	1.09 \pm 0.11	1.00 \pm 0.11	0.82 \pm 0.04
<i>kao1-2</i>	1.65 \pm 0.15	1.14 \pm 0.10	1.06 \pm 0.10	0.79 \pm 0.12
<i>kao2-1</i>	1.64 \pm 0.11	0.91 ^a \pm 0.07	0.81 ^a \pm 0.07	0.63 ^a \pm 0.08

(a) Values represent the percentage of germinated seeds. 150 to 200 seeds per genotype were imbibed in presence of PAC in the light at 22°C for 7 days. Similar results were obtained in at least two independent biological experiments.

(b) Root length measurements. The values are the means \pm SD (n > 15). ^aSignificantly different from the wild-type ($P < 0.05$).

Table S2. Primer list. DNA oligonucleotide sequences used in the study

Primer pairs used for the cloning

pKAO1-F	aagatcagaggaaggtcgtccag
pKAO1-R	agacttttcacttagttaaacttgc
pKAO2-F	gactggacgtgtagcggatctg
pKAO2-R	agcttcagtcgtaaactctcc
KAO1-F	gcaagtttaactaagtgaaaagtct
KAO1-R	ctgataactaattcttgccaagcaa
KAO2-F	aggagagtgtttacgactgaagct
KAO2-R	tggcatcgttctggtgattcttgct

Primers used for RT-PCR analysis

KAO1-F	cttatcgcaggttgatgatg
KAO1-R	atcagttggtctggtatg
KAO2-F	tcttctggtttgcttatcat
KAO2-R	tggactgaaaggcagctaca
EF1-F	ttgctcccacaggattgaccactg
EF1-R	tcacttcgcacccttcttgacg

Primers used for qRT-PCR analysis

KAO1-F	cttatcgcaggttgatgatg
KAO1-R	ttccaaccttttgggatcaa
KAO2-F	ctagaggatacaagaggtggtc
KAO2-R	ccgtcatagcttcagtcg
GA20ox1-F	gagactgaattactaccctc
GA20ox1-R	tgggtttggtgagccaatc
GA20ox2-F	cgatctctcaagccaagactcg
GA20ox2-R	tcgctgacgccatgattg
GA20ox3-F	caacctctccaagtcccactca
GA20ox3-R	agtagcctccgatgccaagc
GA20ox4-F	cctctccaacgaccattatt
GA20ox4-R	tttgctgcttcagagacgag
GA20ox5-F	ttgcttcaagacgatggttg
GA20ox5-R	gaacggtctgccaactacct
GA3ox1-F	gtctagcagctcataccgac
GA3ox1-R	cttctctgtgatttctaate
GA3ox2-F	gccaccacctcaaatactgtg
GA3ox2-R	ggccattgtatgtccttttc
GA3ox3-F	tctgcagttgaactcctacc
GA3ox3-R	tgtgaggggctaaaccata
GA3ox4-F	aagagtccggttgggtcac
GA3ox4-R	tcaccaatggtgaccacgag
GA20ox1-F	ccaaaatccgggttctctct
GA20ox1-R	tttcacgagggcatgtttg

GA2ox2-F	aggtcgtaaaccacggagtc
GA2ox2-R	caagccgaagaagccaatag
GA2ox3-F	cmetaagagtagaccatggtaattg
GA2ox3-R	cattttggattaacatagaggttgc
GA2ox4-F	aagcagttggctcgtgagat
GA2ox4-R	tgaaactgtgaggtgggaca
GA2ox6-F	tcatgatgatcctttcaagttcag
GA2ox6-R	ccaaatctctaaccgtgcgta
GA2ox7-F	atagttaccgttggggaaacc
GA2ox7-R	acgcttccgaaacggagt
GA2ox8-F	tcggaatcagaggcattagc
GA2ox8-R	tttgtccagatTTTTctgcaag
Tip41Like-F	gtgaaaactgttggagagaagcaa
Tip41Like-R	tcaactggataccctttcgca
AT4G2610-F	gagctgaagtggcttcaatgac
AT4G2610-R	ggtccgacatacccatgatcc

Supporting experimental procedures

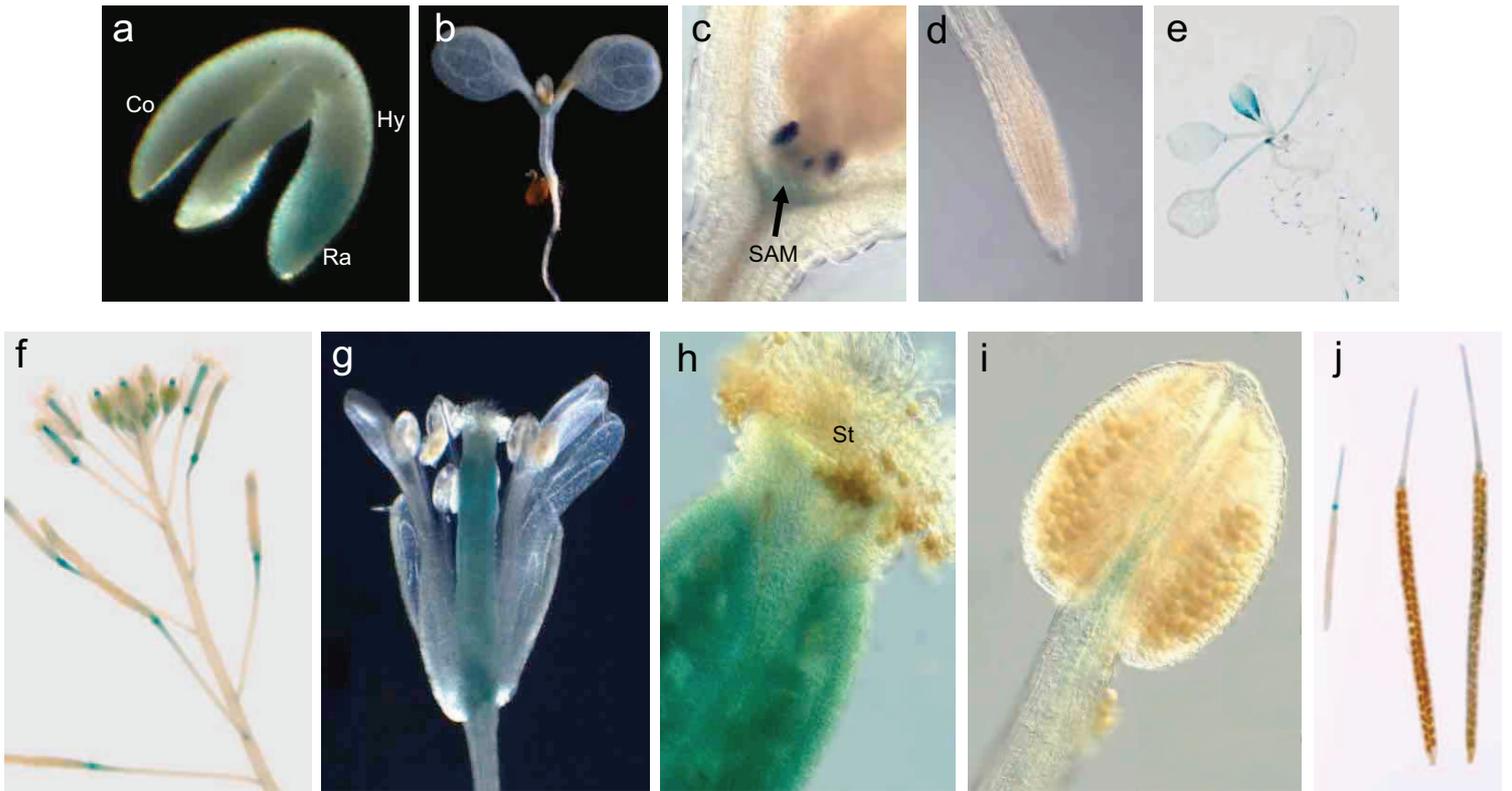
Methods S1. GA determinations

For GA analysis frozen plant tissues (1 g) were spiked with 17, 17-d₂-GA standards (1 ng each; from Professor L. Mander, Canberra, Australia) and pulverized under liquid nitrogen. Eighty percent methanol-water (3 mL) was added and the extract was stirred for 2 h at 4°C. After centrifugation, the pellet was re-extracted with 80% methanol (3 mL) for 2 h and re-centrifuged. The pellet was re-extracted a third time with methanol (3 mL) for 20h and re-centrifuged. The combined methanol extracts were concentrated under a stream of nitrogen to give a total volume of 1 ml aqueous extract and adjusted to pH 3.2 (acetic acid). Solvent partition was performed using ethyl acetate (six-times, 1 mL). The combined ethyl acetate fractions were evaporated to dryness under a stream of nitrogen, re-dissolved in methanol/acetone (1:1, 100 μ L) and water (4 mL, adjusted to pH 3.2 (acetic acid)). After loading onto a C18 cartridge (Waters), the cartridge was washed with water (20 mL), pH 3.2. GAs were eluted with methanol (6 mL), which was then dried under a stream of nitrogen. For purification by HPLC, the residues were re-dissolved in 200 μ L methanol-water, pH 3.2 (1:1), and applied to a C18 reverse-phase column (10 cm long, 8 mm i.d., 4 mm particle size, Novapack liquid chromatography cartridge in a RCM100 radial compression system; Waters) equilibrated with 50% methanol in water, pH3.2. Gibberellins were eluted with a gradient from 62,5% methanol in water, pH3.2 to 100% methanol in 25 min delivered by a two-pump HPLC system (models 501 and 510; Waters) at a flow rate of 1 mL min⁻¹. Starting from 4 mL, 15 fractions were collected per run, each containing 2 mL eluate and dried under a stream of nitrogen. Dried HPLC fractions were re-dissolved in methanol (100 μ L), and methylated with ethereal diazomethane (two times, 200 μ L). The methylated samples were dried and re-dissolved in 2 μ L N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (Macherey-Nagel). The derivatized samples were analyzed using a Turbo-Mass MS system (Perkin-Elmer) equipped with a Perkin-Elmer Auto System XL gas chromatograph as described elsewhere (Lange et al., 2005). The ions monitored for quantification of endogenous *ent*-kaurenoic acid were 316 and 314, and for *ent*-7 α -hydroxy kaurenoic acid 318 and 316. Identification was confirmed on the basis of retention time and the co-occurrence of additional ions. Endogenous levels were calculated on the basis of peak areas, after corrections were made for the contribution of naturally occurring isotopes and for the presence of unlabeled GAs in the internal standards, where necessary.

Supporting reference

Lange, T., Kappler, J., Fischer, A., Frisse, A., Padeffke, T., Schmidtke, S. and Pimenta Lange, M.J. (2005) Gibberellin biosynthesis in developing pumpkin seedlings. *Plant Physiol.* **139**, 213–223.

pKAO1:GUS



pKAO2:GUS

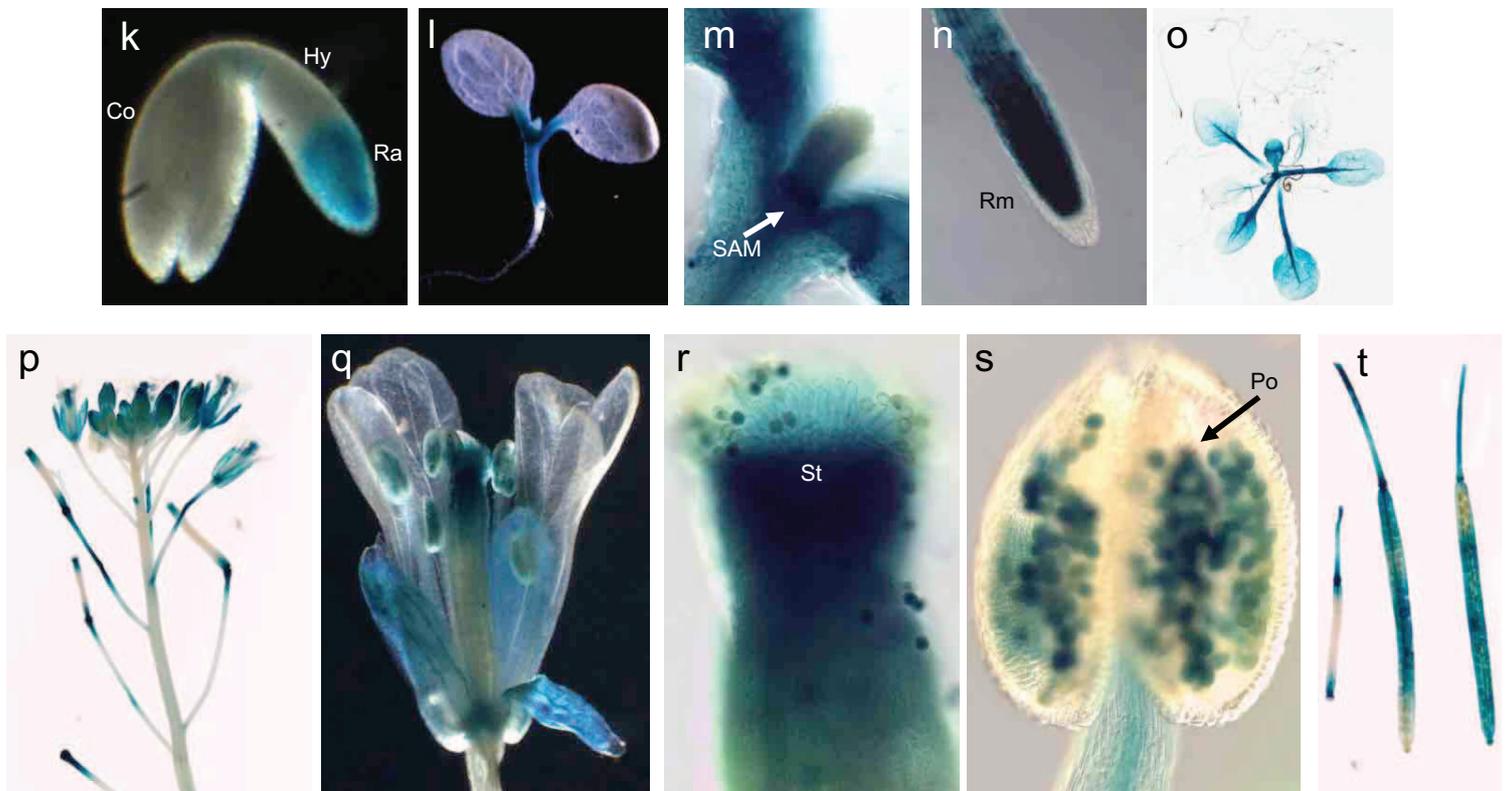


Figure 71 : Patron d'expression des fusions transcriptionnelles *pKAO1:GUS* et *pKAO2:GUS*

Le niveau d'expression des gènes *KAO1* et *KAO2* est analysé dans différents tissus et stades du développement par coloration GUS dans les lignées *pKAO1:GUS* (a-j) et *pKAO2:GUS* (k-t), respectivement. (a,k) embryon en germination depuis 24h (b,l) plantule 7 jours, (c,m) méristème apical caulinaire de plantule 7 jours, (d,n) pointe racinaire de plantule 7 jours, (e,o) plante au stade rosette 21 jours, (f,p) inflorescence, (g,q) fleur disséquée, (h,r) stigmate, (i,s) étamine, (j,t) siliques. Co = cotylédon, Hy = hypocotyle, Po = pollen, Ra = radicule, Rm = méristème racinaire, SAM = méristème apical St = Stigmate.

3. 3 Résultats additionnels

3.3.1 Analyse histochimique de plantes transgéniques exprimant les fusions transcriptionnelles *pKAO1:GUS* et *pKAO2:GUS*

Les analyses histochimiques présentées dans l'article sont basées sur l'observation de lignées transgéniques exprimant les fusions traductionnelles *pKAO1:KAO1-GUS* et *pKAO2:KAO2-GUS*. Il a été rapporté dans la littérature que des différences de patron d'expression entre fusions transcriptionnelles et fusions traductionnelles peuvent exister. Ces différences s'expliquent principalement par la présence de séquences régulatrices dans les introns des gènes analysés, comme cela a déjà été démontré pour d'autres gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des GA tels que la *CPS*, les *GA20ox* ou les *GA3ox* (Silverstone et al., 1999; Mitchum et al., 2006; Hu et al., 2008; Plackett et al., 2012). J'ai ainsi généré des fusions transcriptionnelles *pKAO1:GUS* et *pKAO2:GUS* (où l'expression du gène rapporteur *GUS* est dirigée par un fragment de 1,6 kb de la région promotrice de chaque gène) afin de comparer leur patron d'expression à celui des fusions traductionnelles. Ces lignées peuvent également me permettre de mettre en évidence d'éventuelles modifications post-traductionnelles intervenant dans la localisation de KAO1 et KAO2.

Les fusions transcriptionnelles analysées montrent les mêmes colorations que les fusions traductionnelles équivalentes (figure 2 du manuscrit, figure 71). Dans les graines en germination depuis 24h, l'expression de *pKAO1:GUS* et *pKAO2:GUS* est restreinte à la partie inférieure de l'hypocotyle et à la radicule. A 7 jours, les plantules *pKAO2:GUS* présentent une coloration GUS dans l'hypocotyle, dans les pétioles des cotylédons ainsi que dans le méristème apical végétatif, et la zone méristématique des racines principales et latérales. Ce patron d'expression diffère de celui des plantules *pKAO1:GUS* où l'activité GUS est observée uniquement dans le méristème apical végétatif. Au stade rosette, les plantes *pKAO2:GUS* montrent une forte coloration dans les pétioles et le système vasculaire des feuilles, contrastant avec la faible coloration observable dans les vaisseaux des plus jeunes feuilles des plantes *pKAO1:GUS*. Dans les inflorescences, l'expression de *pKAO1:GUS* est retrouvée principalement dans le style, le réceptacle floral et très légèrement à la base des anthères alors que l'expression de *pKAO2:GUS* est détectée dans les vaisseaux des sépales, dans le sommet du style, dans le stigmate, dans le filament des anthères et dans le pollen. Enfin dans les siliques, *pKAO2:GUS* présente une expression dans les valves, le réplum, et les tissus du réceptacle, et *pKAO1:GUS* est faiblement exprimée dans le réplum et le réceptacle.

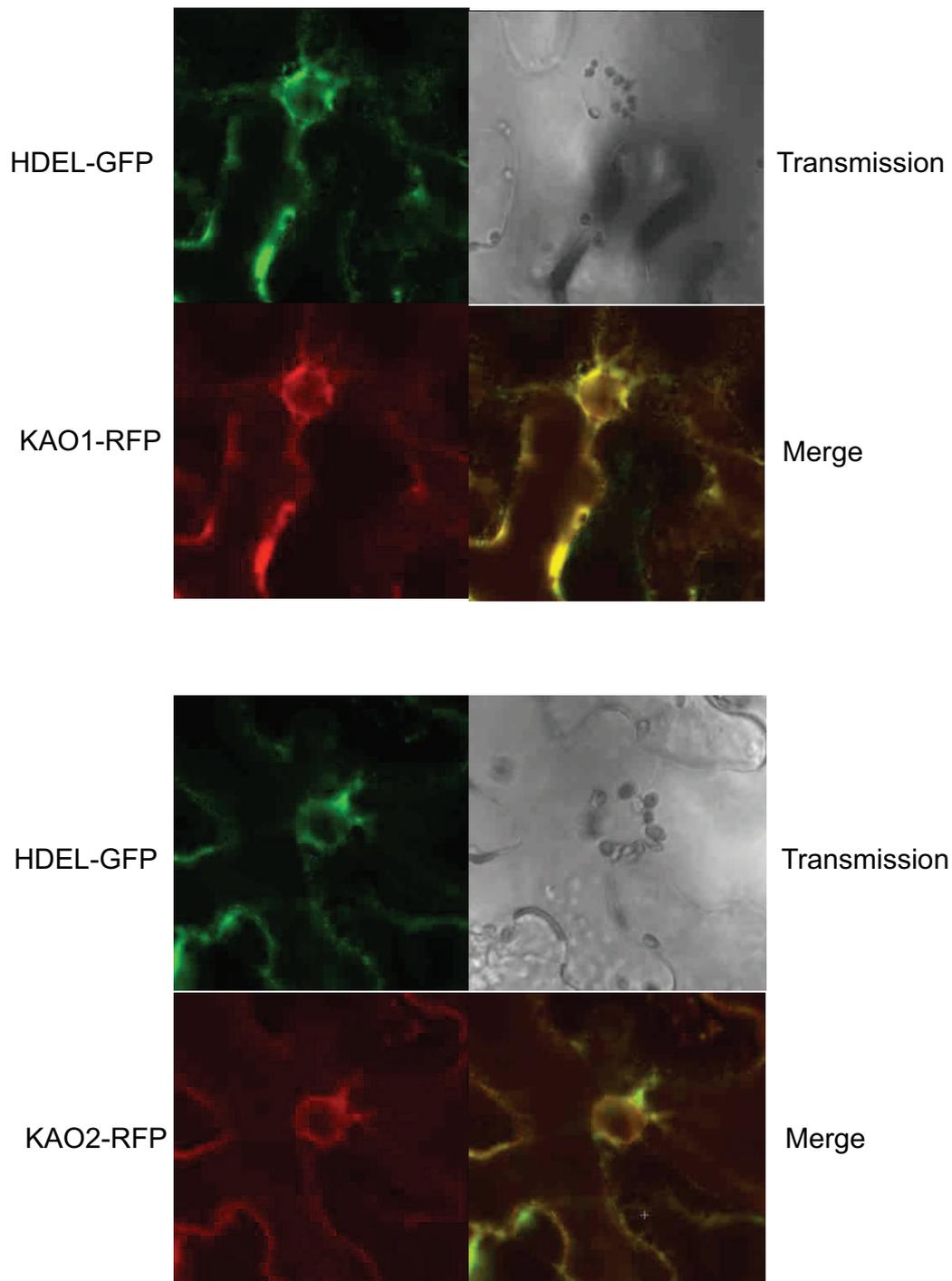


Figure 72 : Localisation sub-cellulaire de KAO1 et KAO2 par expression transitoire dans *Nicotiana benthamiana*

Observation par microscopie confocale de KAO1-RFP et KAO2-RFP (*p35S:KAO1-RFP* et *p35S:KAO2-RFP*) dans des feuilles de *N. benthamiana* exprimant de façon stable le motif de rétention au réticulum H-D-E-L fusionné à la GFP (*p35S:HDEL-GFP*).

D'une façon générale, si les patrons d'expression de *pKAO1:GUS* et *pKAO2:GUS* corrélient avec leur équivalent en fusion traductionnelle, on peut toutefois noter également quelques différences. Au stade plantule entre *pKAO1:GUS* et *pKAO1:KAO1-GUS*, l'expression de la fusion traductionnelle est également visible dans les ébauches des deux premières feuilles ainsi que dans les parties méristématiques de la racine principales et des racines latérales. Dans les inflorescences *pKAO1:KAO1-GUS* est exprimée dans le pollen, les ovules, et le stigmate, au contraire de la fusion transcriptionnelle. Enfin, si on détecte une forte coloration GUS dans les anthères et le pollen des lignées *pKAO2:KAO2-GUS*, seul le pollen est coloré dans les anthères des lignées *pKAO2:GUS*.

3.3.2 Localisation sub-cellulaire de KAO1 et KAO2

Afin de confirmer la localisation sub-cellulaire de la KAO dans le réticulum endoplasmique, l'expression transitoire de KAO1 et KAO2 chez *Nicotiana benthamiana* a été effectuée. Cette technique a pour avantage d'éviter l'attente d'obtention de lignées stables, permettant un gain de temps. Les plants de tabac utilisés dans cette expérience expriment de façon stable et constitutive le motif H-D-E-L fusionné à la GFP (Green Fluorescent Protein). Ce motif permet de retenir la GFP dans le réticulum endoplasmique et de marquer ainsi ce compartiment cellulaire, avec une fluorescence verte visible par microscopie confocale.

Les régions codantes de *KAO1* et *KAO2* ont été insérées dans le vecteur d'expression pB7RWG2. Elles sont ainsi sous contrôle du promoteur fort 35S et fusionnées à la RFP (Red Fluorescent Protein). Ce vecteur est ensuite introduit dans la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* utilisée pour la transformation de *Nicotiana benthamiana*.

L'observation par microscopie confocale de feuilles de tabacs agroinfiltrées montre une co-localisation de KAO1 et KAO2 avec le marqueur du réticulum endoplasmique (figure 72). Ce résultat valide ainsi la localisation sub-cellulaire des deux protéines dans cet organe.

Étapes précoces

Étapes tardives

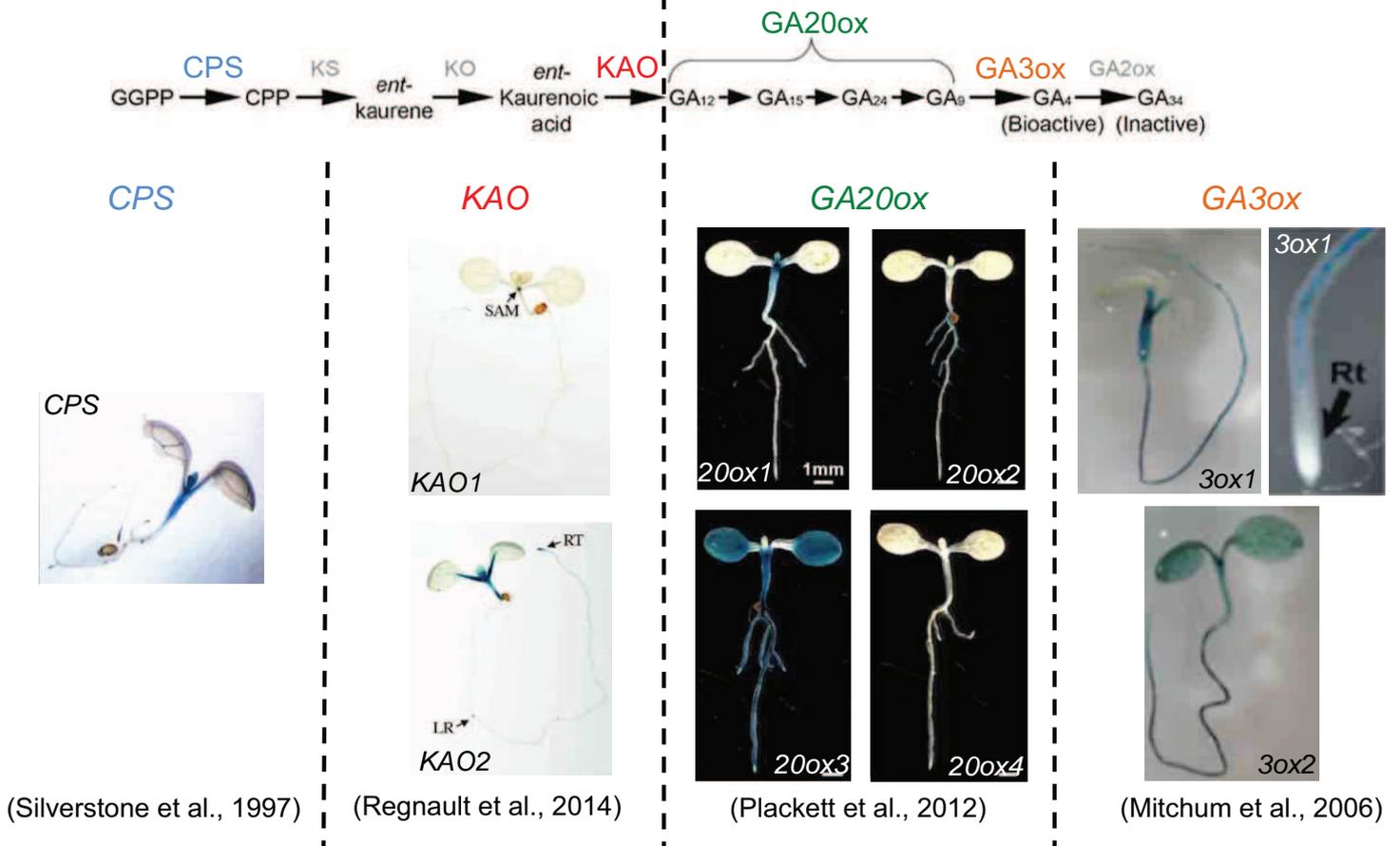


Figure 73 : Comparaison des patrons d'expression de gènes impliqués dans les étapes précoces et les étapes tardives de la voie de biosynthèse des GA

A gauche, patron d'expression de la *CPS*, *KAO1* et *KAO2* participant aux étapes précoces de la biosynthèse des GA. A droite, patron d'expression des *GA20ox1*, *-2*, *-3* et *-4* et *GA3ox1*, *-2* impliqués dans les étapes tardives de la biosynthèse des GA. Les colorations GUS sont effectuées sur des plantules âgées de 7 jours. LR = racine latérale ; RT = pointe racinaire ; SAM = méristème apical caulinaire.

3. 4 Discussion complémentaire

D'une façon générale, le patron d'expression de *KAO1* et *KAO2* recouvre celui des autres gènes de biosynthèse, et ce tout au long du développement de la plante avec une localisation plus spécifique dans les jeunes tissus en division nécessitant des GA pour croître (figures 27, 28, 30, et 31). Toutefois, une différence existe dans la racine (figure 73). Sur des plantules âgées de 7 jours, les colorations GUS montrent une expression de *KAO1* et *KAO2* dans l'apex de la racine principale, mais également des racines latérales. Ce patron d'expression est identique à celui de la *CPS*, une autre enzyme catalysant la première étape de la voie de biosynthèse des GA (Yamaguchi et al., 2001). Par contre, il diffère clairement de celui des *GA20ox* et *GA3ox*, des enzymes catalysant les dernières étapes de la voie de biosynthèse des GA (figure 73). Ces dernières sont en effet exprimées principalement dans la zone d'élongation et de différenciation de la racine. Cette différence suggère un éventuel transport de la GA_{12} produite par la KAO de l'apex de la racine, vers les zones d'élongation et de différenciation, lieux d'utilisation et de conversion par les *GA20ox* puis les *GA3ox* pour produire la GA_4 bioactive. Ainsi, le transport de la GA_{12} pourrait avoir un rôle de « pont » entre étapes précoces et étapes tardives de la biosynthèse se déroulant dans des tissus différents, comme ici la racine. Un tel transport d'un intermédiaire de GA a également été proposé dans la graine, de l'endoderme vers le cortex (Yamaguchi et al., 2001). Ces résultats suggèrent que le transport de la GA_{12} *in planta* pourrait par conséquent participer aux mécanismes régulant la biosynthèse des GA.

Dans le chapitre 1 lors des expériences de micro-greffes, nous avons observé que la restauration de croissance du greffon des combinaisons Col-0 / *ga1-3* et Col-0 / *kao1 kao2* n'était pas totale en comparaison à une greffe Col-0 / Col-0. Le patron d'expression de ces deux enzymes est semblable dans la racine, avec une expression restreinte uniquement à l'apex de la racine principale et des racines latérales. La GA_{12} produite est donc mobilisée depuis ces extrémités, traversant la zone de différenciation et la zone d'élongation de la racine pour rejoindre les parties aériennes *via* la sève du xylème. Or on l'a vu, c'est dans ces deux zones que sont principalement exprimées les *GA20ox* et les *GA3ox*, produisant la GA_4 bioactive. Il est donc possible qu'une partie de la GA_{12} transportée depuis les apices racinaires vers les parties aériennes soit retenue dans les zones de différenciation et d'élongation afin d'assurer une croissance convenable de la racine et limitant ainsi la quantité de GA_{12} transmise aux tissus aériens. Ainsi, dans les combinaisons de greffes Col-0 / *ga1-3* et Col-0 / *kao1 kao2* la quantité de GA_{12} transportée permettant de restaurer le phénotype du greffon mutant n'est pas suffisante pour assurer une récupération totale de la

croissance de ce dernier. De même, dans les lignées transgéniques où le mutant *kao1 kao2* est transformé par la construction *pARSK1:KAO1-RFP*, la récupération totale de la croissance observée concernant la partie aérienne peut s'expliquer par le patron d'expression du gène *ARSK1*. En effet, sous le contrôle de ce promoteur, l'expression de *KAO1* a lieu dans toute la racine, y compris dans les zones d'élongation et de différenciation. La GA_{12} est par conséquent produite en quantité non limitante dans la racine, et son transport vers les parties aériennes peut ainsi être suffisant pour compenser totalement la déficience en GA des parties aériennes.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Au cours de ces dernières années, des progrès significatifs ont été réalisés dans la compréhension et le clonage de composants majeurs impliqués dans la voie de biosynthèse et de signalisation des GA. Cependant, alors que le transport d'autres phytohormones est désormais bien caractérisé, celui des GA reste très peu étudié.

Avant le début de ces travaux de thèse, des études antérieures démontraient à l'aide d'applications exogènes de l'hormone, que les GA sont transportées de façon apolaire *in planta* (Kato, 1958 ; Clor, 1967 ; Phillips et Hartung, 1973). Chez de nombreuses espèces, différentes formes de GA avaient été retrouvées dans des exsudats de sèves brutes ou élaborées (Hoad et al., 1993), et des expériences de greffes réalisées chez le pois suggéraient qu'un intermédiaire situé entre l'action de la KAO et de la GA3ox est mobilisé (Reid et al., 1983 ; Proebsting et al., 1992). Enfin, une étude chez *Arabidopsis* observait une séparation spatiale entre les étapes précoces et les étapes tardives de la biosynthèse à certains stades, suggérant également un transport de formes intermédiaires (Yamaguchi et al., 2001).

Dans ce contexte, l'objectif principal de cette thèse était de caractériser précisément ce transport sur de longues distances, en utilisant la plante modèle *Arabidopsis*. Ainsi, ces travaux de doctorat permettent de répondre aux trois questions biologiques préalablement posées au début de l'étude :

- Quelle(s) forme(s) de GA est/sont mobile(s) chez *Arabidopsis* ?
- Quel est le mécanisme impliqué dans le transport de cette/ces forme(s) ?
- Quels sont les lieux de production de cette/ces forme(s) transportée(s) ?

Premièrement, une approche de micro-greffes démontre que la GA₁₂ est transportée de façon basipète et acropète sur de longues distances chez *Arabidopsis*, activant la dégradation des répresseurs DELLA dans les tissus receveurs. Deuxièmement, l'étude du mécanisme régissant ce transport permet d'établir que la GA₁₂ est mobilisée à travers les vaisseaux vasculaires de la plante, avec l'implication potentielle de transporteurs actifs. Enfin, l'étude du profil d'expression de *KAO1* et *KAO2* révèle que la GA₁₂ est produite dans les jeunes tissus en expansion. Ces travaux participent ainsi à la compréhension du transport de GA chez *Arabidopsis*, mais également à la compréhension de la biosynthèse, et le contrôle par l'hormone de la croissance et du développement de la plante. Cependant, de

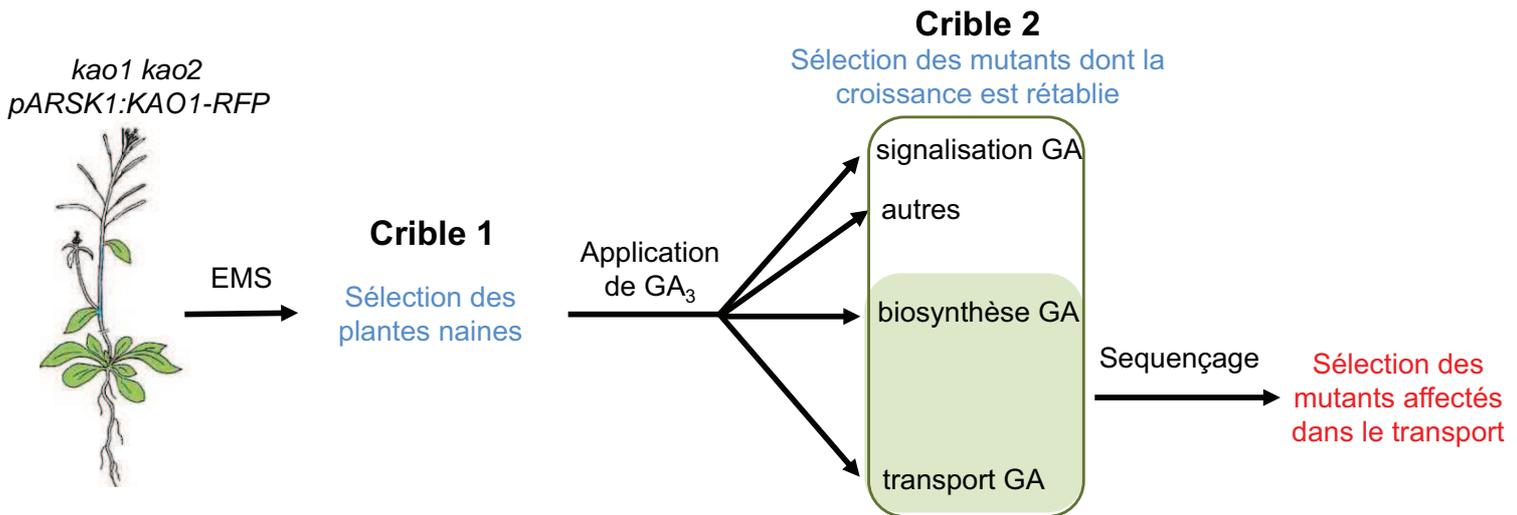


Figure 74 : Stratégie de crible génétique *in planta* pour l'identification d'un transporteur de GA_{12}

Les graines *kao1 kao2 pARSK1:KAO1-RFP* sont traitées avec un agent mutagène (EMS). Un premier crible sélectionne les plantes naines. Suite à un traitement exogène à la GA_3 , les mutants nains dont la croissance est restaurée sont sélectionnés et séquencés. Ces mutants correspondent soit à un mutant de biosynthèse de GA, ou soit à un mutant de transport de GA.

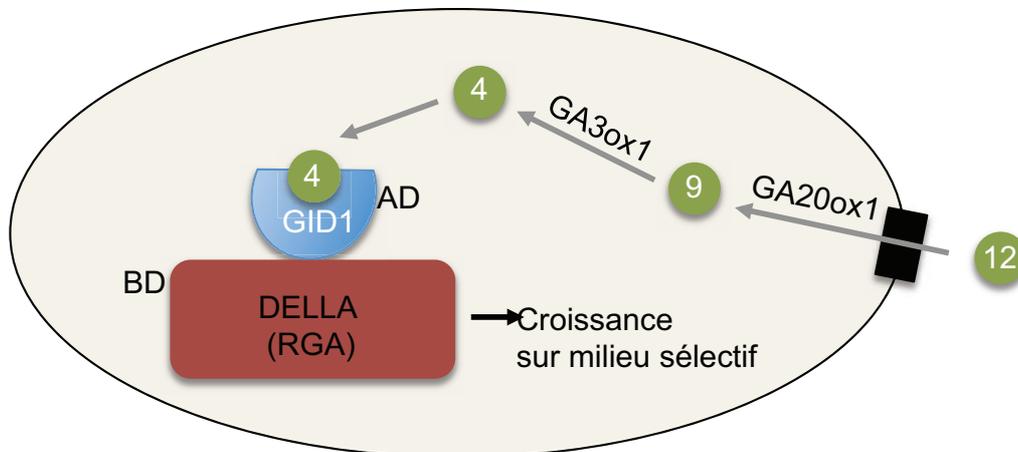


Figure 75 : Stratégie d'un crible en levure basée sur un système double hybride modifié pour la recherche d'un transporteur de GA_{12}

Cette stratégie est basée sur l'interaction possible entre la protéine DELLA (RGA) et le récepteur aux GA (GID1) en présence de GA bioactives (GA_4). Une souche de levure qui exprime une banque d'ADNc d'*Arabidopsis* est transformée avec des plasmides exprimant *RGA-BD*, *GID1-AD*, *GA20ox1* et *GA3ox1* (enzymes de biosynthèse catalysant la formation de GA_4 à partir de GA_{12}). La croissance de la levure sur milieu sélectif contenant de la GA_{12} (12) est rendue possible si un transporteur (rectangle noir) de cette forme est exprimé sur la membrane plasmique. Après import, la GA_{12} est convertie en GA_9 (9) et GA_4 (4) par la *GA20ox1* et la *GA3ox1* respectivement. La GA_4 se fixe à GID1 fusionné au domaine d'activation de GAL4 (AD). Cette fixation stimule l'interaction de GID1 à RGA fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de GAL4 (BD). Le facteur de transcription GAL4 ainsi reconstitué active l'expression de gènes d'auxotrophie permettant la croissance de la levure sur milieu sélectif.

nombreux aspects de ce transport restent à élucider et les outils générés au cours de cette thèse sont maintenant disponibles, permettant d'avancer dans ces perspectives.

1. 1 Recherche de transporteurs de GA₁₂

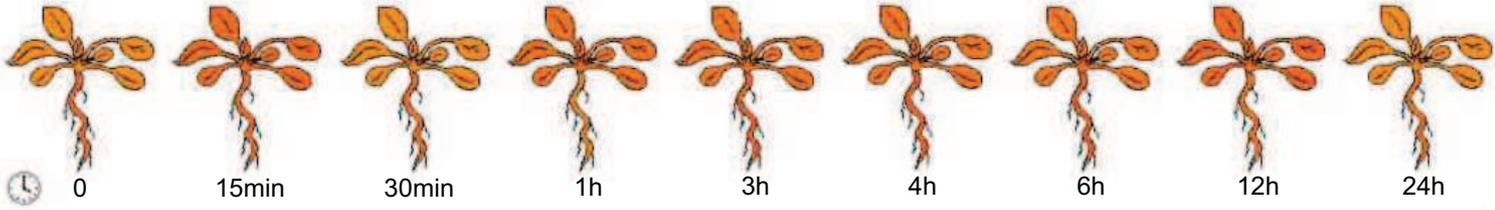
Suite à une analyse bioinformatique, en utilisant les bases de données publiques de microarrays, 13 candidats potentiellement transporteurs de GA₁₂ ont été sélectionnés pour leur réponse à un traitement exogène de GA bioactives. Cette stratégie présente des limites, et n'assure pas d'isoler de façon certaine et complète un/des transporteur(s) de GA₁₂. Des cribles génétiques de plantes et en levure pourraient constituer une alternative intéressante à cette approche (figures 74 et 75).

Ainsi, une mutagenèse aléatoire peut être effectuée sur la lignée d'*Arabidopsis kao1 kao2 pARSK1::KAO1-RFP* (voir chapitre 1, 1.2.1.4). Après un traitement à l'EMS (méthanesulfonate d'éthyle), les plantes présentant un phénotype « nain » et donc potentiellement affectées dans le transport de GA₁₂, seraient sélectionnées. Un traitement exogène de GA₃ sur ces mutants permettrait de restaurer la croissance d'un mutant de biosynthèse, mais également d'un mutant d'un transporteur de GA. A l'opposé, un tel traitement ne pourrait pas rétablir la croissance d'un mutant de la voie de signalisation GA, ou d'un mutant nain sans lien avec les GA (figure 74). Une étape de séquençage, permettrait ensuite d'identifier le gène muté. Toutefois, cette stratégie présente une difficulté : la redondance éventuelle du transporteur (famille multigénique), pouvant compliquer son identification à l'aide du crible génétique *in planta*. Pour cette raison, un autre crible, en levure, peut être envisagé en parallèle.

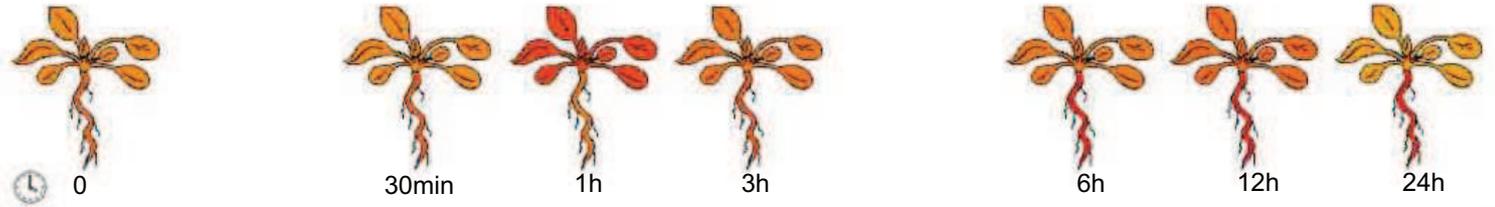
Ce crible en levure repose sur un système double hybride modifié, basé sur le même principe que celui ayant permis l'identification de transporteurs d'ABA (Kanno et al., 2012). Dans la plante, lorsque les concentrations en ABA sont faibles, les protéines phosphatases 2C (PP2C) se lient aux protéines SnRK2, inhibant leur activité de type kinase. Lorsque la concentration en ABA augmente, l'hormone va se fixer au récepteur RCAR/PYR1 qui interagit à son tour avec PP2C (Nishimura et al., 2009 ; Miyazono et al., 2009 ; Santiago et al., 2009 ; Yin et al., 2009). Ce complexe empêche ainsi les PP2C d'inactiver les SnRK2, qui peuvent alors activer la réponse ABA. Le crible utilisé par Kanno et al., (2012) s'appuie sur l'interaction entre le récepteur RCAR/PYR1 et PP2C en présence d'ABA. Le récepteur est fusionné à un domaine de fixation à l'ADN de la protéine GAL4 (ou binding domain, BD). La PP2C est fusionnée à un domaine d'activation de la protéine GAL4 (ou activating domain,

KAO1

Contrôle

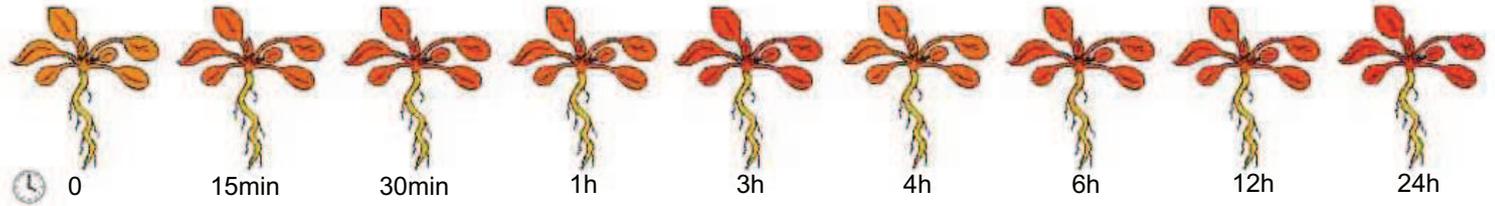


NaCl 150 mM

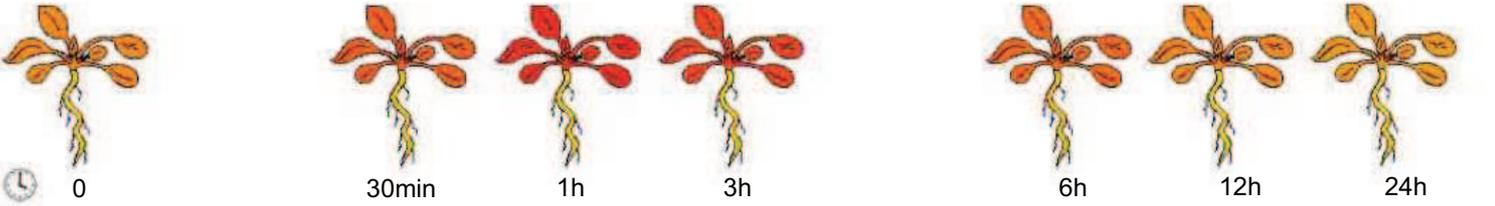


KAO2

Contrôle

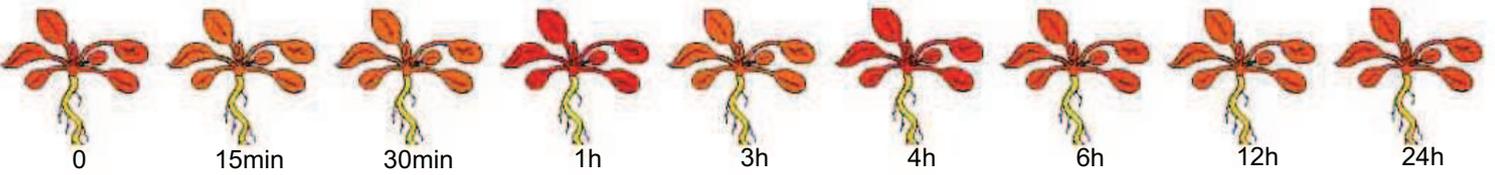


NaCl 150 mM

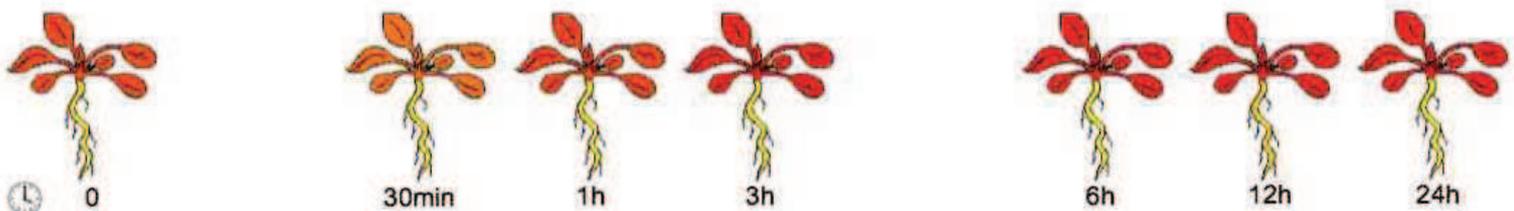


ABCG11

Contrôle

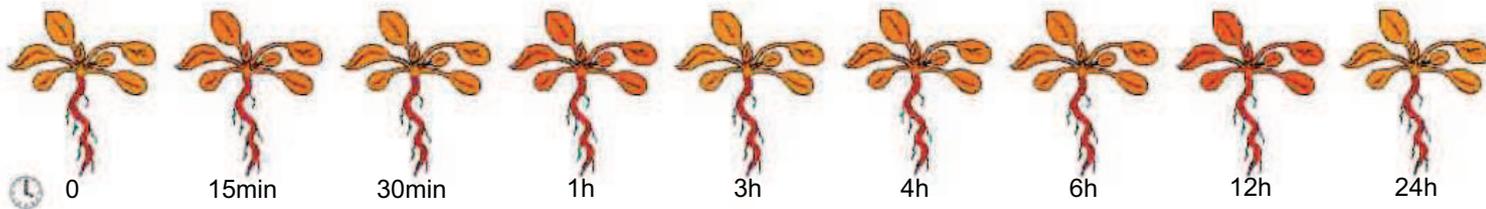


NaCl 150 mM

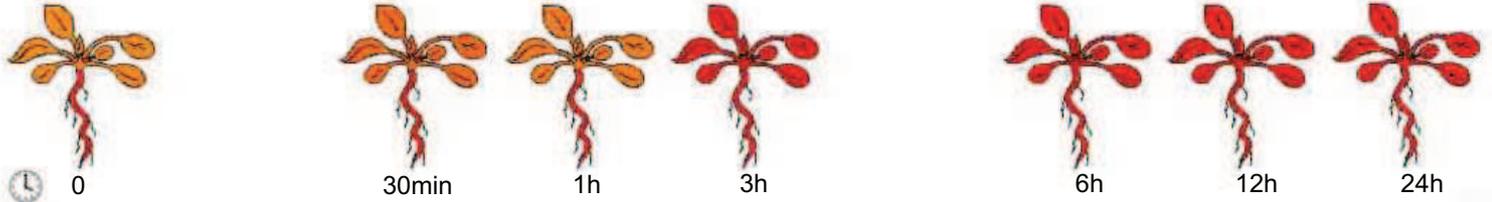


ABCG25

Contrôle

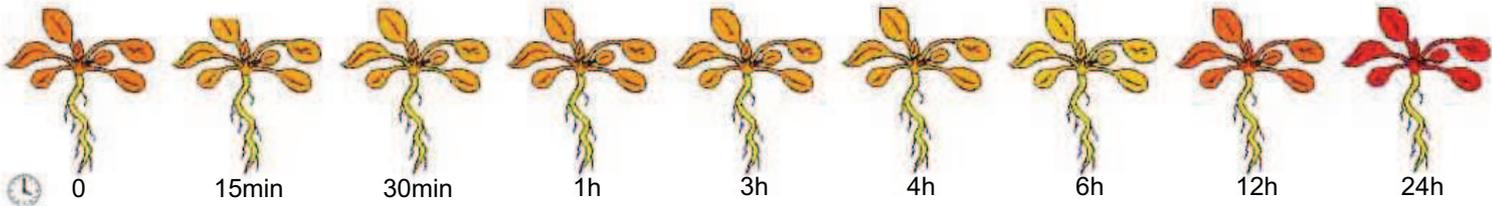


NaCl 150 mM



NPF3.1

Contrôle



NaCl 150 mM

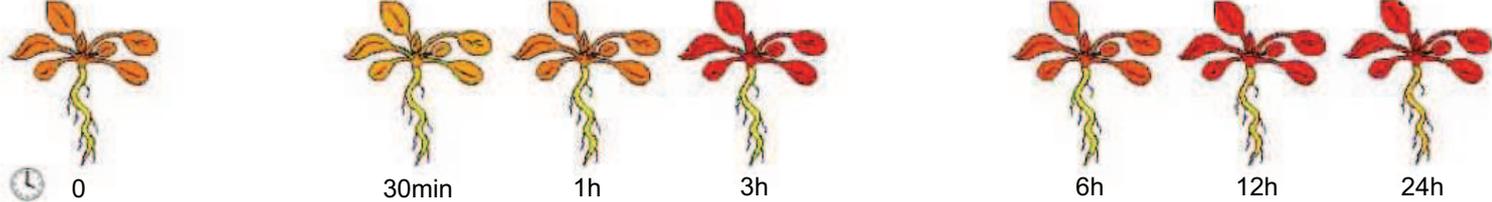


Figure 76 : Niveau d'expression de *KAO1*, *KAO2*, *ACBG11*, *ABCG25* et *ABCG37* en présence d'un stress salin

Le niveau d'expression des gènes de biosynthèse des GA *KAO1* et *KAO2*, ainsi que des transporteurs *ABCG11*, *ABCG25* et *ABCG37* est étudié en absence (Contrôle) ou en présence d'un stress salin (NaCl 150 mM). Cette analyse est réalisée sur des plantules d'*Arabidopsis* Col-0 âgées de 18 jours. Les plantes sont cultivées sur milieu MS agar pendant 11 jours puis repiquées dans du milieu MS liquide. Le stress est appliqué pendant 24h et les plantules sont prélevées aux temps 0, 15 min, 30 min, 1h, 3h, 4h, 6h, 12h et 24h. L'échelle de couleur représente la valeur absolue de l'expression du gène, d'une faible expression (jaune) à forte expression (rouge). Les ARN sont extraits et hybridés sur une puce GeneChip. Les valeurs obtenues issues de duplicats biologiques sont normalisées par le programme d'affymetrix (GCOS). Ces analyses sont disponibles sur le site <http://bar.utoronto.ca/efp/cgj-bin/efpWeb.cgi> et reposent sur les données publiées par Kilian et al., 2007.

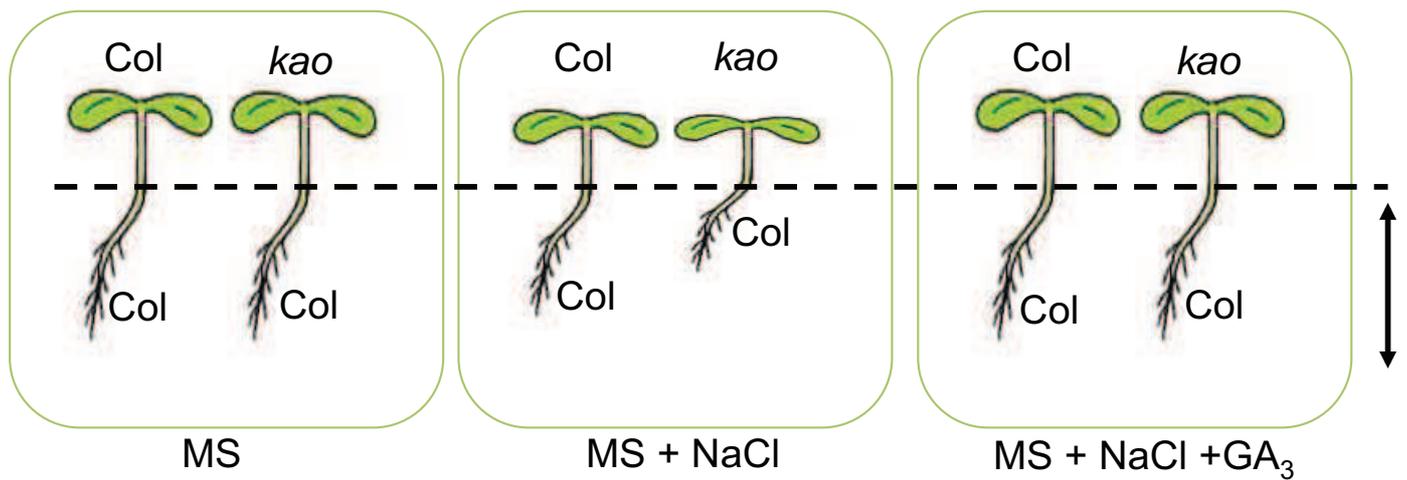


Figure 77 : Expériences permettant d'étudier *in vitro* l'importance du transport de GA₁₂ en présence d'un stress

Les combinaisons de greffes Col-0 / Col-0 et Col-0 / *kaol1 kao2* sont cultivées sur milieu MS (à gauche), complété avec 100 mM de sel (au milieu), ou avec 100 mM de sel plus 10 µM de GA₃ (à droite). La longueur de la racine est mesurée 4 à 5 jours après application du stress salin. (*kaol* = *kaol1 kao2*).

AD). L'interaction entre les deux protéines forme une protéine GAL4 fonctionnelle qui, chez la levure, active une série de gènes rapporteurs permettant à la souche de levure de pousser sur un milieu sélectif. Dans le contexte de la recherche d'un transporteur d'ABA, les auteurs ont transformé une souche de levure comportant ces deux constructions avec une banque d'ADNc. Une fois étalées sur un milieu sélectif contenant de l'ABA, les colonies de levures ayant la capacité de se développer sont celles qui ont réussi à importer de l'ABA grâce à un transporteur, provenant de la banque d'ADNc. Le même principe, pourrait être adapté à la recherche d'un transporteur de GA_{12} . Ce crible utiliserait une souche de levure exprimant la $GA20ox1$, la $GA3ox1$, ainsi qu'une protéine DELLA fusionnée à un « activating domain » et le récepteur $GID1$ fusionné à un « binding domain » (figure 75). Cette souche serait transformée avec une banque d'ADNc et étalée sur un milieu sélectif contenant de la GA_{12} afin de sélectionner des clones ayant la capacité de pousser, du fait de la présence d'un transporteur de GA_{12} . En effet, la GA_{12} importée serait convertie en GA_9 puis GA_4 par la $GA20ox1$ et la $GA3ox1$ respectivement. La GA_4 , en se fixant au récepteur $GID1-BD$, lui permettrait d'interagir avec la DELLA-AD, formant ainsi une protéine GAL4 fonctionnelle (figure 75). Le séquençage des inserts ADNc des colonies survivantes permettrait ensuite d'identifier un gène codant pour un transporteur de GA_{12} .

1. 2 Rôle biologique du transport de GA_{12}

La comparaison du patron d'expression des gènes *KAO* par rapport aux gènes *GA20ox* et *GA3ox* suggère qu'un transport de GA_{12} depuis le méristème racinaire, où elle est produite, vers les zones d'élongation et de différenciation serait nécessaire. Le transport de la GA_{12} pourrait dans ces conditions participer aux mécanismes régulant la biosynthèse des GA. Il s'agit cependant d'une hypothèse, et le rôle biologique précis de ce transport sur de longues distances reste méconnu. Les GA participent à l'adaptation de la croissance des plantes en fonction des contraintes environnementales qu'elles subissent (Colebrook et al., 2014). Par conséquent, on peut imaginer que le transport de GA_{12} puisse être impliqué lors de conditions environnementales défavorables. Dans ce contexte, il serait intéressant d'étudier l'influence d'un stress sur le niveau d'expression des gènes de biosynthèses *KAO1* et *KAO2* qui produisent la GA_{12} , mais également sur le niveau d'expression du/des transporteurs potentiels de cette forme. Une analyse *in silico* des banques de données de microarrays (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) indique par exemple que *KAO1* et *KAO2* sont induits par un stress salin, tout comme les gènes *ABCG11*, *ABCG25* et *NPF3.1* codant pour des transporteurs (figure 76).

De même, il serait intéressant d'analyser le phénotype de plantes issues de différentes combinaisons de greffes en condition de stress. Par exemple, une expérience pourrait être d'analyser la croissance de plantes greffées sur un milieu MS supplémenté en NaCl. Un stress salin affecte la biosynthèse des GA, et des plantules sauvages cultivées sur un milieu enrichi en sel présentent une forte diminution de croissance, notamment des racines (Achard et al., 2006). Mais il est possible que la réduction de croissance des racines observée pour une combinaison Col-0 / Col-0 soit encore plus marquée pour une combinaison Col-0 / *kao1 kao2* (figure 77). En effet, pour cette combinaison de greffe, le transport de GA₁₂ depuis les parties aériennes est impossible, ne permettant pas à la plante de faire face au stress salin. Et si de la GA₃ est ajoutée dans le milieu MS contenant du NaCl, on peut supposer que la croissance racinaire des combinaisons Col-0 / Col-0 et Col-0 / *kao1 kao2* serait identique (figure 77). Une telle expérience illustrerait alors l'importance du transport de la GA₁₂ face à un stress salin. Les lignées homozygotes *kao1 kao2 pARSK1::KAO1-RFP* simulant une microgreffe Col-0 / *kao1 kao2*, elles pourraient permettre de tester ainsi de nombreux stress *in vitro*, comme le froid, la sécheresse, ou encore différentes carences en éléments nutritifs. Enfin, l'analyse de la vitesse du transport de la GA₁₂ *in planta* constitue également une perspective intéressante. L'auxine par exemple est transportée à une vitesse de 9 à 15 mm par heure chez *Arabidopsis* (Kramer et al., 2011). Ainsi, la vitesse de translocation de la GA₁₂ pourrait présenter des variations en présence d'un stress biotique ou abiotique en comparaison à des conditions de culture optimales.

Charles Darwin a été le premier à s'intéresser aux phytohormones en étudiant certains aspects de la physiologie végétale, et notamment leur mouvement (The Power of Movement in Plants, Darwin, 1880). A l'aide de greffes sur des coléoptiles d'alpistes, Darwin a mis en évidence l'existence d'un signal perçu depuis l'extrémité et transmis au reste du coléoptile. 60 ans plus tard il a été démontré que ce signal, orientant la croissance du coléoptile en direction de la lumière, est associé à un transport d'auxine. Depuis, d'autres classes de phytohormones comme l'ABA, les cytokinines, ou les strigolactones ont été découvertes, et leur transport caractérisé. Les GA, dont la découverte remonte au début du 20^{ème} siècle, participent au développement et à la croissance des plantes. La voie de biosynthèse et de signalisation des GA est désormais bien détaillée, mais leur transport reste méconnu. Par des expériences de micro-greffes chez *Arabidopsis*, associées à des outils de biologie moléculaire et de biochimie, ces travaux de thèse apportent un début d'explication sur le transport de GA chez les plantes et ouvrent un nouveau champ d'investigation.

Matériel et méthodes

1.1 Matériel

1.1.1 Matériel végétal

1.1.1.1 Mutants

L'ensemble des mutants est dans le fond génétique Columbia. Le mutant *ga1-3*, appartenant à l'origine au fond génétique Landsberg *erecta* a été rétrocroisé 6 fois dans le fond Columbia.

Mutant	Identifiant	Origine / Référence
<i>ga1-3</i>		Tyler et al., 2004
<i>kao1-1</i>	SAIL_798A12	NASC
<i>kao1-2</i>	SALK_136249C	NASC
<i>kao2-1</i>	SAIL_634E12	NASC
<i>kao1-1 / kao2-1</i>		Laboratoire / Regnault et al., 2014
<i>kao1-2 / kao2-1</i>		Laboratoire/ Regnault et al., 2014
<i>ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3-1</i>		Plackett et al., 2012
<i>ga3ox1 ga3ox2</i>		Mitchum et al., 2006
<i>npf1.1</i>	GK-737B11-023553	Gabi-kat
<i>npf2.13</i>	SALK_022429	ABRC
<i>npf3.1</i>	SALK_076219	NASC / Sugiura et al., 2007
<i>npf4.1</i>	WiscDsLox434A10	NASC / Kanno et al., 2012
<i>npf4.6</i>	SALK_015023	NASC
<i>npf5.16</i>	SAIL_170_B07	NASC / Syngenta
<i>npf5.7</i>	SALK_068690	NASC
<i>npf6.1</i>	SALK_080802	NASC

<i>npf6.3</i>	SALK_097431	NASC
<i>npf8.3</i>	SAIL_400_D08	NASC / Syngenta
<i>abcg11</i>	SALK_119873	NASC / Bird et al., 2007
<i>abcg25</i>	SALK_128873	NASC
<i>abcg37</i>	SALK_050885	NASC / Růžicka et al., 2010

1.1.1.2 Lignées transgéniques

L'ensemble des lignées transgéniques utilisées provient du fond génétique Columbia, à l'exception de la lignée *pRGA::GFP-RGA (ga1-3)* qui est dans Landsberg *erecta*.

Lignée transgénique	Plasmide	Origine / Référence
<i>pKAO1::GUS</i>	pGWB633	Laboratoire
<i>pKAO2::GUS</i>	pGWB633	Laboratoire
<i>pKAO1::KAO1-GUS</i>	pGWB633	Laboratoire / Regnault et al., 2014
<i>pKAO2::KAO2-GUS</i>	pGWB633	Laboratoire / Regnault et al., 2014
<i>pKAO1::KAO1-GFP</i>	pGWB650	Laboratoire / Regnault et al., 2014
<i>pKAO2::KAO2-GFP</i>	pGWB650	Laboratoire / Regnault et al., 2014
<i>35S::KAO1-RFP</i>	pB7RWG2	Laboratoire
<i>35S::KAO2-RFP</i>	pB7RWG2	Laboratoire
<i>pARSK1::GUS</i>	pGWB633	Laboratoire
<i>pARSK1::KAO1-RFP¹</i>	pH7RWG2	Laboratoire
<i>pARSK1::GA20ox1-RFP¹</i>	pH7RWG2	Laboratoire
<i>pRGA::GFP-RGA (ga1-3)</i>	pRG34F	(Silverstone et al., 2001)

1 : Dans ces constructions, le promoteur 35S présent à l'origine dans le vecteur pB7RWG2 est remplacé par la région promotrice du gène *ARSK1* (2,7 kb).

1.1.2 Souches bactériennes

1.1.2.1 *Escherichia coli*

- Souche DB3.1 (invitrogen) : Elle est utilisée pour amplifier les plasmides de type Gateway. Ces plasmides comportent le gène *ccdB* codant la protéine toxique CcdB interférant avec l'ADN gyrase de la bactérie. Pour y résister, cette souche présente une mutation (allèle *gyr462*) dans le gène codant la gyrase, lui permettant de résister aux effets toxiques de la protéine CcdB

- Souche Top10 (Invitrogen) : Cette souche est utilisée pour amplifier les plasmides de type Gateway ou pGEM-T. Le fragment voulu est inséré dans le plasmide par recombinaisons homologues à la place du gène *ccdB*, ou par ligation avec la T4 ligase respectivement.

1.1.2.2 *Agrobacterium tumefaciens*

La souche GV3101 est utilisée pour la transformation d'*Arabidopsis*. Elle comporte un gène de résistance à la rifampicine sur son chromosome, ainsi qu'un plasmide Ti désarmé contenant un gène de résistance à la gentamycine. Le plasmide contient également les gènes de virulence *Vir* permettant d'intégrer dans le génome végétal un fragment d'ADN situé entre les frontières droites et gauches de l'ADN de transfert.

1.1.3 Levures

La souche de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) utilisée est la souche WAT11, de génotype *MATa leu2-3/112 ura3-1 trp1-1 his3-11/15 ade2-1*.

1.2 Méthodes

1.2.1 Techniques relatives aux plantes

1.2.1.1 Culture *in vitro* d'*Arabidopsis thaliana*

Les graines ne nécessitant pas de traitement GA sont stérilisées en surface par une solution d'éthanol à 70% pendant 1 min puis par 3 lavages avec de l'éthanol 100% pendant 2 min chacun. Les graines séchées sont semées dans des boîtes de Pétri contenant du milieu

Murashige et Skoog (MS, Duchefa Biochemical) 1% sucrose et 0,8% agar. Après une stratification de 3 jours à 4°C à l'obscurité, les boîtes sont transférées en chambre de culture (Sanyo) sous une photopériode de 16h lumière /8h obscurité (22°C), et une intensité lumineuse de 90 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$. Les graines pour lesquelles une application exogène de GA est indispensable pour leur germination sont préalablement traitées pendant 3 jours à 4°C avec 5 μM de GA₃ (Sigma-Aldrich) et rincées 3 fois avec de l'eau. Elles sont ensuite stérilisées pendant 15min à l'eau de Javel 5% et rincées 3 fois avec de l'eau stérile avant le semis. Concernant les tests de germination, entre 150 et 200 graines sont disséminées sur un filtre de papier Whatman 3MM imbibé de concentrations croissantes d'acide ent-kaurénoïque (OChemim), de GA₁₂ (Prof L. Mander, Université de Camberra), de GA₄ (Sigma-Aldrich) ou de paclobutrazole (Sigma-Aldrich).

1.2.1.2 Culture en terre d'*Arabidopsis thaliana*

Les plantes sont cultivées dans les serres et chambres de culture de l'IBMP sous une photopériode de 16h lumière / 8h obscurité (21°C/17°C) pour une culture en jours longs. Les conditions de culture en jours courts suivent une photopériode de 8h lumière / 16h obscurité (21°C/17°C).

1.2.1.3 Culture de *Nicotiana benthamiana*

Les expériences d'expression transitoire sont réalisées sur des feuilles de *Nicotiana benthamiana* âgées de 5 semaines. Ces plants sont cultivés dans les serres de l'IBMP sous une photopériode de 16h lumière/ 8h obscurité (21°C/17°C).

1.2.1.4 Transformation stable d'*Arabidopsis*

Les plantes sont transformées par immersion florale dans une solution d'Agrobactéries (Clough et al., 1998). Les transformants de première génération (T1) sont sélectionnés *in vitro* (hygromycine) ou en terre (glufosinates) avec des antibiotiques en fonction de la résistance conférée par le plasmide. Les lignées homozygotes 100% résistantes à l'antibiotique obtenues en 3^{ème} génération (T3) sont analysées.

1.2.1.5 Transformation transitoire de *Nicotiana benthamiana*

Une culture d'agrobactéries (20 mL) contenant le plasmide à étudier est placée sous agitation pendant une nuit à 28°C. En parallèle, une culture d'agrobactéries transformées

avec un plasmide contenant le gène P19 (codant un inhibiteur de silencing), est également lancée. Ces cultures se font dans du milieu LB (Luria-Bertani) avec les antibiotiques adéquats. Elles sont centrifugées à 3500g pendant 10min et le LB est remplacé par du tampon d'infiltration (MgCl_2 10mM pH 5,8) afin d'obtenir une densité optique de 0,5. Les deux cultures sont mélangées à raison de 1/3 de P19 pour 2/3 de plasmide à étudier, et le tube est placé sous agitation pendant 1h à température ambiante avec 200 μM d'acétosyringone. Le côté inférieur de jeunes feuilles de *Nicotiana benthamiana* est ensuite infiltré à l'aide d'une seringue, et les plantes sont placées 48h en logette avant analyse.

1.2.1.6 Micro-greffes d'*Arabidopsis*

Des plantules âgées de 6 à 7 jours sont cultivées sur milieu MS (1% sucrose, 1% agar) dans des boîtes de Pétri placées verticalement en chambre de culture (16h/8h lumière/obscurité, 22°C). Dans une boîte de Petri, un filtre de nitrocellulose (Millipore Membrane Filter, HAWP 0,45 μM) est positionné sur du papier Whatman 3MM stérile et imbibé d'eau stérile (le filtre ne doit jamais sécher). Les plantules à greffer sont placées sur ce filtre, et l'un des cotylédons est coupé à sa base. Puis l'hypocotyle des plantules est sectionné à l'aide d'une lame de rasoir plate, de façon droite et franche, à environ 1/3 de sa base, la partie inférieure (racine) constituant un porte-greffe, et la partie supérieure (aérienne) un greffon. Un greffon est associé à son porte-greffe en mettant précisément en contact les deux parties sous loupe. Une fois les micro-greffes terminées, le papier Whatman est une nouvelle fois imbibé d'eau stérile, et la boîte est refermée hermétiquement avec du parafilm. La boîte est placée verticalement en chambre de culture pendant 6 à 7 jours (16h/8h lumière/obscurité, 22°C), et les micro-greffes sont ensuite vérifiées sous loupe et repiquées en terre.

1.2.1.7 Test de germination

La germination (exprimée en %) est déterminée par le nombre de graines présentant une protrusion de la radicule après 7 jours d'incubation (16h/8h lumière/obscurité, 22°C) par rapport au nombre total de graines.

1.2.1.8 Phénotypage des plantules

Les plantules sont cultivées sur des boîtes de Pétri placées verticalement dans les chambres de culture (16h lumière /8h obscurité (22°C)) pendant 7 jours. Les boîtes sont scannées, et la longueur de l'hypocotyle (en mm) et de la racine (en mm) des plantules est déterminée à

l'aide du logiciel Image J (domaine public, <http://rsb.info.nih.gov/ij>). Pour chaque génotype, 15 plantules au minimum sont analysées.

1.2.1.9 Phénotypage de plantes en terre

La hauteur de la plante (en cm), le diamètre de la rosette (en mm) et le temps de floraison (exprimé en nombre de feuilles de la rosette, produites avant la floraison) sont déterminés après 5 semaines de culture, à l'exception des mutants *ga1-3* et *kao1 kao2* (8 semaines). Concernant les greffes le diamètre de la rosette (en mm) et le temps de floraison sont mesurés après 6 semaines de culture, et la hauteur de plantes après 7 semaines de développement.

1.2.1.10 Analyse des siliques

La longueur de 20 siliques en fin de maturation est mesurée (en mm). Ces siliques sont ouvertes sous loupe binoculaire et le nombre de graines par silique est déterminé. L'analyse a été répétée 2 fois. Les mutants *ga1-3* et *kao1 kao2* sont stériles et ces paramètres n'ont pas été analysés pour ces génotypes.

1.2.2 Techniques relatives à l'analyse de l'ADN

1.2.2.1 Extraction d'ADN génomique

100 mg de matériel végétal sont placés dans un tube Sarstedt à bouchon vissé et broyé à l'aide de billes en verre (Ø 0,5mm) dans le broyeur Precellys®. La poudre est resuspendue dans 400 µL de tampon d'extraction (100mM Tris-HCl pH 8.0, 100mM EDTA, 250mM NaCl, 1% Sarkosyl, 8M Urée) et 400 µL de phénol/chloroforme (v/v). Après 5min de centrifugation à 21000g, la phase supérieure est prélevée et mélangée à 800 µL d'isopropanol afin de précipiter l'ADN. Après 10min de centrifugation à 21000g, le culot obtenu est rincé avec de l'éthanol 70% (v/v) et resuspendu dans 300 µL d'eau stérile. La concentration en ADN est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm (Nanodrop 2000, Thermo Scientific).

1.2.2.2 Extraction de plasmides

Les bactéries sont cultivées dans 3 mL de milieu LB avec l'antibiotique de sélection pendant 1 nuit à 37°C sous agitation à 200 rpm. L'ADN plasmidique est extrait des bactéries par lyse alcaline à l'aide du kit de minipréparation NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) selon les indications fournies par le fabricant.

1.2.2.3 La PCR

La PCR permet d'amplifier *in vitro* un fragment d'ADN d'intérêt grâce à l'ADN polymérase thermostable de *Thermus aquaticus* (Taq). Les amorces utilisées sont présentées en annexes 1, 3 et 4. Lorsque nécessaire, les séquences de restriction ou de recombinaisons indispensables aux clonages sont ajoutées sur les amorces. Les PCR de contrôle et de génotypage ont été réalisées avec la Taq Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientist). Les PCR d'amplifications de fragments avant clonage ont été effectuées avec la Taq Phusion Master Mix (Thermo Scientist). Les mélanges réactionnels sont les suivants :

	Phire (30 µL de volume réactionnel)	Phusion Master Mix (30 µL de volume réactionnel)
Matrice d'ADN	100 ng	100 ng
Amorce sens (10 µM)	1 µL	1 µL
Amorce antisens (10 µM)	1 µL	1 µL
dNTP (10 mM)	1 µL	Master Mix 15 µL
Tampon de l'enzyme	6 µL	Master Mix 15 µL
ADN polymérase	0,3 µL	Master Mix 15 µL
	H ₂ O qsp 30 µL	H ₂ O qsp 30 µL

Le protocole d'amplification après une étape de dénaturation des brins d'ADN à 95°C comprend 30 cycles, composés d'une dénaturation à 95°C, de l'hybridation des amorces sur la matrice d'ADN à une température définie d'après la température de fusion (T_m) des deux

amorces, d'une étape d'élongation à 72°C, et d'une dernière étape finale de 5min à 72°C terminant l'élongation des brins. En fonction de l'enzyme utilisée, le programme de PCR est le suivant :

	Phire	Phusion Master Mix
Dénaturation	30 sec, 98°C	2 min, 98°C
Dénaturation	5 sec, 98°C	10 sec, 98°C
Hybridation	5 sec, T _m + 3°C	10 sec, T _m + 3°C
Elongation	72°C, 15 sec par kb	72°C, 30 sec par kb

La révélation de l'amplification se fait sous UV après électrophorèse sur gel d'agarose 1% contenant du bromure d'ethydidium dans du tampon TAE (Tris-acétate 40 mM, EDTA 0,1 mM).

1.2.2.4 Purification des produits de PCR

Les fragments à cloner sont amplifiés à l'aide d'amorces spécifiques (Annexe 1) par PCR à partir d'ADN génomique de Col-0, ou d'ARN rétrotranscrit en ADNc, puis séparés par migration sur gel d'agarose 1%. Le fragment d'intérêt est découpé du gel à la taille attendue et purifié à l'aide du kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

1.2.2.5 Clonage par le système Gateway

Cette technique permet de transférer efficacement des fragments d'ADN entre des plasmides, en utilisant des séquences recombinantes nommées "att". Les fragments purifiés sont insérés dans le vecteur d'entrée pDONR207 (Invitrogen) par réaction enzymatique BP (BP Clonase II, Invitrogen) une nuit à 22°C et la réaction est arrêtée par une incubation de 10 min à 37°C avec 1 µL de protéinase K (Invitrogen). Les plasmides sont amplifiés après transformation par choc thermique dans *E. coli* (souche TOP10, Invitrogen) et sont extraits par minipréparation. Ces fragments sont séquencés pour contrôler l'absence de mutation que pourrait générer l'étape d'amplification. Ensuite, par réaction enzymatique LR (LR Clonase II, Invitrogen) en présence du vecteur d'entrée et du vecteur de destination une nuit

à 22°C, le gène d'intérêt est introduit par recombinaison homologue (au niveau des sites attB) dans le vecteur binaire adapté (figure 78). Le vecteur est amplifié dans *E.Coli* puis introduit dans *Agrobacterium tumefaciens* (souche GV301) par électroporation à 2,5 kV et 400Ω (GenePulser, Biorad). L'ensemble des lignées transgéniques présentées en 6.1.1 a été généré de la sorte.

1.2.2.6 Clonage par restriction

Les différents transporteurs ont été clonés en levure par cette technique. Les gènes sont amplifiés par PCR à partir d'ARN rétrotranscrit en ADNc. Les amorces spécifiques (annexe 1) comportent à leurs extrémités les sites de restriction EcoR1 (amorce sens) et BamH1 (antisens) ainsi qu'une étiquette codant 6 histidines. Le vecteur pGEM-Teasy est digéré avec les enzymes correspondantes aux sites de restrictions (Promega), et les fragments amplifiés sont introduits dans le plasmide linéarisé, par ligation avec la T4 DNA Ligase (Promega). Les plasmides sont amplifiés chez *E.Coli* (souche *Top10*), puis extraits des bactéries par minipréparation. Après vérification de l'insert par séquençage, le vecteur pGEM-Teasy est de nouveau digéré avec les enzymes de restriction BamH1 et EcoR1 et le produit de digestion est déposé sur gel d'agarose 1%. Après migration, le fragment correspondant à la taille attendue est découpé et purifié. Dans le même temps, le vecteur d'expression en levure pYEDP60 est également digéré avec les enzymes BamH1 et EcoR1. Le fragment purifié est introduit dans le plasmide pYEDP60 (figure 78) linéarisé par ligation avec la T4 DNA Ligase (Promega).

1.2.3 Analyse de l'expression des gènes

1.2.3.1 Extraction des ARN

L'ARN des graines et siliques est extrait comme décrit par Onate-Sanchez et al., 2008. Ces tissus sont broyés manuellement avec de l'azote liquide, et resuspendus dans un tampon d'extraction (4M LiCl, 1M Tris pH8, 10% SDS et 0,5M EDTA) supplémenté avec du chloroforme (v/v). Pour tous les autres tissus, 100mg de matériel végétal est introduit dans un tube Eppendorf de type « safe lock » contenant des billes de verre (Ø 0,5mm) stériles, et congelé dans de l'azote liquide. Le matériel est réduit en poudre à l'aide du broyeur Precellys®. Les ARN totaux sont extraits à l'aide du kit NucleoSpin RNA Plant de Macherey Nagel, en suivant le protocole fourni. La concentration en ARN est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm (Nanodrop 2000, Thermo Scientific).

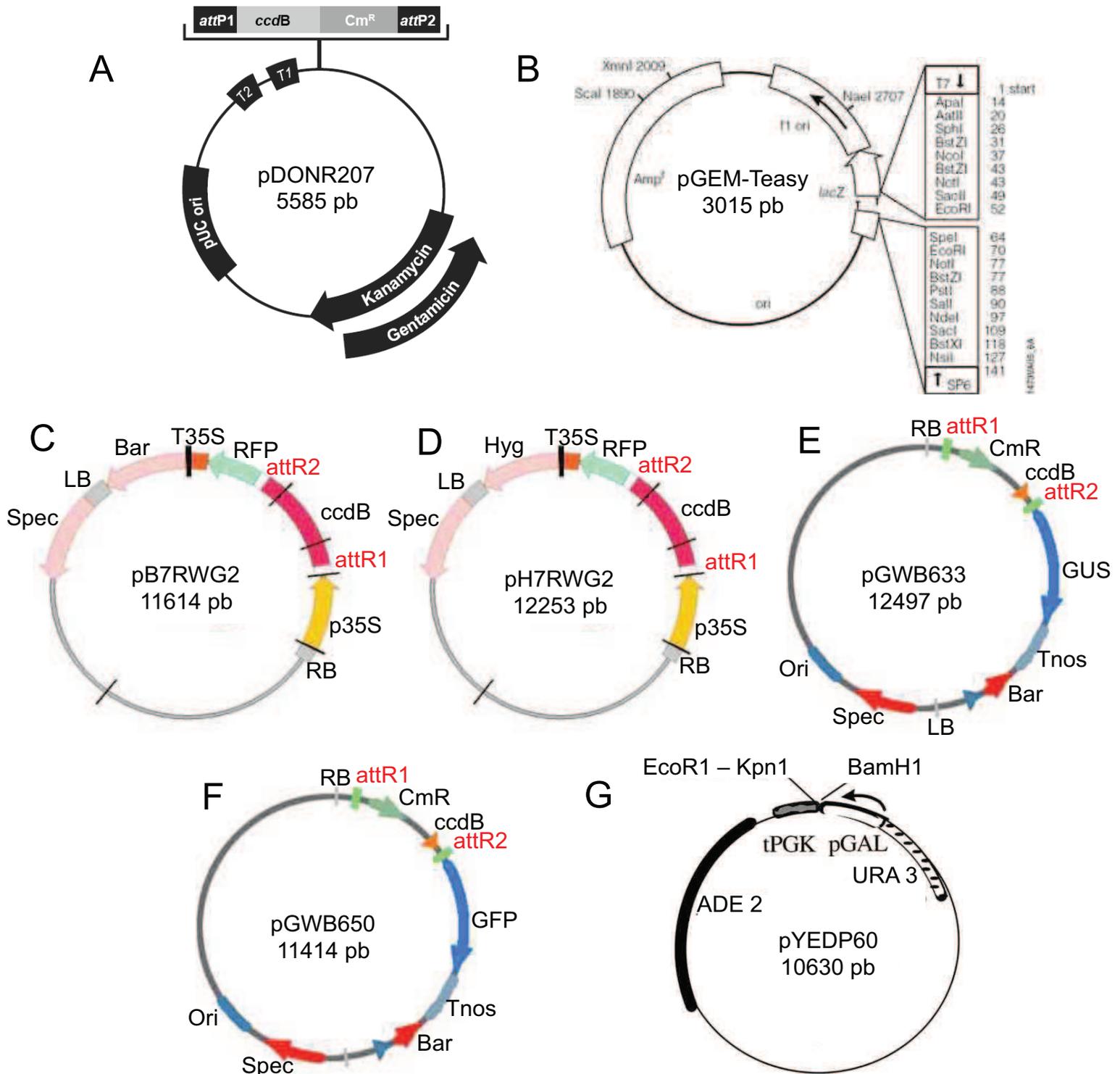


Figure 78 : Carte des vecteurs

(A) Vecteur d'entrée du système Gateway, pDONR207 (Invitrogen). **(B)** Vecteur d'entrée du système de clonage par enzyme de restriction, pGEM-Teasy (Promega). **(C)** et **(D)** Vecteurs de destination du système Gateway permettant de cloner un fragment en N-terminal de la RFP sous contrôle du promoteur 35S (VIB, Gent). **(E)** et **(F)** Vecteurs de destination du système Gateway permettant de cloner un fragment en N-terminal du gène rapporteur GUS (pGWB633) ou de la GFP (pGWB650). **(G)** Vecteur de destination du système de clonage par enzyme de restriction permettant d'exprimer en levure un fragment sous le contrôle d'un promoteur inductible au galactose. PUC ori, f1 ori, ori = origine de réplication du plasmide; *ampR* = gène de résistance à l'ampicilline; *Spec* = gène de résistance à la spectinomycine; *lacZ* = gène codant la β -galactosidase; *Hyg* = gène de résistance à l'hygromycine; *Bar* = gène de résistance au glufosinate; *ccdB* = gène codant la protéine toxique CcdB; *Cm^R* = gène de résistance au chloramphenicol; RB et LB = bordures de l'ADN-T; attR1-R2 = sites de recombinaison; *Tnos* = terminateur nopaline synthase; *p35S* = promoteur 35S; *GUS* = gènes rapporteur GUS; *pGAL* = promoteur inductible au galactose; *tPGK* = terminateur phosphoglycerate kinase

1.2.3.2 Transcription inverse des ARN

La transcription inverse (RT) est réalisée sur 2 µg d'ARN totaux, dans un volume total de 40 µl avec 2 µM d'oligo(dT)₂₀, 0,5 mM de déoxyncléotides triphosphate (dNTP), 5 mM de dithiothréitol (DTT), et 200 unités de Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). Les tubes sont alors placés à 50°C pendant 1h, et la réaction est inactivée à 70°C pendant 15min.

1.2.3.3 PCR quantitative

La PCR quantitative utilise des amorces de gènes spécifiques, dans un volume réactionnel total de 10 µL de SYBR Green Master Mix (Roche) et avec l'appareil LightCycler LC480 (Roche) suivant les instructions du fabricant. La valeur moyenne de trois répliquas techniques est normalisée par rapport aux gènes *TIP41-Like* (AT4G34270) et *EXP* (AT4G26410), et calculée à l'aide du logiciel Lightcycler 480 1.5.0 SP3. Les analyses par RT-qPCR ont toutes été réalisées avec au minimum 2 répliquas biologiques.

1.2.4 Analyse des protéines

1.2.4.1 Extraction des protéines totales de plantes

100 mg de matériel végétal préalablement congelés dans de l'azote liquide sont réduits en poudre à l'aide de billes en verres et de l'utilisation du broyeur Precellys®. Les protéines sont extraites en présence d'un tampon dénaturant (Tris-base 62,5 mM, SDS 3% (p/v), β-mercaptoéthanol 3% (v/v), Glycérol 10% (v/v), Bleu de bromophénol 0,05% (p/v), pH 6,8) en suivant une étape de dénaturation à 95°C pendant 5 min et une centrifugation à 16000g pendant 15min. Le surnageant est récupéré.

1.2.4.2 Quantification des protéines

Une fraction aliquote du surnageant de 10 µL est utilisée pour déterminer la concentration de l'extrait protéique. A cette fraction s'ajoutent 190 µL d'eau et 1 mL d'amidoblack (acide acétique 10% (v/v), méthanol 90% (v/v), et amidoblack 0,05% (p/v)). Cette méthode repose sur la précipitation des protéines dans le méthanol en milieu acide, et leur coloration par l'amidoblack. Après agitation, l'ensemble est centrifugé à 16000g pendant 10 min et le culot de protéines précipitées formé est rincé avec une solution de lavage (acide acétique 10% (v/v), éthanol 90% (v/v)). Le culot est ensuite dissout dans une solution de NaOH 0,2 M et

l'absorbance est mesurée à 595 nm. La concentration protéique de l'extrait est calculée à partir d'une gamme étalon préalablement réalisée avec de la BSA (Albumine de Sérum Bovin).

1.2.4.3 Séparation et détection des protéines par SDS-PAGE

Un gel de migration et un gel de concentration sont préparés d'après Sambrook et al., 1989, et coulé dans le système Mini-Protean III (Biorad). 15 µg de protéines par échantillon sont déposés et la migration se déroule pendant 1h30 à 120V dans un tampon Tris-Glycine (Tris-Base 25 mM, Glycine 250 mM, SDS 10%). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane en PVDF (PolyFluorure de Vinyldène) Immobilon-P (Millipore) dans un système Mini Trans Blot Cell (Biorad) contenant du tampon de transfert (Tris-base 25 mM, Glycine 192 mM, éthanol technique 15% (v/v)) pendant 2h à 270mA. La membrane est lavée dans du TBS-T (Tris-HCl pH 7,4 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1% (v/v)) pendant 5 min et placée pendant 1h dans du TBS-T contenant 5% de lait en poudre. Après blocage, la membrane est incubée une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire, lavée 3 fois avec du TBS-T pendant 10 min, puis incubée avec l'anticorps secondaire à température ambiante pendant 2h sauf si l'anticorps primaire est couplé à une peroxydase. Après 3 nouveaux lavages de 10 min dans du TBS-T, la révélation est effectuée par chimiluminescence avec du Luminata Forte Western HRP (Millipore). Les anticorps primaires utilisés sont l'anti-GFP (Anti-GFP-horseradish peroxidase, MACS Miltenyi Biotec), l'anti-RFP (Clontech), l'anti-HA (Sigma), l'anti-cdc2 (PSTAIR, Santa Cruz Biotechnology) et l'anti-RGA (Agrisera). Les anticorps secondaires utilisés sont le goat anti-rabbit IgG et le goat anti-mouse IgG (Molecular Probe), couplés à la peroxydase.

1.2.4.4 Observations par microscopie

Les images ont été obtenues à l'aide d'un microscope confocal Zeiss LSM780, avec des objectifs 40X. La longueur d'onde d'excitation de la GFP est 488nm et celle de la RFP est 561 nm. Toutes les images obtenues pour une expérience donnée ont été réalisées avec les mêmes modifications et selon les mêmes paramètres d'intensité. La fluorescence GFP dans les racines a été déterminée sur des plantules âgées de 7 jours pour les lignées *pKAO1::KAO1-GFP* et *pKAO2::KAO2-GFP*, et sur des greffes âgées de 14 jours. Les racines sont préalablement traitées avec de l'iodure de propidium (5 mg/ml). Dans le cas des expériences d'expression transitoire, les disques foliaires analysés sont issus de feuilles de *Nicotiana benthamiana* âgés de 5 semaines.

1.2.4.5 Analyses phylogénétiques

L'arbre phylogénétique présenté a été généré en utilisant le logiciel PhyML 3.0 (<http://www.phylogeny.fr/>; Dereeper et al., 2008), à partir de séquences d'acides aminés de gènes entiers obtenues sur Phytozome (<http://www.phytozome.net/>) et provenant de la base de donnée du National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/). Les alignements des séquences protéiques sont réalisés par le logiciel MUSCLE (Edgar, R.C., 2004; Dereeper et al., 2008), avec l'aide du programme Gblocks pour éliminer les régions divergentes ou/et faiblement correspondantes. La longueur des branches est proportionnelle à la distance évolutive entre les séquences et leurs ancêtres. Les valeurs de bootstrap sur les branches représentent la robustesse de la jonction calculée selon la méthode « Approximate Likelihood-Ratio Test », et sont exprimées en pourcentage.

1.2.5 Analyses histochimiques GUS

Le matériel végétal est fixé dans de l'acétone 90% sur glace pendant 10min, puis lavé et infiltré sous vide pendant 15 min dans une solution GUS (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-Gluc) 500 μ g/ml, sodium phosphate pH 7 50 mM, potassium ferricyanide 1 mM, potassium ferrocyanide 1 mM, EDTA 10 mM, triton X-100 0.01% (v/v)). Après une nuit d'incubation à 37°C, le matériel est décoloré pendant 6h à température ambiante dans plusieurs bains d'éthanol 100% (v/v), puis stocké dans de l'éthanol 70% (v/v) à 4°C.

1.2.6 Expression hétérologue des transporteurs

1.2.6.1 Expression hétérologue en levure

La transformation de levure s'effectue selon le protocole « méthode de transformation de levure, à petite échelle, avec de l'acétate de lithium » fourni par Clontech. Une pré-culture de la souche de levure WAT11 est réalisée dans 50 mL de YPD à 30°C pendant une nuit. Après obtention d'une DO_{600nm} de 0,7, les levures sont centrifugées à 3500 rpm pendant 5min. Le culot est resuspendu dans 1,5 mL de tampon de transformation (Lithium Acétate 0,1M, Tris-HCl 10mM pH8, EDTA 1mM pH 7,5). 10 μ L d'ADN de sperme de saumon (0,1 mg) préalablement chauffé à 95°C et refroidi sont mélangés à 100 μ g de plasmide (pYEDP60 dans lesquels sont introduits les gènes codant les transporteurs) et à 100 μ L de la suspension de levure. L'ADN et les levures sont mélangés par vortex. 600 μ L de tampon de

transformation contenant du PEG4000 40% (v/v) sont alors ajoutés et une incubation de 30 min à 30°C est effectuée. Aux levures compétentes, il est ensuite ajouté 70 µL de DMSO, mélangé par inversion. La transformation se déroule pendant 15min à 42°C, puis les tubes sont refroidis dans la glace. Après centrifugation (5 sec, 14000 rpm), les culots de levures transformées sont resuspendus dans 200 µL de tampon TE et étalés sur le milieu sélectif YPD – Uracile. Les colonies apparaissent après 3 jours d'incubation à 30°C. Pour vérifier l'expression des transporteurs en levure, une colonie est repiquée et placée en culture liquide dans du YPD – Ura contenant 10 mg / ml de galactose pendant 24h (3 répliquas indépendants sont réalisés). Les levures sont centrifugées et les culots sont broyés à l'aide de billes de verre (Precellys®). Les protéines sont extraites comme présenté en 6.2.4, et l'étiquette des transporteurs, constituée par 6 histidines, est détectée après séparation en western-blot à l'aide d'un anticorps anti-HIS.

1.2.6.2 Expression hétérologue en ovocyte de xénope

L'expression hétérologue en ovocyte de xénope a été réalisée sur la plateforme spécialisée à Montpellier (BPMP) avec l'aide de Sophie Leran, et suivant un protocole décrit par Krouk et al., 2010. Les ovocytes de xénope (*Xenopus laevis*) sont défollicularisés pendant 1h par un traitement à la collagénase (1 mg/ml) dans une solution contenant 82.5 mM de NaCl, 2 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂, et 5 mM de HEPES-NaOH (pH 7,4). Les ovocytes sont ensuite placés à 18°C dans une solution contenant 96 mM de NaCl, 2 mM de KCl, 1.8 mM de MgCl₂, 1 mM de CaCl₂, 2.5 mM de Na-pyruvate, et 5 mM HEPES-NaOH (pH 7,4), complétée avec 50 mg/ml de gentamicine. 50 nl d'ARNc (500 ng/µL) correspondant aux transporteurs sont injectés dans les ovocytes à l'aide d'une micropipette couplée à un injecteur. Après 48h d'incubation, les ovocytes sont triés et sélectionnés pour les tests d'import. Les ovocytes transformés (24 par transporteur) sont placés dans une solution physiologique (liquide de Ringer, pH 5,5) contenant de la GA₁₂ (10 µM) ou de la GA₃ (10 µM) pendant 30min. Les ovocytes sont rincés 3 fois avec la solution physiologique permettant d'éliminer tout résidu de l'hormone à l'extérieur de l'ovocyte. Des ovocytes non-transformés, servant de contrôles négatifs dans l'expérience sont également incubés dans les mêmes conditions. Une gamme étalon est réalisée en injectant des concentrations connues de GA₁₂ ou de GA₃ dans les ovocytes. Ils sont ensuite broyés dans une solution de méthanol 80% et analysés par LC-MS (en collaboration avec Patrick Wehrung, Faculté de Pharmacie, Illkirch) pour rechercher de la GA₁₂ ou de la GA₃ éventuellement importée.

1.2.7 Dosages de GA

1.2.7.1 Analyse de la sève brute d'*Arabidopsis*

Les plantes âgées de 35 jours, soit 5 jours après l'induction florale, sont utilisées pour ces expériences. Au préalable, 2h avant la récolte, les plantes sont placées dans une mini-serre et les pots sont imbibés d'eau. La tige de plantes est coupée 2 cm au dessus de la rosette, puis une première goutte se forme quelques minutes après la coupure. Celle-ci est récoltée mais n'est pas utilisée dans l'analyse. Les gouttes suivantes (de 4 à 5) sont collectées toutes les 30 min dans un tube eppendorf de 1,5 mL. Un plateau de 40 plantes permet de récupérer environ 500 μ L de sève xylémienne. L'échantillon est concentré et réduit à sec (SpeedVac). Après resuspension dans 150 μ L de méthanol 80% (v/v), la concentration en GA₁₂ est déterminée par chromatographie liquide à haute performance (UPLC, Waters) couplée à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS, Waters Quattro Premier XE), en suivant le protocole décrit par Wild et al., 2012 (Annexe 5).

1.2.7.2 Analyse de la sève élaborée d'*Arabidopsis*

La sève phloémienne est récoltée selon une méthode décrite par Beneteau et al., 2010. Les feuilles matures de plantes âgées de 4 semaines sont coupées en biseau à l'aide d'une lame de rasoir. Elles sont placées dans des tubes eppendorf de 1,5 mL, le pétiole reposant dans 80 μ L de tampon d'exsudation (Potassium phosphate 50mM, EDTA 10 mM, pH 7,6). L'exsudation dans le tampon se déroule pendant 3h à l'obscurité, dans une boîte contenant du papier Whatmann imbibé d'eau afin d'assurer un taux d'humidité élevé. Les exsudats provenant de 80 tubes sont ensuite regroupés, concentrés et réduits à sec (SpeedVac). Après resuspension dans 150 μ L de méthanol 80% (v/v), la concentration en GA₁₂ est déterminée par chromatographie liquide à haute performance (UPLC, Waters) couplée à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS, Waters Quattro Premier XE), en suivant le protocole décrit par Wild et al., 2012 (Annexe 5).

1.2.7.3 Dosages de GA dans les plantules

Les GA sont extraites de plantules âgées de 7 jours et analysées grâce au système Turbo-Mass (Perkin-Elmer) comme décrit dans les « Methods S1 » de l'article présenté au chapitre 4.

1.2.7.4 Dosage de GA dans les ovocytes de xénope

Trois ovocytes par échantillon sont regroupés dans 20 µL de méthanol 80% (v/v), et broyés à l'aide de billes en verre (Precellys®). Le tube est centrifugé pendant 5 min à 21000g puis l'ensemble est placé une nuit à 4°C. L'ensemble est à nouveau centrifugé 5 min à 21000g et le surnageant est récupéré. L'échantillon est analysé par LC-UV-MS/MS (Agilent 1200) (Service commun d'analyse, Faculté de Pharmacie, Illkirch).

1.2.7.5 Dosage de GA dans les greffons

Les greffons lyophilisés sont réduits en poudre à l'aide d'un broyeur à bille, et chaque échantillon est pesé afin d'obtenir 0,5 g de poudre. L'extraction se déroule dans 100 mL de méthanol 80% (v/v) à 4°C sous agitation pendant une nuit. L'échantillon est filtré afin d'éliminer les débris puis distillé sous vide pendant 15 à 30 min dans un bain marie à 40°C afin de le concentrer. 10 mL d'eau sont ajoutés dans les ballons et le pH est ajusté à 8 avec du KOH 0,5M. L'échantillon est déposé dans une colonne échangeuse d'anion (QAE Sephadex A-25, GE Healthcare Life Science). L'éluât est directement déposé dans une colonne C18 Sep-Pak Cartridge (Waters) et la colonne est lavée avec 30 mL d'acide formique 0,2 M. Les extraits purifiés après passage dans la colonne C18 sont méthylés avec du diazométhane et séchés sous un flux d'azote (N₂). Ils sont dissous dans l'acétate d'éthyle (1 mL) et mélangés à de l'eau (1 mL). La phase contenant l'acétate d'éthyle est éluée sur une colonne Bond-Elut NH₂ Cartridge (Varian) préalablement conditionnée avec 1 mL d'acétate d'éthyle. L'éluât est réduit à sec (SpeedVac), puis resuspendu dans 400 µL de méthanol 20%. L'échantillon purifié est ensuite fractionné par chromatographie en phase liquide à haute performance (Merck), et analysé par spectrométrie de masse (ThermoFinnigan GCQ).

Bibliographie

- Aach, H., Bode, H., Robinson, D. G., and Graebe, J. E. *ent*-Kaurene synthase is located in proplastids of meristematic shoot tissues. *Planta* **202**, 211–219 (1997).
- Aach, H., Böse, G., and Graebe, J. E. *ent*-Kaurene biosynthesis in a cell-free system from wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings and the localization of *ent*-kaurene synthetase in plastids of three species. *Planta* **197**, 333–342 (1995).
- Achard, P. & Genschik, P. Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *J. Exp. Bot.* **60**, 1085–1092 (2009).
- Achard, P., Gusti, A., Cheminant, S., Alioua, M., Dhondt, S., Coppens, F., Beemster, G. T., and Genschik, P. Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **19**, 1188–1193 (2009).
- Achard, P., Gong, F., Cheminant, S., Alioua, M., Hedden, P., and Genschik, P. The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. *Plant Cell* **20**, 2117–2129 (2008).
- Achard, P., Baghour, M., Chapple, A., Hedden, P., Van Der Straeten, D., Genschik, P., Moritz, T., and Harberd, N. P. The plant stress hormone ethylene controls floral transition via DELLA-dependent regulation of floral meristem-identity genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 6484–6489 (2007).
- Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van Der Straeten, D., Peng, J., and Harberd, N. P. Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* **311**, 91–94 (2006).
- An, F., Zhang, X., Zhu, Z., Ji, Y., He, W., Jiang, Z., Li, M., and Guo, H. Coordinated regulation of apical hook development by gibberellins and ethylene in etiolated *Arabidopsis* seedlings. *Cell Res.* **22**, 915–927 (2012).
- Appleford, N. E., Evans, D. J., Lenton, J. R., Gaskin, P., Croker, S. J., Devos, K. M., Phillips, A. L., and Hedden, P. Function and transcript analysis of gibberellin-biosynthetic enzymes in wheat. *Planta* **223**, 568–582 (2006).
- Appleford, N. E. & Lenton, J. R. Gibberellins and leaf expansion in near-isogenic wheat lines containing *Rht1* and *Rht3* dwarfing alleles. *Planta* **183**, 229–236 (1991).
- Ariizumi, T., Lawrence, P. K., and Steber, C. M. The role of two F-box proteins, SLEEPY1 and SNEEZY, in *Arabidopsis* gibberellin signaling. *Plant Physiology* **155**, 765–775 (2011).
- Arnaud, N., Girin, T., Sorefan, K., Fuentes, S., Wood, T. A., Lawrenson, T., Sablowski, R., and Østergaard, L. Gibberellins control fruit patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* **24**, 2127–2132 (2010).
- Bai, M.-Y., Shang, J. X., Oh, E., Fan, M., Bai, Y., Zentella, R., Sun, T. P., and Wang, Z. Y. Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in *Arabidopsis*. *Nat. Cell Biol.* **14**, 810–817 (2012).
- Band, L. R. & Bennett, M. J. Mapping the site of action of the Green Revolution hormone gibberellin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 4443–4444 (2013).
- Barker, R. Gibberellin Biosynthesis and Signaling in *Arabidopsis* Root Growth, Thèse soutenue à l'Université de Nottingham (2011).

- Bennett, M. J., Marchant, A., Green, H. G., May, S. T., Ward, S. P., Millner, P. A., Walker, A. R., Schulz, B., and Feldmann, K. A. Arabidopsis AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* **273**, 948–950 (1996).
- Bird, D., Beisson, F., Brigham, A., Shin, J., Greer, S., Jetter, R., Kunst, L., Wu, X., Yephremov, A., and Samuels, L. Characterization of Arabidopsis ABCG11/WBC11, an ATP binding cassette (ABC) transporter that is required for cuticular lipid secretion. *Plant Journal* **52**, 485–498 (2007).
- Blakeslee, J. J., Peer, W. A., and Murphy, A. S. Auxin transport. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 494–500 (2005).
- Bolle C. The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* **218**, 683–692 (2004).
- Bouquin, T., Meier, C., Foster, R., Nielsen, M. E., and Mundy, J. Control of specific gene expression by gibberellin and brassinosteroid. *Plant Physiology* **127**, 450–458 (2001).
- Boursiac, Y., L eran, S., Corratg -Faillie, C., Gojon, A., Krouk, G., and Lacombe, B. ABA transport and transporters. *Trends Plant Sci.* **18**, 325–333 (2013).
- Bradford, K. J. & Yang, S. F. Stress-induced Ethylene Production in the Ethylene-requiring Tomato Mutant Diageotropica. *Plant Physiology* **65**, 327–330 (1980)
- Canny, M. J. The Mechanism of Translocation. *Ann. Botany* **26**, 603–617 (1962).
- Cao, D., Cheng, H., Wu, W., Soo, H. M., and Peng, J. Gibberellin mobilizes distinct DELLA-dependent transcriptomes to regulate seed germination and floral development in Arabidopsis. *Plant Physiology* **142**, 509–525 (2006).
- Carr, D. J., Reid, D. M. and Skene, K. The supply of gibberellins from the root to the shoot. *Planta* **63**, 382–392 (1964).
- Chandler, P.M., Marion-Poll, A., Ellis, M., and Gubler, F. Mutants at the *Slender1* locus of barley cv Himalaya: Molecular and physiological characterization. *Plant Physiology* **129**, 181–190 (2002).
- Cheminant, S., Wild, M., Bouvier, F., Pelletier, S., Renou, J. P., Erhardt, M., Hayes, S., Terry, M. J., Genschik, P., and Achard P. DELLAs regulate chlorophyll and carotenoid biosynthesis to prevent photooxidative damage during seedling deetiolation in Arabidopsis. *Plant Cell* **23**, 1849–1860 (2011).
- Chen, R., Hilson, P., Sedbrook, J., Rosen, E., Caspar, T., and Masson, P. H. The arabidopsis thaliana AGRVITROPIC 1 gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 15112–15117 (1998).
- Cheng, H., Qin, L., Lee, S., Fu, X., Richards, D.E., Cao, D., Luo, D., Harberd, N.P., and Peng, J. Gibberellin regulates *Arabidopsis* floral development via suppression of DELLA protein function. *Development* **131**, 1055–1064 (2004).
- Chin, T. Y. & Lockhart, J. A. Translocation of applied gibberellin in bean seedlings. *American Journal of Botany* **828–833** (1965).
- Clor, M. A. Translocation of tritium-labelled gibberellic acid in pea stem segments and potato tuber cylinders. *Nature* **214**, 1263–1264 (1967).

- Colebrook, E. H., Thomas, S. G., Phillips, A. L. and Hedden, P. The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. *J. Exp. Biol.* **217**, 67–75 (2014).
- Coles, J. P., Phillips, A. L., Croker, S. J., García-Lepe, R., Lewis, M. J., and Hedden, P. Modification of gibberellin production and plant development in *Arabidopsis* by sense and antisense expression of gibberellin 20-oxidase genes. *Plant Journal* **17**, 547–556 (1999).
- Croker, S. J., Hedden, P., Lenton, J. R., and Stoddart, J. L. Comparison of gibberellins in normal and slender barley seedlings. *Plant Physiology* **94**, 194-200 (1990)
- Crouzet, J., Trombik, T., Fraysse, A. S. and Boutry, M. Organization and function of the plant pleiotropic drug resistance ABC transporter family. *FEBS Lett.* **580**, 1123-1130 (2006).
- Curaba, J., Moritz, T., Blervaque, R., Parcy, F., Raz, V., Herzog, M., and Vachon, G. *AtGA3ox2*, a key gene responsible for bioactive gibberellin biosynthesis, is regulated during embryogenesis by LEAFY COTYLEDON2 and FUSCA3 in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **136**, 3660–3669 (2004).
- Curtis, P. J., & Cross, P. E. Gibberellic acid: A new metabolite from the culture filtrates of *Gibberella fujikuroi*. *Chem. Ind.* 1066 (1954).
- Dai, M., Zhao, Y., Ma, Q., Hu, Y., Hedden, P., Zhang, Q., and Zhou, D. X. The rice YABBY1 gene is involved in the feedback regulation of gibberellin metabolism. *Plant Physiology* **144**, 121–133 (2007).
- Darwin, C. *The Power of Movements in Plants* (1880).
- Davidson, S. E., Elliott, R. C., Helliwell, C. A., Poole, A. T. and Reid, J. B. The pea gene NA encodes *ent*-kaurenoic acid oxidase. *Plant Physiology* **131**, 335–344 (2003).
- Davière, J.-M., de Lucas, M. and Prat, S. Transcriptional factor interaction: a central step in DELLA function. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **18**, 295–303 (2008).
- Davière, J. M., & Achard, P. Gibberellin signaling in plants. *Development* **140**, 1147-1151 (2013).
- Davière, J. M., Wild, M., Regnault, T., Baumberger, N., Eisler, H., Genschik, P., and Achard, P. Class I TCP-DELLA Interactions in Inflorescence Shoot Apex Determine Plant Height. *Curr. Biol.* **24**, 1923-1928 (2014).
- Debeaujon, I., & Koorneef, M. Gibberellin Requirement for *Arabidopsis* Seed Germination Is Determined Both by Testa Characteristics and Embryonic Abscisic Acid. *Plant Physiology* **122**, 415-424 (2000).
- De Lucas, M., Davière, J. M., Rodríguez-Falcón, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J. M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blázquez, M. A., Titarenko, E., and Prat, S. A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* **451**, 480-484 (2008).
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J. F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J. M., and Gascuel, O. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 2008
- Dietz, K. J., Sauter, A., Wichert, K., Messdaghi, D., and Hartung, W. Extracellular β -glucosidase activity in barley involved in the hydrolysis of ABA glucose conjugate in leaves. *J. Exp. Bot.* **5**, 937-944 (2000).
- Dill, A., Jung, H. S. and Sun, T. P. The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of

- RGA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 14162–14167 (2001)
- Edgar, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1792-1797 (2004).
- Eriksson, S., Böhlenius, H., Moritz, T. and Nilsson, O. GA4 is the active gibberellin in the regulation of LEAFY transcription and Arabidopsis floral initiation. *Plant Cell* **18**, 2172–2181 (2006).
- Evans, L. T. The Role of Gibberellins in Floral Evocation of the Grass *Lolium temulentum*. *Plant Physiology*, **Chapter 25**, Essay 25.1 (1996).
- Fambrini, M., Mariotti, L., Parlanti, S., Picciarelli, P., Salvini, M., Ceccarelli, N., and Pugliesi C. The extreme dwarf phenotype of the GA-sensitive mutant of sunflower, *dwarf2*, is generated by a deletion in the ent-kaurenoic acid oxidase1 (*HaKAO1*) gene sequence. *Plant Mol. Biol.* **75**, 431–450 (2011).
- Fan, S. C., Lin, C. S., Hsu, P. K., Lin, S. H. and Tsay, Y. F. The Arabidopsis Nitrate Transporter NRT1.7, Expressed in Phloem, Is Responsible for Source-to-Sink Remobilization of Nitrate. *Plant Cell* **21**, 2750–2761 (2009).
- Feng, S., Martinez, C., Gusmaroli, G., Wang, Y., Zhou, J., Wang, F., Chen, L., Yu, L., Iglesias-Pedraz, J. M., Kircher, S., Schäfer, E., Fu, X., Fan, L. M., and Deng, X. W. Coordinated regulation of Arabidopsis thaliana development by light and gibberellins. *Nature* **451**, 475-479 (2008).
- Feurtado, J. A., Huang, D., Wicki-Stordeur, L., Hemstock, L. E., Potentier, M. S., Tsang, E. W. T., and Cutler, A. J. The Arabidopsis C2H2 zinc finger INDETERMINATE DOMAIN1/ENHYDROUS promotes the transition to germination by regulating light and hormonal signaling during seed maturation. *Plant Cell* **23**, 1772-1794 (2011).
- Fleet, C. M. & Sun, T.-P. A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 77–85 (2005).
- Fleet, C. M., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kawaide, H., David, C. J., Kamiya, Y., and Sun, T. P. Overexpression of *AtCPS* and *AtKS* in *Arabidopsis* confers increased ent-kaurene production but no increase in bioactive gibberellins. *Plant Physiology* **132**, 830–839 (2003).
- Fourcroy, P., Sisó-Terraza, P., Sudre, D., Savirón, M., Reyt, G., Gaymard, F., Abadía, A., Abadia, J., Alvarez-Fernández, A., and Briat, J. F. Involvement of the ABCG37 transporter in secretion of scopoletin and derivatives by Arabidopsis roots in response to iron deficiency. *New Phytol.* **201**, 155–167 (2014).
- Fray, R.G., Wallace, A., Fraser, P.D., Valero, D., Hedden, P., Bramley, P.M. and Grierson, D. Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. *Plant Journal* **8**, 693–701 (1995).
- Frigerio, M., Alabadí, D., Pérez-Gómez, J., García-Cárcel, L., Phillips, A. L., Hedden, P. and Blázquez, M. A. Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology* **142**, 553–563 (2006).
- Friml, J. Auxin transport - shaping the plant. *Curr. Opin. in Plant Biol.* **6**, 7-12 (2003).
- Gallego-Bartolomé, J., Alabadí, D. and Blázquez, M. A. DELLA-induced early transcriptional changes during etiolated development in Arabidopsis thaliana. *PLoS ONE* **6**, e23918 (2011).
- Gallego-Bartolomé, J., Minguet, E. G., Marín, J. A., Prat, S., Blázquez, M. A., and Alabadí, D.

- Transcriptional diversification and functional conservation between DELLA proteins in *Arabidopsis*. *Mol. Biol. Evol.* **27**, 1247-1256 (2010).
- Garcia-Martinez, J. L., & Gil, J. Light regulation of gibberellin biosynthesis and mode of action. *J. Plant Growth Regul.* **20**, 354-368 (2002).
- Geisler, M., Blakeslee, J. J., Bouchard, R., Lee, O. R., Vincenzetti, V., Bandyopadhyay, A., Titapiwatanakun, B., Peer, W. A., Bailly, A., Richards, E. L., Ejendal, K. F., Smith, A. P., Baroux, C., Grossniklaus, U., Müller, A., Hrycyna, C. A., Dudler, R., Murphy, A. S., and Martinoia, E. Cellular efflux of auxin catalyzed by the *Arabidopsis* MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant Journal* **44**, 179-194 (2005).
- Goldin, A. L., Chapter 1. Expression of Ion Channels in *Xenopus* Oocytes. *Expression and Analysis of Recombinant Ion Channels*. Edited by Jeffrey J. Clare and Derek J. Trezise (2006).
- Gómez-Cadenas, A., Zentella, R., Walker-Simmons, M.K., and Ho, T.-H.D. Gibberellin/abscisic acid antagonism in barley aleurone cells: Site of action of the protein kinase PKABA1 in relation to gibberellin signaling molecules. *Plant Cell* **13**, 667-679 (2001).
- Gómez-Mena, C., de Folter, S., Costa, M. M. R., Angenent, G. C. and Sablowski, R. Transcriptional program controlled by the floral homeotic gene AGAMOUS during early organogenesis. *Development* **132**, 429–438 (2005).
- Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z. L., Powers, S. J., Gong, F., Phillips, A. L., Hedden, P., Sun, T. P., and Thomas, S. G. Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 3399–3414 (2006).
- Guo, F.Q., Wang, R., Chen, M. and Crawford, N.M. The *Arabidopsis* dual-affinity nitrate transporter gene *AtNRT1.1* (CHL1) is activated and functions in nascent organ development during vegetative and reproductive growth. *Plant Cell* **13**, 1761-1777 (2001).
- Hansen, H., & Dörffling, K. Changes of free and conjugated abscisic acid and phaseic acid in xylem sap of drought - stressed sunflower plants. *J. Exp. Bot.* **50**, 1599-1605 (1999).
- Hay, A., Kaur, H., Phillips, A., Hedden, P., Hake, S., and Tsiantis, M. The gibberellin pathway mediates KNOTTED1-type homeobox function in plants with different body plans. *Curr. Biol.* **12**, 1557–1565 (2002).
- Hedden, P. Gibberellins close the lid. *Nature* **456**, 455–456 (2008).
- Hedden, P. & Phillips, A. L. Manipulation of hormone biosynthetic genes in transgenic plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 130–137 (2000).
- Hedden, P. & Phillips, A. L. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Science* **5**, 523–530 (2000).
- Hedden, P. & Proebsting, W. M. Genetic analysis of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiology* **119**, 365–370 (1999).
- Hedden, P. The genes of the Green Revolution. *Trends Genet.* **19**, 5–9 (2003).
- Hedden P., & Thomas S.G. Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem. J.* **15**, 11-25 (2012)
- Heller, R., Esnault, R., and Lance, C. Physiologie végétale, *Dunod*, 6^{ème} édition, 65-67 (2004).
- Helliwell, C. A., Sheldon, C. C., Olive, M. R., Walker, A. R., Zeevaart, J. A., Peacock, W. J., and Dennis, E. S. Cloning of the *Arabidopsis* ent-kaurene oxidase gene GA₃. *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. U.S.A.* **95**, 9019–9024 (1998).
- Helliwell, C. A., Poole, A., Peacock, W. J., and Dennis, E. S. *Arabidopsis ent*-kaurene oxidase catalyzes three steps of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiology* **119**, 507-10 (1999)
- Helliwell, C. A., Chandler, P. M., Poole, A., Dennis, E. S. and Peacock, W. J. The CYP88A cytochrome P450, ent-kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellin biosynthesis pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 2065–2070 (2001).
- Helmut, A., Bode, H., Robinson, D. and Graebe, J. E. ent-Kaurene synthase is located in proplastids of meristematic shoot tissues. *Planta* **211–219** (1997).
- Henikoff, S., Greene, E. A., Pietrokovski, S., Bork, P., Attwood, T. K., and Hood, L. Gene families: The taxonomy of protein paralogs and chimeras. *Science* **278**, 609–614 (1997).
- Heo, J.-O., Chang, K. S., Kim, I. A., Lee, M. H., Lee, S. A., Song, S. K., Lee, M. M., and Lim, J. Funneling of gibberellin signaling by the GRAS transcription regulator scarecrow-like 3 in the *Arabidopsis* root. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 2166–2171 (2011).
- Higgins, C.F. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**, 67-113 (1992).
- Hirano, K., Asano, K., Tsuji, H., Kawamura, M., Mori, H., Kitano, H., Ueguchi-Tanaka, and M., Matsuoka, M. Characterization of the molecular mechanism underlying gibberellin perception complex formation in rice. *Plant Cell* **22**, 2680–2696 (2010).
- Hirano, K., Kouketu, E., Katoh, H., Aya, K., Ueguchi-Tanaka, M., and Matsuoka, M. The suppressive function of the rice DELLA protein SLR1 is dependent on its transcriptional activation activity. *Plant Journal* **71**, 443–453 (2012).
- Hoad, G. V. Transport of hormones in the phloem of higher plants. *Plant Growth Regulation* **16**, 1–10 (1995).
- Hoad, G. V., Retamales, J. A., Whiteside, R. J., Lewis, M. J. Phloem translocation of gibberellins in three species of higher plants. *Plant Growth Regulation* **13**, 85–88 (1993).
- Hoad, G. V., & Bowen M. R. Evidence for Gibberellin-like Substances in Phloem Exudate of Higher Plants. *Planta* **82**, 22–32 (1968).
- Holland, J. J., Roberts, D., and Liscum, E. Understanding Phototropism : from Darwin to today. *J. Exp. Bot.* **60**, 1969-1978 (2009)
- Hong, G.-J., Xue, X.-Y., Mao, Y.-B., Wang, L.-J. and Chen, X.-Y. *Arabidopsis* MYC2 interacts with DELLA proteins in regulating sesquiterpene synthase gene expression. *Plant Cell* **24**, 2635–2648 (2012).
- Hopkins, W. G. Physiologie végétale, *De boeck*, 2^{ème} édition, 310-311 (2003).
- Hori, S. Some observations on 'Bakanae' disease of the rice plant. *Agricultural Research Station (Tokyo)* **12**, 110-119 (1898).
- Hu, J., Mitchum, M. G., Barnaby, N., Ayele, B. T., Ogawa, M., Nam, E., Lai, W. C., Hanada, A., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Swain, S. M., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., and Sun, T. P. Potential sites of bioactive gibberellin production during reproductive growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**, 320–336 (2008).
- Hwang, I., & Goodman, H. M. An *Arabidopsis thaliana* root-specific kinase homolog is induced by

- dehydration, ABA, and NaCl. *Plant Journal* **8**, 37-43 (1995).
- Ikeda, A., Ueguchi-Tanaka, M., Sonoda, Y., Kitano, H., Koshioka, M., Futsuhara, Y., Matsuoka, M., and Yamaguchi, J. Slender rice, a constitutive response mutant, is caused by a null mutation of the SLR1 gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8. *Plant Cell* **13**, 999-1010 (2001).
- Ingram, T.J., Reid, J.B., Murfet, I.C., Gaskin, P., Willis, C.L., and MacMillan, J. Internode length in Pisum: the Le gene controls the 3 β -hydroxylation of gibberellin A20 to gibberellin A1. *Planta* **160**, 455–463 (1984).
- Ishida, S., Fukazawa, J., Yuasa, T., and Takahashi, Y. Involvement of 14–3–3 signaling protein binding in the functional regulation of the transcriptional activator REPRESSION OF SHOOT GROWTH by gibberellins. *Plant Cell* **16**, 2641–2651 (2004).
- Itoh, H., Tatsumi, T., Sakamoto, T., Otomo, K., Toyomasu, T., Kitano, H., Ashikari, M., Ichihara, S., and Matsuoka, M. A rice semi-dwarf gene, Tan-Ginbozu (D35), encodes the gibberellin biosynthesis enzyme, *ent*-kaurene oxidase. *Plant Mol. Biol.* **54**, 533–547 (2004).
- Jager, C. E., Symons, G. M., Ross, J. J., Smith, J. J., and Reid, J. B. The brassinosteroid growth response in pea is not mediated by changes in gibberellin content. *Planta* **221**, 141-148 (2005).
- Jasinski, S., Piazza, P., Craft, J., Hay, A., Woolley, L., Rieu, I., Phillips, A., Hedden, P., and Tsiantis, M. KNOX action in *Arabidopsis* is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Curr. Biol.* **15**, 1560-1565 (2005).
- Josse, E. M., Gan, Y., Bou-Torrent, J., Stewart, K. L., Gilday, A.D., Jeffree, C. E., Vaistij, F. E., Martinez-Garcia, J.F., Nagy, F., Graham, I.A., and Halliday, K.J. A DELLA in Disguise: SPATULA Restrains the Growth of the Developing Arabidopsis Seedling. *Plant Cell* 1-16 (2011).
- Kang, J., Parka, J., Choia, H., Burlab, B., Kretzschmarb, T., Leea, Y., and Martinoiaa, E. Plant ABC Transporters. *Arabidopsis Book* **9**, e0153 (2011).
- Kang, J., Hwang, J. U., Lee, M., Kim, Y. Y., Assmann, S. M., Martinoia, E., and Lee, Y. PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 2355–2360 (2010).
- Kanno, Y., Kamiya, Y. and Seo, M. Nitrate does not compete with abscisic acid as a substrate of AtNPF4.6/NRT1.2/AIT1 in Arabidopsis. *Plant Signal Behav* **8**, e26624 (2013).
- Kanno, Y., Hanada, A., Chiba, Y., Ichikawa, T., Nakazawa, M., Matsui, M., Koshiha, T., Kamiya, Y., and Seo, M. Identification of an abscisic acid transporter by functional screening using the receptor complex as a sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 9653–9658 (2012).
- Karssen, C. M., & Laçka, E. A revision of the hormone balance theory of seed dormancy: studies on gibberellin and/or abscisic acid-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Substances* 315–323 (1986).
- Kasahara, H., Hanada, A., Kuzuyama, T., Takagi, M., Kamiya, Y., and Yamaguchi, S. Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of gibberellins in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* **277**, 45188–45194 (2002).
- Kato, J. J. Non-polar transport of gibberellin through pea stem and a method for its determination. *Science* **128**, 1008–1009 (1958).

- Kendall, S. L., Hellwege, A., Marriot, P., Whalley, C., Graham, I. A., and Penfield, S. Induction of dormancy in *Arabidopsis* summer annuals requires parallel regulation of DOG1 and hormone metabolism by low temperature and CBF transcription factors. *Plant Cell* **23**, 2568-2580 (2011).
- King, K.E., Moritz, T., and Harberd, N.P. Gibberellins are not required for normal stem growth in *Arabidopsis thaliana* in the absence of GAI and RGA. *Genetics* **159**, 767–776 (2001).
- Kilian, J., Whitehead, D., Horak, J., Wanke, D., Weinl, S., Batistic, O., D'Angelo, C., Bornberg-Bauer, E., Kudla, J., and Harter, K. The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *The Plant Journal* **50**, 347–363 (2007).
- Kim, D. H., Yamaguchi, S., Lim, S., Oh, E., Park, J., Hanada, A., Kamiya, Y., and Choi, G. SOMNUS, a CCCH-type zinc finger protein in *Arabidopsis*, negatively regulates light-dependent seed germination downstream of PIL5. *Plant Cell* **20**, 1260–1277 (2008).
- Kluge, M., Reinhard, E., and Ziegler, H. : Gibberellinaktivitat yon Siebenrohrensaften. *Naturwissenschaften* **6**, 145-146 (1964).
- Kohlen, W., Charnikhova, T., Liu, Q., Bours, R., Domagalska, M. A., Beguerie, S., Verstappen, F., Leyser, O., Bouwmeester, H., and Ruyter-Spira, C. Strigolactones are transported through the xylem and play a key role in shoot architectural response to phosphate deficiency in nonarbuscular mycorrhizal host *Arabidopsis*. *PLANT PHYSIOLOGY* **155**, 974–987 (2011).
- Koorneef, M., & Van der Veen, J. H. Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Theor. Appl. Genet.* **58**, 257-263 (1980).
- Koorneef, M., Elgersma, A., Hanhart, C. J., Van Loenen-Martinet, E. P., Van Rijn, L., and Zeevaart, J. A. A gibberellin insensitive mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **65**, 33-39 (1985).
- Kramer, E. M., Rutschow, H. L., and Mabie, S. S. AuxV: a database of auxin transport velocities. *Trends Plant Science* **16**, 461-463 (2011).
- Krouk, G., Lacombe, B., Bielach, A., Perrine-Walker, F., Malinska, K., Mounier, E., Hoyerova, K., Tillard, P., Leon, S., Ljung, K., Zazimalova, E., Benkova, E., Nacry, P., and Gojon, A. Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Developmental Cell* **18**, 927–937 (2010).
- Kudo, T., Kiba, T., and Sakakibara, H. Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *J. Integr. Plant Biol.* **52**, 53-60 (2010).
- Kuromori, T., Miyaji, T., Yabuuchi, H., Shimizu, H., Sugimoto, E., Kamiya, A., Moriyama, Y., and Shinozaki, K. ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 2361–2366 (2010).
- Kurosawa, E. Experimental studies on the nature of the substance secreted by the 'bakanae' fungus. *Transactions of the Natural History Society of Formosa* **16**, 213-227 (1926).
- Lange, B. M., Ghassemian, M. Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. *Plant Mol. Biol.* **51**, 925-948 (2003).
- Lee, S., Cheng, H., King, K. E., Wang, W., He, Y., Hussain, A., Lo, J., Harberd, N. P., and Peng, J. Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes Dev.* **16**, 646–658 (2002).

- Léran, S. *et al.* A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. *Trends Plant Science* **19**, 5–9 (2014).
- Léran, S., Muñoz, S., Brachet, C., Tillard, P., Gojon, A., and Lacombe, B. The Arabidopsis NRT1.1 is a bidirectional transporter involved in root to shoot nitrate translocation. *Mol. Plant* (2013).
- Lester, D. R., Ross, J. J., Davies, P. J., and Reid, J. B. Mendel's stem length gene (*Le*) encodes a gibberellin 3 β -hydroxylase. *Plant Cell* **9**, 1435–1443 (1997).
- Lilley, J. L. S., Gan, Y., Graham, I. A. & Nemhauser, J. L. DELLA effects on growth change with developmental stage and brassinosteroid levels. *Plant Journal* (2013).
- De Lucas, M., Davière, J. M., Rodríguez-Falcón, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J. M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blázquez, M. A., Titarenko, E., and Prat, S. A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* **451**, 480–484 (2008).
- Lavender, D.P., Sweet, G. B., Zaerr, J. B., and Herman, R. K. Spring shoot growth in Douglas-fir may be initiated by gibberellins exported from the roots. *Science* **182**, 838–839 (1973).
- Locascio, A., Blázquez, M. A., and Alabadi, D. Dynamic regulation of cortical microtubule organization through prefoldin-DELLA interaction. *Curr. Biol.* **23**, 804–809 (2013).
- Magome, H., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kamiya, Y., and Oda, K. The DDF1 transcriptional activator upregulates expression of a gibberellin-deactivating gene, *GA2ox7*, under high-salinity stress in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **56**, 613–26 (2008).
- Magome, H., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kamiya, Y. and Oda, K. dwarf and delayed-flowering 1, a novel Arabidopsis mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor. *Plant Journal* **37**, 720–729 (2004).
- Martin, D. N., Proebsting, W. M., and Hedden, P. Mendel's dwarfing gene: cDNAs from the *Le* alleles and function of the expressed proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 8907–8911 (1997).
- MacMillan, J. Occurrence of Gibberellins in Vascular Plants, Fungi, and Bacteria. *Journal of Plant Growth Regulation* **20**, 387–442 (2001).
- McComb, A. J. The stability and movement of gibberellic acid in pea seedlings. *Annals of Botany* **28**, 669–687 (1964).
- McGinnis, K. M., Thomas, S. G., Soule, J. D., Strader, L. C., Zale, J. M., Sun, T. P., and Steber, C. M. The Arabidopsis SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell* **15**, 1120–1130 (2003).
- McFarlane, H. E., Shin, J. J., Bird, D. A. and Samuels, A. L. Arabidopsis ABCG transporters, which are required for export of diverse cuticular lipids, dimerize in different combinations. *Plant Cell*, **22**, 3066–3075 (2010).
- Mitchum, M. G., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kuwahara, A., Yoshioka, Y., Kato, T., Tabata, S., Kamiya, Y., and Sun, T. P. Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in Arabidopsis development. *Plant Journal* **45**, 804–818 (2006).
- Monna, L., Kitazawa, N., Yoshino, R., Suzuki, J., Masuda, H., Maehara, Y., Tanji, M., Sato, M., Nasu, S., and Minobe, Y. Positional cloning of rice semidwarfing gene, *sd1*: rice “green revolution gene” encodes a mutant enzyme involved in gibberellin synthesis. *DNA Res.* **9**, 11–17

(2002).

- Morrone, D., Chen, X., Coates, R. M. and Peters, R. J. Characterization of the kaurene oxidase CYP701A3, a multifunctional cytochrome P450 from gibberellin biosynthesis. *Biochem. J.* **431**, 337–344 (2010).
- Murase, K., Hirano, Y., Sun, T.-P. and Hakoshima, T. Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* **456**, 459–463 (2008).
- Miyazono, K., Miyakawa, T., Sawano, Y., Kubota, K., Kang, H. J., Asano, A., Miyauchi, Y., Takahashi, M., Zhi, Y., Fujita, Y., Yoshida, T., Kodaira, K. S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Tanokura, M. Structural basis of abscisic acid signalling. *Nature* **462**, 609–614 (2009).
- Nakajima, M., Shimada, A., Takashi, Y., Kim, Y. C., Park, S. H., Ueguchi-Tanaka, M., Suzuki, H., Katoh, E., Iuchi, S., Kobayashi, M., Maeda, T., Matsuoka, M., and Yamaguchi, I. Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. *Plant Journal* **46**, 880–889 (2006).
- Nishimura, N., Hitomi, K., Arvai, A. S., Rambo, R. P., Hitomi, C., Cutler, S. R., Schroeder, J. I., and Getzoff, E. D. Structural mechanism of abscisic acid binding and signaling by dimeric PYR1. *Science* **326**, 1373–1379 (2009).
- Noh, B., Murphy, A. S., and Spalding, E. P. Multidrug resistance-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development. *Plant Cell* **13**, 2441–2454 (2001).
- Nour, J. M. & Rubery, P. H. The uptake of gibberellin A1 by suspension-cultured *Spinacia oleracea* cells has a carrier-mediated component. *Planta* **160**, 436–443 (1984).
- Nour-Eldin, H. H., Andersen, T. G., Burow, M., Madsen, S. R., Jørgensen, M. E., Olsen, C. E., Dreyer, I., Hedrich, R., Geiger, D., and Halkier, B. A. NRT/PTR transporters are essential for translocation of glucosinolate defence compounds to seeds. *Nature* **488**, 531–534 (2012).
- Ogawa, M., Hanada, A., Yamauchi, Y., Kuwahara, A., Kamiya, Y., and Yamaguchi, S. Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Cell* **15**:1591–604 (2003).
- Oh, E., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Bae, G., Chung, W. I., and Choi, G. Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **47**, 124–139 (2006).
- Oikawa, T., Koshioka, M., Kojima, K., Yoshida, H., and Kawata, M. A role of *OsGA20ox1*, encoding an isoform of gibberellin 20-oxidase, for regulation of plant stature in rice. *Plant Mol. Biol.* **55**, 687–700 (2004).
- Oñate-Sánchez, L., & Vicente-Carbajosa, J. DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques. *BMC Research Notes* **1**, 93 (2008).
- O'Neill, D. P., Davidson, S. E., Clarke, V. C., Yamauchi, Y., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Reid, J. B., and Ross, J. J. Regulation of the gibberellin pathway by auxin and DELLA proteins. *Planta* **232**, 1141–1149 (2010).
- Otsuka, M., Kenmoku, H., Ogawa, M., Okada, K., Mitsuhashi, W., Sassa, T., Kamiya, Y., Toyomasu, T., and Yamaguchi, S. Emission of *ent*-kaurene, a diterpenoid hydrocarbon precursor for gibberellins, into the headspace from plants. *Plant Cell Physiol.* **45**, 1129–1138 (2004).
- Park, J., Nguyen, K. T., Park, E., Jeon, J.-S. and Choi, G. DELLA proteins and their interacting RING Finger proteins repress gibberellin responses by binding to the promoters of a subset of

- gibberellin-responsive genes in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**, 927–943 (2013).
- Penfield, S., Josse, E. M., Kannangara, R., Gilday, A. D., Halliday, K. J., and Graham, I. A. Cold and light control seed germination through the bHLH transcription factor SPATULA. *Curr. Biol.* **15**, 1998–2006 (2005).
- Peng, J., Carol, P., Richards, D. E., King, K. E., Cowling, R. J., Murphy, G. P., and Harberd, N. P. The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev.* **11**, 3194–3205 (1997).
- Peng, J., Richards, D. E., Hartley, N. M., Murphy, G. P., Devos, K. M., Flintham, J. E., Beales, J., Fish, L. J., Worland, A. J., Pelica, F., Sudhakar, D., Christou, P., Snape, J. W., Gale, M. D., and Harberd, N.P. 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* **400**, 256-261 (1999).
- Peng, Y. J., Shih, C. F., Yang, J. Y., Tan, C. M., Hsu, W. H., Huang, Y. P., Liao, P. C., and Yang, C. H. A RING-type E3 ligase controls anther dehiscence by activating the jasmonate biosynthetic pathway gene DEFECTIVE IN ANTHER DEHISCENCE1 in Arabidopsis. *Plant Journal* **74**, 310–327 (2013).
- Phillips, A. L., Ward, D. A., Uknes, S., Appleford, N. E., Lange, T., Huttly, A. K., Gaskin, P., Graebe, J. E., and Hedden, P. Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from Arabidopsis. *Plant Physiology* **108**, 1049–1057 (1995).
- Phillips, I. & Hartung, W. Basipetal and acropetal transport of [3, 4-3H] Gibberellin A1 in short and long segments of Phaseolus coccineus second internode. *Planta* **116**, 109–121 (1974).
- Phillips, I. & Jones, R. L. Gibberellin-like activity in bleeding-sap of root systems of Helianthus annuus detected by a new dwarf pea epicotyl assay and other methods. *Planta* **63**, 269–278 (1964).
- Phinney, B. O., West, C.A., Ritzel, M.B., and Neely, P. M. Evidence for gibberellin-like substances from flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **43**, 398–404 (1957)
- Pingali, P. L. Green revolution: impacts, limits, and the path ahead. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 12302-12308 (2002).
- Plackett, A. R. G., Powers, S. J., Fernandez-Garcia, N., Urbanova, T., Takebayashi, Y., Seo, M., Jikumaru, Y., Benlloch, R., Nilsson, O., Ruiz-Rivero, O., Phillips, A. L., Wilson, Z. A., Thomas, S. G., and Hedden, P. Analysis of the developmental roles of the Arabidopsis gibberellin 20-oxidases demonstrates that GA20ox1, -2, and -3 are the dominant paralogs. *Plant Cell* **24**, 941–960 (2012).
- Proebsting, W. M., Hedden, P., Lewis, M. J., Croker, S. J. and Proebsting, L. N. Gibberellin concentration and transport in genetic lines of pea : effects of grafting. *Plant Physiology* **100**, 1354–1360 (1992).
- Pysh, L.D., Wysocka-Diller, J.W., Camilleri, C., Bouchez, D., and Benfey, P.N. The GRAS gene family in Arabidopsis: Sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant Journal* **18** 111–119 (1999).
- Lockard L. G. & Grunwald, C. Grafting and Gibberellin Effects on the Growth of Tall and Dwarf Peas. *Plant Physiology* **45**, 160–162 (1970).
- Rademacher, W. GROWTH RETARDANTS: Effects on Gibberellin Biosynthesis and Other Metabolic Pathways. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**, 501–531 (2000).

- Ragni, L., Nieminen, K., Pacheco-Villalobos, D., Sibout, R., Schwechheimer, C., and Hardtke, C. S.. Mobile gibberellin directly stimulates Arabidopsis hypocotyl xylem expansion. *Plant Cell* **23**, 1322–1336 (2011).
- Radley, M. Occurrence of substances similar to gibberellic acid in higher plants. *Nature* **178**, 1070-1071
- Regnault, T., Davière, J. M., Heintz, D., Lange, T., and Achard, P. The gibberellin biosynthetic genes *AtKAO1* and *AtKAO2* have overlapping roles throughout Arabidopsis development. *Plant Journal* 2014 Aug 21
- Reid, D. M., Crozier, A. and Harvey, B. M. The effects of flooding on the export of gibberellins from the root to the shoot. *Planta* **89**, 376–379 (1969).
- Reid, J. B., Murfet, I. C., and Potts, W. C. Internode length in Pisum. II. Additional information on the relationship and action of loci *Le*, *La*, *Cry*, *Na* and *Lm*. *J. Exp. Bot.* **34**, 349–364 (1983).
- Reid, J. B., Davidson, S. E. and Ross, J. J. Auxin acts independently of DELLA proteins in regulating gibberellin levels. *Plant Signal. Behav.* **6**, 406–408 (2011).
- Rieu, I., Ruiz-Rivero, O., Fernandez-Garcia, N., Griffiths, J., Powers, S. J., Gong, F., Linhartova, T., Eriksson, S., Nilsson, O., Thomas, S. G., Phillips, A. L., and Hedden, P. The gibberellin biosynthetic genes *AtGA20ox1* and *AtGA20ox2* act, partially redundantly, to promote growth and development throughout the Arabidopsis life cycle. *Plant Journal* **53**, 488–504 (2008 a).
- Rieu, I., Eriksson, S., Powers, S. J., Gong, F., Griffiths, J., Woolley, L., Benlloch, R., Nilsson, O., Thomas, S. G., Hedden, P., and Phillips, A. L. Genetic analysis reveals that C19-GA 2-oxidation is a major gibberellin inactivation pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**, 2420–2436 (2008 b).
- Ross, J. J., O'Neill, D. P., Smith, J. J., Kerckhoffs, L. H., and Elliott, R. C. Evidence that auxin promotes gibberellin A1 biosynthesis in pea. *Plant Journal* **21**, 547-552 (2000).
- Rogers, B. *et al.* The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**, 207–214 (2001).
- Rudich, J., Sell, H. M. & Baker, L. R. Transport and metabolism of 3H-gibberellin A1 in dioecious cucumber seedlings. *Plant Physiology* **57**, 734–737 (1976).
- Ruyter-Spira, C., Al-Babili, S., van der Krol, S. & Bouwmeester, H. The biology of strigolactones. *Trends Plant Sci.* **18**, 72–83 (2013).
- Ruzicka, K., Strader, L. C., Bailly, A., Yang, H., Blakeslee, J., Langowski, L., Nejedlá, E., Fujita, H., Itoh, H., Syono, K., Hejátko, J., Gray, W. M., Martinoia, E., Geisler, M., Bartel, B., Murphy, A. S., and Friml, J. Arabidopsis PIS1 encodes the ABCG37 transporter of auxinic compounds including the auxin precursor indole-3-butyric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 10749–10753 (2010).
- Saito, H., Oikawa, T., Hamamoto, S., Ishimaru, Y., Utsumi, T., Chen, J., Kanamori-Sato, M., Sasako-Sekimoto, Y., Masuda, S., Kamiya, Y., Seo, M., Uozumi, N., Ueda, M., and Ohta, H. Functional analysis of a jasmonate-responsive NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family-member protein that mediates stamen development. *21th International Symposium on Plant Lipids*, Guelph (2014)
- Sakakibara, H. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 431–

449 (2006).

- Sakamoto, T., Kamiya, N., Ueguchi-Tanaka, M., Iwahori, S. and Matsuoka, M. KNOX homeodomain protein directly suppresses the expression of a gibberellin biosynthetic gene in the tobacco shoot apical meristem. *Genes Dev.* **15**, 581–590 (2001).
- Sakamoto, T., Miura, K., Itoh, H., Tatsumi, T., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Agrawal, G. K., Takeda, S., Abe, K., Miyao, A., Hirochika, H., Kitano, H., Ashikari, M., and Matsuoka, M. An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiology* **134**, 1642–1653 (2004).
- Sambrook, J., Fritschi, E. F. and Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York (1989).
- Santelia, D., Vincenzetti, V., Azzarello, E., Bovet, L., Fukao, Y., Dückig, P., Mancuso, S., Martinoia, E., and Geisler, M. MDR-like ABC transporter AtPGP4 is involved in auxin-mediated lateral root and root hair development. *FEBS Lett.* **579**, 5399–5406 (2005).
- Santiago, J., Dupeux, F., Round, A., Antoni, R., Park, S. Y., Jamin, M., Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., and Marquez, J. A. The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. *Nature* **462**, 665–668 (2009).
- Sasaki, A., Ashikari, M., Ueguchi-Tanaka, M., Itoh, H., Nishimura, A., Swapan, D., Ishiyama, K., Saito, T., Kobayashi, M., Khush, G. S., *et al.* Green revolution: a mutant gibberellin-synthesis gene in rice. *Nature* **416**, 701–702 (2002).
- Sasaki, A., Itoh, H., Gomi, K., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Jeong, D. H., An, G., Kitano, H., Ashikari, M., and Matsuoka, M. Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. *Science* **299**, 1896–1898 (2003).
- Schneider, G. & Schliemann, W. Gibberellin conjugates: an overview. *Plant Growth Regulation* **15**, 247–260 (1994).
- Schomburg, F. M., Bizzell, C. M., Lee, D. J., Zeevaart, J. A. D. and Amasino, R. M. Overexpression of a novel class of gibberellin 2-oxidases decreases gibberellin levels and creates dwarf plants. *Plant Cell* **15**, 151–163 (2003).
- Searle, I., & Coupland, G. Induction of flowering by seasonal changes in photoperiod. *EMBO Journal* **23**, 1217–1222 (2004).
- Seo, M., Hanada, A., Kuwahara, A., Endo, A., Okamoto, M., Yamauchi, Y., North, H., Marion-Poll, A., Sun, T. P., Koshiba, T., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., and Nambara, E. Regulation of hormone metabolism in Arabidopsis seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. *Plant Journal* **48**, 354–366 (2006).
- Shani, E., Weinstain, R., Zhang, Y., Castillejo, C., Kaiserli, E., Chory, J., Tsien, R. Y., and Estelle, M. Gibberellins accumulate in the elongating endodermal cells of Arabidopsis root. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 4834–4839 (2013).
- Shimada, A., Ueguchi-Tanaka, M., Nakatsu, T., Nakajima, M., Naoe, Y., Ohmiya, H., Kato, H., and Matsuoka, M. Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1. *Nature* **456**, 520–523 (2008).
- Shinomura, T., Nagatani, A., Hanzawa, H., Kubota, M., Watanabe, M., and Furuya, M. Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8129–8133 (1996).

- Silverstone, A. L., Jung, H. S., Dill, A., Kawaide, H., Kamiya, Y., Sun, T. P. Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**, 1555–1566 (2001).
- Silverstone, A. L., Ciampaglio, C. N. and Sun, T. The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* **10**, 155–169 (1998).
- Silverstone, A. L., Chang, C., Krol, E. and Sun, T. P. Developmental regulation of the gibberellin biosynthetic gene GA1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **12**, 9–19 (1997).
- Silverstone, A. L., Tseng, T. S., Swain, S. M., Dill, A., Jeong, S. Y., Olszewski, N. E., and Sun, T. P. Functional analysis of SPINDLY in gibberellin signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology* **143**, 987–1000 (2007).
- Spielmeyer, W., Ellis, M. H., and Chandler, P. M. Semidwarf (*sd-1*), “green revolution” rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. *Proc. Nat. Ac. Science* **99**, 9043-9048 (2002).
- Sponsel, V. M., & Hedden, P. Gibberellin biosynthesis and inactivation. In *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action*. ed. *PJ Davies Dordrecht: Kluwer Acad.*, 63–94 (2004).
- Sponsel, V. M. Structures of Some Important Gibberellins and Their Precursors, Derivatives, and Inhibitors of Gibberellin Biosynthesis. *Plant Physiology*, Topic 20.1 Chapter 20 (2010).
- Stavang, J. A., Pettersen, R. I., Wendell, M., Solhaug, K. A., Junttila, O., Moe, R., and Olsen, J. E. Thermoperiodic growth control by gibberellin does not involve changes in photosynthetic or respiratory capacities in pea. *J. Exp. Bot.* **61**, 1015-1029 (2009).
- Stodola, F. H., Raper, K. B., Fennell, D. I., Conway, H. F., Sohns, V. E., Langford, C. T., and Jackson, R. W. The microbial production of gibberellin A and X. *Arch. Biochem. Biophys.* **54**, 240-245 (1955).
- Stodola, F. H. Nelson, G. E., and Spence, D. J. The separation of gibberellin A and gibberellic acid on buffered partition columns. *Arch. Biochem. Biophys.* **66**, 438-443 (1957)
- Strader, L. C., Ritchie, S., Soule, J. D., McGinnis, K. M., and Steber, C. M. Recessive-interfering mutations in the gibberellin signaling gene SLEEPY1 are rescued by overexpression of its homologue, SNEEZY. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **101**, 12771-12776 (2004).
- Sugiura, M., Georgescu, M. N. and Takahashi, M. A Nitrite Transporter Associated with Nitrite Uptake by Higher Plant Chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* **48**, 1022–1035 (2007).
- Sun, T. P. & Kamiya, Y. The Arabidopsis GA1 locus encodes the cyclase ent-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* **6**, 1509–1518 (1994).
- Sun, T. P. The molecular mechanism and evolution of the GA-GID1-DELLA signaling module in plants. *Curr. Biol.* **21**, R338–45 (2011).
- Sun, T. P. Gibberellin-GID1-DELLA: a pivotal regulatory module for plant growth and development. *Plant Physiology* **154**, 567–570 (2010).
- Sun, T.-P. Gibberellin metabolism, perception and signaling pathways in Arabidopsis. *Arabidopsis Book* **6**, e0103 (2008).
- Sun, T., Goodman, H. M. and Ausubel, F. M. Cloning the Arabidopsis GA1 Locus by Genomic

- Subtraction. *Plant Cell* **4**, 119–128 (1992).
- Suzuki, Y., Yamane, H., Spray, C. R., Gaskin, P., Macmillan, J., and Phinney, B. O. Metabolism of *ent*-Kaurene to Gibberellin A(12)-Aldehyde in Young Shoots of Normal Maize. *Plant Physiology* **98**, 602-610 (1992).
- Swain, S.M., Singh, D. P., Helliwell, C. A., and Poole, A.T. Plants with increased expression of *ent*-kaurene oxidase are resistant to chemical inhibitors of this gibberellin biosynthesis enzyme. *Plant Cell Physiol.* **46**, 284-291 (2005).
- Symons, G. M., & Reid, J. B. Brassinosteroids do not undergo long-distance transport in pea. Implications for the regulation of endogenous brassinosteroid levels. *Plant Physiology* **135**, 2196-2206 (2004).
- Talon, M., Koornneef, M., and Zeevaart, J. A. Endogenous gibberellins in *Arabidopsis thaliana* and possible steps blocked in the biosynthetic pathways of the semidwarf *ga4* and *ga5* mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 7983–7987(1990)
- Takahashi, N. H., Kitamura, H., Kawarada, A., Seta, Y., Takai, M., Tamura, S., and Sumiki, Y., Biochemical studies on bakanae fungus : PART XXXIV Isolation of gibberellins and their properties. *Bull. Agric. Chem. Soc.* **19**, 267-277 (1955)
- Takahashi, N. H., Kitamura, H., Seta, Y., and Sumiki, Y., A new gibberellin, gibberellin A₄. *Bull. Agric. Chem. Soc.* **21**, 396-398 (1957)
- Telfer, A., Bolman, K. M., and Poethig, R. S. Phase change and the regulation of trichome distribution in *Arabidopsis*. *Development* **124**, 645–654 (1997).
- Thomas, S. G., Phillips, A. L. and Hedden, P. Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2- oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 4698–4703 (1999).
- Tyler, L., Thomas, S. G., Hu, J., Dill, A., Alonso, J. M., Ecker, J. R., and Sun, T. P., DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **135**, 1008–1019 (2004).
- Ubeda-Tomás, S., Federici, F., Casimiro, I., Beemster, G. T., Bhalerao, R., Swarup, R., Doerner, P., Haseloff, J., and Bennett, M. J. Gibberellin signaling in the endodermis controls *Arabidopsis* root meristem size. *Curr. Biol.* **19**,1194-1199 (2009).
- Úbeda-Tomás, S., Swarup, R., Coates, J., Swarup, K., Laplaze, L., Beemster, G. T., Hedden, P., Bhalerao, R., and Bennett, M. J. Root growth in *Arabidopsis* requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. *Nat. Cell Biol.* **10**, 625–628 (2008).
- Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T. Y., Hsing, Y. I., Kitano, H., Yamaguchi, I., and Matsuoka, M. GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* **437**, 693–698 (2005).
- Ueguchi-Tanaka, M., Nakajima, M., Katoh, E., Ohmiya, H., Asano, K., Saji, S., Hongyu, X., Ashikari, M., Kitano, H., Yamaguchi, I., and Matsuoka, M. Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, *GID1*, with a rice DELLA protein, *SLR1*, and gibberellin. *Plant Cell* **19**, 2140-2155 (2007).
- Vandenbussche, F., & Van Der Straeten, D. Shaping the shoot: a circuitry that integrates multiple signals. *Trends in Plant Science* **9**, 499–506 (2004).

- Vandenbussche, F., & Van Der Straeten, D. One for all and all for one: cross-talk of multiple signals controlling the plant phenotype. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**, 178-187 (2007).
- Van Schie, C. C., Ament, K., Schmidt, A., Lange, T., Haring, M.A., and Schuurink, R.C. Geranyl diphosphate synthase is required for biosynthesis of gibberellins. *Plant Journal* **52**, 752-762 (2007).
- Varbanova, M., Yamaguchi, S., Yang, Y., McKelvey, K., Hanada, A., Borochoy, R., Yu, F., Jikumaru, Y., Ross, J., Cortes, D., Ma, C. J., Noel, J. P., Mander, L., Shulaev, V., Kamiya, Y., Rodermel, S., Weiss, D., and Pichersky, E. Methylation of gibberellins by *Arabidopsis* GAMT1 and GAMT2. *Plant Cell* **19**, 32–45 (2007).
- Wang, H., Caruso, L. V., Downie, A. B. and Perry, S. E. The embryo MADS domain protein AGAMOUS-Like 15 directly regulates expression of a gene encoding an enzyme involved in gibberellin metabolism. *Plant Cell* **16**, 1206–1219 (2004).
- Weaver, R. J. Growth of grapes in relation to gibberellin. In *Gibberellins. Adv. In Chem. Series* **28**, 89-108 (1960).
- Weaver, R. J., & McCune, S. B. Response of certain varieties of *Vitis vinifera* to gibberellin. *Hilgardia* **28**, 297-350 (1959).
- Weiler, E. W. & Ziegler, H. Determination of phytohormones in phloem exudate from tree species by radioimmunoassay. *Planta* **152**, 168–170 (1981).
- Weller, J. L., Hecht, V., Vander Schoor, J. K., Davidson, S. E. and Ross, J. J. Light regulation of gibberellin biosynthesis in pea is mediated through the COP1/HY5 pathway. *Plant Cell* **21**, 800–813 (2009).
- Wen, C.-K. & Chang, C. *Arabidopsis* RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell* **14**, 87–100 (2002).
- Weston, D. E., Elliott, R. C., Lester, D. R., Rameau, C., Reid, J. B., Murfet, I. C., and Ross, J. J. The Pea DELLA proteins LA and CRY are important regulators of gibberellin synthesis and root growth. *Plant Physiology* **147**, 199–205 (2008).
- White, O. E., Studies of inheritance in *Pisum II*. *Proc. Am. Philos. Soc.* **56**, 487-588 (1917)
- Wild, M., Davière, J.M., Cheminant, S., Regnault, T., Baumberger, N., Heintz, D., Baltz, R., Genschik, P., and Achard, P. The *Arabidopsis* DELLA RGA-LIKE3 is a direct target of MYC2 and modulates jasmonate signaling responses. *Plant Cell* **24**, 3307–3319 (2012).
- Willige, B.C., Ghosh, S., Nill, C., Zourelidou, M., Dohmann, E.M.N., Maier, A., and Schwechheimer, C. The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DEARF1A gibberellin receptor of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 1209–1220 (2007).
- Willige, B. C., Isono, E., Richter, R., Zourelidou, M. and Schwechheimer, C. Gibberellin regulates PIN-FORMED abundance and is required for auxin transport-dependent growth and development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **23**, 2184–2195 (2011).
- Wilson, R., Heckman, J., and Somerville, C. Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. *Plant Physiology* **100**, 403-408 (1992).
- Winkler, R. G. & Helentjaris, T. The maize Dwarf3 gene encodes a cytochrome P450-mediated early step in Gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 1307–1317 (1995).

- Wolbang, C. M., Chandler, P. M., Smith, J. J., and Ross, J. J. Auxin from the developing inflorescence is required for the biosynthesis of active gibberellins in barley stems. *Plant Physiology* **134**, 769–776 (2004).
- Wolfram, H., Angela, S. and Eleonore, H. Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? *J. Exp. Bot.* **53**, 27–32 (2002).
- Wollenweber, H. W. Fusarium an Walnuss. *Mitt. Deutsch. Dendr. Gesell* **XLIII**, 447 (1931)
- Wollenweber, H. W., & Reinking, O. A. Reinking Die Fusarien. *ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung* 215 (1935).
- Xu, Z. J., Nakajima, M., Suzuki, and Y., Yamaguchi, I. Cloning and characterization of the abscisic acid-specific glucosyltransferase gene from adzuki bean seedlings. *Plant Physiology* **5**, 1285–1295 (2002).
- Yabuta, T. Biochemistry of the “bakanae” fungus of rice. *Agriculture and Horticulture* **10**, 17–22 (1935).
- Yabuta, T., & Sumiki, Y., Studies on the Chemical Constituents of “Inekoji” Part IV. *Journal of the agricultural chemical society of Japan* **13**, 103-105 (1937).
- Yamaguchi, S., Sun, T., Kawaide, H., and Kamiya, Y. The GA2 locus of *Arabidopsis thaliana* encodes ent-kaurene synthase of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiology* **116**, 1271–78 (1998).
- Yamaguchi, S., Smith, M. W., Brown, R. G., Kamiya, Y., and Sun, T. Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3 β -hydroxylase genes in germinating *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell* **10**, 2115–2126 (1998).
- Yamaguchi, S. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 225–251 (2008).
- Yamaguchi, S., Kamiya, Y. and Sun, T.-P. Distinct cell-specific expression patterns of early and late gibberellin biosynthetic genes during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Journal* **28**, 443–453 (2001).
- Yamauchi, Y. *et al.* Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell* **16**, 367–378 (2004).
- Yamauchi, Y., Takeda-Kamiya, N., Hanada, A., Ogawa, M., Kuwahara, A., *et al.* Contribution of gibberellin deactivation by *AtGA2ox2* to the suppression of germination of dark-imbibed *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell Physiol.* **48**, 555–561 (2007).
- Yang, Y., Hammes, U. Z., Taylor, C. G., Schachtman, D. P., and Nielsen, E. High-affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein. *Curr. Biol.* **16**, 1123-1127 (2006).
- Yang, H. B. and Murphy, A. S. Functional expression and characterisation of *Arabidopsis* ABCB, AUX 1 and PIN auxin transporters in *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Journal* **59**, 179-191 (2009).
- Yang, D.-L., Yao, J., Mei, C. S., Tong, X. H., Zeng, L. J., Li, Q., Xiao, L. T., Sun, T. P., Li, J., Deng, X. W., Lee, C. M., Thomashow, M. F., Yang, Y., He, Z., and He, S. Y. Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, E1192–200 (2012).
- Yaxley, J. R., Ross, J. J., Sherriff, L. J., and Reid, J. B. Gibberellin biosynthesis mutations and root development in pea. *Plant Physiology* **125**, 627-633 (2001).
- Yin, P., Fan, H., Hao, Q., Yuan, X., Wu, D., Pang, Y., Yan, C., Li, W., Wang, J., and Yan, N. Structural

- insights into the mechanism of abscisic acid signaling by PYL proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 1230-1236 (2009).
- Yoshida, H., Hirano, K., Sato, T., Mitsuda, N., Nomoto, M., Maeo, K., Koketsu, E., Mitani, R., Kawamura, M., Ishiguro, S., Tada, Y., Ohme-Takagi, M., Matsuoka, M., and Ueguchi-Tanaka, M. DELLA protein functions as a transcriptional activator through the DNA binding of the INDETERMINATE DOMAIN family proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2014).
- Yu, S., Galvão, V. C., Zhang, Y. C., Horrer, D., Zhang, T. Q., Hao, Y. H., Feng, Y. Q., Wang, S., Schmid, M., and Wang, J. W. Gibberellin regulates the Arabidopsis floral transition through miR156-targeted SQUAMOSA promoter binding-like transcription factors. *Plant Cell* **24**, 3320–3332 (2012).
- Zeevaart, J. A. D. Plant Research '86, Annual Report of the MSUDOE Plant Research Laboratory (East Lansing, MI) 130-131 (1986).
- Zentella, R., Zhang, Z. L., Park, M., Thomas, S. G., Endo, A., Murase, K., Fleet, C. M., Jikumaru, Y., Nambara, E., Kamiya, Y., and Sun, T. P. Global analysis of della direct targets in early gibberellin signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 3037–3057 (2007).
- Zhang, Z. L., Ogawa, M., Fleet, C. M., Zentella, R., Hu, J., Heo, J. O., Lim, J., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., and Sun, T. P. Scarecrow-like 3 promotes gibberellin signaling by antagonizing master growth repressor DELLA in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 2160-2165 (2011).
- Zhang, K., Novak, O., Wei, Z., Gou, M., Zhang, X., Yu, Y., Yang, H., Cai, Y., Strnad, M., and Liu, C. J. Arabidopsis ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins. *Nat. Commun.* **5**, 3274 (2014).
- Zhao, X., Yu, X., Foo, E., Symons, G. M., Lopez, J., Bendehakalu, K. T., Xiang, J., Weller, J. L., Liu, X., Reid, J. B., and Lin, C. A study of gibberellin homeostasis and cryptochrome-mediated blue light inhibition of hypocotyl elongation. *Plant Physiology* **145** 106-118 (2007).
- Zhu, Y., Nomura, T., Xu, Y., Zhang, Y., Peng, Y., Mao, B., Hanada, A., Zhou, H., Wang, R., Li, P., Zhu, X., Mander, L. N., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., and He, Z. ELONGATED UPPERMOST INTERNODE encodes a cytochrome P450 monooxygenase that epoxidizes gibberellins in a novel deactivation reaction in rice. *Plant Cell* **18**, 442–456 (2006).

Annexes

Annexe 1 : Amorces utilisées pour les clonages

Gène cloné	Couple d'amorces 5'-3' (sens = haut, antisens = bas)
<i>KA01</i>	GCAAGTTTAACTAAGTGAAAAGTCT
	CTGATAACTAATTCTTGCCAAGCAA
<i>pKA01</i>	AAGATCAGAGGAAGGTCGTCCAG
	AGACTTTTCACTTAGTTAACTTGC
<i>KA02</i>	AGGAGAGTGTTTACGACTGAAGCT
	TGGCATCGTTCTGGTGATTCTTGCT
<i>pKA02</i>	GACTGGACGTGTAGCGGTATCTG
	AGCTTCAGTCGTAAACACTCTCC
<i>pKA01::KA01</i>	AAGATCAGAGGAAGGTCGTCCAG
	CTGATAACTAATTCTTGCCAAGCAA
<i>pKA02::KA02</i>	GACTGGACGTGTAGCGGTATCTG
	TGGCATCGTTCTGGTGATTCTTGCT
<i>GA20ox1</i>	CACTTTACTATAATCTCTCAA
	GATGGGTTTGGTGAGCCAATC
<i>pARSK1</i>	CATTATTGGAAGAGAATTAATAAG
	TTTCAACTTCTTCTTTTGTGTTAT
<i>NPF3.1</i>	ATGGAGGAGCAAAGCAAGAAC
	TTCATCAACTAACTCCTATTTG
<i>NPF2.13</i>	ATGGTTTTGGAGGATAGAAAGGA
	TTTCATCGATTTCTTCTGAAGTC

<i>NPF4.1</i>	ATGCAGATTGAGATGGAAGAGAAG
	ATATCTTTTCGCCCAGAAAATAT
<i>NPF6.1</i>	ATGGTTGCTTCTGAGATTAATC
	AAGAACAGCACTACTCTTGTC
<i>NPF5.7</i>	ATGGAGCACAACAAGGTTGAT
	CGTAACTTGGACGTGTTATTC
<i>NPF6.3</i>	ATGTCTCTTCCTGAACTAAAT
	ATGACCCATTGGAATACTCGGC

Annexe 2 : Amorces utilisées pour les RT-qPCR

Gène	Couple d'amorces 5'-3' (sens = haut, antisens = bas)
<i>KA01</i>	CTTATCGCAGGTTGTCGATG
	TTCCAACCTTTTGGGATCAA
<i>KA02</i>	CTAGAGGATACAAGAGGTGGTC
	CCGTCATAGCTTCAGTCG
<i>GA20ox1</i>	GAGACTGAATTACTACCCTC
	TGGGTTTGGTGAGCCAATC
<i>GA20ox2</i>	CGATCTCTCAAGCCAAGACTCG
	TCGCTGACGCCATGATTG
<i>GA20ox3</i>	CAACCTCTCCAAGTCCCCTCA
	AGTAGCCTCCGATGCCAAGC
	CCTCTCCAACGACCCATTATT

<i>GA20x4</i>	TTTGCTGCTTCAGAGACGAG
<i>GA20x5</i>	TTGCTTCAAGACGATGTTGTG
	GAACGGTCTGCCAACTACCT
<i>GA30x1</i>	GTCTAGCAGCTCATACCGAC
	CTTCTCTGTGATTTCTAATC
<i>GA30x2</i>	GCCACCACCTCAAATACTGTG
	GGCCATTGTATGTCCTTTTC
<i>GA30x3</i>	TCTGCAGTTGAACTCCTACCC
	TGTGAGGGGCTAAACCCATA
<i>GA30x4</i>	AAGAGTCCGGTTGGGTCAC
	TCACCAATGTTGACCACGAG
<i>GA20x1</i>	CCAAAATCCGGGTTCTCTCT
	TTTCACGAGGGCATGTTTG
<i>GA20x2</i>	AGGTCGTAAACCACGGAGTC
	CAAGCCGAAGAAGCCAATAG
<i>GA20x3</i>	CCAAAAGAGTAGACCATGGTAATTG
	CATTTTGGATTAACATAGAGGTTGC
<i>GA20x4</i>	AAGCAGTTGGCTCGTGAGAT
	TGAAACTGTGAGGTGGGACA
<i>GA20x6</i>	TCATGATGATCCTTTCAAGTTCAG
	CCAAATCTCTAACCGTGCGTA
<i>GA20x7</i>	ATAGTTACCGTTGGGGAAACC
	ACGCTTCCGAAACGGAGT

<i>GA2ox8</i>	TCGGAATCAGAGGCATTAGC
	TTTGTCCAGATTTTTCTGCAAG
<i>Tip41-Like</i>	GTGAAACTGTTGGAGAGAAGCAA
	TCAACTGGATACCCTTTCGCA
<i>EXP</i> <i>AT4G26410</i>	GAGCTGAAGTGGCTTCAATGAC
	GGTCCGACATACCCATGATCC
<i>NPF1.1</i>	TTGCTTCTCTCTCCAGTCTCCT
	GGTTTTACTTGCGGCAACAT
<i>NPF2.13</i>	CATCGCTTTCGCCTCATT
	AGGAAACGATGCTGTGAGTGT
<i>NPF3.1</i>	CTCACCCACACCAAACACAT
	CAATGGTTTTGGGATTTGACC
<i>NPF4.1</i>	TTGAGATGGAAGAGAAGTTTGAAG
	CATATTCTCCATCGTCTCTACAACA
<i>NPF4.6</i>	GGCACAGCTTTTCTCCTAGC
	CCGAGCTTGAATTGTGAGTATG
<i>NPF5.16</i>	GACTTCTGCCGAAAATCT
	GCAAATCTTTCTCCAATTCCA
<i>NPF5.7</i>	TTCTCGATTCTTCGACCGAT
	TCTCGCTGAATTCGATACCA
<i>NPF6.1</i>	GTTGGATCGCAGCTTTCTTC
	CACCGAGAGTCCGAAATACG
	CCTTCTTGATGCTTGGGACT

<i>NPF6.3</i>	CTCCACGGCCTCAATACAA
<i>NPF8.3</i>	CGAGCATACCGATGATTGC
	AGTTGGAATAATCTCCGGATTC
<i>ABCG11</i>	AGGTTGAGGAGATATCCCAATTTA
	AGGTCTGCAGAAGGAACTAGC
<i>ABCG25</i>	TCAAATGAACGGTCCAGATTC
	TCGGTAACACACATCAACGAA
<i>ABCG37</i>	AGAATGATAATCTCAAGTTGCTCAAG
	CGGTAACTCCATCCCGACT
<i>GUS</i>	GAAACTCAGCAAGCGCACTTA
	TATCCGGTTCGTTGGCAAT

Annexe 3 : Amorces utilisées pour les RT-PCR

Gène	Couple d'amorces 5'-3' (sens = haut, antisens = bas)
<i>KA01</i>	CTTATCGCAGGTTGTCGATG
	ATCAGTTGGTCTGGTATG
<i>KA02</i>	TCTTCCTGGGTTTGCTTATCAT
	TGGACTGAAAGGCAGCTACA
<i>EF1</i>	TTGCTCCCACAGGATTGACCACTG
	TCACTTCGCACCCTTCTTGACG
<i>NPF2.13</i>	CGTCGGAGCGTATATCTCAGA
	CAACTGAGTGGGTCTGGCTG

<i>NPF4.6</i>	ATCGTGCGATAGTCCCACATG
	ACCAGTTGATCTATACTTGTA
<i>NPF5.7</i>	CTAGCATCATACTCACAATAG
	CTGTAAGATGTATTACATACG
<i>NPF6.1</i>	GATGTTCGTACCAGACCAGAG
	CTGTGCATAGCTTCCATGGAG
<i>NPF6.3</i>	ATCCGTCTATCTCTACGATGT
	GTAGAAGACTGCCATCGATGC

Annexe 4 : Amorces utilisées pour les génotypages

Gène	Couple d'amorces 5'-3' (sens = haut, antisens = bas)
insertion SALK LBB1.3	ATTTGCCGATTTTCGGAAC
insertion SAIL LB3	TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATACAC
<i>KA01</i>	GGTTGTTCGATGAGACACTTCGAG
	TATCAGTTGGTCTGGTATGAGGC
<i>KA02</i>	CGGGTTTGATTCTCATGTGGTTC
	CAACCTATGTGGAAGGCATCATC
<i>NPF2.13</i>	ACGCTGGAGAGACTGGGATCG
	CGTAGACATAACGCTTCATTC
<i>NPF4.6</i>	ACCAGTTGATCTATACTTGTA
	CTAGCATCATACTCACAATAG
	CTGTAAGATGTATTACATACG

NPF5.7	GATGTTTCGTACCAGACCAGAG
NPF6.1	CTGTGCATAGCTTCCATGGAG
	ATCCGTCCTATCTCTACGATGT
NPF6.3	GTAGAAGACTGCCATCGATGC
	CTTCTCTGTGATTTCTAATC

Annexe 5 : Manuscrit d'article publié dans la revue *Plant Cell*

Cet article révèle que la protéine DELLA RGL3 (RGA-LIKE3) participe à la réponse de défense des plantes médiée par le jasmonate (JA). A l'opposé des quatre autres protéines DELLA d'*Arabidopsis*, l'expression de RGL3 est induite par le JA ou l'inoculation de pathogènes. En retour, cette induction permet d'augmenter l'expression de gènes de réponse au JA, impliqués dans la défense de la plante. Par conséquent, RGL3 régule positivement la résistance des plantes, contrôlée par le JA, à des pathogènes de type nécrotrophes comme *Botrytis cinerea*. Ainsi, l'induction de RGL3 médiée par le JA représente une nouvelle et récente diversification fonctionnelle des DELLA.

Dans ces travaux, j'ai participé à la confirmation de l'interaction entre RGL3 et JAZ1 / JAZ8 en levure (double hybride, Supplemental Figure 6).

Annexe 6 : Manuscrit d'article publié dans la revue *Current Biology*

Les résultats présentés dans cet article montrent que les protéines DELLA sont capables d'interagir avec des facteurs de transcription de la famille TCP (TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA, et PROLIFERATING CELL FACTOR), spécifiques des plantes, sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Ces facteurs stimulent la croissance en activant la transcription de gènes cibles impliqués dans la prolifération cellulaire dans des régions particulières nommées méristèmes. Au niveau de ces méristèmes caulinaires, l'interaction DELLA-TCP, bloque la capacité d'interaction des facteurs TCPs aux promoteurs de gènes cibles impliqués dans la progression du cycle cellulaire, modulant en conséquence l'élongation de la tige des plantes. Ainsi, des mutants "perte de fonction" *tcp*, présentent un phénotype de nanisme

sévère, et une réponse altérée à l'action des GA. Dans leur ensemble, ces travaux fournissent un nouveau modèle sur les mécanismes de contrôle de la stature des plantes par l'interaction DELLA-TCP au niveau des inflorescences. Les plantes de taille réduite, issues de la révolution verte, portent des gènes DELLA variants, qui codent pour des protéines répressives plus stables. Ces gènes ont été transmis à la plupart des variétés modernes de céréales comme le riz, le blé et l'orge. La découverte de leur mode d'action ouvre de nouveaux champs d'investigation pour les sélectionneurs, afin d'adapter au mieux la croissance des plantes d'intérêts agronomiques aux contraintes environnementales.

Dans ces travaux, j'ai contribué à l'analyse phylogénétique (Supplemental S1A).

The *Arabidopsis* DELLA RGA-LIKE3 Is a Direct Target of MYC2 and Modulates Jasmonate Signaling Responses[□]

Michael Wild,^a Jean-Michel Davière,^a Soizic Cheminant,^a Thomas Regnault,^a Nicolas Baumberger,^a Dimitri Heintz,^a Rachel Baltz,^b Pascal Genschik,^{a,1} and Patrick Achard^{a,1}

^aInstitut de Biologie Moléculaire des Plantes, Unité Propre de Recherche 2357, Conventionné avec l'Université de Strasbourg, 67084 Strasbourg, France

^bBayer CropScience, 69263 Lyon, France

Gibberellins (GAs) are plant hormones involved in the regulation of plant growth in response to endogenous and environmental signals. GA promotes growth by stimulating the degradation of nuclear growth-repressing DELLA proteins. In *Arabidopsis thaliana*, DELLAs consist of a small family of five proteins that display distinct but also overlapping functions in repressing GA responses. This study reveals that DELLA RGA-LIKE3 (RGL3) protein is essential to fully enhance the jasmonate (JA)-mediated responses. We show that JA rapidly induces RGL3 expression in a CORONATINE INSENSITIVE1 (COI1)- and JASMONATE INSENSITIVE1 (JIN1/MYC2)-dependent manner. In addition, we demonstrate that MYC2 binds directly to RGL3 promoter. Furthermore, we show that RGL3 (like the other DELLAs) interacts with JA ZIM-domain (JAZ) proteins, key repressors of JA signaling. These findings suggest that JA/MYC2-dependent accumulation of RGL3 represses JAZ activity, which in turn enhances the expression of JA-responsive genes. Accordingly, we show that induction of primary JA-responsive genes is reduced in the *rgl3-5* mutant and enhanced in transgenic lines overexpressing RGL3. Hence, RGL3 positively regulates JA-mediated resistance to the necrotroph *Botrytis cinerea* and susceptibility to the hemibiotroph *Pseudomonas syringae*. We propose that JA-mediated induction of RGL3 expression is of adaptive significance and might represent a recent functional diversification of the DELLAs.

INTRODUCTION

Bioactive gibberellins (GAs) are a class of tetracyclic diterpenoid plant hormones that modulate diverse developmental processes throughout the plant life cycle, such as seed germination, growth through cell elongation and division, and floral transition (Achard and Genschik, 2009). Typically, mutants deficient in GA synthesis or responses are dwarf or semidwarf in stature, whereas elevated GA concentrations or increased signaling result in taller plants. GA regulates growth by suppressing a group of nuclear growth-repressing DELLA proteins, a subset of the GRAS family of transcriptional regulators (Peng et al., 1997; Silverstone et al., 1998; Bolle, 2004; Cheng et al., 2004; Zentella et al., 2007; de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008; Cheminant et al., 2011). Binding of GA to its receptor GA INSENSITIVE DWARF1 (GID1) promotes the GID1–DELLA interaction, which in turn stimulates the interaction between DELLAs and the specific E3 ubiquitin ligase SCF^{SLY1/GID2} complex, leading to subsequent degradation of DELLAs by the 26S proteasome (Silverstone et al., 2001; McGinnis et al., 2003; Sasaki et al., 2003; Dill et al., 2004; Fu et al., 2004; Ueguchi-Tanaka et al.,

2005; Griffiths et al., 2006; Nakajima et al., 2006; Willige et al., 2007). The *Arabidopsis thaliana* genome encodes five DELLAs, GA INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR OF GA1-3 (RGA), RGA-LIKE1 (RGL1), RGL2, and RGL3. Genetic analyses have shown that RGA and GAI are major repressors of vegetative growth (Dill and Sun, 2001; King et al., 2001). RGL2 mainly represses seed germination (Lee et al., 2002), whereas RGA, RGL1, and RGL2 are regulators of floral development (Cheng et al., 2004; Tyler et al., 2004). The biological function of the remaining *Arabidopsis* DELLA protein, RGL3, is less understood. RGL3 was recently proposed (with RGL2) to repress testa rupture during seed germination (Piskurewicz and Lopez-Molina, 2009). The functional diversification of DELLAs relies largely on their gene expression pattern (spatially and in term of regulatory responses) rather than on their molecular activity. Promoter swap experiments revealed that DELLAs could perform equivalent functions (Gallego-Bartolomé et al., 2010).

Recent advances revealed the role of DELLAs in many aspects of plant growth that are influenced by environmental cues, such as excess salt, light, or cold (Achard et al., 2006; Achard et al., 2008a; de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008; Cheminant et al., 2011). Moreover, DELLAs promote survival in an adverse environment (Achard et al., 2006; Achard et al., 2008a). Thus, it was proposed that DELLAs integrate environmental signals that enable plants to adapt their growth and development according to their surrounding environment. Furthermore, DELLAs are involved in response to biotic stress (Achard et al., 2008b; Navarro et al., 2008). DELLA activity promotes plant resistance to necrotrophs by potentiating jasmonate (JA) signaling and, reciprocally, increases plant susceptibility to virulent biotrophs by attenuating the salicylic acid (SA)

¹ Address correspondence to patrick.achard@ibmp-cnrs.unistra.fr.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantcell.org) is: Patrick Achard (patrick.achard@ibmp-cnrs.unistra.fr).

□ Some figures in this article are displayed in color online but in black and white in the print edition.

□ Online version contains Web-only data.

www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.112.101428

pathway (Navarro et al., 2008). Thus, DELLAs modulate plant immune response by modulating the balance of JA/SA. Recently, the DELLA proteins have been demonstrated to interact with the JA ZIM-domain (JAZ) proteins, repressors of JA signaling (Hou et al., 2010; Yang et al., 2012). JAZ proteins bind and inhibit activity of a wide array of transcription factors, including the basic helix-loop-helix (bHLH) JASMONATE INSENSITIVE1 (JIN1/MYC2), MYC3, and MYC4 transcription factors, which regulate major aspects of JA-mediated gene expression (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007; Gfeller et al., 2010; Fernández-Calvo et al., 2011). Besides the MYC proteins, JAZs interact with other members of the bHLHs, MYBs, and the ETHYLENE INSENSITIVE3 (EIN3)/EIN3-Like (EIL) family of transcription factors to repress a subset of JA-regulated responses, such as stamen and trichome development, anthocyanin synthesis, or defense against necrotrophic pathogens (Pauwels and Goossens, 2011; Qi et al., 2011; Song et al., 2011; Zhu et al., 2011). In the presence of jasmonyl-Ile (the active form of JA) bound to the E3 ubiquitin ligase SCF^{COI1} complex (through the JA receptor/F-box protein COI1), JAZs interact with COI1, leading to their ubiquitylation and subsequent degradation by the 26S proteasome (Xie et al., 1998; Devoto et al., 2002; Xu et al., 2002; Yan et al., 2009). Upon degradation of JAZs, MYC2 and related transcription factors are released to promote JA-induced gene expression. The fact that DELLAs and MYC2 compete for binding to JAZ repressors provides a mechanism by which DELLAs could potentiate JA signaling. Consistent with this model, MYC2-dependent JA-responsive genes are upregulated in response to JA treatment in mutant backgrounds accumulating DELLAs (e.g., in the GA biosynthetic mutant *ga1-3*; Sun and Kamiya, 1994), whereas this upregulated expression is impaired under combined GA and JA treatment (Hou et al., 2010). However, although these observations suggest that DELLA activity modulates JA signaling via competitive binding to JAZs, the biological significance of this mechanism in a natural context remained unclear.

In this study, we present genetic and molecular data showing that the DELLA protein RGL3 is critical for the expression of JA-responsive genes in a biological context. In contrast with the other DELLA genes, we show that *RGL3* is induced by JA in a MYC2-dependent fashion. Moreover, we show that RGL3 interacts with JAZs, thus suggesting that JA-induced RGL3 accumulation sequesters JAZ repressors, thereby releasing MYC2 transcriptional activity. Accordingly, overexpression of *RGL3* activates MYC2-dependent JA-induced gene expression, whereas *rgl3* mutation reduces it. In addition, phenotypic analyses show that the *rgl3-5* mutant exhibits enhanced susceptibility to the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* and resistance to the hemibiotroph *Pseudomonas syringae*. Taken together, our findings show that RGL3 is a distinct negative regulator of GA responses that acts as an integrating factor that links GA and JA signaling to enable adaptive regulation of plant resistance to pathogens.

RESULTS

RGL3 and JA-Related Genes Are Coregulated and Induced by JA

To address the biological function of *RGL3*, we first surveyed its expression pattern using the ATTED-II Network Drawer, which

predicts regulatory networks based on coexpressed genes determined from public microarray analyses (Obayashi et al., 2007). Bioinformatics study revealed that *RGL3* is tightly coregulated with JA-related genes, including JAZs (*JAZ2*, *JAZ3*, *JAZ6*, *JAZ9*, and *JAZ10*), thus suggesting that JA regulates *RGL3* expression (see Supplemental Figure 1 online). To confirm these data, we analyzed by quantitative RT-PCR (qRT-PCR) the induction kinetics of the five *Arabidopsis* DELLA genes (*GAI*, *RGA*, *RGL1*, *RGL2*, and *RGL3*) in 7-d-old seedlings treated with 50 μ M of methyl jasmonate (MeJA). We found that JA transiently induced *RGL3* (and to a lesser extent *RGL1*), with *RGL3* reaching its maximum induction after 1 h of JA treatment (Figure 1A; see Supplemental Figure 2 online). DELLA proteins are subject to destabilization in the presence of GA (Achard and Genschik, 2009). Thus, we assessed whether JA-mediated transient induction of *RGL3* was accompanied by an increase in RGL3 protein accumulation. To this end, we generated a translational fusion with the full-length *RGL3* cDNA fused to the *Green Fluorescent Protein* (GFP) open reading frame downstream of the *RGL3* promoter (*pRGL3:RGL3-GFP*). By protein gel blotting using an anti-GFP antibody, we found that JA rapidly enhanced the accumulation of RGL3-GFP protein in 7-d-old *pRGL3:RGL3-GFP* transgenic seedlings (Figure 1B). Furthermore, the level of RGL3-GFP accumulation was maintained over 24 h of JA treatment (Figure 1B). To visualize in planta the accumulation of RGL3 proteins, we next generated a line expressing a RGL3- β -glucuronidase (GUS) translational fusion driven by the *RGL3* promoter (*pRGL3:RGL3-GUS*). In 3-week-old plants, trace levels of RGL3-GUS were visible only in the shoot apices (Figure 1C). In the presence of JA, RGL3-GUS expression was elevated throughout the plant, mainly in the petiole and the vasculature of the leaves. Thus, JA induces *RGL3* expression rapidly and broadly within the plant.

Next, to investigate whether JA modulated the GA-mediated degradation of RGL3 proteins, we examined the half-life of RGL3-GFP (in 7-d-old *p35S:RGL3-GFP* seedlings) in the presence of cycloheximide (CHX), a chemical blocking protein synthesis. As previously reported, the level of RGL3-GFP proteins was significantly reduced 2 h after CHX treatment, and the kinetic of RGL3-GFP degradation was accelerated in the presence of 50 μ M of gibberellic acid (GA₃) (see Supplemental Figure 3 online) (Feng et al., 2008). JA alone or combined with GA₃ did slightly delay the kinetics of RGL3-GFP degradation in comparison with the controls, in the absence and presence of GA₃, respectively (see Supplemental Figure 3 online) (Yang et al., 2012). However, we showed that JA did not statistically alter the content of the biologically active GA, GA₄ (see Supplemental Figure 4 online). Thus, overall, these results indicate that JA rapidly enhances RGL3 protein accumulation essentially via induction of the gene transcripts.

RGL3 Is a Direct Target of MYC2

JA activates JA responses by stimulating the SCF^{COI1}-dependent degradation of the JAZ proteins, thereby releasing MYC2 to promote JA-induced gene expression (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007). Here, we demonstrated that JA-induced *RGL3* expression works via the COI1/MYC2-dependent

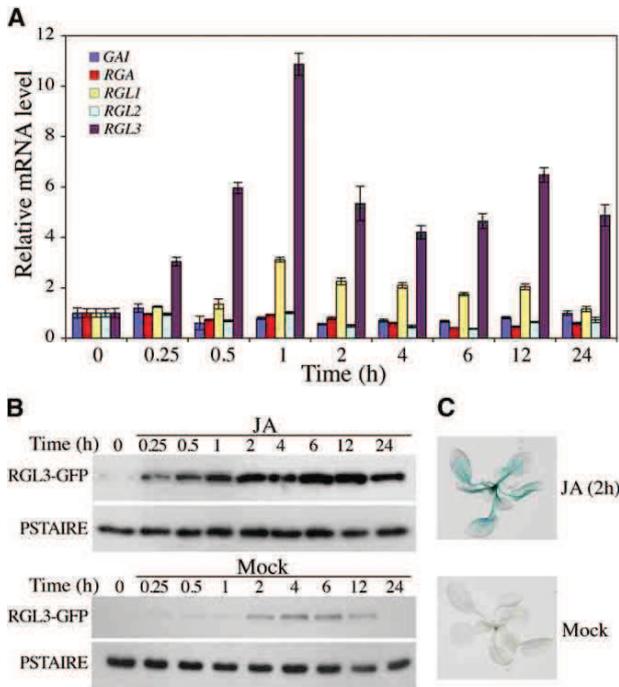


Figure 1. JA Enhances *RGL3* Transcript and Protein Levels.

(A) Relative levels (mean \pm sd) of *GAI*, *RGA*, *RGL1*, *RGL2*, and *RGL3* gene transcripts (determined by qRT-PCR) in 7-d-old seedlings treated with 50 μ M of MeJA for the time (15 min to 24 h) indicated. Similar results were obtained in three independent experiments.

(B) Immunodetection of RGL3-GFP in 7-d-old *pRGL3:RGL3-GFP* seedlings treated with 50 μ M of MeJA for the time (15 min to 24 h) indicated (and mock treatment for controls). PSTAIRE serves as sample loading control. Similar results were obtained in three independent experiments.

(C) RGL3-GUS induction in 3-week-old *pRGL3:RGL3-GUS* plantlets after 2 h of JA-treatment (50 μ M of MeJA) and control (mock treatment). Similar results were obtained in three independent experiments.

signaling pathway (Figure 2). Loss-of-function *coi1-1* confers stabilization of JAZs and impairs responsiveness to JA (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007). We found that JA-mediated induction of *RGL3* was abolished in the *coi1-1* mutant, indicating that *RGL3* is downstream of *COI1* (Figure 2A). We next investigated the responsiveness of *RGL3* to JA in the *myc2/jin1-8* mutant. We found that *RGL3* expression was partially insensitive to JA (Figure 2B). The *Arabidopsis* genome encodes two close MYC2 homologs, MYC3 and MYC4, which have an additive effect on the activation of the JA responses (Fernández-Calvo et al., 2011). As in the *myc2* mutant, JA-mediated induction of *RGL3* was significantly impaired in the *myc3* mutant and to a lesser extent in the *myc4* mutant. In addition, the responsiveness of *RGL3* to JA was completely impaired in the triple *myc2 myc3 myc4* mutant (Figure 2B). Altogether, these results indicate that MYC2/MYC3/MYC4 proteins act redundantly in the activation of *RGL3* in response to JA.

MYC2/MYC3/MYC4 proteins are bHLH transcriptional factors that specifically bind to G-box (CACGTG) or G-box-like motifs (Lorenzo et al., 2004; Dombrecht et al., 2007; Fernández-Calvo

et al., 2011). We found five G-box-related motifs (two CACATG and three CACGTT boxes) within the 1.5-kb promoter of *RGL3* (Figure 3A). To investigate whether MYC2 binds directly to the *RGL3* promoter, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) with the *jin1-8 pMYC2:MYC2-FLAG* transgenic line described previously (Hou et al., 2010). After immunoprecipitation of protein-DNA complexes using an antibody against the FLAG epitope, enriched DNA sequences were amplified by quantitative PCR (qPCR) using primers that annealed near the G-box-like motifs present in the *RGL3* promoter. A genomic fragment of *ACTIN2* was also amplified as a negative control, and the promoter of *JAZ1* was amplified as a positive control (Hou et al., 2010). We performed ChIP assays on plants that had been treated for 4 h with 50 μ M of MeJA to induce *MYC2-FLAG* expression (and on controls without JA treatment). As shown in Figure 3A, we found an enrichment of the F3 region of the *RGL3* promoter, indicating that *RGL3* is a direct target of MYC2. To confirm the specificity of the FLAG antibody, we also performed ChIP assays on nontransgenic *jin1-8* mutant, and we did not find an enrichment of the same promoter region by qPCR (see Supplemental Figure 5 online).

To validate further the interaction of MYC2 with the *RGL3* promoter, we next conducted a DNA electrophoretic mobility shift assay (EMSA) with a recombinant maltose binding protein (MBP)-MYC2 protein produced in *Escherichia coli* and affinity-purified. We found that MBP-MYC2 fusion proteins (but not MBP alone) were able to bind a DNA probe containing the CACATG G-box-like motif located near the F3 region of the *RGL3* promoter (Figure 3B). Furthermore, unlabeled DNA probes competed for binding in a dose-dependent manner, but the DNA probes containing the mutant form of the CACATG motif did not (Figure 3B). Together, these results reveal that MYC2 regulates *RGL3* expression through a direct association with its promoter.

RGL3 Interacts with JAZ1 and JAZ8 and Modulates MYC2-Dependent Gene Expression

Recent studies reported the interaction of the DELLA proteins with JAZ proteins, providing a mechanism by which DELLAs contribute to JA signaling (Hou et al., 2010; Yang et al., 2012). By fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) analysis of nuclei in transiently transformed *Nicotiana benthamiana* cells, we showed the direct interaction of RGL3 with two phylogenetically distant JAZ isoforms, JAZ1 and JAZ8 (a JAZ resistant to JA-mediated degradation; Shyu et al., 2012) with a fluorescence resonance energy transfer of 10.9 and 9.4%, respectively (Figures 4A and 4C). We also showed the direct interaction of RGL3 with JAZ1 and JAZ8 by yeast two-hybrid assays (see Supplemental Figure 6 online). This latest result contrasts with those from Yang et al. (2012), who did not observe an interaction between RGL3 and JAZ8 in yeast. Moreover, coimmunoprecipitation studies further confirmed an in vivo interaction of RGL3 with JAZ1 and with JAZ8 (Figures 4B and 4D). Taken together, our results demonstrate that RGL3 interacts in planta with various JAZ proteins and therefore suggest that JA-mediated induction of *RGL3* transcripts is critical to enhance the JA responses.

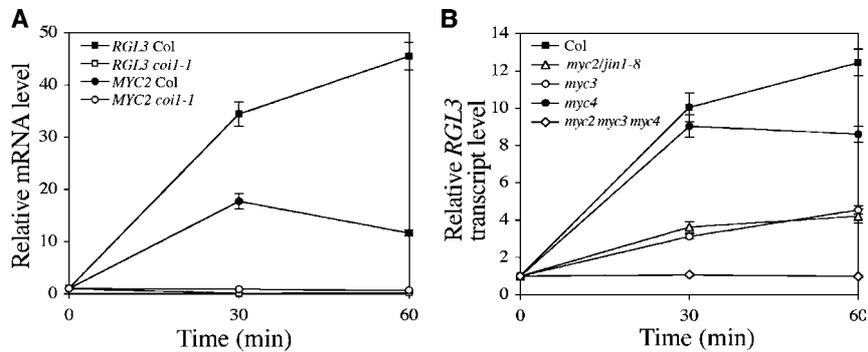


Figure 2. JA Induces the Expression of *RGL3* in a COI1/MYC2-Dependent Manner.

(A) Time-course induction (mean \pm sd) of *RGL3* and *MYC2* transcripts in 14-d-old wild-type (Col) and *coi1-1* mutant seedlings treated with 50 μ M of MeJA for the time indicated. Similar results were obtained in two independent experiments. Col, Col-0.

(B) Time-course induction (mean \pm sd) of *RGL3* transcripts in 7-d-old wild-type (Col), *myc2/jin1-8*, *myc3*, *myc4*, and triple *myc2 myc3 myc4* mutant seedlings treated with 50 μ M of MeJA for the time indicated. Similar results were obtained in two independent experiments.

To investigate further the biological function of *RGL3*, we identified a new *rgl3* mutant allele (SALK_082546), hereafter called *rgl3-5* (see Supplemental Figure 7 online). We speculated that lack of *RGL3* activity would reduce or delay the induction of *MYC2*-dependent gene expression. To test this hypothesis, we compared the kinetics of induction of typical *MYC2*-regulated genes (including two *MYC2* direct targets, *LOX2* and *TAT1*; Hou et al., 2010) in 3-week-old wild-type and *rgl3-5* plants treated with JA. We found that the *rgl3-5* mutant exhibited reduced induction levels of *VSP2*, *TAT1*, and *LOX2* transcripts in comparison with the wild type (Figure 5A). Thus, *RGL3* is essential to fully

enhance JA-induced *MYC2*-dependent gene expression. Consistent with this result, overexpression of *RGL3* (in *p35S:RGL3-GFP* transgenic line) constitutively enhanced the expression of *VSP2*, *TAT1*, and *LOX2* in comparison with the wild type (Figure 5B). Thus, JA enhances *MYC2* transcriptional activity by a dual mechanism. First, JA stimulates the SCF^{COI1}-dependent degradation of the JAZs, thus releasing *MYC2* transcriptional activity. Second, JA (in a *MYC2*-dependent fashion) enhances the accumulation of *RGL3*, which in turn sequesters JAZs into inactive complexes unable to restrain *MYC2* transcriptional activity (Hou et al., 2010). This second regulatory mechanism is likely to

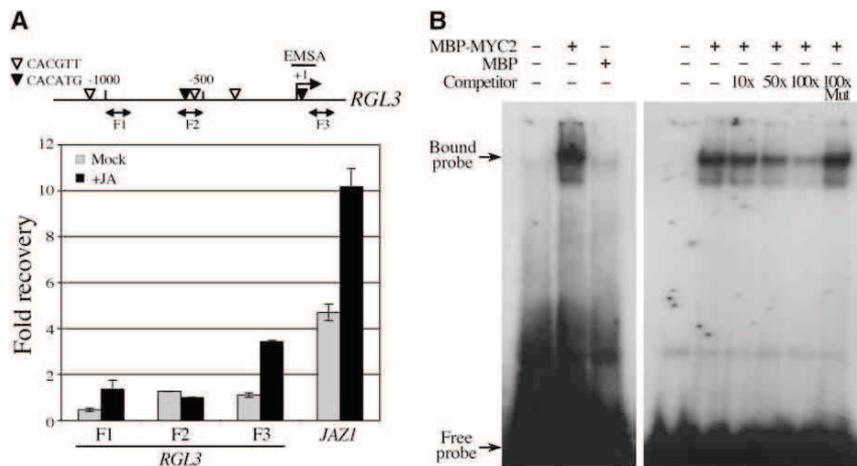


Figure 3. *MYC2* Regulates *RGL3* Expression through a Direct Association with Its Promoter.

(A) *MYC2* interacts with the *RGL3* promoter according to ChIP analysis. (Top) Schematic representation of the *RGL3* promoter, including potential *MYC2* binding sites (white and black triangles) and DNA fragments used for ChIP (F1, F2, and F3) and for EMSA. (Bottom) Fold enrichment of indicated *RGL3* promoter fragments and of *JAZ1*. Chromatin of transgenic plants expressing *MYC2-FLAG* (*jin1-8 pMYC2:MYC2-FLAG*) treated with 50 μ M of MeJA for 4 h and untreated controls (Mock) were subjected to ChIP with anti-FLAG antibodies followed by qPCR. Data represent means \pm sd of triplicate determinations. The experiment was repeated twice with several technical replicates.

(B) EMSA showing that MBP-MYC2 fusion protein binds to the DNA probe of *RGL3* in vitro. ³²P-radiolabeled probes were incubated with MBP-MYC2 or MBP purified proteins, and the free and bound probes were separated in an acrylamide gel. As indicated, unlabeled probes were used as competitors. Similar results were obtained in two independent experiments. Mut, mutated unlabeled probe in which the CACATG motif was deleted.

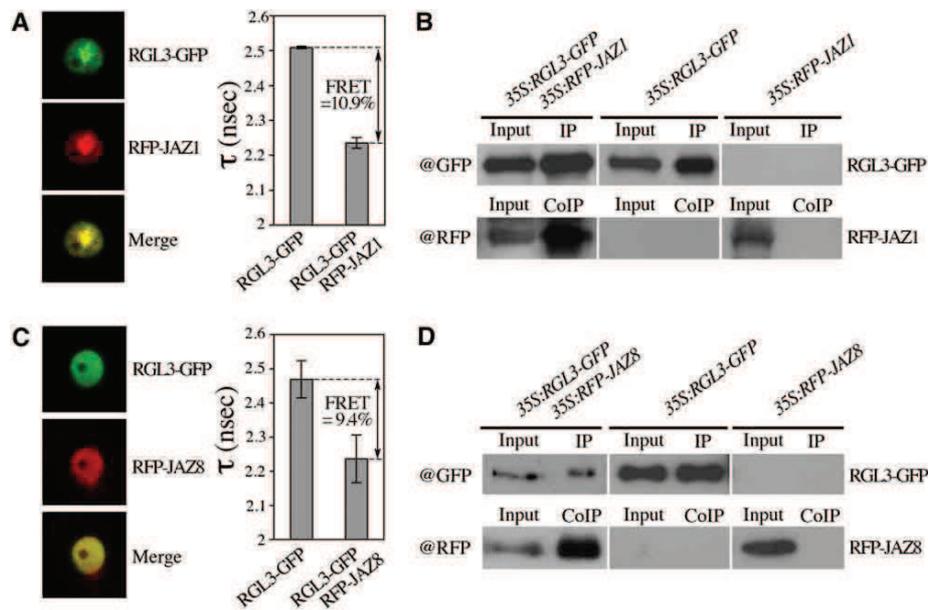


Figure 4. RGL3 Interacts with JAZ1 and JAZ8.

(A) and (C) Fluorescence lifetime analyses (in nanoseconds [nsec]) of RGL3-GFP alone or together with RFP-JAZ1 or RFP-JAZ8, and mean (\pm se) fluorescence resonance energy transfer (FRET) value (%) in *N. benthamiana* agroinfiltrated leaves.

(B) and (D) Coimmunoprecipitation studies. Total protein extract from *N. benthamiana* agroinfiltrated leaves with *p35S::RGL3-GFP* and *p35S::RFP-JAZ1* or *p35S::RFP-JAZ8* were immunoprecipitated with anti-GFP antibody. The coimmunoprecipitated proteins were detected by anti-RFP antibody. The experiment was repeated twice with several technical replicates. CoIP, coimmunoprecipitated proteins; IP, immunoprecipitated proteins.

play a prominent role in modulating the activity of the JAZs that are relatively resistant to JA-mediated degradation, such as JAZ8 (Shyu et al., 2012).

RGL3 Modulates JA-Dependent Plant Defense Responses

The JA signaling pathway performs a critical role in plant defense. JA is the major signaling molecule implicated in plant

resistance to necrotrophic pathogens (Lorenzo and Solano, 2005). For example, mutants impaired in JA production exhibit enhanced susceptibility to the necrotrophic fungus *B. cinerea* (Stintzi et al., 2001; Kunkel and Brooks, 2002). To address the biological role of RGL3 in JA-mediated plant defense responses, we first examined the expression pattern of *RGL3* in rosette leaves of 6-week-old plants inoculated with *B. cinerea* spores over a time-course experiment. We found that *RGL3* was

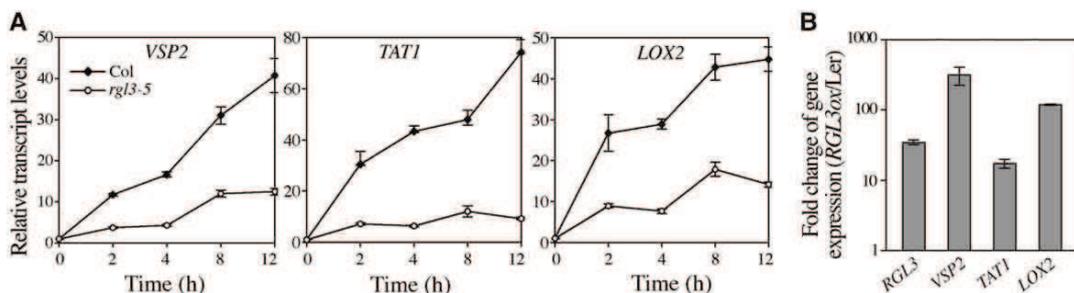


Figure 5. RGL3 Enhances JA-Responsive Gene Expression.

(A) Time-course induction (mean \pm se) of *VSP2*, *TAT1*, and *LOX2* transcripts in 3-week-old wild-type (Col) and *rg13-5* mutant plants treated with 50 μ M of MeJA for the time indicated. Similar results were obtained in three of four biological replicates. Col, Col-0.

(B) Relative transcript levels of *RGL3*, *VSP2*, *TAT1*, and *LOX2* in 6-week-old wild-type (Ler) and a line overexpressing *RGL3* (*p35S::RGL3-GFP*). Data (mean \pm se) are represented as fold change in gene expression (*RGL3ox/Ler*). Similar results were obtained in two independent experiments.

broadly induced and accumulated throughout the leaves 24 to 48 h after inoculation (Figures 6A and 6B). Next, we assessed whether RGL3 modulates JA-dependent plant defense responses. To this end, we inoculated leaves of 6-week-old wild-type and *rgl3-5* mutant plants with *B. cinerea* spores and examined disease symptoms 2 d after inoculation. *rgl3-5* mutant plants were found to be more susceptible to *B. cinerea*, because they presented larger lesions compared with wild-type infected plants (Figure 6C). Consistent with this, the increased severity of the disease symptoms in *rgl3-5* mutant plants correlated with increased pathogen content (Figure 6D). Finally, we monitored the kinetics of JA-responsive gene induction (including the pathogen-responsive *PLANT DEFENSIN1.2* [*PDF1.2*] and *ETHYLENE RESPONSE FACTOR1* [*ERF1*] genes; Zhu et al., 2011), in wild-type and *rgl3-5* mutant plants inoculated with *B. cinerea*. All the JA-responsive genes tested displayed decreased induction rates in *rgl3-5* infected plants compared with wild-type infected plants (Figure 6E). Thus, RGL3 enhances JA-dependent plant defense responses to necrotrophic pathogens.

We also analyzed the biological function of RGL3 in response to infection by the hemibiotrophic pathogen *P. syringae* pv *tomato* DC3000 (*Pst*). Contrary to necrotrophic pathogens, which

activate the JA pathway and trigger a strong defense response, *Pst* produces a JA-mimicking phytotoxin, coronatine (COR), which can induce a set of JA-responsive genes to promote susceptibility (Laurie-Berry et al., 2006). As expected, we found that *Pst* induced *RGL3* expression in leaves 3 d after inoculation (Figures 7A and 7B). Conversely, *RGL3* was not induced by a *P. syringae* strain defective in COR synthesis (*Pst* COR⁻), thus indicating that *P. syringae* uses the COR-dependent pathway to modulate *RGL3* expression (Figure 7A). We then analyzed whether the loss-of-function *rgl3* mutation altered resistance to *P. syringae*. Infected *rgl3-5* plants displayed an ~15-fold reduction in bacterial growth at 3 d after inoculation compared with wild-type infected plants (Figures 7C and 7D). Consistent with this, no significant difference in bacterial growth was observed between *rgl3-5* and wild-type infected plants with the COR-deficient *Pst* COR⁻ strain (Figure 7D).

SA is the main signaling molecule involved in plant resistance to *P. syringae* (Kunkel and Brooks, 2002). Because the SA pathway is antagonistic to the JA pathway (Robert-Seilaniantz et al., 2011), we tested whether the increased resistance of the *rgl3-5* mutant to *Pst* correlated with a hyperinduction of SA-dependent defense genes and a suppression of JA-dependent gene expression,

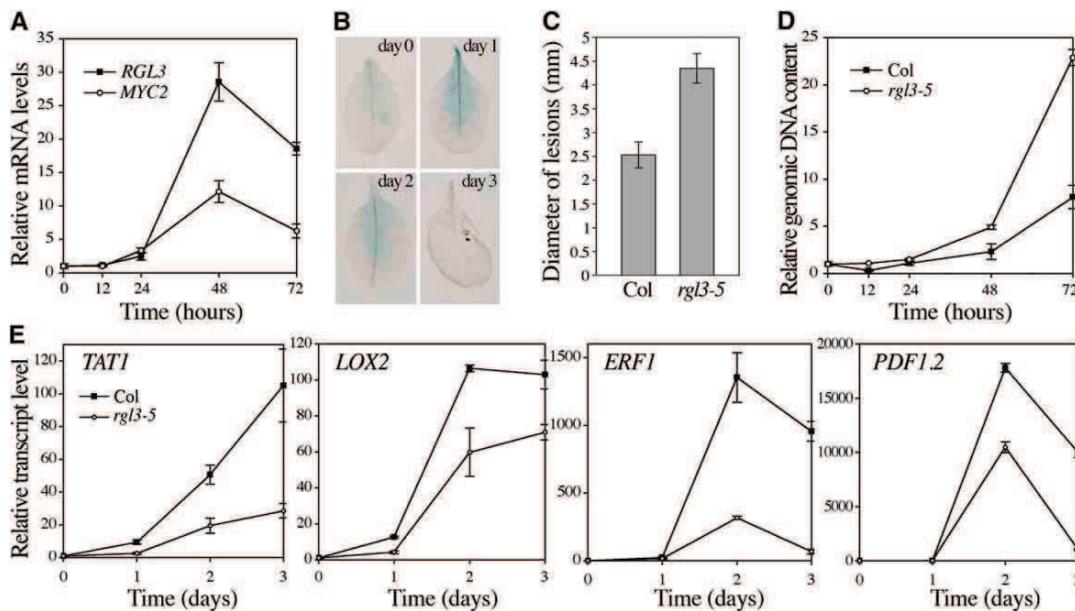


Figure 6. RGL3 Enhances JA-Dependent Plant Defense Responses to the Necrotroph *B. cinerea*.

(A) to (E) Six-week-old rosette leaves were inoculated with *B. cinerea* spores at a concentration of 2×10^5 spores/mL.

(A) Time-course induction (mean \pm SD) of *RGL3* and *MYC2* transcripts in wild-type inoculated leaves. Similar results were obtained in three independent experiments.

(B) RGL3-GUS induction in *pRGL3:RGL3-GUS* infected leaves at 0, 1, 2, and 3 d after inoculation.

(C) Graphical representation of disease symptoms (diameter of lesions) at 2 d after inoculation (mean \pm SE). At least 25 leaves per genotype were inoculated in each experiment. Experiments were repeated at least five times with similar results.

(D) Quantification of in planta growth of *B. cinerea* in wild-type and *rgl3-5* infected leaves at 0 to 3 d after inoculation. qPCR was used to analyze the relative genomic DNA level of *B. cinerea* *CUTINASE A* gene compared with *Arabidopsis* *ACTIN2*. Data represent means \pm SD of triplicate determinations. Similar results were obtained in three independent experiments.

(E) Time-course induction (mean \pm SD) of *TAT1*, *LOX2*, *ERF1*, and *PDF1.2* transcripts in wild-type and *rgl3-5* inoculated leaves. Similar results were obtained in three of four biological replicates.

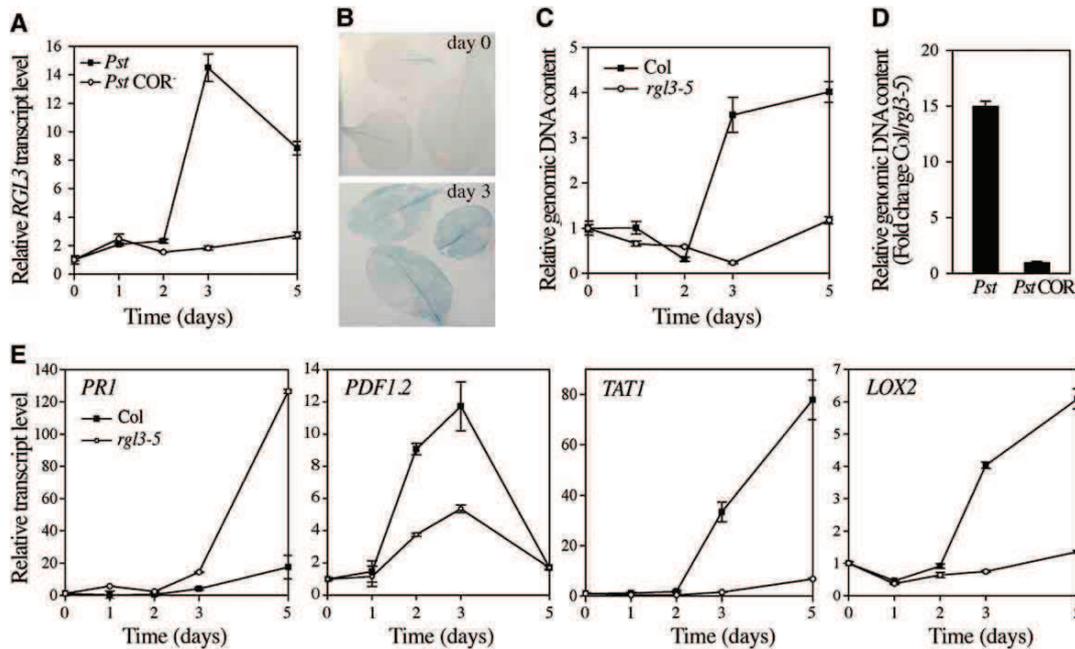


Figure 7. RGL3 Enhances Plant Susceptibility to the Hemibiotrophic Pathogen *P. syringae*.

(A) to (E) Six-week-old rosette leaves were inoculated by spray with *Pst* and *Pst* COR⁻ (as indicated) at a bacterial concentration of 2×10^8 colony-forming units/mL.

(A) Time-course induction (mean \pm sd) of *RGL3* transcripts in wild-type inoculated leaves. Similar results were obtained in three independent experiments.

(B) RGL3-GUS induction in *pRGL3:RGL3-GUS* leaves inoculated with *Pst* at 0 and 3 d after inoculation.

(C) Quantification of in planta growth of *Pst* in wild-type and *rgl3-5* infected leaves at 0 to 5 d after inoculation. qPCR was used to analyze the relative genomic DNA level of *P. syringae oprf* gene compared with *Arabidopsis ACTIN2*. Data represent mean \pm sd of triplicate determinations. Similar results were obtained in three independent experiments.

(D) Relative growth of *Pst* and *Pst* COR⁻ assessed at 3 d after inoculation. Data (mean \pm sd; calculated as described in [C]) are represented as fold change of genomic DNA content (Col/*rgl3-5*). Similar results were obtained in three independent experiments. Col, Col-0.

(E) Time-course induction (mean \pm sd) of *PR1*, *PDF1.2*, *TAT1*, and *LOX2* transcripts in wild-type and *rgl3-5* leaves inoculated with *Pst*. Similar results were obtained in three of four independent experiments.

respectively. We found that SA-dependent *PATHOGENESIS-RELATED1* (*PR1*) transcripts displayed stronger induction in infected leaves of *rgl3-5* versus the wild type, indicating that RGL3 represses the SA pathway (Figure 7E). Conversely, the induction of JA-dependent gene expression, including *PDF1.2*, *TAT1*, and *LOX2*, was severely compromised in *rgl3-5* infected leaves in comparison with wild-type infected leaves (Figure 7E). Altogether, these results indicate that RGL3 modulates plant defense to pathogens via its positive regulation of JA signaling.

DISCUSSION

DELLA proteins mediate GA signaling in a wide range of plant species. Studies of loss-of-function alleles of *GAI*, *RGA*, *RGL1*, and *RGL2* in *Arabidopsis* have shown that *GAI* and *RGA* function redundantly as negative regulators of GA responses affecting stem elongation (Peng et al., 1997; Silverstone et al., 1998; Dill and Sun, 2001; King et al., 2001), and *RGL2* functions as a main repressor of seed germination (Lee et al., 2002), whereas *RGA*, *RGL1*, and *RGL2* together are important for modulating GA-

regulated floral development (Cheng et al., 2004; Tyler et al., 2004). The RGL3 amino acid sequence is related to *GAI/RGA/RGL1/RGL2* throughout its entire length (Lee et al., 2002), suggesting that RGL3 also regulates GA responses. Accordingly, a recent study revealed that GA stimulates the degradation of TAP-tagged RGL3 protein and that MG132 (a 26S proteasome inhibitor) prevents GA-mediated degradation of RGL3 (Feng et al., 2008). Moreover, RGL3 (like the other DELLAs) interacts with SLY1, the F-box component of the SCF^{SLY1} complex that specifically ubiquitinates DELLAs (Tyler et al., 2004). However, because *RGL3* is expressed at low levels, it was suggested that RGL3 plays only a minor role in the control of GA-regulated responses (Tyler et al., 2004; Piskurewicz and Lopez-Molina, 2009). Therefore, no clear function has yet been attributed to RGL3.

To study the function of *RGL3*, we first surveyed its expression pattern in microarray data sets from various growth and stress conditions. We found that *RGL3* was coregulated with several *JAZ* members, suggesting that JA regulates *RGL3* expression. Consistent with this observation, our expression studies have further confirmed that JA induced the expression of

RGL3 via the COI1/MYC2-dependent signaling pathway (Figures 1 and 2). Collectively, these results indicate that *RGL3* acts downstream of MYC2/MYC3/MYC4 in the JA signaling pathway. Interestingly, a previous work provided genetic evidence showing that GA acts through JA to promote stamen filament growth in *Arabidopsis* (Cheng et al., 2009). Thus, the hierarchical relationship between GA and JA signaling pathways might be different depending on the tissue or the developmental stage.

Our findings raised the possibility that MYC2 directly regulates *RGL3* expression, like other primary JA-responsive genes, such as *LOX2*, *TAT1*, *JAZ1*, or *JAZ3* (Chung et al., 2008; Hou et al., 2010). Indeed, ChIP experiments indicated that MYC2 directly associates with a G-box-related motif CACATG present in the promoter of *RGL3* (Figure 3). It is noteworthy that the CACATG motif is not the preferred MYC2 core binding site (which is CACGTG), but several lines of evidence indicate that MYC2 can bind efficiently to this G-box-related hexamer and regulate the expression of the corresponding genes (Dombrecht et al., 2007; Chen et al., 2011).

JA treatment also weakly induced *RGL1* expression (Figure 1). Sequence analysis of the *RGL1* promoter revealed one G-box-related motif (CACGTT) located 1447 bp upstream of the translational start codon. However, we did not detect an interaction of MYC2 with this promoter region by ChIP assays (data not shown), suggesting that the induction of *RGL1* is indirect.

Previous reports showed that the DELLA proteins interact with the repressors of MYC2 activity, JAZs (Hou et al., 2010; Yang et al., 2012). We also showed that *RGL3* interacts in vivo with *JAZ1* and *JAZ8*, a JAZ resistant to JA-mediated degradation (Figure 4). Thus, according to our current knowledge about the JA signaling pathway, JA-mediated accumulation of *RGL3*

protein should enhance the expression of JA-responsive genes via competitive binding to the JAZs. Indeed, we showed that the MYC2 direct targets are reduced in *rgl3-5* mutants and enhanced in a transgenic line overexpressing *RGL3* (Figure 5). Therefore, we propose a model in which *RGL3* enhances JA action (Figure 8). In the absence of JA, JAZs repress MYC2 activity and thus the expression of MYC2-regulated genes. In the presence of JA, the JAZs containing the conserved LPIAR degron motif (such as *JAZ1*; Shyu et al., 2012) are ubiquitinated and destabilized by the proteasome, and MYC2 is released from the negative effect of this subgroup of JAZ proteins. In turn, JAZs are positively regulated by MYC2 by a feedback mechanism conferring a transitory character to JA. However, MYC2 also positively regulates *RGL3* accumulation, which leads to the release of MYC2 by competitive binding to JAZs. Given the ability of *RGL3* to interact with *JAZ8*, the induction of *RGL3* by JA provides an efficient mechanism by which JA may repress the activity of the JAZs that are resistant to the action of JA (Figure 8). Taken together, our results indicate that *RGL3* plays a critical role in modulating JA action by enhancing the responsiveness of the plant to JA. *RGL3* is destabilized in the presence of GA (see Supplemental Figure 3 online); therefore, the importance of *RGL3* in this response is inversely proportional to the amount of bioactive GAs accumulated in the plant. This is consistent with other findings reporting that pretreatment with exogenous GA compromised JA signaling responses (Navarro et al., 2008; Hou et al., 2010).

To investigate further the role of *RGL3* in modulating JA action in a natural context, we analyzed JA-regulated defense responses in wild-type and *rgl3* loss-of-function mutant plants. Plant defense is mediated by complex signaling networks in

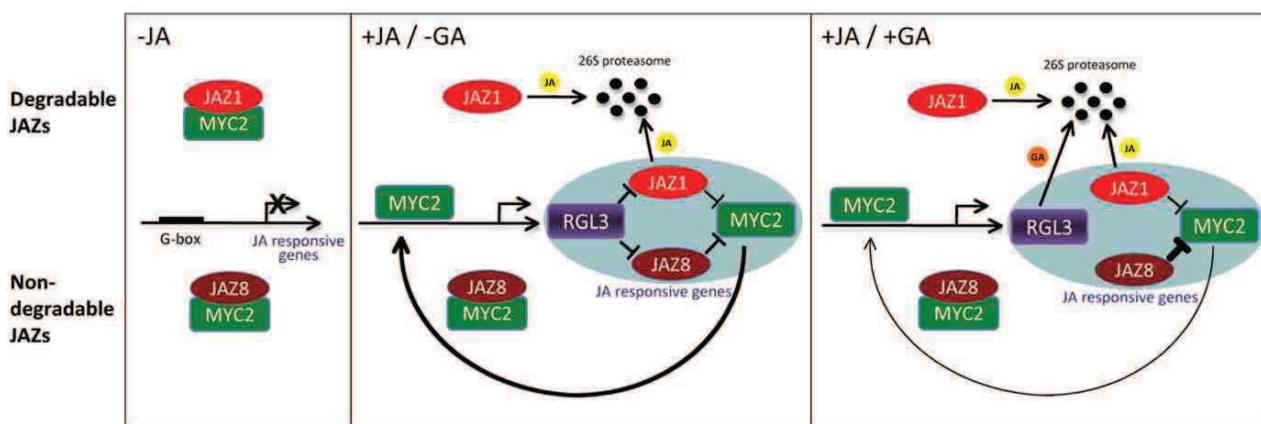


Figure 8. Model of *RGL3*-Mediated Regulation of *JAZ1* and *JAZ8* by JA/MYC2.

In the absence of JA, the JAZs sequester the transcription factor MYC2, and thereby repress the expression of early JA-responsive genes. Binding of JA to the JA-receptor/F-box COI1 promotes the polyubiquitination and subsequent destruction of degradable *JAZ1* (but not of nondegradable *JAZ8*), thus releasing the *JAZ1*-mediated inhibition of MYC2 target genes. Moreover, JAZs are regulated by a feedback mechanism creating a transitional character of the JA signaling. JA-induced MYC2 expression also leads to *RGL3* accumulation, which competes with MYC2 binding to JAZs, leading to the release of MYC2, which in turn enhances the expression of JA-responsive genes. In the presence of GA, *RGL3* is immediately degraded by the proteasome, allowing the accumulation of JAZs free to interact with MYC2.

[See online article for color version of this figure.]

which the plant hormones JA and SA play key roles (Robert-Seilanianz et al., 2011). In general, JA-mediated signaling pathways elevate necrotroph resistance, whereas the SA pathway is associated with enhanced resistance to biotrophs. Moreover, these two pathways are mostly antagonistic. Thus, elevated necrotroph resistance is often correlated with increased biotroph susceptibility and vice versa. As an example of JA-dependent resistance, we analyzed the infection by the necrotrophic fungus *B. cinerea*, and as an example of JA-mediated susceptibility, we analyzed the infection by the hemibiotroph *Pst*. Consistent with our model, *rgl3-5* mutation enhanced susceptibility to *B. cinerea* and resistance to *P. syringae* (Figures 6 and 7). Collectively, these results indicate that RGL3 contributes substantially to JA-regulated defense responses. Interestingly, we have already shown that *RGL3* is induced by various environmental stresses, such as cold (Achard et al. 2008a). Therefore, it is likely that the contribution of RGL3 to plant fitness increases when the environmental conditions are less favorable for plant growth.

Previous studies have indicated the existence of two branches in the JA signaling pathway that are antagonistically regulated by MYC2 and ERF1 (Lorenzo et al., 2004). Whereas MYC2 is responsible for the activation of wound/insect-responsive genes, such as *LOX2* and *TAT1*, and the repression of pathogen-responsive genes, such as *PDF1.2*, ERF1 exerts antagonistic effects. Interestingly, *ERF1*, *PDF1.2*, *TAT1*, and *LOX2* transcripts all displayed decreased induction rates in *rgl3-5* infected plants compared with wild-type infected plants (Figures 6 and 7). The JAZ proteins interact with various transcription factors, including EIN3, a positive regulator of *ERF1* and *PDF1.2* (Zhu et al., 2011); therefore, RGL3 may enhance the activity of EIN3 (or other JAZ-interacting factors) via competitive binding to JAZs. Further analyses will be required to assess these possibilities.

Gene duplications are considered to be the major source for variation and the acquisition of novel functions (Ohno, 1970). Unlike in monocots, DELLA genes are often duplicated in dicots. A recent report proposed that functional diversification of *Arabidopsis* DELLAs relied on changes in their expression patterns (Gallego-Bartolomé et al., 2010). Thus, JA-mediated induction of *RGL3* expression could represent a novel function with adaptive significance. Bioinformatics studies performed on publicly available microarray resources (www.bar.utoronto.ca) indicate that some *Arabidopsis* accessions, including ecotypes Canary Islands (Can-0) and San Feliu (Sf-2), express *RGL3* at higher levels in comparison with ecotype Columbia (Col-0) seedlings, suggesting that these accessions are hyperresponsive to JA. Consistent with this, we found that JA induces *RGL3* expression to a substantially higher level in Can-0 and Sf-2 than in Col-0 and that the basal level of primary JA-responsive gene transcripts is also higher and is induced to higher levels by JA in Sf-2 than in Col-0 (see Supplemental Figure 8 online). Interestingly, the Sf-2 accession was recently reported to be naturally more resistant to various pathogens, including the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina* (Ahmad et al., 2011). Results from our study raise the possibility that DELLA gene duplication events (that probably occurred after the divergence between dicots and monocots) increase the plasticity and the adaptation of plants to their surrounding growth conditions.

METHODS

Plant Materials and Growth Conditions

Arabidopsis thaliana Col-0 is the genetic background for all mutant lines. *rgl3-5* (SALK_082546) and *jln1-8* (SALK_061267) mutant lines were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre resource center. The mutants *coi1-1*, *myc3*, *myc4*, *myc2 myc3 myc4*, and the transgenic line *jln1-8 pMYC2:MYC2-FLAG* have been previously described (Xie et al., 1998; Hou et al., 2010; Fernández-Calvo et al., 2011). *Arabidopsis* Sf-2 and Can-0 accessions were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre resource center. Plants were grown on soil (12-h light/12-h dark; 22°C) or on plates containing 1× Murashige and Skoog medium (Duchefa Biochemical), 0.5% Suc, and 1% agar under a 16-h photoperiod at 22°C. For hormone treatments, 7-d-old seedlings grown in Murashige and Skoog liquid medium or 3-week-old plantlets grown on soil were treated with 50 μM of MeJA (Duchefa Biochemical) or 50 μM of GA₃ (Sigma-Aldrich) for the time indicated.

Plasmid Construction and Plant Transformation

pRGL3:RGL3 fragment was PCR amplified from ecotype Landsberg *erecta* (Ler) genomic DNA with appropriate primers encompassing 1.5-kb promoter region of *RGL3*. Subsequently, the fragment was inserted into pDONR207 (Invitrogen) by Gateway cloning methods and then recombined with the plant binary vectors pMDC204 (Curtis and Grossniklaus, 2003) and pBGWFS7 (Karimi et al., 2002) to generate the *pRGL3:RGL3-GUS* and *pRGL3:RGL3-GFP* constructs, respectively. *RGL3* coding sequence was PCR amplified from Col-0 genomic DNA, subsequently inserted into pDONR207 and recombined with pB7FWG2 (Karimi et al., 2002) to generate *p35S:RGL3-GFP*. The N-terminal part of the DELLA proteins is subject to autoactivation in yeast two-hybrid assays (de Lucas et al., 2008); therefore, only the C-terminal domain of RGL3 (amino acids 140 to 523) was cloned and recombined with pGBT9 (Clontech) to generate *BD-RGL3*. The *JAZ1* and *JAZ8* cDNAs were amplified by RT-PCR, subsequently inserted into pDONR207, and recombined with pB7WGR2 (Karimi et al., 2002) to generate *p35S:red fluorescent protein (RFP)-JAZ1* and *p35S:RFP-JAZ8* or with pGADT7 (Clontech) to generate *AD-JAZ1* and *AD-JAZ8*. Finally, *MYC2* coding sequence was amplified from Col-0 genomic DNA, inserted into pDONR207, and recombined with the *Escherichia coli* expression vector pHMWGA (Busso et al., 2005) to express His-tagged MBP-MYC2 protein. Primers used for the cloning are listed in Supplemental Data Set 1 online. The plant binary vectors were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 strain by electroporation, and *Arabidopsis* Ler plants were transformed by floral dip.

Gene Expression Analyses

Total RNA was extracted using RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) following the user manual. First, 2 μg of total RNA were treated with two units of DNase I (Promega) and then reverse transcribed in a total volume of 40 μL with 2 μM of oligo(dT)₂₀, 0.5 mM of deoxynucleotide triphosphate, 5 mM of DTT, and 200 units of Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). qRT-PCR was performed using gene-specific primers in a total volume of 6 μL of SYBR Green Master mix (Roche) on a Lightcycler LC480 apparatus (Roche) according to manufacturer's instructions. The *GAPDH* and *TIP41-like* genes were used as internal reference genes. The relative expression level of each gene was calculated using Lightcycler 480 software, release 1.5.0 SP3, and averaged over three replicates. qRT-PCR analyses were performed on at least two biological repeats. qRT-PCR primers used are listed in Supplemental Data Set 1 online.

Immunoblot Analyses and Protein Half-Life Determination

pRGL3:RGL3-GFP seedlings that were 7 d old and inoculated with 50 μM of MeJA for the time indicated were ground in 2× SDS-PAGE buffer and

then boiled for 5 min. After centrifugation, the protein extracts were fractionated on a 10% SDS-PAGE gel and blotted onto membrane. Immunoblots were performed using a 10,000-fold dilution of anti-GFP-horseradish peroxidase (HRP) antibodies (MACS Miltenyi Biotec). Signals were detected by film (within linear range of detection) using the Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore). The blot was subsequently stripped with 0.2 N of Gly, pH 2.5, and reprobed with anti-cdc2 (PSTAIRE) antibody (Santa Cruz Biotechnology) for loading control. The immunoblot assay was repeated three times.

For the determination of protein half-life, 7-d-old *p35S:RGL3-GFP* were incubated with 100 μ M of CHX (Fluka Analytical) to inhibit protein synthesis. A total of 50 μ M of GA₃ and/or 50 μ M of MeJA were added with CHX when indicated. After incubation for 0 to 180 min, seedlings were frozen in liquid nitrogen, and total proteins were extracted as described above. Immunoblotting was performed with anti-GFP-HRP in the same fashion as described above.

GUS Analyses

Histochemical detection of GUS activity was performed on 3-week-old (MeJA induction assay) or 6-week-old (pathogen assays) *pRGL3:RGL3-GUS* plants using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-Gluc) as a substrate. Plants were placed in 80% acetone on ice for 10 min, then infiltrated in X-Gluc buffer solution (500 μ g/mL of X-Gluc; 50 mM of sodium phosphate, pH 7; 10 mM of EDTA; 0.01% Triton X-100) for 10 min and incubated at 37°C overnight.

ChIP Assays

ChIP assays were performed on 7-d-old *jin1-8 pMYC2:MYC2-FLAG* seedlings as previously described (Berr et al., 2010). Briefly, chromatin was immunoprecipitated with anti-FLAG antibodies (Sigma-Aldrich) together with protein A magnetic beads (Millipore). ChIP experiments using mouse IgG were performed as negative controls. The resulting ChIP DNA was subjected to qPCR analysis. Enrichment of promoter regions was averaged over three replicates and normalized using *ACTIN2*. Enrichment of a *JAZ1* promoter fragment was used as positive control. ChIP-qPCR analyses were performed on two independent biological repeats with several technical repeats. qPCR primers used are listed in Supplemental Data Set 1 online.

EMSA Assays

The His-tagged MBP-MYC2 recombinant protein was expressed in the Rosetta 2 (DE3) pLysS (Novagen) *E. coli* strain by induction with 0.25 mM of isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside for 4 h at 20°C. The recombinant MBP-MYC2 protein was purified binding onto a Ni-NTA column (His60 Ni Superflow; Clontech) and eluted with 500 mM of imidazole. Elution buffer was replaced by EMSA buffer (15 mM of HEPES-KOH, pH 7.5; 40 mM of KCl; 0.1 mM of dithiothreitol; 10% glycerol) by filtration through a Sephadex-G25 HiTrap column (GE Healthcare Life Sciences). Oligonucleotide probe containing the G-box-like motif was end-filled labeled with the Klenow enzyme (Fermentas) in the presence of ³²P-dCTP. The sequence of the oligonucleotides is indicated in Supplemental Data Set 1 online. The EMSA reaction was performed with 1 ng of ³²P-labeled probe, 2 μ g of poly(dI-dC), and 100 ng of MBP-MYC2 fusion proteins (or MBP as control) and was incubated at room temperature for 20 min. The binding reactions were analyzed by electrophoresis on 6% native acrylamide gels in 0.5 \times TBE buffer. After drying, the gels were subjected to autoradiography and were exposed at -80°C overnight.

Yeast Two-Hybrid Assays

Interaction assays in yeast were performed following the Clontech small-scale LiAc yeast transformation procedure. Yeast strain AH109 was

cotransformed with BD-RGL3 (amino acids 140 to 523) and AD-JAZ1 or AD-JAZ8 or empty vector, and interaction tests were surveyed on selective media lacking Leu, Trp, Ade, and His (Clontech).

Coimmunoprecipitation Assays

Coimmunoprecipitation assays of RGL3 and JAZ1 or JAZ8 proteins were performed on *Nicotiana benthamiana* agroinfiltrated leaves with *p35S:RGL3-GFP* and *p35S:RFP-JAZ1* or *p35S:RFP-JAZ8* constructs. Total proteins were extracted in Lysis buffer containing 50 mM of Tris-HCl, pH 8, 150 mM of NaCl, 1% Triton X-100, supplemented with EDTA-free protease inhibitors (Roche), and then incubated for 2 h at 4°C with 50 μ L of anti-GFP antibody conjugated to micro beads (μ MACS GFP-tagged beads; Miltenyi Biotec). μ MACS GFP-tagged beads were retained and washed onto a magnetic column system (M columns; Miltenyi Biotec) to recover the immunoprotein complexes according to the manufacturer's instructions. RGL3 and JAZ1 or JAZ8 proteins bound to the beads were resolved by SDS-PAGE and detected by anti-GFP-HRP (Miltenyi Biotec) or anti-RFP antibody (Clontech) followed by a goat anti-rabbit-HRP antibody (Invitrogen).

Observation of GFP/RFP Fluorescence and FLIM Analyses

Confocal microscopy images were obtained with a Zeiss LSM510 inverted confocal laser microscope with 40 \times objectives. The excitation wavelength for GFP and RFP detection was 488 and 561 nm, respectively. Fluorescence was determined on *N. benthamiana* agroinfiltrated leaves with *p35S:RGL3-GFP* and *p35S:RFP-JAZ1* or *p35S:RFP-JAZ8* constructs.

FLIM was performed using a Nikon TE2000 microscope connected to a LIFA FLIM system. Fluorescence lifetime was measured using the LIFLIM software version 1.2.8. on *N. benthamiana* agroinfiltrated leaves expressing RGL3-GFP (control) and coexpressing RGL3-GFP and RFP-JAZ1 or RFP-JAZ8 proteins. At least 60 nuclei per condition were analyzed.

Pathogen Inoculation and Analyses

Pathogen inoculation assays were performed on 6-week-old plants (12-h light/12-h dark). *Botrytis cinerea* (5×10^5 spores/mL in one-half potato dextrose broth [Duchefa Biochemical]) inoculation was performed by placing 5- μ L droplets onto fully expanded leaves. Disease symptoms were scored 2 d after inoculation. RNA and DNA analyses were conducted on 8-mm leaf disks centered on the infection site of at least 30 leaves per genotype. For in planta quantification of pathogen growth, DNA content of *B. cinerea* was compared with plant DNA by comparing the abundance of the fungal *CUTINASE* gene to the *Arabidopsis*-specific *ACTIN2* DNA by qPCR analysis as described in Berr et al. (2010). The bacterial strains used in this study were *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 (*Pst*) and *Pst* COR⁻. Bacterial inoculations were performed by spraying at a concentration of 2×10^8 colony-forming units/mL. RNA and DNA analyses were conducted on whole mature leaves from six different plants. Quantification of bacterial growth was determined by relative quantification of bacteria and plant DNA by comparing the abundance of *P. syringae oprf* gene with plant *ACTIN2* by means of qPCR analysis as in Brouwer et al. (2003). Primer sequences are detailed in Supplemental Data Set 1 online. Work with pathogens was repeated at least five times, and similar results were obtained.

GA₄ Quantification

GA₄ were extracted from 3-week-old plants by adding 2 mL of ice-cold acetone to 600 mg of ground fresh whole plant material. The mixture was agitated at 4°C for 20 min at 1300 rpm and then centrifuged at 4°C for 20 min at 16,000g. The supernatant was separated and completely

evaporated under argon on ice. After resuspension with 130 μ L of methanol, GA₄ contents were measured by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry as described in Supplemental Methods 1 online.

Accession Numbers

Sequence data from this article can be found in the Arabidopsis Genome Initiative or GenBank/EMBL databases under the following accession numbers: At2g01570 (*RGA*), At1g14920 (*GAI*), At1g66350 (*RGL1*), At3g03450 (*RGL2*), At5g17490 (*RGL3*), At1g32640 (*MYC2/JIN1*), At5g46740 (*MYC3*), At4g17880 (*MYC4*), At2g39940 (*COI1*), At1g19180 (*JAZ1*), At1g30135 (*JAZ8*), At5g24770 (*VSP2*), At4g23600 (*TAT1*), At3g45140 (*LOX2*), AT3G23240 (*ERF1*), AT5G44420 (*PDF1.2*), and At2g14610 (*PR1*).

Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Figure 1. Coexpression Analysis of *RGL3*.

Supplemental Figure 2. JA Induces *RGL3* Expression.

Supplemental Figure 3. Effect of GA and JA on *RGL3*-GFP Protein Abundance.

Supplemental Figure 4. Effect of JA on GA₄ Levels.

Supplemental Figure 5. Negative Control of ChIP Experiments.

Supplemental Figure 6. *RGL3* Interacts with JAZ1 and JAZ8 in Yeast.

Supplemental Figure 7. Characterization of *rgl3-5* Mutant.

Supplemental Figure 8. Natural Variation of *RGL3* Expression.

Supplemental Methods 1. GA₄ Extraction and Quantification.

Supplemental Data Set 1. DNA Primer Sequences Used in the Study.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Roberto Solano for the *myc3*, *myc4*, and *myc2 myc3 myc4* mutants, John G. Turner for *coi1-1*, Hao Yu for the *jin1-8 pMYC2:MYC2-FLAG* line, Thierry Heitz for *B. cinerea* spores and *Pst* bacterial strain, Lionel Navarro for *Pst* COR⁻ strain, and Alexandre Berr for technical help with ChIP and pathogen growth analyses. This article was supported by Bayer.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.W., R.B., P.G., and P.A. designed the research. M.W., J.-M.D., S.C., T.R., N.B., D.H., R.B., P.G., and P.A. performed different aspects of the research and contributed to the analysis of the data. M.W., N.B., D.H., R.B., P.G., and P.A. wrote the article.

Received June 11, 2012; revised July 20, 2012; accepted July 30, 2012; published August 14, 2012.

REFERENCES

Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van Der Straeten, D., Peng, J., and Harberd, N.P. (2006). Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* **311**: 91–94.

Achard, P., and Genschik, P. (2009). Releasing the brakes of plant growth: How GAs shutdown DELLA proteins. *J. Exp. Bot.* **60**: 1085–1092.

Achard, P., Gong, F., Cheminant, S., Alioua, M., Hedden, P., and Genschik, P. (2008a). The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. *Plant Cell* **20**: 2117–2129.

Achard, P., Renou, J.P., Berthomé, R., Harberd, N.P., and Genschik, P. (2008b). Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Curr. Biol.* **18**: 656–660.

Ahmad, S., Van Hulten, M., Martin, J., Pieterse, C.M., Van Wees, S.C., and Ton, J. (2011). Genetic dissection of basal defence responsiveness in accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* **34**: 1191–1206.

Berr, A., McCallum, E.J., Alioua, A., Heintz, D., Heitz, T., and Shen, W.H. (2010). Arabidopsis histone methyltransferase SET DOMAIN GROUP8 mediates induction of the jasmonate/ethylene pathway genes in plant defense response to necrotrophic fungi. *Plant Physiol.* **154**: 1403–1414.

Bolle, C. (2004). The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* **218**: 683–692.

Brouwer, M., Lievens, B., Van Hemelrijck, W., Van den Ackerveken, G., Cammue, B.P., and Thomma, B.P. (2003). Quantification of disease progression of several microbial pathogens on *Arabidopsis thaliana* using real-time fluorescence PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* **228**: 241–248.

Busso, D., Delagoutte-Busso, B., and Moras, D. (2005). Construction of a set Gateway-based destination vectors for high-throughput cloning and expression screening in *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* **343**: 313–321.

Cheminant, S., Wild, M., Bouvier, F., Pelletier, S., Renou, J.P., Erhardt, M., Hayes, S., Terry, M.J., Genschik, P., and Achard, P. (2011). DELLAs regulate chlorophyll and carotenoid biosynthesis to prevent photooxidative damage during seedling deetiolation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**: 1849–1860.

Chen, Q., et al. (2011). The basic helix-loop-helix transcription factor MYC2 directly represses *PLETHORA* expression during jasmonate-mediated modulation of the root stem cell niche in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**: 3335–3352.

Cheng, H., Qin, L., Lee, S., Fu, X., Richards, D.E., Cao, D., Luo, D., Harberd, N.P., and Peng, J. (2004). Gibberellin regulates *Arabidopsis* floral development via suppression of DELLA protein function. *Development* **131**: 1055–1064.

Cheng, H., Song, S., Xiao, L., Soo, H.M., Cheng, Z., Xie, D., and Peng, J. (2009). Gibberellin acts through jasmonate to control the expression of *MYB21*, *MYB24*, and *MYB57* to promote stamen filament growth in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* **5**: e1000440.

Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., García-Casado, G., López-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., Micol, J.L., and Solano, R. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**: 666–671.

Chung, H.S., Koo, A.J., Gao, X., Jayanty, S., Thines, B., Jones, A.D., and Howe, G.A. (2008). Regulation and function of Arabidopsis *JASMONATE ZIM*-domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant Physiol.* **146**: 952–964.

Curtis, M.D., and Grossniklaus, U. (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol.* **133**: 462–469.

de Lucas, M., Davière, J.M., Rodríguez-Falcón, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J.M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blázquez, M.A., Titarenko, E., and Prat, S. (2008). A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* **451**: 480–484.

- Devoto, A., Nieto-Rostro, M., Xie, D., Ellis, C., Harmston, R., Patrick, E., Davis, J., Sherratt, L., Coleman, M., and Turner, J.G. (2002). COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in *Arabidopsis*. *Plant J.* **32**: 457–466.
- Dill, A., and Sun, T. (2001). Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **159**: 777–785.
- Dill, A., Thomas, S.G., Hu, J., Steber, C.M., and Sun, T.P. (2004). The *Arabidopsis* F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell* **16**: 1392–1405.
- Dombrecht, B., Xue, G.P., Sprague, S.J., Kirkegaard, J.A., Ross, J.J., Reid, J.B., Fitt, G.P., Sewelam, N., Schenk, P.M., Manners, J.M., and Kazan, K. (2007). MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 2225–2245.
- Feng, S., et al. (2008). Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* **451**: 475–479.
- Fernández-Calvo, P., et al. (2011). The *Arabidopsis* bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell* **23**: 701–715.
- Fu, X., Richards, D.E., Fleck, B., Xie, D., Burton, N., and Harberd, N.P. (2004). The *Arabidopsis* mutant sleepy1^{gair2-1} protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCF^{SLY1} E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. *Plant Cell* **16**: 1406–1418.
- Gallego-Bartolomé, J., Minguet, E.G., Marín, J.A., Prat, S., Blázquez, M.A., and Alabadí, D. (2010). Transcriptional diversification and functional conservation between DELLA proteins in *Arabidopsis*. *Mol. Biol. Evol.* **27**: 1247–1256.
- Gfeller, A., Liechti, R., and Farmer, E.E. (2010). *Arabidopsis* jasmonate signaling pathway. *Sci. Signal.* **3**: cm4.
- Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z.L., Powers, S.J., Gong, F., Phillips, A.L., Hedden, P., Sun, T.P., and Thomas, S.G. (2006). Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 3399–3414.
- Hou, X., Lee, L.Y., Xia, K., Yan, Y., and Yu, H. (2010). DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Dev. Cell* **19**: 884–894.
- Karimi, M., Inzé, D., and Depicker, A. (2002). GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* **7**: 193–195.
- King, K.E., Moritz, T., and Harberd, N.P. (2001). Gibberellins are not required for normal stem growth in *Arabidopsis thaliana* in the absence of GAI and RGA. *Genetics* **159**: 767–776.
- Kunkel, B.N., and Brooks, D.M. (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 325–331.
- Laurie-Berry, N., Joardar, V., Street, I.H., and Kunkel, B.N. (2006). The *Arabidopsis thaliana* JASMONATE INSENSITIVE 1 gene is required for suppression of salicylic acid-dependent defenses during infection by *Pseudomonas syringae*. *Pol. Plant Microbe Interact.* **19**: 789–800.
- Lee, S., Cheng, H., King, K.E., Wang, W., He, Y., Hussain, A., Lo, J., Harberd, N.P., and Peng, J. (2002). Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes Dev.* **16**: 646–658.
- Lorenzo, O., Chico, J.M., Sánchez-Serrano, J.J., and Solano, R. (2004). JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 1938–1950.
- Lorenzo, O., and Solano, R. (2005). Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 532–540.
- McGinnis, K.M., Thomas, S.G., Soule, J.D., Strader, L.C., Zale, J.M., Sun, T.P., and Steber, C.M. (2003). The *Arabidopsis* SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell* **15**: 1120–1130.
- Nakajima, M., et al. (2006). Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. *Plant J.* **46**: 880–889.
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lisón, P., Nemri, A., Harberd, N.P., and Jones, J.D. (2008). DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr. Biol.* **18**: 650–655.
- Obayashi, T., Kinoshita, K., Nakai, K., Shibaoka, M., Hayashi, S., Saeki, M., Shibata, D., Saito, K., and Ohta, H. (2007). ATTED-II: A database of co-expressed genes and cis elements for identifying co-regulated gene groups in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res.* **35**: D863–D869.
- Ohno, S. (1970). Evolution by Gene Duplication. (New York: Springer).
- Pauwels, L., and Goossens, A. (2011). The JAZ proteins: A crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *Plant Cell* **23**: 3089–3100.
- Peng, J., Carol, P., Richards, D.E., King, K.E., Cowling, R.J., Murphy, G.P., and Harberd, N.P. (1997). The *Arabidopsis* GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev.* **11**: 3194–3205.
- Piskurewicz, U., and Lopez-Molina, L. (2009). The GA-signaling repressor RGL3 represses testa rupture in response to changes in GA and ABA levels. *Plant Signal. Behav.* **4**: 63–65.
- Qi, T., Song, S., Ren, Q., Wu, D., Huang, H., Chen, Y., Fan, M., Peng, W., Ren, C., and Xie, D. (2011). The Jasmonate-ZIM-domain proteins interact with the WD-repeat/bHLH/MYB complexes to regulate jasmonate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **23**: 1795–1814.
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., and Jones, J.D. (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: More than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol.* **49**: 317–343.
- Sasaki, A., Itoh, H., Gomi, K., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Jeong, D.H., An, G., Kitano, H., Ashikari, M., and Matsuoka, M. (2003). Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. *Science* **299**: 1896–1898.
- Shyu, C., Figueroa, P., Depew, C.L., Cooke, T.F., Sheard, L.B., Moreno, J.E., Katsir, L., Zheng, N., Browse, J., and Howe, G.A. (2012). JAZ8 lacks a canonical degron and has an EAR motif that mediates transcriptional repression of jasmonate responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**: 536–550.
- Silverstone, A.L., Ciampaglio, C.N., and Sun, T. (1998). The *Arabidopsis* RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* **10**: 155–169.
- Silverstone, A.L., Jung, H.S., Dill, A., Kawaide, H., Kamiya, Y., and Sun, T.P. (2001). Repressing a repressor: Gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 1555–1566.
- Song, S., Qi, T., Huang, H., Ren, Q., Wu, D., Chang, C., Peng, W., Liu, Y., Peng, J., and Xie, D. (2011). The Jasmonate-ZIM domain proteins interact with the R2R3-MYB transcription factors MYB21 and MYB24 to affect jasmonate-regulated stamen development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**: 1000–1013.
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J., and Farmer, E.E. (2001). Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 12837–12842.
- Sun, T.P., and Kamiya, Y. (1994). The *Arabidopsis* GA1 locus encodes the cyclase ent-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* **6**: 1509–1518.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A., and Browse, J. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**: 661–665.
- Tyler, L., Thomas, S.G., Hu, J., Dill, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Sun, T.P. (2004). DELLA proteins and gibberellin-regulated seed

- germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **135**: 1008–1019.
- Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T.Y., Hsing, Y.I., Kitano, H., Yamaguchi, I., and Matsuoka, M.** (2005). *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1* encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* **437**: 693–698.
- Willige, B.C., Ghosh, S., Nill, C., Zourelidou, M., Dohmann, E.M., Maier, A., and Schwechheimer, C.** (2007). The DELLA domain of GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 1209–1220.
- Xie, D.X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M., and Turner, J.G.** (1998). *COI1*: An *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**: 1091–1094.
- Xu, L., Liu, F., Lechner, E., Genschik, P., Crosby, W.L., Ma, H., Peng, W., Huang, D., and Xie, D.** (2002). The SCF(COI1) ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**: 1919–1935.
- Yan, J., Zhang, C., Gu, M., Bai, Z., Zhang, W., Qi, T., Cheng, Z., Peng, W., Luo, H., Nan, F., Wang, Z., and Xie, D.** (2009). The *Arabidopsis* CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *Plant Cell* **21**: 2220–2236.
- Yang, D.L., et al.** (2012). Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**: E1192–E1200.
- Zentella, R., Zhang, Z.L., Park, M., Thomas, S.G., Endo, A., Murase, K., Fleet, C.M., Jikumaru, Y., Nambara, E., Kamiya, Y., and Sun, T.P.** (2007). Global analysis of della direct targets in early gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 3037–3057.
- Zhu, Z., et al.** (2011). Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**: 12539–12544.

Class I TCP-DELLA Interactions in Inflorescence Shoot Apex Determine Plant Height

Jean-Michel Davière,¹ Michael Wild,¹ Thomas Regnault,¹ Nicolas Baumberger,¹ Herfried Eisler,¹ Pascal Genschik,^{1,2} and Patrick Achard^{1,*}

¹Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, UPR2357, Conventionné avec l'Université de Strasbourg, 67084 Strasbourg, France

²Laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, UMR CNRS/INRA/SupAgro/UM2, 34060 Montpellier, France

Summary

Regulation of plant height, one of the most important agronomic traits, is the focus of intensive research for improving crop performance [1]. Stem elongation takes place as a result of repeated cell divisions and subsequent elongation of cells produced by apical and intercalary meristems. The gibberellin (GA) phytohormones have long been known to control stem and internodal elongation by stimulating the degradation of nuclear growth-repressing DELLA proteins; however, the mechanism allowing GA-responsive growth is only slowly emerging [2]. Here, we show that DELLAs directly regulate the activity of the plant-specific class I TCP transcription factor family, key regulators of cell proliferation [3]. Our results demonstrate that class I TCP factors directly bind the promoters of core cell-cycle genes in *Arabidopsis* inflorescence shoot apices while DELLAs block TCP function by binding to their DNA-recognition domain. GAs antagonize such repression by promoting DELLA destruction and therefore cause a concomitant accumulation of TCP factors on promoters of cell-cycle genes. Consistent with this model, the quadruple mutant *tcp8 tcp14 tcp15 tcp22* exhibits severe dwarfism and reduced responsiveness to GA action. Altogether, we conclude that GA-regulated DELLA-TCP interactions in inflorescence shoot apex provide a novel mechanism to control plant height.

Results

Gibberellins (GAs) are key endogenous regulators of plant growth [2]. Thus, mutant plants impaired in GA biosynthesis exhibit a dwarf phenotype, while exogenous application of GAs results in taller plants [4, 5]. GAs promote growth by opposing the function of the DELLA proteins, a family of nuclear growth repressors [6–9]. Upon binding to the GA receptor GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF 1 (GID1) [10–12], GAs trigger the specific destruction of the DELLAs through the ubiquitin-dependent proteasome pathway [13–19]. When GA levels are low, DELLAs accumulate and directly inactivate a number of transcription factors, including members of the basic-helix-loop-helix (bHLH) protein family such as PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 3 (PIF3) and PIF4 or ALCATRAZ (ALC) [20–22]. Despite these significant advances in our understanding of the GA signaling pathway, little

is known about the mechanism by which GA and/or DELLA contribute to the regulation of plant height.

Plant stature relies on developmental processes, which involve the control of cell proliferation and expansion [23]. During periods of growth, the cells of apical meristems of dicotyledonous plants and of intercalary meristems of grasses divide and continually add more cells for expansion, providing the basic structure of the plant body [23, 24]. With the goal of identifying the molecular mechanism by which GA signaling controls stem elongation, we first determined the expression levels of *Arabidopsis* DELLAs in dissected inflorescence apices (Figure 1A). The *Arabidopsis* genome encodes five DELLAs, GAI (GA-INSENSITIVE), RGA (REPRESSOR of GA1-3), RGL1 (RGA-LIKE1), RGL2, and RGL3, which display partially redundant but also distinct functions in repressing GA responses [6, 7, 9, 25–30]. We found that *GAI* and *RGA* were the two most strongly expressed DELLA genes in shoot apices, consistent with previous findings that *GAI* and *RGA* are the major GA repressors of stem growth [25, 26]. DELLAs have recently been reported to restrain root meristem growth via their effects on cell proliferation [31, 32]. However, it remains unclear whether GA and/or DELLA also contribute to cell proliferation in inflorescence shoot apices. To investigate this possibility, we monitored how changes in GA and/or DELLA levels affected the expression of the D box *pCYCB1;1:GUS* reporter (marking cells at the G2/M phase of the cell cycle; [33]) in apical shoots of wild-type, GA-deficient *ga1-3* mutant, and *gai-t6 rga-24* (lacking both *GAI* and *RGA*) mutant plants. When we analyzed the β -glucuronidase (GUS) pattern in dissected apices, we observed a striking decrease of CYCB1-GUS staining in *ga1-3* compared to wild-type or *gai-t6 rga-24* mutant (Figure 1B). Accordingly, treatment of *ga1-3* with exogenous GA₃ restored CYCB1-GUS activity to a nearly wild-type profile. In contrast, paclobutrazol (PAC; a GA biosynthesis inhibitor) reduced CYCB1-GUS activity in wild-type apices to levels similar to those in *ga1-3* but had no effect on *gai-t6 rga-24* apices (Figure 1B). Altogether, these results demonstrate that GAs regulate cell division in inflorescence shoot apices via suppression of *GAI* and *RGA* function.

DELLAs are nuclear proteins that interact with and inhibit the activity of key transcription factors to modulate plant development [2]. By doing so, DELLAs control the expression of a multitude of genes from distinct pathways. To identify the partners through which *GAI* and *RGA* exert their regulatory functions in apical shoots, we conducted a yeast two-hybrid (Y2H) screening of a cDNA library from *Arabidopsis* inflorescence shoot apices, using a N-terminally truncated version of *RGA* as bait since the full-length version exhibits strong autoactivation activity [20]. Three of the positive clones encoded TCP14, a member of the TCP (TEOSINTE BRANCHED 1 [TB1], CYCLOIDEA [CYC], and PROLIFERATING CELL FACTOR [PCF]) family of transcription factors that play roles in various aspects of plant development [3]. Further Y2H assays showed that TCP14 interacted with all *Arabidopsis* DELLAs (Figure 2A). In *Arabidopsis*, the TCPs constitute a small gene family of 24 members, which have been subdivided into class I (also known as the PCF class, to which TCP14 belongs) and class II (also known as the CYC/TB1 class), based on differences within

*Correspondence: patrick.achard@ibmp-cnrs.unistra.fr



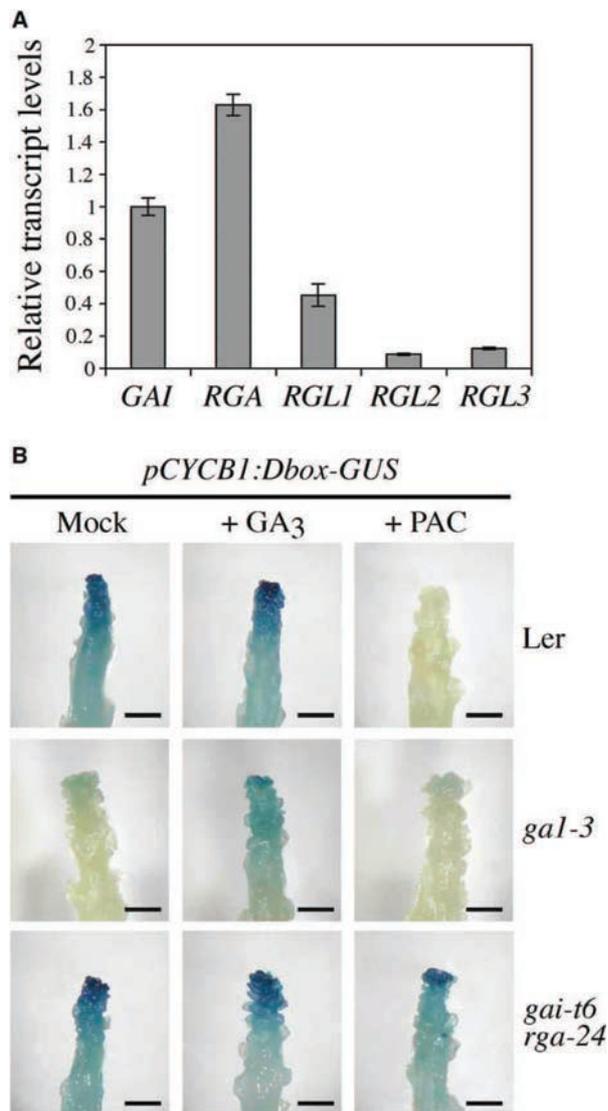


Figure 1. GAI and RGA Restrains Cell Division in Inflorescence Shoot Apices (A) Relative expression levels of *GAI*, *RGA*, *RGL1*, *RGL2*, and *RGL3* in dissected inflorescence shoot apices of 5-week-old wild-type (Col-0) plants. Data are means \pm SD of three replicates. Similar results were obtained in three independent experiments. (B) Effects of gibberellin (GA) and paclobutrazol (PAC) treatments on the D box *CYCBI*:1-GUS cell division marker in dissected apices of wild-type (Ler), *gal-3*, and *gai-16 rga-24* mutant inflorescences. Photographs show representative dissected apices of 5-week-old plants treated twice one week after bolting with 100 μ M GA₃ or 10 μ M PAC. Scale bars represent 0.5 mm.

their TCP domains [3]. We found that RGA could interact with each class I TCP protein tested (see Figures S1A and S1B available online).

To confirm these interactions in living plant cells, we used fluorescence resonance energy transfer-fluorescence lifetime (FRET-FLIM) assays in *Nicotiana benthamiana* leaves. The FRET phenomenon describes the transfer of energy from an excited fluorescent donor molecule (GFP) to a fluorescent acceptor molecule (RFP), if they are in close proximity. Expression of both RGA-GFP and TCP14-RFP proteins led to a

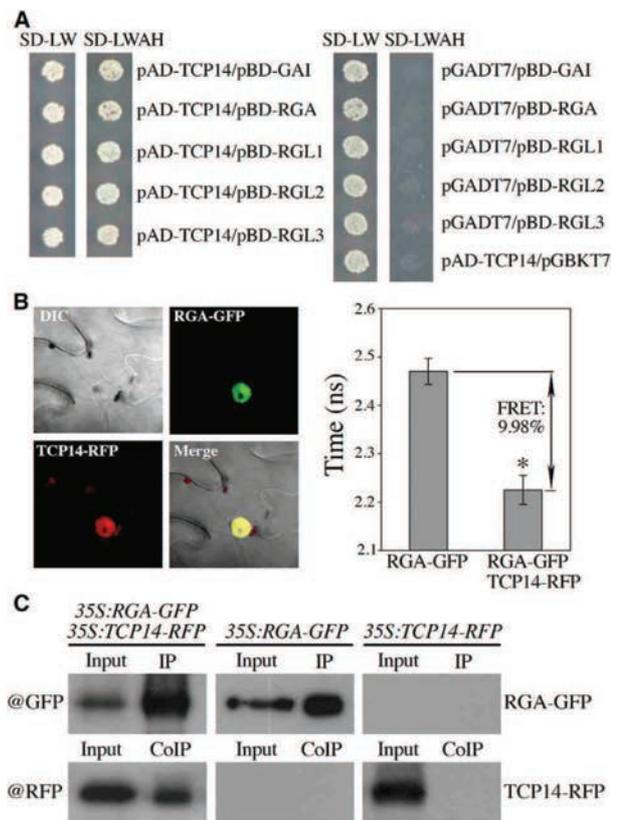


Figure 2. DELLAs Interact with TCP14

(A) Yeast two-hybrid interactions. TCP14 was tested pairwise with the five *Arabidopsis* DELLA proteins, GAI, RGA, RGL1, RGL2, and RGL3. Growth on selective plates lacking leucine, tryptophan, adenine, and histidine (SD-LWAH) and on control plates lacking only leucine and tryptophan (SD-LW) is shown. Empty pGBKT7 and pGADT7 vectors were also included as negative controls. Pictures of the plates were taken after 4 days at 30°C. (B) Left: confocal images showing subcellular localization of RGA-GFP and TCP14-RFP in transiently transformed *Nicotiana benthamiana* leaves. The two fusion proteins colocalize in the nucleus. DIC, differential interference contrast. Right: fluorescence lifetime analyses in nanoseconds (ns) of RGA-GFP alone or together with TCP14-RFP, and mean \pm SE fluorescence resonance energy transfer (FRET) value (%) in *N. benthamiana* agroinfiltrated leaves. * $p \leq 0.05$ by Student's *t* test. (C) Coimmunoprecipitation studies. Total protein extracts from *N. benthamiana* agroinfiltrated leaves with *p35S:RGA-GFP* and *p35S:TCP14-RFP* were immunoprecipitated with anti-GFP antibody. The coimmunoprecipitated proteins were detected by anti-RFP antibody. Similar results were obtained in three independent experiments. IP, immunoprecipitated proteins; CoIP, coimmunoprecipitated proteins.

reduction of the fluorescence lifetime of GFP of about 10%, revealing a direct interaction between RGA and TCP14 in the nuclei (Figure 2B). Moreover, coimmunoprecipitation studies further corroborated this interaction (Figure 2C). Taken together, these results suggest that DELLAs regulate some aspects of GA responses through their interaction with class I TCPs.

To gain more insight into the molecular mechanism underlying this protein-protein interaction, we mapped the domains engaged in the contact between both RGA and TCP14 using Y2H assays. Deletion studies revealed that the first heptad leucine repeat in RGA is the main domain for the interaction with TCP14, but the C-terminal region may also contribute

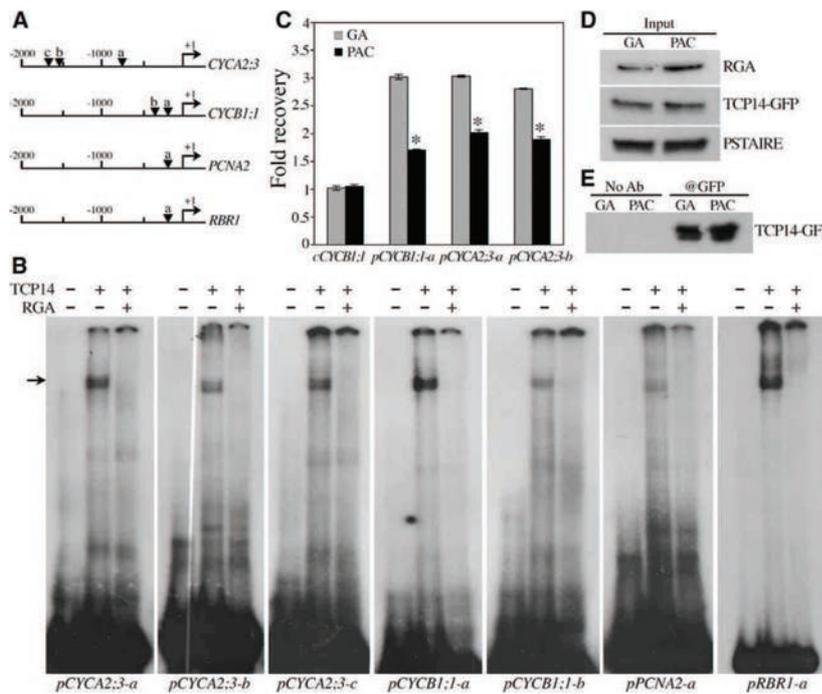


Figure 3. DELLAs Decrease the Capacity of TCP14 to Interact with the Promoter of Cell-Cycle Target Genes

(A) Schematic representation of *CYCA2;3*, *CYCB1;1*, *PCNA2*, and *RBR1* promoters, including potential TCP14 binding sites, indicated a, b, and c. (B) EMSA studies using oligonucleotides encompassing potential TCP14 binding sites in *pCYCA2;3*, *pCYCB1;1*, *pPCNA2*, and *pRBR1* promoters and recombinant TCP14 and RGA proteins. ³²P-radiolabeled oligonucleotides were incubated with TCP14 alone or together with RGA (a 1:3 ratio), and the free and bound probes were separated in an acrylamide gel. Similar results were obtained in two independent experiments. (C) Fold enrichment of indicated *pCYCB1;1* and *pCYCA2;3* promoter fragments and the *cCYCB1;1* coding region fragment. Chromatin of inflorescences of transgenic plants expressing TCP14-GFP (*pTCP14:TCP14-GFP*) treated with 100 μM GA₃ (GA) or 50 μM PAC was subjected to ChIP with anti-GFP antibodies followed by qPCR. Data represent means ± SD of triplicate determinations. The experiment was repeated twice with two technical replicates. *p ≤ 0.05 for PAC-treated plants versus GA-treated plants by Student's t test. (D and E) Quantification of RGA and TCP14-GFP in nuclear extracts (D) or immunoprecipitated fractions (E) of inflorescences of 6-week-old *pTCP14:TCP14-GFP* plants treated with 100 μM GA₃ (GA) or 50 μM PAC, using anti-RGA and anti-GFP antibodies, respectively.

(Figures S1C and S1D). Moreover, we determined that two domains of TCP14, including the TCP DNA-binding domain [34], are responsible for interaction of TCP14 with RGA (Figures S1E and S1F). Of note, the TCP domain is predicted to form a basic-helix-loop-helix structure similar to that of bHLH transcription factors [35]. The fact that DELLAs interfere with the DNA-binding activity of PIF3 and PIF4 via interaction with their bHLH domain [20, 21] raises the possibility that RGA regulates TCP14 activity in a similar manner.

Class I TCP factors have been implicated in the stimulation of cell proliferation, as first highlighted for two rice proteins from this class (PCF1 and PCF2) that bind to GGNCCCAC elements required for expression of the *PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN (PCNA)* gene [36]. Since then, class I TCPs have been shown to interact with promoters of various cell-cycle genes such as the cyclins *CYCA2;3* and *CYCB1;1*, *PCNA2*, and *RETINOBLASTOMA-RELATED 1 (RBR1)* [37–40]. To investigate whether DELLAs block the DNA-binding activity of class I TCP factors, we carried out electrophoretic mobility shift assay (EMSA) experiments using recombinant TCP14 and RGA proteins (Figure 3; Figure S2A). As expected, TCP14 was able to interact with the class I TCP-binding sequence GTGGGCCAC [34], but strikingly, the presence of RGA abolished such binding activity in a dose-dependent manner, which was not the case with the MALTOSE-BINDING PROTEIN (MBP) (Figure S2A). Moreover, competition experiments with cold DNA probes showed that this binding activity requires an intact TCP-binding element (Figure S2A).

To extend this result to the promoter of cell-cycle genes, we next selected TCP-binding related motifs within the 2 kb promoter of *CYCA2;3*, *CYCB1;1*, *PCNA2*, and *RBR1* (Figure 3A). For each promoter fragment tested by EMSA, the presence of RGA decreased the DNA-binding capacity of TCP14 (Figure 3B). Additional evidence for such a sequestration mechanism was obtained by chromatin immunoprecipitation (ChIP)

assays using a *pTCP14:TCP14-GFP* transgenic line (Figure 3C). After immunoprecipitation of protein-DNA complexes from inflorescences using an antibody against the GFP epitope (Figures 3D and 3E), enriched DNA sequences were amplified by quantitative PCR (qPCR) using primers that annealed near the TCP-binding elements present in the *CYCA2;3* and *CYCB1;1* promoters. To confirm the specificity of the GFP antibody, we also amplified a coding DNA fragment of *CYCB1;1* as a negative control. Interaction of TCP14 with its target gene promoters was clearly reduced in inflorescences accumulating the DELLAs (after PAC treatment) in comparison with GA-treated inflorescences (Figure 3C). Hence, this result emphasizes the role of DELLAs in blocking TCP14 DNA-binding activity in vivo.

To explore the significance of these interactions on the transcriptional activity of the class I TCP factors, we tested whether RGA can affect the transcriptional function of TCP14. To do this, we performed transient expression assays in *Nicotiana benthamiana* leaves, using a *pCYCB1;1:GUS* construct as a reporter for TCP14 transcriptional activity. Whereas the expression of *TCP14* resulted in a 4.7-fold induction of *CYCB1;1* reporter activity, expression of *TCP14-SRDX* (*TCP14* fused with the plant-specific repression domain SRDX, [41]) nearly abolished *GUS* reporter gene expression, providing evidence for a positive regulatory activity of this factor (Figure S2B). More importantly, coexpression of RGA and TCP14 significantly altered *CYCB1;1* expression, demonstrating that RGA-TCP14 interaction suppresses TCP14 transcriptional activity.

To evaluate the number of cell-cycle genes directly regulated by the class I TCP-DELLA protein complexes, we defined the consensus DNA-binding motif for class I TCP factors. To this end, we compiled all motif sequences tested in our study and those identified by Viola et al. [33] and Franco-Zorrilla et al. [42], and based on the degree of sequence

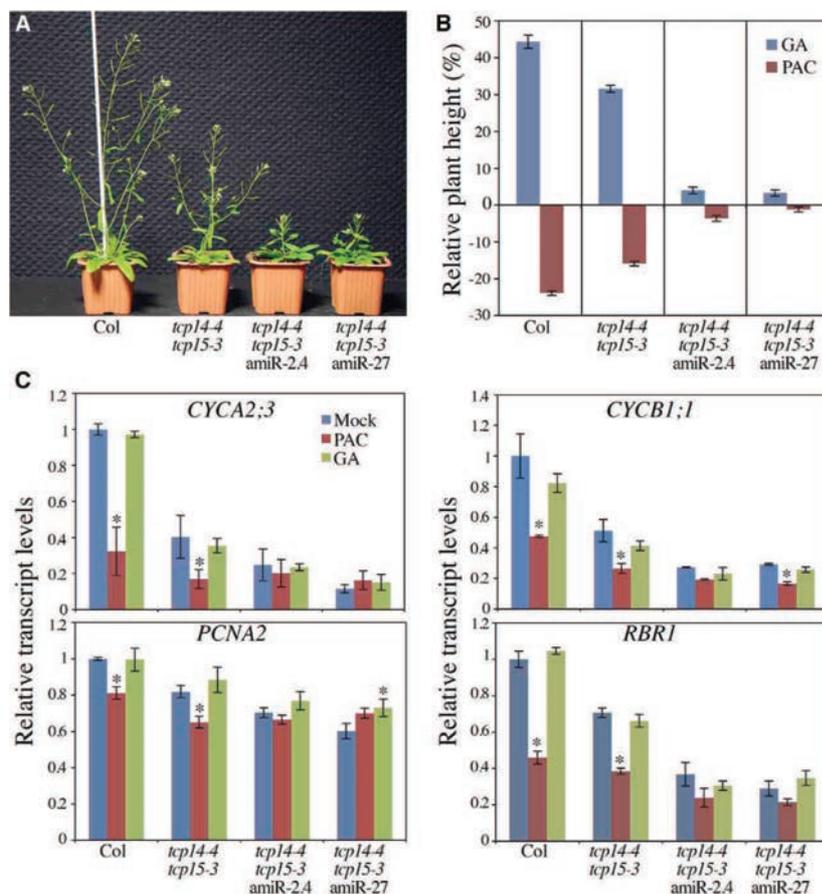


Figure 4. *tcp14 tcp15* amiR-*tcp8/22* Mutants Exhibit Dwarfism and Reduced Responsiveness to GA

(A) Representative 6-week-old wild-type (Col), *tcp14-4 tcp15-3*, and *tcp14-4 tcp15-3* amiR-*tcp8/22* (lines 2.4 and 27) plants.

(B) Mean \pm SD relative plant height of 9-week-old wild-type (Col), *tcp14-4 tcp15-3*, and *tcp14-4 tcp15-3* amiR-*tcp8/22* mutant plants treated twice per week after bolting with 100 μ M GA₃ (blue) or 10 μ M PAC (red), expressed as percentage of nontreated plants.

(C) Relative expression levels of *CYCA2;3*, *CYCB1;1*, *PCNA2*, and *RBR1* genes in dissected inflorescence shoot apices of 5-week-old wild-type (Col), *tcp14-4 tcp15-3*, and *tcp14-4 tcp15-3* amiR-*tcp8/22* mutant plants treated twice per week after bolting with 100 μ M GA₃ (green) or 10 μ M PAC (red) and controls (mock; blue). Data are means \pm SD of three replicates. **p* \leq 0.05 for treated plants versus untreated (Mock) plants by Student's *t* test. Similar results were obtained in three independent experiments.

TCP15, *TCP21*, and *TCP22* were functionally redundant in inflorescence shoot apices [44, 46]. To further substantiate the function of this set of TCP factors, we generated a multiple *tcp* mutant exhibiting reduced *TCP8*, *TCP14*, *TCP15*, and *TCP22* expression. To this end, we used a strategy based on artificial microRNAs [47]. We aligned *TCP8* and *TCP22* nucleotide sequences and determined a 21-nucleotide sequence that shows a perfect match for the two genes using Web MicroRNA Designer (<http://wmd3.>

conservation, we then deduced the most probable TCP consensus motif (KHGGGVC) (Figure S2C). Using the Promoter program (http://bbc.botany.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/BAR_Promomer.cgi), we found that 39% of the core cell-cycle genes (29 of 74 genes) harbored at least one TCP consensus motif within their 1 kb promoter sequences (Table S1). Taken together, these in silico analyses suggest that class I TCP-DELLA protein complexes regulate the expression of a large set of genes controlling cell-cycle progression [43].

Functional analysis of class I TCP factors revealed that *TCP14* along with its closest homolog *TCP15* has a role in stem elongation by promoting cell proliferation in inflorescence shoot apices [44]. Hence, *tcp14-4 tcp15-3* double mutants exhibit significant reduction in plant height [44]. The identification of *TCP14* and other class I TCP proteins as interactors of DELLA proteins in shoot apices thus suggests a mechanism by which GAs could regulate plant height. Since most of the class I TCP factors are likely to function redundantly [45], we first determined the expression levels of phylogenetically related TCPs in dissected inflorescence shoot apices (Figures S1A and S3A). We found that *TCP8*, *TCP14*, and *TCP15* transcripts (and to a lesser extent *TCP7*, *TCP21*, and *TCP22*) were relatively abundant in apical shoots, while *TCP11* and *TCP23* transcripts were not detected (Figure S3A). To confirm this result, we monitored the spatial expression of *TCP7*, *TCP8*, *TCP14*, *TCP15*, *TCP22*, and *TCP23* by promoter-GUS fusion studies (Figure S3B). GUS activities were consistent with qRT-PCR analyses suggesting that *TCP7*, *TCP8*, *TCP14*,

weigelworld.org). We used the miR319a precursor as a backbone for amiR-*tcp8/22* expression under the control of the CaMV 35S promoter, and we introgressed the transgene into *tcp14-4 tcp15-3* double mutant plants. We selected two independent *tcp14 tcp15* amiR-*tcp8/22* transgenic lines for amiR-*tcp8/22* expression (lines 2.4 and 27; Figure S3C), and both displayed a strong reduction in the accumulation of *TCP8*, *TCP14*, *TCP15*, and *TCP22* transcripts (Figure S3D). Phenotypic analysis revealed that *tcp14 tcp15* amiR-*tcp8/22* mutant plants were shorter than *tcp14 tcp15* double mutants, thus confirming that *TCP8*, *TCP14*, *TCP15*, and *TCP22* play redundant roles in regulating plant height (Figure 4A).

We next investigated the effects of GA and PAC treatments on the growth of *tcp14-4 tcp15-3* and *tcp14 tcp15* amiR-*tcp8/22* mutant plants. Consistent with the model in which GA signaling regulates growth via its effect on class I TCP factors, the progressive lack of TCP activity in *tcp* mutants reduced the sensitivity of the plants to GA and PAC (Figure 4B). Finally, to validate the negative role of the DELLAs in TCP transcriptional activity, we determined the expression levels of *CYCA2;3*, *CYCB1;1*, *PCNA2*, and *RBR1* in dissected inflorescence shoot apices of wild-type, *tcp14-4 tcp15-3*, and *tcp14 tcp15* amiR-*tcp8/22* mutant plants treated with GA or PAC. Treatment with GA had no effect, most likely because GA levels are not limiting in apical shoots. However, treatment with PAC reduced the expression levels of all four genes in the wild-type and in double *tcp* mutants (Figure 4C). By contrast, *CYCA2;3*, *CYCB1;1*, *PCNA2*, and *RBR1* expression were less

affected by PAC in the *tcp14 tcp15 amiR-tcp8/22* mutant, thus providing direct evidence that DELLAs negatively regulate the expression of cell-cycle genes in inflorescence shoot apices by repressing the transcriptional activity of TCP8, TCP14, TCP15, and TCP22 proteins. It is noteworthy that although TCP14 and TCP15 enhance cell proliferation in inflorescence shoot apices and in the embryo during seed germination [44, 48], they have also been reported to decrease cell proliferation in developing leaves, suggesting that the influence of class I TCPs on cell proliferation is context dependent [39, 40, 44, 45].

Discussion

Plant height is one of the most important agronomic traits, affecting both crop yield and quality. Among all hormones, GAs play a major role in regulating stem or internode elongation and thus have been an obvious focus for improving crop performance via both conventional breeding and genetic engineering [1]. In deepwater rice, for example, GAs promote internode elongation by increasing both the rate of cell production in the intercalary meristems and the expansion of cells in the internodal elongation zone [24]. Although it was known that DELLAs repress the growth-promoting effects of GAs by interacting with key regulatory proteins [2], the molecular mechanism by which DELLAs repress cell proliferation driving plant growth remained unclear. Collectively, our data support a positive function of the class I TCP factors in GA-mediated control of plant height. Hence, we showed in *Arabidopsis* that GAI and RGA, the two most abundant DELLAs in inflorescence shoot apices, interact with the TCP DNA-binding motif of class I TCPs, likely sequestering these factors into inactive complexes unable to bind target gene promoters. By doing so, DELLAs repress the expression of a number of core cell-cycle genes controlling cell division. These results raise the possibility that GA signaling may also regulate other aspects of plant development, such as the differentiation of lateral organs [3, 49, 50], in a TCP-dependent manner.

It is noteworthy that DELLA proteins interact and repress other growth-promoting transcription factors, such as PIFs, involved mainly in the control of cell elongation [20, 21]. The relative contributions of TCPs versus PIFs in plant height regulation might however differ from one plant species to another, and they remain to be further investigated. Nevertheless, considering that GA levels peak at the transition zone between the division and the expansion zone, as shown in maize leaves [51], it is possible that GAs regulate plant height by modulating both TCP and PIF transcriptional activity at the boundary of the differentiation zone of the growing stem.

Moreover, plants adjust their final height to the prevailing environmental conditions by increasing or decreasing their growth rate in response to external and internal signals. Interestingly, GAs have been reported to play critical role in that regulatory mechanism [52]. Recent advances have revealed that environmental stresses repress bioactive GA levels, resulting in the accumulation of DELLAs, which in turn are responsible for mitotic exit [53]. Therefore, GA-regulated DELLA-TCP interactions could provide a flexible mechanism enabling plants to optimize their growth rate in response to changing environments.

Supplemental Information

Supplemental Information includes three figures, two tables, and Supplemental Experimental Procedures and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.07.012>.

Acknowledgments

We thank P. Doerner for the *pCYCB1;1:Dbox-GUS* line; B. Davies for the *tcp14-4 tcp15-3* mutant, *pTCP14:TCP14-GUS*, and *pTCP15:TCP15-GUS* reporter lines and the *pTCP14:TCP14:SRDX* plasmid; N. Sinha for *pTCP7:GUS*, *pTCP8:GUS*, *pTCP21:GUS*, and *pTCP22:GUS* reporter lines; D. Weigel for the plasmid pRS300 containing the miR319a precursor; S. Prat for the truncated versions of RGA for Y2H; C. Schwachheimer for the anti-RGA antibody; and P. Dunoyer for the *p35S:P19* plasmid. We gratefully acknowledge funding from Agence Nationale de la Recherche grant 07-JCJC-0118 and the European Regional Development Fund (ERDF) in the framework of INTERREG IV for cofinancing the Trinational Institute for Plant research (TIP), to which the Institut de Biologie Moléculaire des Plantes belongs.

Received: April 2, 2014
Revised: June 7, 2014
Accepted: July 3, 2014
Published: August 7, 2014

References

1. Hedden, P. (2003). The genes of the Green Revolution. *Trends Genet.* 19, 5–9.
2. Davière, J.M., and Achard, P. (2013). Gibberellin signaling in plants. *Development* 140, 1147–1151.
3. Martín-Trillo, M., and Cubas, P. (2010). TCP genes: a family snapshot ten years later. *Trends Plant Sci.* 15, 31–39.
4. Koornneef, M., and van der Veen, J.H. (1980). Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) heyhn. *Theor. Appl. Genet.* 58, 257–263.
5. Hedden, P., and Thomas, S.G. (2012). Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem. J.* 444, 11–25.
6. Peng, J., Carol, P., Richards, D.E., King, K.E., Cowling, R.J., Murphy, G.P., and Harberd, N.P. (1997). The *Arabidopsis* GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev.* 11, 3194–3205.
7. Silverstone, A.L., Ciampaglio, C.N., and Sun, T. (1998). The *Arabidopsis* RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* 10, 155–169.
8. Silverstone, A.L., Jung, H.S., Dill, A., Kawaide, H., Kamiya, Y., and Sun, T.P. (2001). Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 1555–1566.
9. Cheng, H., Qin, L., Lee, S., Fu, X., Richards, D.E., Cao, D., Luo, D., Harberd, N.P., and Peng, J. (2004). Gibberellin regulates *Arabidopsis* floral development via suppression of DELLA protein function. *Development* 131, 1055–1064.
10. Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T.Y., Hsing, Y.I., Kitano, H., Yamaguchi, I., and Matsuoka, M. (2005). GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* 437, 693–698.
11. Murase, K., Hirano, Y., Sun, T.P., and Hakoshima, T. (2008). Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* 456, 459–463.
12. Shimada, A., Ueguchi-Tanaka, M., Nakatsu, T., Nakajima, M., Naoe, Y., Ohmiya, H., Kato, H., and Matsuoka, M. (2008). Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1. *Nature* 456, 520–523.
13. Sasaki, A., Itoh, H., Gomi, K., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Jeong, D.H., An, G., Kitano, H., Ashikari, M., and Matsuoka, M. (2003). Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. *Science* 299, 1896–1898.
14. McGinnis, K.M., Thomas, S.G., Soule, J.D., Strader, L.C., Zale, J.M., Sun, T.P., and Steber, C.M. (2003). The *Arabidopsis* SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell* 15, 1120–1130.
15. Dill, A., Thomas, S.G., Hu, J., Steber, C.M., and Sun, T.P. (2004). The *Arabidopsis* F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell* 16, 1392–1405.
16. Fu, X., Richards, D.E., Fleck, B., Xie, D., Burton, N., and Harberd, N.P. (2004). The *Arabidopsis* mutant *sleepy1^{9a2-1}* protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCF^{S_{LY}1} E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. *Plant Cell* 16, 1406–1418.

17. Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z.L., Powers, S.J., Gong, F., Phillips, A.L., Hedden, P., Sun, T.P., and Thomas, S.G. (2006). Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 3399–3414.
18. Ueguchi-Tanaka, M., Nakajima, M., Katoh, E., Ohmiya, H., Asano, K., Saji, S., Hongyu, X., Ashikari, M., Kitano, H., Yamaguchi, I., and Matsuoka, M. (2007). Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, GID1, with a rice DELLA protein, SLR1, and gibberellin. *Plant Cell* **19**, 2140–2155.
19. Willige, B.C., Ghosh, S., Nill, C., Zourelidou, M., Dohmann, E.M., Maier, A., and Schwechheimer, C. (2007). The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 1209–1220.
20. de Lucas, M., Davière, J.M., Rodríguez-Falcón, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J.M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blázquez, M.A., Titarenko, E., and Prat, S. (2008). A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* **451**, 480–484.
21. Feng, S., Martinez, C., Gusmaroli, G., Wang, Y., Zhou, J., Wang, F., Chen, L., Yu, L., Iglesias-Pedraz, J.M., Kircher, S., et al. (2008). Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* **451**, 475–479.
22. Arnaud, N., Girin, T., Sorefan, K., Fuentes, S., Wood, T.A., Lawrenson, T., Sablowski, R., and Østergaard, L. (2010). Gibberellins control fruit patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* **24**, 2127–2132.
23. Ingram, G.C., and Waites, R. (2006). Keeping it together: co-ordinating plant growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**, 12–20.
24. van der Knaap, E., Kim, J.H., and Kende, H. (2000). A novel gibberellin-induced gene from rice and its potential regulatory role in stem growth. *Plant Physiol.* **122**, 695–704.
25. King, K.E., Moritz, T., and Harberd, N.P. (2001). Gibberellins are not required for normal stem growth in *Arabidopsis thaliana* in the absence of GAI and RGA. *Genetics* **159**, 767–776.
26. Dill, A., and Sun, T.P. (2001). Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **159**, 777–785.
27. Lee, S., Cheng, H., King, K.E., Wang, W., He, Y., Hussain, A., Lo, J., Harberd, N.P., and Peng, J. (2002). Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via *RGL2*, a *GAI/RGA*-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes Dev.* **16**, 646–658.
28. Wen, C.K., and Chang, C. (2002). *Arabidopsis* RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell* **14**, 87–100.
29. Tyler, L., Thomas, S.G., Hu, J., Dill, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Sun, T.P. (2004). DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **135**, 1008–1019.
30. Wild, M., Davière, J.M., Cheminant, S., Regnault, T., Baumberger, N., Heintz, D., Baltz, R., Genschik, P., and Achard, P. (2012). The *Arabidopsis* DELLA RGA-LIKE3 is a direct target of MYC2 and modulates jasmonate signaling responses. *Plant Cell* **24**, 3307–3319.
31. Achard, P., Gusti, A., Cheminant, S., Alioua, M., Dhondt, S., Coppens, F., Beemster, G.T.S., and Genschik, P. (2009). Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **19**, 1188–1193.
32. Ubeda-Tomás, S., Federici, F., Casimiro, I., Beemster, G.T.S., Bhalerao, R., Swarup, R., Doerner, P., Haseloff, J., and Bennett, M.J. (2009). Gibberellin signaling in the endodermis controls *Arabidopsis* root meristem size. *Curr. Biol.* **19**, 1194–1199.
33. Colón-Carmona, A., You, R., Haimovitch-Gal, T., and Doerner, P. (1999). Technical advance: spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J.* **20**, 503–508.
34. Viola, I.L., Uberti Manassero, N.G., Ripoll, R., and Gonzalez, D.H. (2011). The *Arabidopsis* class I TCP transcription factor AtTCP11 is a developmental regulator with distinct DNA-binding properties due to the presence of a threonine residue at position 15 of the TCP domain. *Biochem. J.* **435**, 143–155.
35. Heim, M.A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weissshaar, B., and Bailey, P.C. (2003). The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol. Biol. Evol.* **20**, 735–747.
36. Kosugi, S., and Ohashi, Y. (1997). PCF1 and PCF2 specifically bind to *cis* elements in the rice proliferating cell nuclear antigen gene. *Plant Cell* **9**, 1607–1619.
37. Trémousaygue, D., Garnier, L., Bardet, C., Dabos, P., Hervé, C., and Lescure, B. (2003). Internal telomeric repeats and 'TCP domain' protein-binding sites co-operate to regulate gene expression in *Arabidopsis thaliana* cycling cells. *Plant J.* **33**, 957–966.
38. Li, C., Potuschak, T., Colón-Carmona, A., Gutiérrez, R.A., and Doerner, P. (2005). *Arabidopsis* TCP20 links regulation of growth and cell division control pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 12978–12983.
39. Hervé, C., Dabos, P., Bardet, C., Jauneau, A., Auriac, M.C., Ramboer, A., Lacout, F., and Trémousaygue, D. (2009). *In vivo* interference with AtTCP20 function induces severe plant growth alterations and deregulates the expression of many genes important for development. *Plant Physiol.* **149**, 1462–1477.
40. Li, Z.Y., Li, B., and Dong, A.W. (2012). The *Arabidopsis* transcription factor AtTCP15 regulates endoreduplication by modulating expression of key cell-cycle genes. *Mol. Plant* **5**, 270–280.
41. Koyama, T., Furutani, M., Tasaka, M., and Ohme-Takagi, M. (2007). TCP transcription factors control the morphology of shoot lateral organs via negative regulation of the expression of boundary-specific genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 473–484.
42. Franco-Zorrilla, J.M., López-Vidriero, I., Carrasco, J.L., Godoy, M., Vera, P., and Solano, R. (2014). DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 2367–2372.
43. Menges, M., de Jager, S.M., Gruijsem, W., and Murray, J.A. (2005). Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J.* **41**, 546–566.
44. Kieffer, M., Master, V., Waites, R., and Davies, B. (2011). TCP14 and TCP15 affect internode length and leaf shape in *Arabidopsis*. *Plant J.* **68**, 147–158.
45. Aguilar-Martínez, J.A., and Sinha, N. (2013). Analysis of the role of *Arabidopsis* class I TCP genes AtTCP7, AtTCP8, AtTCP22 and AtTCP23 in leaf development. *Front. Plant Sci.* **4**, 406.
46. Uberti-Manassero, N.G., Lucero, L.E., Viola, I.L., Vegetti, A.C., and Gonzalez, D.H. (2012). The class I protein AtTCP15 modulates plant development through a pathway that overlaps with the one affected by CIN-like TCP proteins. *J. Exp. Bot.* **63**, 809–823.
47. Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., and Weigel, D. (2006). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 1121–1133.
48. Tatematsu, K., Nakabayashi, K., Kamiya, Y., and Nambara, E. (2008). Transcription factor AtTCP14 regulates embryonic growth potential during seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **53**, 42–52.
49. Hay, A., Kaur, H., Phillips, A., Hedden, P., Hake, S., and Tsiantis, M. (2002). The gibberellin pathway mediates KNOTTED1-type homeobox function in plants with different body plans. *Curr. Biol.* **12**, 1557–1565.
50. Jasinski, S., Piazza, P., Craft, J., Hay, A., Woolley, L., Rieu, I., Phillips, A., Hedden, P., and Tsiantis, M. (2005). KNOX action in *Arabidopsis* is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Curr. Biol.* **15**, 1560–1565.
51. Nelissen, H., Rymen, B., Jikumaru, Y., Demuyneck, K., Van Lijsebettens, M., Kamiya, Y., Inzé, D., and Beemster, G.T.S. (2012). A local maximum in gibberellin levels regulates maize leaf growth by spatial control of cell division. *Curr. Biol.* **22**, 1183–1187.
52. Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van Der Straeten, D., Peng, J., and Harberd, N.P. (2006). Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* **311**, 91–94.
53. Claeys, H., Skirycz, A., Maleux, K., and Inzé, D. (2012). DELLA signaling mediates stress-induced cell differentiation in *Arabidopsis* leaves through modulation of anaphase-promoting complex/cyclosome activity. *Plant Physiol.* **159**, 739–747.

Résumé :

Les gibbérellines (GA) sont une classe de phytohormones diterpénoïques tétracycliques modulant différents aspects du développement des plantes tels que la germination, l'élongation des jeunes tissus, la floraison et la maturation des fruits. La biosynthèse des GA à partir du géranylgeranyl diphosphate est catalysée par l'activité des terpenes cyclases, des cytochromes P450 monooxygénases, et des dioxygénases 2-oxoglutarate-dépendantes, permettant la formation des formes bioactives GA₁ et GA₄. Ainsi, les mutants de biosynthèse des GA sont nains et présente un retard de floraison. Inversement, un excès de l'hormone provoque une croissance excessive et une stérilité. Par conséquent, les plantes ont développé des mécanismes efficaces leur permettant de maintenir une concentration optimale de GA bioactives, comme la régulation de la voie de biosynthèse. Toutefois, un niveau supplémentaire de régulation pourrait être constitué par une séparation spatiale de la voie de biosynthèse dans différents types cellulaires et organes nécessitant des GA pour leur développement. Alors que le transport d'une autre phytohormone, l'auxine, est désormais bien caractérisé, le transport des GA reste méconnu. A l'aide d'approches biochimiques, génétiques et de micro-greffes, nous démontrons qu'un intermédiaire de la voie de biosynthèse, la GA₁₂, est mobile sur de longues distances chez *Arabidopsis*. Ce transport s'effectue à travers les vaisseaux vasculaires de la plante, et pourrait impliquer des transporteurs spécifiques de GA₁₂. L'analyse du profil d'expression des gènes à l'origine de la production de la GA₁₂ par des approches moléculaires (RT-qPCR) et histochimiques (lignées rapportrices GUS), couplée à l'étude des mutants, démontrent que la GA₁₂ est produite dans les jeunes tissus en croissance de la plante comme les méristèmes racinaires et apicaux, et les organes floraux. Ensembles, nos résultats révèlent la nature et les propriétés biologiques du transport de GA sur de longues distances chez *Arabidopsis*.

Mots clefs: *Arabidopsis*, gibbérellines, transport, biosynthèse, hormone, croissance

Summary :

Gibberellins (GA) are a class of diterpenoid hormones regulating major aspects of plant growth such as seed germination, root and shoot elongation, flowering and fruit maturation. GA biosynthesis from geranylgeranyl diphosphate is catalyzed by the activity of the terpene cyclase, cytochrome P450 monooxygenase and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase classes, leading to the formation of the active forms of GA, GA₁ and GA₄. Thus GA biosynthesis mutants are dwarfs and late flowering, while GA overdose causes excessive growth and sterility. Therefore plants have evolved efficient mechanisms to maintain optimal levels of bioactive GA, such as the regulation of GA biosynthesis. However, an additional level of regulation may reside in the separation of the GA biosynthetic pathway into distinct cell types and organs that require GA for development. While the transport of another plant growth hormone, auxin, has been well characterized for decades, the transport of GA is less understood. Through micro-grafting, genetic and biochemical approaches, we demonstrate that a GA intermediate, GA₁₂, is mobile over long distances in *Arabidopsis*. Moreover, this transport occurs through vascular tissues of the plant, and may involve specific GA₁₂ transporters. By using transcriptional and translational GUS reporter lines, qRT-PCR analyses and a reverse genetic approach, we show that GA₁₂ is primarily produced in young actively dividing tissues such as root and shoot meristems, and in floral organs. Altogether, our results reveal the nature and the biological properties of GA long distances transport in *Arabidopsis*.

Keywords: *Arabidopsis*, gibberellins, hormone, transport, biosynthesis, growth