



HAL
open science

Rôle des gibbérellines dans l'adaptation des plantes à la disponibilité en azote

Lucie Camut

► **To cite this version:**

Lucie Camut. Rôle des gibbérellines dans l'adaptation des plantes à la disponibilité en azote. Biologie végétale. Université de Strasbourg, 2019. Français. NNT : 2019STRAJ109 . tel-03510221

HAL Id: tel-03510221

<https://theses.hal.science/tel-03510221>

Submitted on 4 Jan 2022

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

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

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes

UPR CNRS 2357

THÈSE présentée par :

Lucie CAMUT

soutenue le : **25 octobre 2019**

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

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

**Rôle des gibbérellines dans l'adaptation
des plantes à la disponibilité en azote**

THÈSE dirigée par :

Dr. ACHARD Patrick DR CNRS, Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr. BELLINI Catherine DR INRA, Institut Jean-Pierre Bourgin, Versailles

Dr. KROUK Gabriel DR CNRS, Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, Montpellier

EXAMINATEUR INTERNE :

Dr. LECHNER Esther IR CNRS, Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Strasbourg

INVITÉS :

Dr. RUFFEL Sandrine CR INRA, Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, Montpellier

Dr. DAVIERE Jean-Michel Maître de conférences, Université de Strasbourg

Remerciements

Je voudrais d'abord remercier Patrick pour son encadrement et son soutien permanent pendant ces trois ans. Tu es toujours disponible pour répondre à mes nombreuses interrogations, et surtout très patient et pédagogue. C'est un réel plaisir de travailler à tes côtés, merci de m'avoir fait confiance.

Je tiens également à dire mille « merci » à Jean-Michel, la bienveillance incarnée. Même si tu n'es pas officiellement mon co-directeur de thèse, tu as toujours été là pour me soutenir, me conseiller et m'aider au quotidien. Tes connaissances scientifiques m'ont beaucoup apportée, toutes nos discussions, scientifiques ou non, sont toujours enrichissantes et pleines d'optimismes. J'admire justement ton optimisme à toute épreuve, je m'en rappellerai dans mes moments de doutes. Merci aussi de m'avoir rappelé quelques règles essentielles de grammaire que j'avais égarées, et appris des expressions et mots de la langue française ~~d'un autre temps~~ que je ne connaissais pas :).

Mes remerciements vont également aux autres membres de la team GA. Lali, ta bonne humeur et ton enthousiasme égalaient chaque jour le bureau et le labo. Merci de m'avoir fait découvrir les spécialités culinaires géorgiennes (surtout le khachapuri !!). Ton aide à la paillasse et au quotidien au labo a largement contribué à mon travail de thèse.

Amelia, it was a pleasure to work with you, we had some fun especially when we teached you some "bad words" and weird expression in French ! I wish you the best !

Mathilde, merci pour tes conseils sur les stats, mais surtout pour tous ces bons moments partagés dans le labo et à l'extérieur, nos discussions interminables sur GOT, notre passion commune pour les mêmes et bien-sûr merci pour tes cookies à tomber par terre ! Je te souhaite beaucoup de réussite pour ta thèse et de prendre du plaisir (à travailler).

Lucas, alias Lulu Junior, cette année est passée tellement (trop) vite ! Les concours « photoshop » ou de lancer de boulettes d'alu vont me manquer, contrairement à l'odeur « surimi » immonde de tes Agro, que tu aimes tant. Je rassure Patrick et Jean-Michel, on a aussi bien travaillé ensemble, toujours dans la bonne humeur (et en musique) à se motiver pour avancer et résoudre les problèmes rencontrés. J'admire la patience dont tu as fait preuve pendant ma rédaction de thèse, merci pour ton soutien et les sessions running le soir ! Je te souhaite aussi beaucoup de réussite pour ta thèse (courage tes clonages sont bientôt finis !). Enfin, je souhaite aussi remercier les anciens membres de l'équipe, Laure, Maxime, Mathilde et Vianney.

Ce travail de thèse n'aurait pas été possible sans nos différents collaborateurs. Barbora Gallova, Peter Hedden, Stephen Thomas et Andrew Phillips, merci pour votre expertise sur le blé. Merci Esther Carrera, pour les nombreux dosages de GAs en Espagne. Merci Sandrine Ruffel pour tes conseils précieux pour les expériences de « split-root » *in vitro* et pour la réalisation des expériences en hydroponie. Thank you Mikhail Schepetilnikov, for your kindness, your help and advices to better understand the TOR signaling pathway. Merci

également à tous les collaborateurs au projet NPF ; Jenia Binenbaum, Eilon Shani, Nikolai Wulff et Hussam Hassan Nour-Eldin.

Mes remerciements vont également aux membres du jury, Catherine Bellini, Esther Lechner, Sandrine Ruffel et Gabriel Krouk, pour avoir accepté d'étudier et évaluer ces trois années de travail.

Je souhaite remercier tout particulièrement nos voisins au 4^e étage, l'ensemble des membres (passés et présents) du laboratoire de Pascal Genschik : Marie-Claire, Esther, Sandra, Marion, Katya, Naomie, Kinda, Adrien, Thibault, Thomas et Léon. Merci pour le partage de nombreux gâteaux, des litres de café (et de crémants...) et discussions toujours intéressantes. Merci aussi pour tous les échanges de matériels et conseils techniques et scientifiques.

Je remercie aussi les plateformes techniques, scientifiques et administratives de l'IBMP pour leurs conseils et leurs aides ; dont Julie Zumsteg et Dimitri Heintz pour les quantifications des GAs, Malek Alioua et Sandrine Koechler de la plateforme de séquençage, Mathieu Erhardt et Jérôme Mutterer de la plateforme de microscopie et Fabrice Braun, Sébastien Staerck, Michel Kerneis et Richard Wagner de plateforme de production végétale.

Ces trois ans de thèse n'étaient pas un long fleuve tranquille, heureusement dans les moments difficiles mais surtout dans les meilleures on peut toujours compter sur de véritables amis. Merci Chloé, Lucie, Loya, Lucas, Valentin, Pierre, Adrien et Cédric pour tous ces moments inoubliables (des pauses café, aux midis à la cafet', aux bars le soir, jusqu'aux sorties canoë mémorables et j'en passe). Chloé et Lucie, quand je vous ai rencontré, je n'aurai jamais imaginé lier une amitié aussi forte avec vous, comme quoi les apparences sont trompeuses. J'espère que cette amitié durera encore longtemps malgré la distance. Loya, ton sourire et ta bonne humeur sont toujours réconfortants, merci pour les petites sessions running avec Lucas, je ne doute pas de ta réussite au master et pour la suite de ton parcours. Valou, tes blagues, souvent pourries, vont me manquer (juste un peu) mais aussi notre passion commune pour Kaamelott ! Bon courage pour la rédaction ! Pierre et Adrien, merci pour vos conseils vélo et votre bonne humeur.

Je n'oublie pas évidemment mes amis « non scientifiques » toujours présents et au soutien malgré la distance, Camille, Pauline, (votre arrosage était parfait ;)), Geoffrey, Maxence, (le chariot vous remercie pour la ballade ;)), Audrey, Camille Koko, Solenn, Mathilde, Kévin, Julien et Michaël.

Enfin, je remercie affectueusement mes parents, Sylvie et Jean-Marie et mon frère, Guillaume. Votre soutien et vos encouragements durant ces trois ans, mais aussi les années antérieures, ont été très précieux et ce malgré mon « sale » caractère et ma mauvaise foi. Merci de nous avoir donné, à Guillaume et moi, la liberté dans le choix de nos études, ainsi que les moyens de les réaliser, et de nous avoir transmis votre passion pour la culture, du potager à la Grande Culture.

Sommaire

Liste des figures et tableaux	1
Liste des annexes.....	3
Abréviations	4
Introduction	9
1. Préambule.....	11
2. Les gibbérellines.....	11
2.1. Découverte des gibbérellines	11
2.2. Métabolisme des GA.....	13
2.2.1. Généralités.....	13
2.2.2. Biosynthèse des GA	15
2.2.2.1. Du GGDP à l'ent-kaurène dans les plastes	17
2.2.2.2. De l'ent-kaurène à la GA ₁₂ /GA ₅₃	17
2.2.2.3. De la GA ₁₂ /GA ₅₃ aux formes bioactives dans le cytoplasme	19
2.2.3. Catabolisme des GA.....	21
2.2.4. Sites de production des GA.....	23
2.3. Voie de signalisation des GA.....	25
2.3.1. Perception des GA.....	25
2.3.2. Les DELLA, protéines clés de la signalisation GA.....	27
2.3.3. Dégradation des DELLA par le protéasome.....	29
2.3.4. Mécanisme d'action des DELLA.....	29
2.3.5. Modifications post-traductionnelles des DELLA.....	31
2.3.6. Influence de la voie de signalisation GA sur l'homéostasie des GA.....	33
2.4. Mise en place de la voie de signalisation GA au cours de l'évolution	35
2.5. Transport des GA.....	37
2.6. Rôle des GA dans le développement végétatif des plantes.....	41
2.7. Rôle des GA dans l'adaptation aux facteurs environnementaux.....	45
2.7.1. La lumière et la température.....	45
2.7.1.1. Effet de la lumière et température sur le métabolisme des GA	45
2.7.1.2. Rôle de la signalisation GA dans la photo- et thermomorphogénèse.....	47
2.7.2. Rôle des GA dans le développement d'endosymbioses.....	49
2.7.3. Rôle des GA dans la nutrition minérale des plantes	51

3. La nutrition azotée des plantes	53
3.1. La nutrition minérale.....	53
3.2. Rôle de l'azote dans le développement des plantes.....	53
3.3. Sources azotées disponibles pour les plantes.....	57
3.4. Absorption, transport et assimilation du nitrate chez <i>Arabidopsis</i>	59
3.5. Signalisation du nitrate.....	63
3.5.1. <i>Signalisation primaire du nitrate</i>	63
3.5.2. <i>Signalisation du nitrate en milieux hétérogènes</i>	65
3.5.3. <i>Rôle de TOR dans la signalisation du nitrate</i>	71
3.5.4. <i>L'oxyde nitrique (NO), une molécule signal</i>	73
3.6. Hormones et nutrition azotée	73
3.6.1. <i>Le nitrate contrôle la biosynthèse des cytokinines</i>	75
3.6.2. <i>Le nitrate contrôle la biosynthèse et le transport d'auxine</i>	75
3.6.3. <i>La signalisation GA contrôle l'assimilation du nitrate</i>	77
4. Évolution de l'agriculture moderne : enjeux économiques, environnementaux et sociétaux	79
4.1. La Révolution Verte.....	79
4.1.1. <i>Progrès de l'industrie chimique</i>	79
4.1.2. <i>Sélection variétale : rôle clé des gibbérellines</i>	81
4.2. Nouvelle Révolution Verte.....	81
4.2.1. <i>La Directive « Nitrate » et sa mise en application en Europe</i>	83
4.2.2. <i>Amélioration de l'efficacité d'utilisation de l'azote (NUE)</i>	85
5. Objectifs de la thèse	87
Résultats	91
Chapitre 1 : Effet du nitrate sur le métabolisme, le transport et la signalisation GA au cours du développement de la plante	93
1. Introduction du chapitre 1.....	93
2. Rôle des GA dans les mécanismes de croissance activés par le nitrate	95
3. Résultats additionnels	133
3.1. Le nitrate n'altère pas la différenciation cellulaire.....	133
3.2. Rôle de TOR et du NO dans la régulation du métabolisme des GA par le nitrate	135
3.2.1. <i>La voie de signalisation TOR régulerait le métabolisme des GA</i>	135
3.2.2. <i>Le métabolisme des GA ne semble pas être régulé pas le NO en réponse au nitrate</i>	137

3.2.3. <i>Le nitrate n'a pas d'effet sur l'abondance de l'enzyme KAO2</i>	141
3.3. Rôle des GA dans l'adaptation des plantes à une disponibilité hétérogène en N.....	141
4. Discussion complémentaire	150
Chapitre 2 : Étude du transport de GA₁₂ sur de longues-distances chez <i>Arabidopsis</i>	159
1. Introduction du chapitre 2.....	159
2. Partie 1 : Caractérisation des transporteurs NPF2.12 et NPF2.13	163
2.1. Résultats	163
2.1.1. <i>Recherche de nouveaux NPF candidats</i>	163
2.1.2. <i>Patrons d'expression de NPF2.12 et NPF2.13</i>	165
2.1.3. <i>NPF2.12 et NPF2.13 sont des transporteurs de GA chez <i>Arabidopsis</i></i>	171
2.1.3.1. <i>Génération et analyse de mutants <i>npf2.12</i> et <i>npf2.13</i></i>	171
2.1.3.2. <i>NPF2.12 et NPF2.13 facilitent le transport basipète de GA₁₂</i>	171
2.1.3.3. <i>La concentration de GA₁₂ dans le phloème diminue chez le mutant <i>npf2.12</i> <i>npf2.13</i></i>	173
2.1.3.4. <i>L'absence de NPF2.12 et NPF2.13 restreint le transport de GA chez des plantes greffées</i>	175
2.1.4. <i>Compétition entre le transport de GA₃ et le nitrate par NPF2.12 et NPF2.13</i>	177
2.2. Discussion.....	179
3. Partie 2 : Rôle du transport acropète de GA ₁₂ en réponse à une élévation de la température ambiante	187
Conclusions générales et perspectives	211
Matériel et méthodes	219
1. Matériel	220
1.1. Matériel vegetal.....	220
1.1.1. <i>Mutants</i>	220
1.1.2. <i>Lignées transgéniques</i>	220
1.2. Souches bactériennes.....	221
1.2.1. <i>Escherichia coli</i>	221
1.2.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	221
2. Méthodes	221
2.1. Techniques relatives aux plantes	221
2.1.1. <i>Conditions de culture pour <i>Arabidopsis</i></i>	221

2.1.1.1. Culture <i>in vitro</i>	221
2.1.1.2. Culture en système « split-root » <i>in vitro</i>	222
2.1.1.3. Culture en système « split-root » en hydroponie non stérile.....	223
2.1.1.4. Culture en sol.....	223
2.1.2. Conditions de culture pour le blé.....	224
2.1.3. Micro-greffes d' <i>Arabidopsis</i>	224
2.1.4. Analyse de la croissance d' <i>Arabidopsis</i> et du blé.....	225
2.1.5. Transformation stable d' <i>Arabidopsis</i>	225
2.2. Techniques relatives à l'ADN.....	226
2.2.1. Extraction de l'ADN.....	226
2.2.2. Extraction de plasmides.....	226
2.2.3. La PCR.....	226
2.2.4. Purification des produits de PCR.....	227
2.2.5. Clonage par le système Gateway.....	227
2.3. Analyse de l'expression des gènes.....	228
2.3.1. Extraction des ARN.....	228
2.3.2. Transcription inverse des ARN.....	229
2.3.3. PCR quantitative.....	229
2.4. Analyse des protéines.....	229
2.4.1. Extraction des protéines totales.....	229
2.4.2. Quantification des protéines.....	230
2.4.3. Séparation et détection des protéines par SDS-PAGE.....	230
2.4.4. Observations de la fluorescence GFP par microscopie confocale.....	231
2.5. Analyses histochimiques.....	231
2.5.1. Coloration GUS.....	231
2.5.2. Coupe transversale de pétiole des feuilles pNPF2.12:GUS.....	231
2.5.3. Coloration au Carmin vert d'iode (réactif de Mirande).....	232
2.6. Purification de polysomes.....	232
2.7. Expression hétérologue en ovocyte de <i>Xenopus laevis</i>	233
2.8. Dosages de GA et de nitrate.....	233
2.8.1. Dosages de GA dans les plantules d' <i>Arabidopsis</i> et chez le blé.....	233
2.8.2. Analyse de la sève brute d' <i>Arabidopsis</i>	234
2.8.3. Analyse de la sève élaborée d' <i>Arabidopsis</i>	235
2.8.4. Dosages de GA et du nitrate dans les ovocytes de <i>Xenopus laevis</i>	235

2.8.4.1. Dosages de GA	235
2.8.4.2. Dosages du nitrate.....	236
2.9. Analyses statistiques.....	236
Bibliographie	239
Annexes	261

Liste des figures et tableaux

- Figure 1.** Plants de riz infectés par *Gibberella fujikuroi*. (p.10)
- Figure 2.** Réponse de plants de maïs nains, *dwarf-1*, à l'application de l'acide gibbérellique. (p.12)
- Figure 3.** Structure chimique générale des gibbérellines. (p.12)
- Figure 4.** Synthèse de l'*ent*-kaurène dans les plastides par deux terpènes synthases. (p.14)
- Figure 5.** Phénotype des mutants *ga1-3* et *ga2* chez *Arabidopsis*. (p.14)
- Figure 6.** Synthèse de la première forme de gibbérelline, la GA₁₂. (p.16)
- Figure 7.** Phénotype des mutants *ga3*, *kao1* et *kao2* chez *Arabidopsis*. (p.16)
- Figure 8.** Conversion de la GA₁₂ en GA bioactives GA₁ et GA₄ et les étapes de désactivation. (p.18)
- Figure 9.** Phénotype des mutants *ga20ox* et de lignées sur-exprimant les GA20-oxidasés chez *Arabidopsis*. (p.18)
- Figure 10.** Phénotype des mutants *ga3ox* chez *Arabidopsis*. (p.20)
- Figure 11.** Phénotype des surexprimeurs de *GA2ox* chez *Arabidopsis*. (p.20)
- Figure 12.** Principales voies du catabolisme des GA. (p.20)
- Figure 13.** Patrons d'expression de la *CPS*, *KAO1* et *KAO2* au cours du développement de la plante chez *Arabidopsis*. (p.22)
- Figure 14.** Patron d'expression des *GA20ox* au cours du développement chez *Arabidopsis*. (p.24)
- Figure 15.** Patron d'expression des *GA3ox* au cours du développement chez *Arabidopsis*. (p.26)
- Figure 16.** Analyse par PCR quantitative de l'expression des *GA2ox* au cours du développement chez *Arabidopsis*. (p.26)
- Figure 17.** Formation du complexe GA-GID1-DELLA. (p.28)
- Figure 18.** Structure d'une protéine DELLA. (p.28)
- Figure 19.** Les protéines DELLA répriment la croissance des plantes. (p.28)
- Figure 20.** Dégradation des protéines DELLA par le protéasome 26S. (p.30)
- Figure 21.** Mécanismes d'action des protéines DELLA. (p.30)
- Figure 22.** Effets de SEC et SPY sur l'activité des protéines DELLA. (p.34)
- Figure 23.** Rétrocontrôle des protéines DELLA sur la voie de biosynthèse et de signalisation des GA. (p.34)
- Figure 24.** Les protéines DELLA de la mousse *Physcomitrella patens* et du lycophyte *Selaginella kraussiana* répriment la croissance d'*Arabidopsis*. (p.36)
- Figure 25.** Arbres phylogénétiques des familles de transporteurs NPF et SWEET chez *Arabidopsis*. (p.38)

- Figure 26.** Transport longue-distance de GA chez le pois (*Pisum sativum*) et *Arabidopsis*. (p.38)
- Figure 27.** Les GA stimulent la croissance aérienne *via* les facteurs de transcription TCP et la croissance racinaire chez *Arabidopsis*. (p.40)
- Figure 28.** Modèle illustrant l'effet de l'auxine (en bleu), des cytokinines (en rouge) et gibbérellines (en jaune) sur la division et la différenciation cellulaire. (p.42)
- Figure 29.** Modèle simplifié du rôle central de PIF4 dans l'intégration de la température et de la lumière. (p.48)
- Figure 30.** Les GA régulent la formation des endosymbioses chez le pois (*Pisum sativum*) et la luzerne (*Medicago trunculata*). (p.50)
- Figure 31.** Effet de l'azote sur la croissance du blé (*Triticum aestivum*) et *Arabidopsis*. (p.54)
- Figure 32.** Systèmes de prélèvement du nitrate chez *Arabidopsis*. (p.58)
- Figure 33.** Transport du nitrate chez *Arabidopsis*. (p.60)
- Figure 34.** Remobilisation du nitrate chez *Arabidopsis*. (p.60)
- Figure 35.** Mécanisme d'assimilation du nitrate dans la cellule. (p.62)
- Figure 36.** Signalisation primaire du nitrate. (p.64)
- Figure 37.** Le système de culture « split-root » et les signalisations associées. (p.66)
- Figure 38.** Les peptides CEP et les CK sont des signaux systémiques de demande en N. (p.68)
- Figure 39.** Évolution des rendements en blé en Europe. (p.78)
- Figure 40.** Mutants de la Révolution Verte. (p.80)
- Figure 41.** Bonnes pratiques agricoles pour réduire la pollution de l'eau par les nitrates. (p.82)
- Figure 42.** Cartes des zones vulnérables aux nitrates (NVZ) dans l'Union Européenne en 2015. (p.82)
- Figure 43.** Évolution de la qualité des eaux souterraines et de surface dans l'Union Européenne. (p.84)
- Figure 44.** Effet du nitrate sur la différenciation cellulaire. (p.132)
- Figure 45.** Rôle de l'activité TOR sur l'accumulation de la protéine RGA en réponse à un traitement nitrate. (p.136)
- Figure 46.** Accumulation de la protéine RGA chez le mutant *na1 nia2* en réponse à un traitement nitrate. (p.140)
- Figure 47.** Accumulation de la protéine KAO2-GFP en réponse à un traitement nitrate. (p.140)
- Figure 48.** Étude du rôle de la signalisation GA dans l'adaptation des plantes à une disponibilité hétérogène en nitrate, grâce au système « split-root » *in vitro*. (p.142)
- Figure 49.** Étude du rôle de la signalisation GA dans l'adaptation des plantes à une disponibilité hétérogène en nitrate, grâce au système « split-root » en hydroponie. (p.148)
- Figure 50.** Analyse par RT-qPCR de l'expression de *NPF2.13*. (p.162)

Figure 51. Transport de GA dans des oocytes de *Xenopus laevis* exprimant *NPF2.12* et *NPF2.13* (réalisé par Nikolai Wulff). (p.164)

Figure 52. Patron d'expression des fusions transcriptionnelles *pNPF2.12:GUS* et *pNPF2.13:GUS*. (p.166)

Figure 53. Patron d'expression de *NRT1.7 (NPF2.13)* chez des plantes *pNRT1.7:GUS* (d'après Fan et al., 2009). (p.168)

Figure 54. Analyse par RT-qPCR de l'expression de *NRT1.7 (NPF2.13)* (Fan et al., 2009). (p.168)

Figure 55. Analyse par RT-qPCR de l'expression de *NPF2.12* et *NPF2.13* dans les feuilles. (p.168)

Figure 56. Validation génétique des mutants *npf2.12* (SALK_138987) et *npf2.13* (SALK_022429). (p.170)

Figure 57. *NPF2.12* et *NPF2.13* facilitent le transport de GA_{12} des 1^{ère} feuilles formées vers les racines. (p.172)

Figure 58. *NPF2.13* facilite le transport de GA_{12} des vieilles feuilles vers les jeunes feuilles. (p.174)

Figure 59. *NPF2.12* et *NPF2.13* transportent la GA_{12} dans le phloème. (p.174)

Figure 60. *NPF2.12* et *NPF2.13* participent au transport basipète des GA. (p.176)

Figure 61. Évaluation d'une compétition entre le transport de GA_3 et de nitrate par *NPF2.12* et *NPF2.13* (réalisé par Nikolai Wulff). (p.176)

Figure 62. Stratégie de criblages pour rechercher des plantes mutantes affectées dans le transport longue-distance de GA_{12} . (p.214)

Tableau 1. Protéines interagissant avec les DELLA (DIP). (p.32)

Tableau 2. Éléments minéraux essentiels à la majorité des plantes vasculaires et leurs fonctions. (p.52)

Tableau 3. Sites de prédiction des événements des nitrations de tyrosine et des S-nitrosylations de cystéine chez les enzymes impliquées dans les premières étapes de la biosynthèse des GA et de catabolisme de la GA_{12} . (p.138)

Liste des annexes

Annexe 1. Amorces utilisées pour les clonages. (p.262)

Annexe 2. Amorces utilisées pour les RT-qPCR. (p.262)

Annexe 3. Amorces utilisées pour les RT-PCR. (p.265)

Annexe 4. Amorces utilisées pour les génotypages. (p.265)

Annexe 5. Revue-communication publiée dans *Molecular Plant*. (p.266)

Abréviations

°C	Degré Celsius
2-ODD	dioxygénases 2-oxoglutarate-dépendantes
ABA	Acide Abscissique
ABC	ATP-BINDING CASSETTE
ABCB ou G	ATP-BINDING CASSETTE TRANSPORTER SUBFAMILY B ou G
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AM	endosymbioses mycorhiziennes à arbuscules
amiR	microARNm
ARNc	Acide Ribonucléique complémentaire
ARNm	Acide Ribonucléique Messenger
ARR1	ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR1
ARSK1	ROOT-SPECIFIC KINASE 1
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
BR	Brassinostéroïdes
C	carbone
C.	Contrôle
CBL	CALCINEURIN B-LIKE PROTEIN
CEP	C-TERMINALLY ENCODED PEPTIDES
CEPD	CEP DOWNSTREAM
CERP	CEP RECEPTOR
CIMMYT	International Maize and Wheat Improvement Center
CIPK	CBL-INTERACTION PROTEIN KINASE
CK	Cytokinines
CLC	CHLORIDE CHANNELS
cm	centimètre
Col-0	Columbia 0
CPK	CALCIUM-SENSOR PROTEIN KINASE
CPS	<i>ent</i> -copalyl diphosphate synthase
Ct	contrôle
CYCB1	cyclineB1
D8	DWARF8
DIP	DELLA-Interacting Proteins
dNTP	mélange des 4 désoxyribonucléotide triphosphate
DO	Densité Optique
DTT	dithiothréitol
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétraacétique
EGTA	Acide Ethylène Glycol Tétraacétique
e.g.	<i>exempli gratia</i> , par exemple
ET	éthylène

EUI	ELONGATED UPPERMOST INTERNODE
FIT	FER-like IRON-DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR
FT ou TF	facteurs de transcription
GA	Gibbérellines
GA13ox	GA13-oxydase
GA20ox	GA20-oxydases
GA2ox	GA2-oxydases
GA3ox	GA3-oxydase
GAI	GA-INSENSITIVE
GAMT1, 2	Gibbérelline Methyltransferase 1, 2
GFP	Green Fluorescent Protein
GGDP	géranyl-géranyl diphosphate
GID1, 2	GA INSENSITIVE DWARF 1, 2
Gln	glutamine
Glu	glutamate
GRF4	GROWTH-REGULATOR FACTOR 4
GS	glutamine synthétase
GUS	beta-Glucuronidase
h	heure
ha	hectare
HATS	système de transport de haute affinité
IAA	indole-3-acetic acide
IAA19	INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 19
IPP	isopentenyl diphosphate
IPT	ISOPENTENYL TRANSFERASE
IRT1	IRON-REGULATED TRANSPORTER1
JA	Acide Jasmonique
KAO	acide ent-kaurénoïque oxydase
Km	constante de Michaelis
KO	<i>ent</i> -kaurène oxydase
KS	<i>ent</i> -kaurène synthase
L	litre
LATS	système de transport de faible affinité
LB	Luria-Bertani
Ler	<i>Landsberg erecta</i>
MEP	méthylérythritol phosphate
MFS	MAJOR FACILITATOR SUPERFAMILY
mg	milligramme
mL	millilitre
mM	millimolaire
mm	millimètre

MVA	mévalonate
N	azote
N₂	diazote
ng	nanogramme
NH₃	ammoniaque
NH₄⁺	ammonium
NiR	nitrite réductase
nL	nanolitre
NLP	NIN-LIKE PROTEIN
NO	oxyde nitrique
NO₂⁻	nitrite
NO₃⁻	nitrate
NPF	NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER
NR	nitrate réductase
NRT2	NITRATE TRANSPORTER 2
NUE	Nitrogen Use Efficiency / efficacité d'utilisation de l'azote
NVZ	zones vulnérables au nitrate
OGT	<i>O-linked N-acetylglucosamine</i> transférase
oligoDT	acide oligodesoxythymidylique P450
p/v	poids/volume
P450	cytochromes P450 mono-oxygénases
PAC	paclobutrazol
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PepT/PTR	PEPTIDE TRANSPORTER
pH	Potentiel Hydrogène
Phy	phytochromes
PIF	PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR
PIN	PIN-FORMED
PNR	Primary Nitrate Response
POFUT	O-fucosyltransférase
POT	PROTON-COUPLED OLIGOPEPTIDE TRANSPORTER
Pp	<i>Physcomitrella patens</i>
PRE1	PACLOBUTRAZOL RESISTANT 1
PRO	PROCERA
Ps	<i>Pisum sativum</i>
psi	pound per square inch
QC	centre quiescent
RAPTOR	REGULATORY ASSOCIATED PROTEIN OF TOR
RGA	REPRESSOR OF ga1-3
RGL1, 2, 3	RGA-LIKE 1, 2, 3
Rht	REDUCED HEIGHT

rpm	rotation par minute
RT ou TR	régulateurs transcriptionnels
SA	Acide Salicylique
SCF	SKP1, CULLIN, F-BOX
SCR	SCARECROW
s.d.	standard deviation / erreur standard
SD1	SEMIDWARF1
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
sec	seconde
SEC	SECRET AGENT
SHY2	SHORT HYPOCOTYL2
Sk	<i>Selaginella kraussiana</i>
SL	Strigolactones
SLAC/SLAH	SLOW ANION ASSOCIATED CHANNEL HOMOLOG
SLC15	SOLUTE CARRIER 15
SLN1	SLENDER1
SLR1	SLENDER RICE1
SLY1	SLEEPY1
SNE	SNEEZY
Sp.	Split
SPY	SPINDLY
TAA1	TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1
TAE	Tris-Acétate-EDTA
TAR1, 2	TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE RELATED 1, 2
TBS	Tris-Buffered Saline
TCP	TEOSINTE BRANCHED 1, CYCLOIDEA, PROLIFERATING CELL FACTOR
TORC	complexe TOR
TPS	terpènes synthase
Tris	2-Amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol
tZ	trans-zéatine
UHPLC-MS	chromatographie liquide à ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse
uORF	upstream open reading frame / cadre de lecture ouvert en amont du cadre principal
UV	Rayonnement Ultraviolet
V	Volts
v/v	Volume / Volume
YUC8	YUCCA 8
µg	microgramme
µL	microlitre
µM	micromolaire
µm	micromètre

Introduction



Figure 1. Plants de riz infectés par *Gibberella fujikuroi*.

A. À gauche, plants infectés par le champignon, présentant un allongement excessif des tiges et un jaunissement des feuilles, comparés aux plants de riz sains, à droite.

B. Gigantisme d'un plant de riz infecté.

(International Rice Research Institute, IRRI)

1. Préambule

Dans des conditions naturelles, en tant qu'organismes sessiles, les plantes ont développé la capacité d'ajuster leur physiologie et leur architecture, en réponse aux diverses conditions environnementales dans laquelle elles se développent. Ainsi, les plantes perçoivent constamment les changements de l'environnement tels que la quantité et qualité de la lumière, la température, la disponibilité des nutriments, ou encore les attaques de pathogènes et herbivores. Ces informations externes sont intégrées au programme génétique de la plante, afin d'optimiser sa croissance et son développement, et de contribuer à la survie de l'espèce.

Il est maintenant admis que les phytohormones à travers leur voie de signalisation, constituent un niveau d'intégration des signaux environnementaux et développementaux et modulent la plasticité des plantes en réponses adaptatives face à ces variations de l'environnement. Ces phytohormones correspondent à de petites molécules organiques, présentent à de faibles concentrations et qui agissent localement près de leur site de production, ou dans les tissus distants. Les phytohormones regroupent l'auxine (IAA), les cytokinines (CK), les gibbérellines (GA), l'acide abscissique (ABA), l'éthylène (ET), les brassinostéroïdes (BR), les strigolactones (SL), l'acide jasmonique (JA), l'acide salicylique (SA), mais aussi d'autres composés organiques comme les peptides ou les sucres. Beaucoup de mécanismes biologiques dont la croissance, le développement et la défense sont régulés de manière similaire par de multiples hormones et impliquent des réseaux complexes de régulation.

Lors de ma thèse, je me suis principalement intéressée aux gibbérellines, hormone de croissance majeure chez les plantes.

2. Les gibbérellines

2.1. Découverte des gibbérellines

L'origine des recherches sur les gibbérellines remonte à la fin du 19^e siècle au Japon. Certaines cultures de riz présentent les symptômes de la maladie du « bakanae » ou « herbe folle » qui consistent en une élongation excessive des entre-nœuds et une perte sévère des rendements en grains (Figure 1). Les phytopathologistes attribuent cette maladie au champignon phytopathogène, *Gibberella fujikuroi* (aujourd'hui renommé *Fusarium fujikuroi*) (Hori, 1898; Sawada, 1912). Par la suite, en 1926, Eiichi Kurosawa obtient un filtrat semi-purifié de culture de *Gibberella fujikuroi* et démontre que celui-ci induit l'élongation de la tige de riz sains, mais aussi d'autres cultures importantes à l'époque, comme l'orge et le soja (Kurosawa, 1926). Ce n'est qu'en 1938 que la molécule active est isolée sous sa forme



Figure 2. Réponse de plants de maïs nains, *dwarf-1*, à l'application de l'acide gibbérellique.

L'application exogène d'acide gibbérellique augmente sensiblement la croissance de plants de maïs sauvage (gauche).

En revanche, la croissance du mutant *dwarf-1* est restaurée par l'acide gibbérellique, soulignant l'importance de la présence de gibbérellines endogènes chez les plantes pour assurer une croissance optimale. (Phinney, 1957)

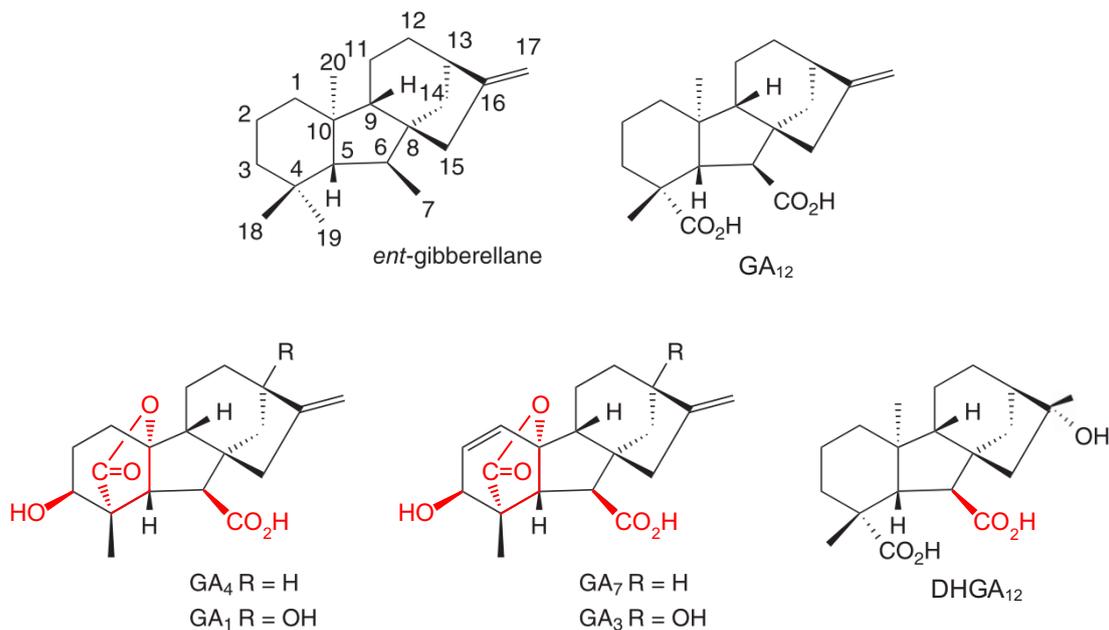


Figure 3. Structure chimique générale des gibbérellines.

En haut à gauche, squelette carboné de l'*ent*-gibbérellane, commun à toutes les gibbérellines.

À droite, structure chimique de la première gibbérelline formée inactive, la GA₁₂ (C₂₀).

En bas à gauche, représentation des principales GA bioactives. La GA₁ et la GA₃ diffèrent de la GA₄ et GA₇ par un groupement hydroxyle en C₁₃ (R). Les GA bioactives possèdent toutes 3 structures chimiques essentielles pour leur liaison au récepteur GID1 (en rouge) : une fonction lactone, un groupement carboxyle en C₆ et hydroxyle en C₃.

En bas à droite, structure chimique de la DHGA₁₂ qui ne possède que le groupement hydroxyle en C₃ par rapport aux autres GA bioactives.

(Adapté de Hedden et al., 2016)

cristalline et appelée « gibbérelline A » (et donnera l'abréviation GA) d'après le nom scientifique du champignon phytopathogène (Yabuta et Sumiki, 1937).

Après la Seconde guerre mondiale, l'intérêt pour cette « gibbérelline » stimulant la croissance des plantes, gagne l'Occident et notamment les États-Unis et l'Angleterre. Un groupe anglais réussit à purifier un acide gibbérellique ayant des propriétés chimiques différentes de la gibbérelline A (Curtis et Cross, 1954). Dans le même temps, l'échantillon contenant la gibbérelline A est une nouvelle fois analysé et contient en réalité un mélange de trois gibbérellines alors nommées GA₁, GA₂ et GA₃ (Takahashi et al., 1955). Il apparaît alors que l'acide gibbérellique et la GA₃ sont la même molécule et la forme principalement sécrétée par *Gibberella fujikuroi* (Curtis et Cross, 1954). Encore aujourd'hui, ces deux noms sont conservés pour cette molécule.

En parallèle des travaux sur les micro-organismes, des recherches sont entreprises chez les plantes. L'application exogène de GA₃ sur des plantules de pois et maïs naines restaure de façon notable l'élongation des entre-nœuds, suggérant ainsi une production de gibbérellines par les plantes (Brian et Hemming, 1955; Phinney, 1957) (Figure 2). Cette hypothèse est alors vérifiée par Margaret Radley. Après avoir appliqué des extraits de pois sauvages sur des pois nains, elle observe une induction de croissance chez ces derniers et démontre que celle-ci est similaire à celle obtenue en réponse à l'acide gibbérellique. Elle identifie ensuite, par chromatographie, des substances « gibberellin-like » dans des extraits de plantules de pois (Radley, 1956). La démonstration définitive de la présence de gibbérellines endogènes chez les plantes est apportée par Jake MacMillan et P.J. Suter qui isolent la GA₁ dans des graines immatures d'haricots (*Phaseolus coccineus*) (MacMillan et Suter, 1958).

Jusqu'à présent, 137 gibbérellines ont été identifiées chez les plantes, champignons et bactéries. Elles sont nommées gibbérellines A_x ou GA_x, où x correspond au nombre attribué selon l'ordre de leur découverte.

2.2. Métabolisme des GA

2.2.1. Généralités

Les gibbérellines appartiennent à la grande classe des acides carboxyliques diterpénoides trétracycliques. Leur squelette est basé sur l'*ent*-gibbérellane et composé de 19 ou 20 atomes de carbone (gibbérelline en C-19 ou C-20) (Figure 3). La grande majorité des GA représente des précurseurs ou catabolites des formes actives : GA₁, GA₃, GA₄, GA₇, qui partagent des structures chimiques communes, nécessaires pour se lier à leur récepteur GID1 (GA INSENSITIVE DWARF 1) et induire les réponses biologiques (Figure 3)

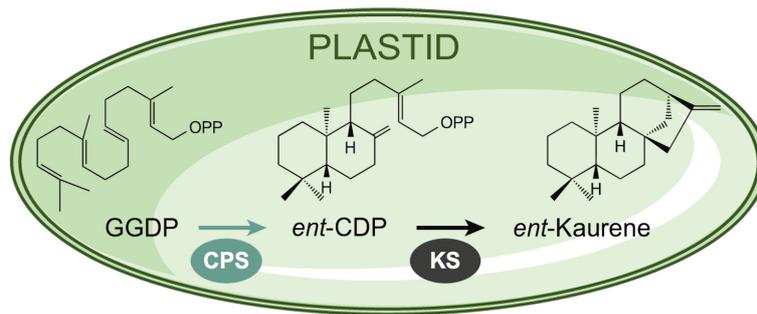


Figure 4. Synthèse de l'ent-kaurène dans les plastes par deux terpènes synthases.
 CPS, *ent*-copalyl diphosphate synthase ; KS, *ent*-kaurène synthase
 (Adapté de Hedden et Thomas, 2012)

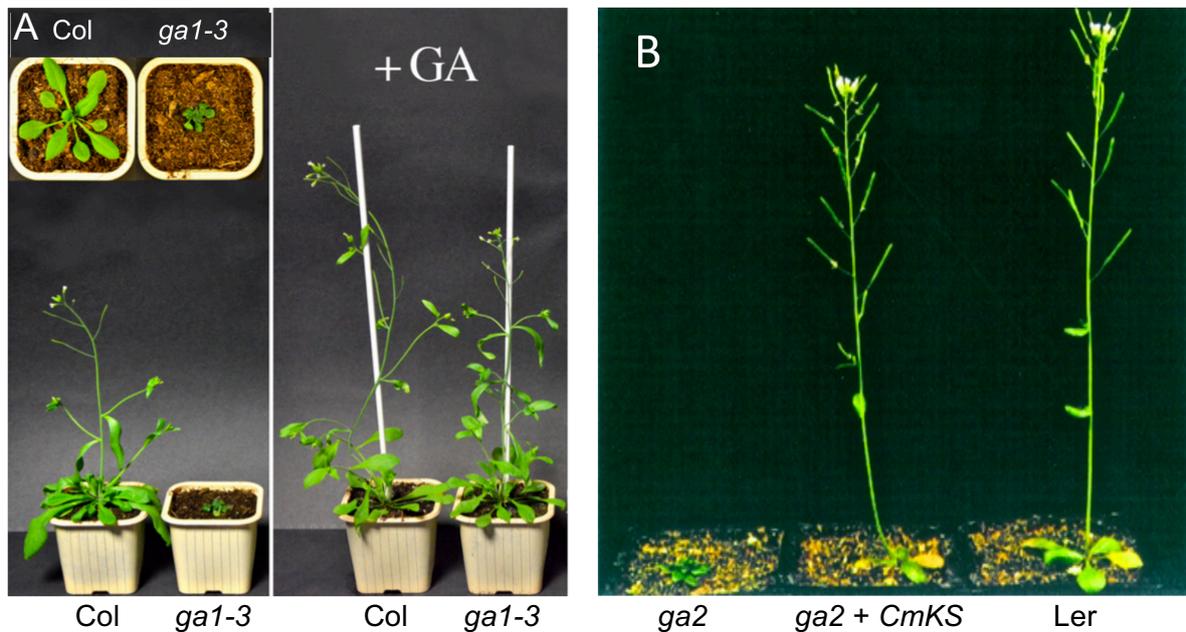


Figure 5. Phénotype des mutants *ga1-3* et *ga2* chez *Arabidopsis*.

A. À gauche, phénotype du mutant *ga1-3*, comparé à une plante sauvage (Ler), où le gene codant pour la CPS est muté. À droite, l'apport exogène de GA₃ (GA) restaure la croissance du mutant *ga1-3*.

B. Phénotype du mutant *ga2*, gène codant pour la KS. Ce phénotype peut être complémenté par la KS du potiron (*Cucurbita maxima*). Plantes âgées de 35 jours.

(Crédit, Patrick Achard; Yamaguchi et al., 1998)

(Ueguchi-Tanaka et al., 2005; Yamaguchi, 2008; Hedden et Thomas, 2012). Récemment, une nouvelle forme bioactive, la DHGA₁₂, a été identifiée mais ses activités biologiques restent à éclaircir (Liu et al., 2019a; Hedden, 2019). L'acide gibbérellique GA₃ constitue la forme bioactive principalement synthétisée par *Gibberella fujikuroi*, alors que les GA₁ et GA₄ sont prédominantes chez les plantes. Une plante ne produisant pas de GA présente un phénotype de nanisme sévère, des feuilles de couleur vert-foncé, ainsi qu'une rosette compacte, une stérilité mâle importante et une faible germination des graines (Koornneef et van der Veen, 1980).

La suite de cette partie décrira uniquement le métabolisme des GA chez les plantes. Celui des champignons et bactéries est décrit en détails dans les revues de Yamaguchi, 2008; Hedden et Thomas, 2012; Hedden et Sponsel, 2015.

La biosynthèse et le catabolisme des GA ont été élucidés grâce à différents procédés tels que l'analyse par chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse des contenus en GA, la purification des enzymes impliquées, la caractérisation de mutants déficients en GA chez le riz et *Arabidopsis*, ainsi que le clonage des gènes correspondants (Hedden et Phillips, 2000; Yamaguchi, 2008).

2.2.2. Biosynthèse des GA

La biosynthèse des GA débute par la formation d'IPP (isopentenyl diphosphate) et sa conversion en GGDP (géranyl-géranyl diphosphate), précurseur à 20 atomes de carbone, commun à de nombreux diterpènes. Deux voies distinctes sont à l'origine de la synthèse de l'IPP : la voie du mévalonate (MVA) dans le cytoplasme et la voie du méthylérythritol phosphate (MEP) dans les plastes. Cette dernière fournit l'essentiel de l'IPP pour la synthèse de GA (Kasahara et al., 2002).

La suite de la biosynthèse se déroule en 3 étapes dans différents compartiments subcellulaires:

1. La conversion du GGDP en *ent*-kaurène par des terpènes synthases (TPS) dans les plastes,
2. La conversion de l'*ent*-kaurène en GA₁₂/GA₅₃ par des cytochromes P450 mono-oxygénases (P450) à la surface des membranes plastidiales et du réticulum endoplasmique,
3. La conversion des GA₁₂/GA₅₃ en gibbérellines bioactives, respectivement GA₄ et GA₁, dans le cytoplasme par des dioxygénases 2-oxoglutarate-dépendantes (2-ODD).

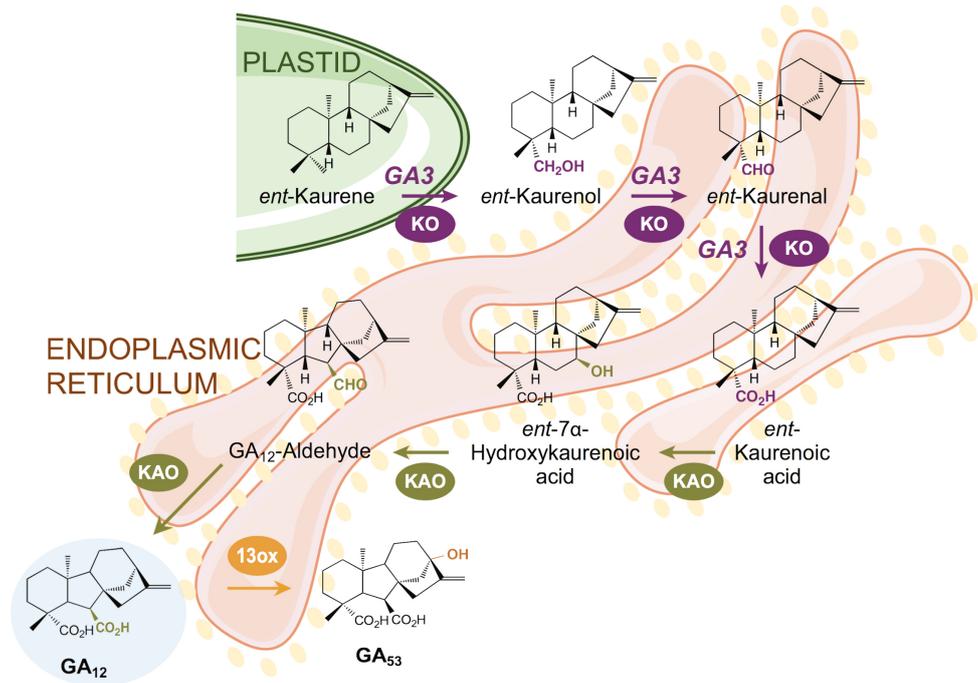


Figure 6. Synthèse de la première forme de gibbérelline, la GA₁₂.
 KO, *ent*-kaurène oxydase ; KAO, acide *ent*-Kaurénoïque oxydase.
 (Adapté de Hedden et Thomas, 2012)

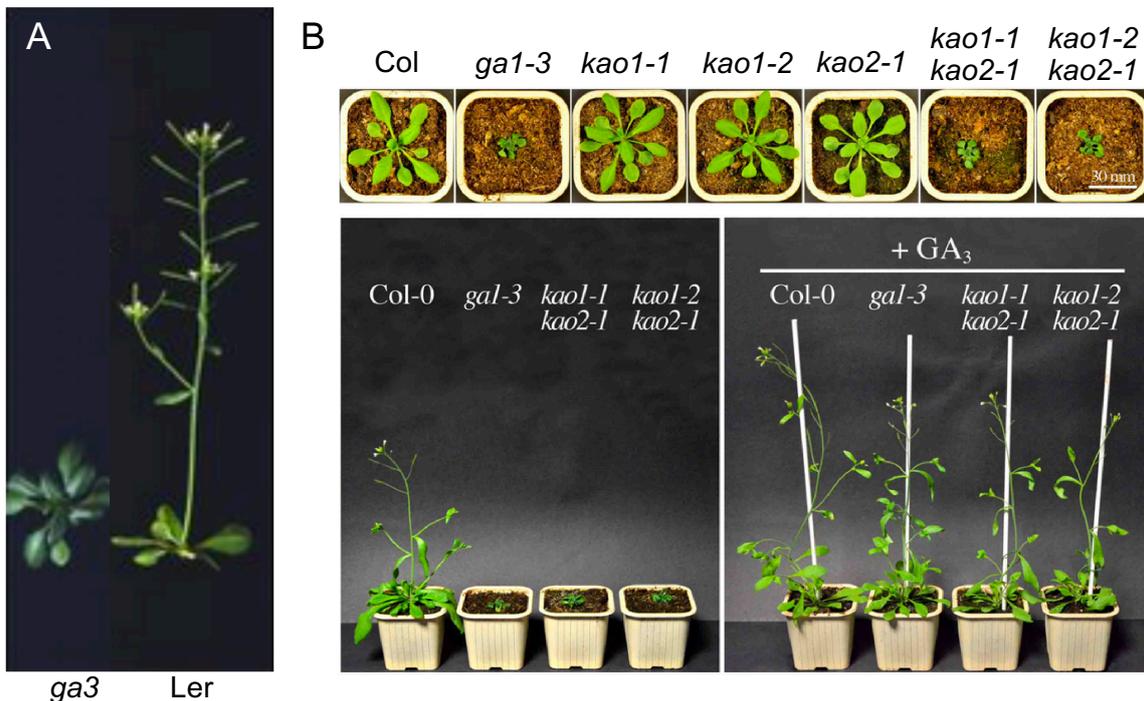


Figure 7. Phénotype des mutants *ga3*, *kao1* et *kao2* chez *Arabidopsis*.

A. Phénotype du mutant *ga3*, où le gène codant pour la KO est altéré.

B. Phénotype des simples et doubles mutants *kao* âgés de 21 jours pour le stade rosette, et 40 jours pour le stade plus avancé après floraison. Les simples mutants *kao1* et *kao2* sont identiques à la plante sauvage Col-0. Les doubles mutants *kao1 kao2* sont nains, similaires au mutant de biosynthèse *ga1-3*. L'application de GA₃ restaure entièrement la croissance des doubles mutants *kao1 kao2*.
 (Helliwell et al., 1998; Regnault et al., 2014)

2.2.2.1. Du GGDP à l'ent-kaurène dans les plastes

Le géranyl-géranyl diphosphate est converti en *ent*-kaurène en deux étapes successives de cyclisation, impliquant deux terpènes synthases, la *ent*-copalyl diphosphate synthase (CPS) et la *ent*-kaurène synthase (KS) (Figure 4), qui produisent l'*ent*-copalyl diphosphate (*ent*-CDP), puis l'*ent*-kaurène, respectivement. Chacune de ces enzymes est codée par un gène unique chez *Arabidopsis* et le riz. Les simples mutants (*ga1* pour la CPS et *ga2* pour la KS) présentent un phénotype caractéristique d'un mutant déficient en production de GA, à savoir un fort nanisme (Figure 5). Ce phénotype peut être restauré par un apport exogène de GA bioactives (Koornneef et van der Veen, 1980; Sun et Kamiya, 1994; Yamaguchi et al., 1998). De manière surprenante, la surexpression de ces deux enzymes augmente la production d'*ent*-kaurène mais pas les niveaux d'accumulation des GA bioactives, ce qui résulte en un phénotype identique aux plantes sauvages. Ces deux premières étapes de la biosynthèse ne sont donc pas limitantes (Fleet et al., 2003).

2.2.2.2. De l'ent-kaurène à la GA₁₂/GA₅₃

Une fois synthétisé, l'*ent*-kaurène est immédiatement oxydé en GA₁₂ *via* plusieurs étapes successives catalysées par deux cytochromes P450 mono-oxygénases de la sous famille des CYP701A : la KO (*ent*-kaurène oxydase) et la KAO (acide *ent*-kaurénoïque oxydase) (Figure 6).

La KO, convertit l'*ent*-kaurène en acide *ent*-kaurénoïque en trois étapes d'oxydation successives. Cette enzyme possède une double localisation, au niveau de la membrane externe des plastes et sur la membrane du réticulum endoplasmique (Figure 6). Chez *Arabidopsis* et le riz, un gène unique code pour la KO et le mutant *ko* (*ga3*) est nain (Figure 7A). Néanmoins, comme pour la CPS et KS, des plantes qui sur-expriment la KO sont semblables aux plantes sauvages. Des inhibiteurs ou ralentisseurs de croissance utilisés en agriculture, comme le paclobutrazol (PAC) ou l'uniconazol, ciblent cette étape de la biosynthèse des GA. Ces inhibiteurs ne sont pas spécifiques aux GA et affectent également d'autres P450 impliquées dans le métabolisme des brassinostéroïdes et de l'acide abscissique (Helliwell et al., 1999, 1998).

La KAO (CYP88A) catalyse la formation de la GA₁₂ par également trois étapes successives d'oxydation à partir de l'acide *ent*-kaurénoïque précédemment formé (Figure 6). Chez le riz l'enzyme KAO est codée par un gène unique, tandis que le génome d'*Arabidopsis* possède deux gènes de fonction redondante (*AtKAO1* et *AtKAO2*) (Helliwell et al., 2001; Regnault et al., 2014). Chez *Arabidopsis*, les simples mutants *kao1* et *kao2* sont phénotypiquement

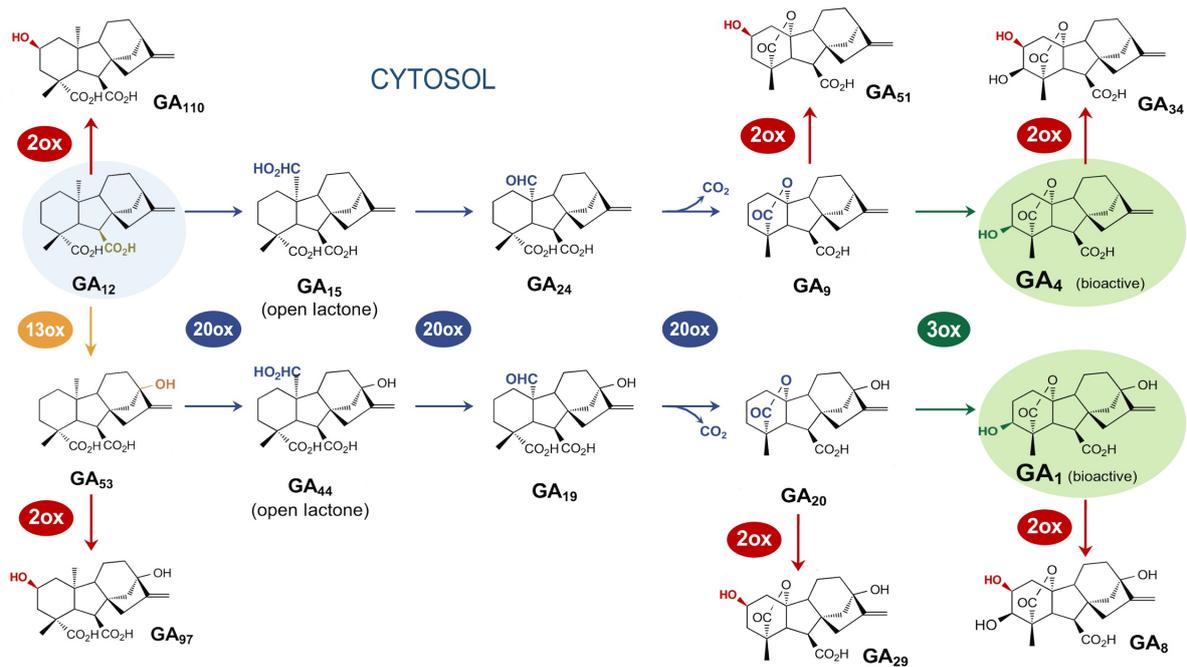


Figure 8. Conversion de la GA₁₂ en GA bioactives GA₁ et GA₄ et les étapes de désactivation.

Étapes de biosynthèse par les 13ox (en jaune), GA13-oxydases ; 20ox (en bleu), GA20-oxydases ; 3ox (en vert), GA3-oxydases.

Étape de désactivation (en rouge) par les 2ox, GA2-oxydases.

Les GA bioactives GA₁ et GA₄ sont entourées en vert.

(Adapté de Yamaguchi, 2008; Hedden et Thomas, 2012)



Figure 9. Phénotype des mutants *ga20ox* et de lignées sur-exprimant les GA20-oxydases chez *Arabidopsis*.

A. Phénotypes des simples mutants *ga20ox1*, *ga20ox2* et *ga20ox3* ainsi que différentes combinaisons de doubles et triples mutants *ga20ox*, comparés à une plante sauvage (Col-0) et au mutant *ga1-3*. Les plantes sont âgées de 44 jours.

B. Les plantes sur-exprimant des GA20ox (20ox) sont plus grandes que la plante sauvage (Col-0). OE, sur-expresseur. Plantes cultivées en jours courts, et âgées de 63 jours.

(Coles et al., 1999; Plackett et al., 2012)

identiques aux plantes sauvages, contrairement au double mutant *kao1 kao2* qui présente un nanisme sévère, démontrant ainsi la redondance fonctionnelle de ces deux enzymes (Figure 7B). Néanmoins, *KAO2* est relativement plus exprimé que son homologue *KAO1* et le niveau d'accumulation plus faible de GA_{12} chez le mutant *kao2* (par rapport au mutant *kao1*), suggère que l'enzyme *KAO2* a un rôle prépondérant chez *Arabidopsis* (Regnault et al., 2014).

À partir de cette étape, la biosynthèse des GA se sépare en deux voies parallèles. En effet, la GA_{12} peut subir une hydroxylation en position C-13 par l'action d'un cytochrome P450 mono-oxygénase, la *GA13-oxydase* (*GA13ox*), formant la GA_{53} (Figure 8). On parle alors de la voie 13-hydroxylée qui aboutira à la production de la GA bioactive GA_1 . Lorsque la GA_{12} est directement oxydée en position C20, la GA bioactive synthétisée est la GA_4 . Ces deux formes possèdent la même bioactivité, leur prédominance dépend uniquement de la présence et de l'activité de la *GA13-oxydase*, qui varie selon les espèces et les tissus. En général, cette branche 13-hydroxylée est dominante chez les monocotylédones, comme chez le blé et le riz où la *GA13-oxydase* a été caractérisée (Webb et al., 1998; Magome et al., 2013). De manière intéressante la *GA13-oxydase* présente chez *Arabidopsis* catalyse la 13-hydroxylation de l'acide *ent*-kaurénoïque à la place de la GA_{12} , mais la présence de GA 13-hydroxylées est plutôt rare (Nomura et al., 2013).

2.2.2.3. De la GA_{12}/GA_{53} aux formes bioactives dans le cytoplasme

Les dernières étapes de la biosynthèse des GA impliquent des enzymes de la famille des dioxygénases 2-oxoglutarate-dépendantes (2-ODD), enzymes solubles localisées dans le cytoplasme. Contrairement aux premières étapes de la biosynthèse, les 2-ODDs impliquées dans ces ultimes étapes sont codées par des familles multigéniques, dont l'expression des gènes peut montrer des profils différents, alors qu'ils présentent souvent des fonctions redondantes.

Les GA_{12} et GA_{53} sont converties respectivement en GA_9 et GA_{20} par trois étapes successives d'oxydation en position C-20 par les *GA20-oxydases* (*GA20ox*), lors de la dernière étape le carbone 20 est perdu sous forme de CO_2 produisant des C19-GA (Figure 8). Cinq gènes *GA20ox* (*GA20ox1-GA20ox5*) ont été identifiés chez *Arabidopsis*. Les analyses des simples, doubles et triples mutants *ga20ox* mettent en évidence que le mutant *ga20ox1* a un phénotype semi-nain et le double mutant *ga20ox1 ga20ox2* ainsi que le triple mutant *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3* sont graduellement et sévèrement affectés dans leur croissance (Figure 9A) (Phillips et al., 1995; Rieu et al., 2008b). En revanche les simples et le double mutant *ga20ox4* et *ga20ox5*, identiques au sauvage, montrent leur rôle mineur pour la croissance aérienne. Par ailleurs, les plantes sur-exprimant les *GA20ox* développent une croissance accrue par rapport

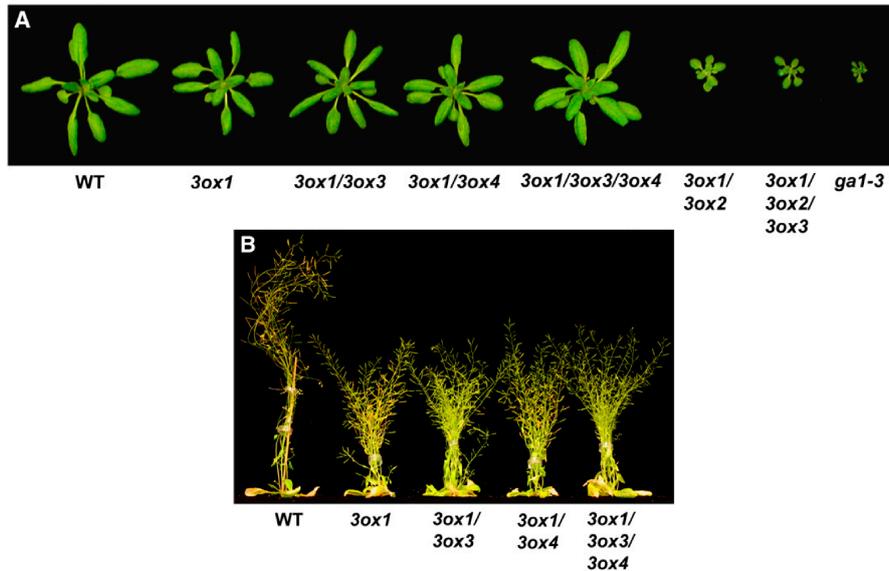


Figure 10. Phénotype des mutants *ga3ox* chez *Arabidopsis*.

Phénotype des mutants *ga3ox* au stade rosette (24 jours) (A) et à un stade plus avancé, après floraison (44 jours) (B). Les gènes *GA3ox1* et *GA3ox2* ont un rôle prépondérant pour la croissance des plantes. (Hu et al., 2008)



Figure 11. Phénotype des surexprimeurs de *GA2ox* chez *Arabidopsis*.

Les plantes sur-exprimant *GA2ox7* et *GA2ox8* présentent un phénotype nain plus ou moins sévère comparé à une plante sauvage (Col-0). Plantes âgées de 48 jours. (Adapté de Schomburg et al., 2003)

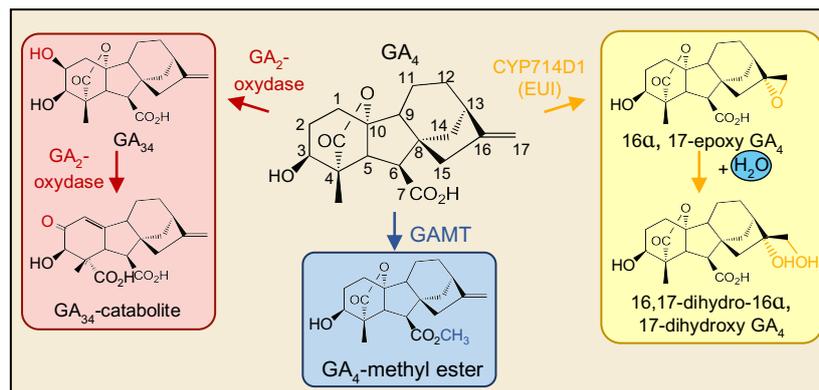


Figure 12. Principales voies du catabolisme des GA.

La désactivation des GA par l'action des *GA2-ox* est bien caractérisée. Un second mécanisme de désactivation des GA, décrit dans les graines d'*Arabidopsis*, implique les méthyltransférases (*GAMT1* et 2). Enfin, un troisième mécanisme de désactivation des GA a été mis en évidence chez le riz, et implique le cytochrome P450 mono-oxygénase *EUI*. (Adapté de Bishop et al., 2015)

aux plantes contrôles, soulignant que ces étapes sont limitantes pour la synthèse de GA (Figure 9B) (Coles et al., 1999; Plackett et al., 2012).

La dernière étape de la biosynthèse des GA est catalysée par une autre classe de 2-ODD, les GA3-oxydases (GA3ox) (Figure 8). Ces enzymes convertissent les GA₉ et GA₂₀ en formes bioactives GA₄ et GA₁, respectivement, par oxydation du carbone en position C3. Le génome d'*Arabidopsis* code pour quatre GA3-oxydases (GA3ox1 à GA3ox4). Comme pour le mutant *ga20ox1*, le simple mutant *ga3ox1* est semi-nain. Au contraire, les autres simples mutants *ga3ox* ont une croissance semblable à une plante sauvage, illustrant une redondance fonctionnelle. Il est intéressant de noter que le double mutant *ga3ox1 ga3ox2* est plus petit que le simple mutant *ga3ox1* (Figure 10). Les gènes GA3ox1 et GA3ox2 ont donc un rôle prépondérant dans la croissance des plantes (Mitchum et al., 2006; Hu et al., 2008).

2.2.3. Catabolisme des GA

Les contenus en GA bioactives sont très finement régulés afin de garantir une croissance optimale des plantes selon les diverses conditions environnementales. De ce fait, au moins trois mécanismes contribuent à l'inactivation des GA (Figure 8).

Le mécanisme le mieux caractérisé est l'ajout d'un hydroxyle en position C2, catalysé par les GA2-oxydases (GA2ox) appartenant à la famille des 2-ODD. Ces GA2ox peuvent être divisées en deux groupes : celles qui catabolisent les C19-GA ou bien, les C20-GA. Les C19-GA2ox convertissent les GA bioactives GA₄ et GA₁ en GA₃₄ et GA₈, respectivement, ainsi que les précurseurs GA₉ et GA₂₀ en GA₅₁ et GA₂₉ (Figure 8). Chez *Arabidopsis*, ces enzymes sont codées par cinq gènes (GA2ox1 à GA2ox6 ; GA2ox5 étant un pseudogène) (Thomas et al., 1999; Rieu et al., 2008a). Les C20-GA2ox ont quant à elles pour substrats les précurseurs GA₁₂ et GA₅₃, qui sont respectivement convertis en GA₁₁₀ et GA₉₇. Deux gènes, GA2ox7 et GA2ox8 codent pour les C20-GA2ox, (Figure 8) (Schomburg et al., 2003). En accord avec leur fonction, les mutants *ga2ox* possèdent des contenus élevés en GA bioactives conduisant à des problèmes de stérilité. Ces mutants sont par ailleurs plus grands que des plantes sauvages. À l'inverse, des plantes qui sur-expriment les GA2ox montrent un nanisme sévère (Figure 11) (Schomburg et al., 2003).

Un second mécanisme de désactivation existe dans une moindre mesure chez *Arabidopsis*. Il s'agit de l'ajout d'un méthyle sur le groupement carboxyle en position C6, catalysé par des méthyltransférases nommées GAMT1 et GAMT2 (Gibbérelline Méthyltransférase 1 et 2) ayant pour substrats à la fois des formes bioactives ou des précurseurs de GA. Cependant, les deux gènes GAMT1 et GAMT2 codant ces enzymes ont une expression restreinte dans les

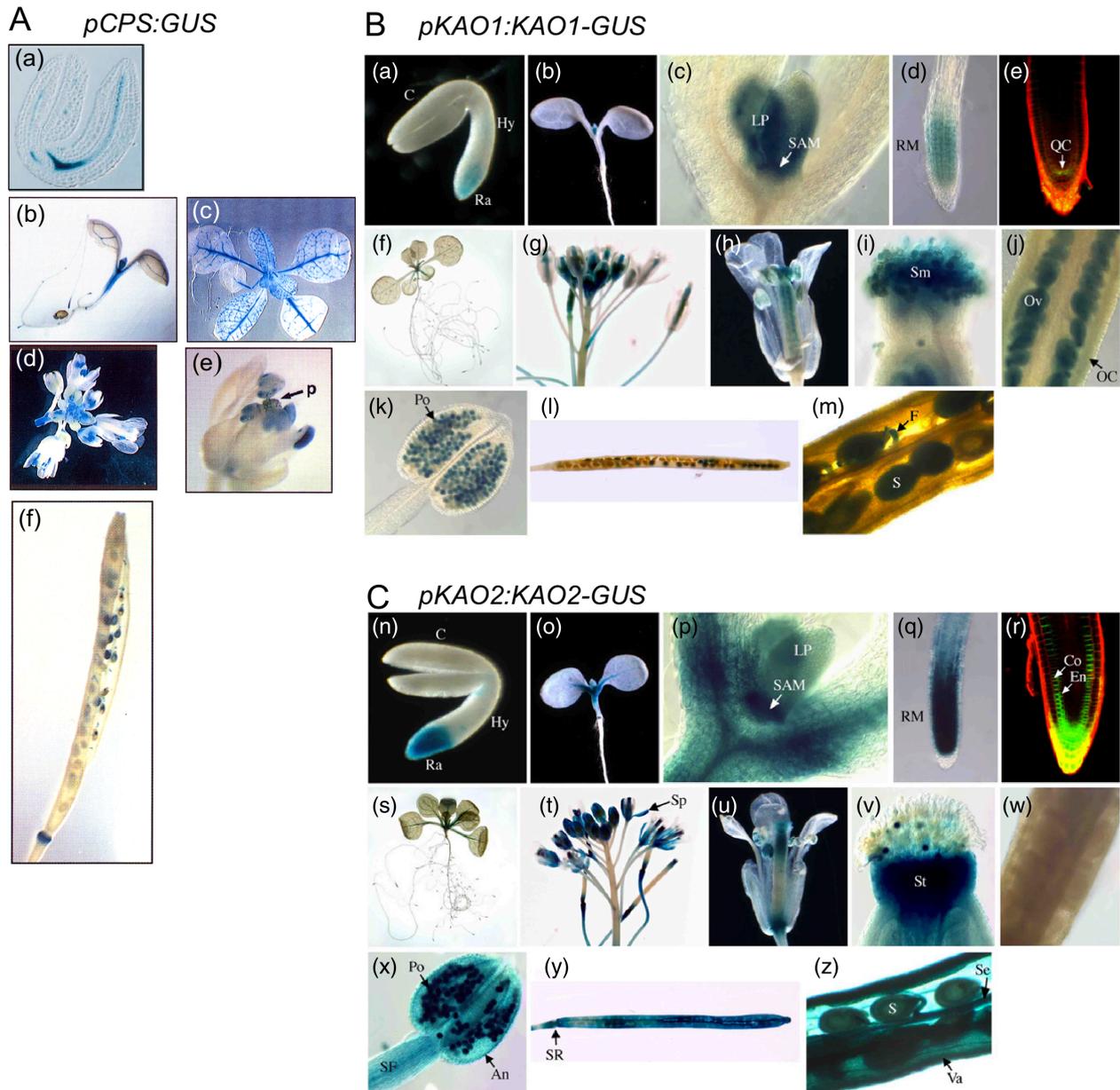


Figure 13. Patterns d'expression de la CPS, KAO1 et KAO2 au cours du développement de la plante chez *Arabidopsis*.

A. Observations de la coloration GUS chez une lignée *pCPS:GUS* : (a) graine en germination ; (b) plantule de 7 jours ; (c) rosette de 15 jours ; (d, e) fleurs ; (f) silique mature.

B-C. Observations de la coloration GUS chez les lignées *pKAO1:KAO1-GUS* (**B**) et *pKAO2:KAO2-GUS* (**C**) : (a, n) graines en germination ; (b, o) plantules de 7 jours ; (c, p) apices caulinaires de 7 jours ; (d, q) apices racinaires de 7 jours ; (f, s) plantes de 21 jours ; (g, t) inflorescences ; (h, u) fleurs ; (i, v) gynécée ; (j, w) ovaires ; (k, x) étamines ; (l, y) siliques matures ; (m, z) siliques ouvertes (e, r) fluorescence GFP chez les lignées *pKAO:KAO-GFP*.

An, anthère ; C, cotylédon ; Co, cellules du cortex ; En, cellules de l'endoderme ; F, funicule ; Hy, hypocotyle ; LP, primordia foliaire ; OC, ovaire ; Ov, ovule ; QC, centre quiescent ; Po et p, pollen ; Ra, radicule ; RM, méristème racinaire ; S, graine ; SAM, méristème apical caulinaire ; Se, septum ; SF, filet des étamines ; SR, réceptacle des siliques ; Sm, stigma ; Sp, sépale ; St, étamine ; Va, valve.

(Silverstone et al., 1997; Yamaguchi et al., 2001; Regnault et al., 2014)

graines, aucune forme de GA méthylée n'a été détectée dans des extraits de plantes (Figure 12) (Varbanova et al., 2007).

Enfin, un dernier mécanisme de désactivation a été révélé spécifiquement chez le riz. En effet, chez le riz, le mutant *eui* (*elongated uppermost internode*) contient des niveaux plus élevés en GA bioactives uniquement au niveau des entrenœuds (Zhu et al., 2006). Le gène *EUI* code pour un cytochrome P450 mono-oxygénase capable de convertir les GA_{12} , GA_9 et GA_4 en formes époxydes inactives (Figure 12). Si deux cytochrome P450 mono-oxygénases ont été identifiés chez *Arabidopsis* par homologie de séquence avec *EUI*, leur rôle n'a pas encore été défini (Zhang et al., 2011a).

Il est important de noter également, que des formes de GA conjuguées avec des sucres ont été détectées, mais là encore, la fonction liée à cette conjugaison reste méconnue (Piotrowska et Bajguz, 2011; Binenbaum et al., 2018).

2.2.4. Sites de production des GA

De manière générale, les GA bioactives s'accumulent principalement dans les jeunes tissus en prolifération et en expansion cellulaire. L'analyse des patrons d'expression des gènes du métabolisme des GA a permis de mieux comprendre la localisation spatiale et temporelle de cette synthèse.

La première partie de la voie de biosynthèse (du GGDP à la GA_{12}/GA_{53}) implique les enzymes (CPS, KS, KO et KAO) codées par un ou deux gènes (pour les KAO). Des analyses histochimiques ont révélé que ces gènes s'expriment essentiellement dans tous les tissus en croissance, principalement dans les méristèmes racinaires et apicaux des plantules, les jeunes feuilles ou encore les inflorescences (Figure 13) (Silverstone et al., 1997; Yamaguchi et al., 2001; Regnault et al., 2014).

Les étapes tardives de la biosynthèse de GA (de GA_{12}/GA_{53} aux GA bioactives) ainsi que le catabolisme sont codées par des familles multigéniques, dont certains membres ont des patrons d'expression tissus-spécifiques. En effet, pour les *GA20ox*, les *GA20ox1*, *GA20ox2* et *GA20ox3* sont exprimés dans l'ensemble des tissus et à tous les stades du développement végétatif (méristèmes et zones d'élongation et de différenciation racinaire) et reproductif, contrairement au gène *GA20ox5* transcrit principalement dans les siliques (Figure 14) (Rieu et al., 2008b; Plackett et al., 2012). Concernant les *GA3ox*, *GA3ox1* est exprimé à tous les stades de développement de la plante, alors que les transcrits *GA3ox2* s'accumulent principalement dans les graines en germination et les tissus végétatifs. À l'inverse, l'expression des gènes *GA3ox4* et *GA3ox5* est spécifique des fleurs et siliques (Figure 15)

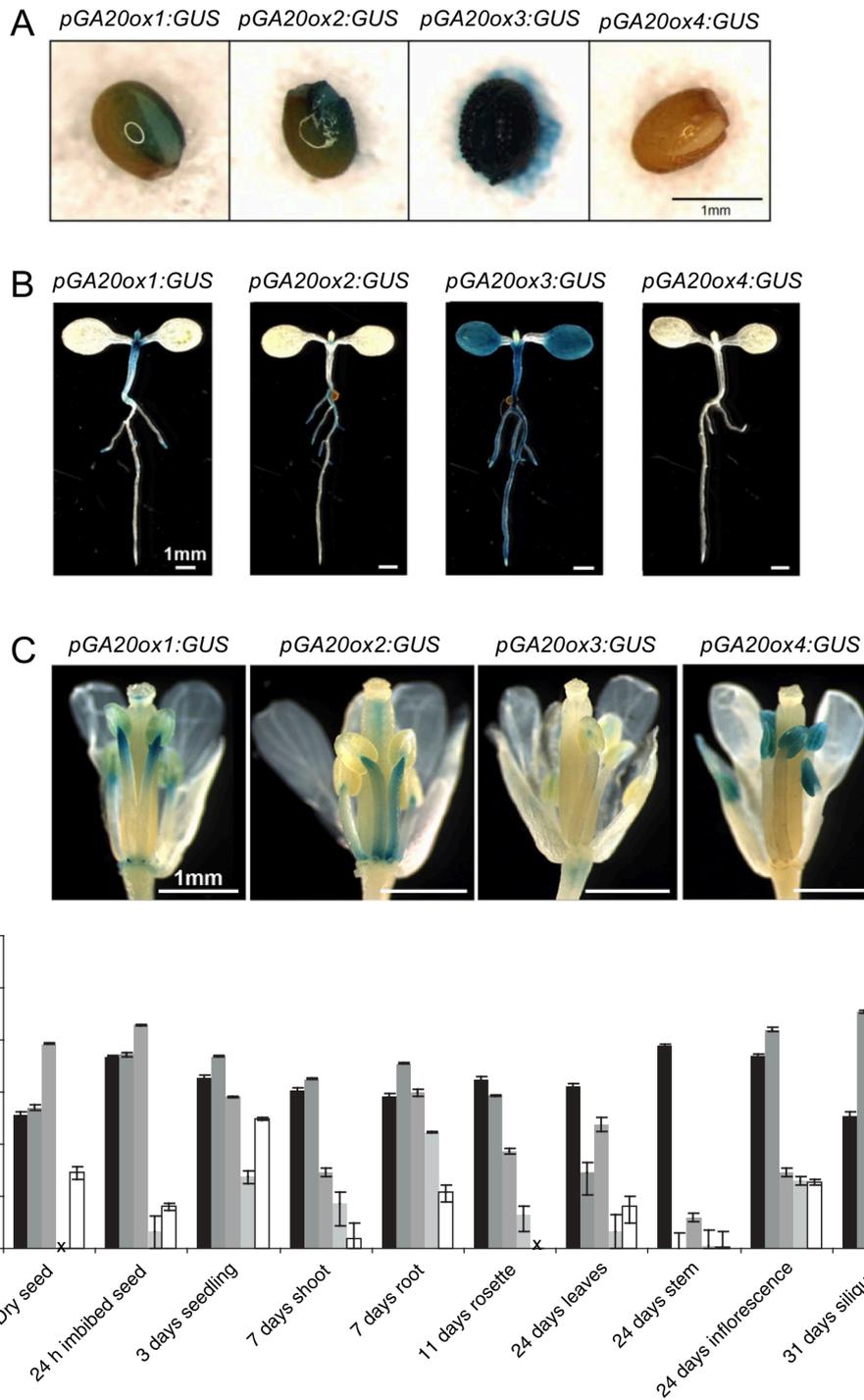


Figure 14. Patrons d'expression des *GA20ox* au cours du développement chez *Arabidopsis*.

Colorations GUS **A.** dans les graines imbibées **B.** chez des plantules de 7 jours **C.** dans les fleurs des lignées *pGA20ox:GUS*

D. Analyse par PCR quantitative de l'expression des *GA20ox*.

(Rieu et al., 2008b; Plackett et al., 2012)

(Mitchum et al., 2006; Hu et al., 2008). Ces patrons d'expression reflètent les phénotypes observés pour ces mutants dans la précédente partie (Figure 9 et 10).

De manière intéressante, les enzymes précoces et tardives de la voie de biosynthèse des GA ne sont pas toujours présentes dans les mêmes tissus. Par exemple la CPS est strictement localisée au niveau du méristème racinaire tandis que les GA20ox et GA3ox se retrouvent dans la zone d'élongation et de différenciation de la racine. Cette observation suggère un transport d'un ou plusieurs intermédiaires de la voie de biosynthèse entre le méristème et la zone d'élongation et différenciation de la racine (voir section sur le transport de GA).

Les GA2ox, impliqués dans le catabolisme des GA, ont des profils d'expression qui suggèrent une redondance fonctionnelle au cours du développement de l'appareil végétatif et reproductif (Figure 16) (Rieu et al., 2008a).

2.3. Voie de signalisation des GA

L'ensemble des composants de la voie de signalisation des GA est désormais bien connu, de la perception des GA, en passant par les éléments de régulation, et déjà de nombreux effecteurs/gènes impliqués dans de multiples voies métaboliques et de développement de la plante ont été caractérisés. Identifiés à la fois chez le riz et *Arabidopsis*, les composants clés de la signalisation GA sont : le récepteur GA INSENSITIVE DWARF 1 (GID1), les protéines DELLA répresseurs de croissance ainsi que les protéines F-box SLEEPY1 (SLY1) et SNEEZY (SNE) chez *Arabidopsis* et GA INSENSITIVE DWARF 2 (GID2) chez le riz. Aujourd'hui, il est admis que les GA stimulent le développement et la croissance des plantes en s'opposant à l'action des protéines DELLA (Harberd, 2003; Davière et Achard, 2013).

2.3.1. Perception des GA

La perception de l'hormone bioactive par le récepteur GID1 permet d'initier la voie de signalisation des GA. GID1 est une protéine nucléaire soluble, identifiée pour la première fois chez le riz (Ueguchi-Tanaka et al., 2005) puis chez *Arabidopsis* (Griffiths et al., 2006). Un mutant *gid1* présente un phénotype aussi sévère qu'un mutant de biosynthèse, cependant un apport exogène de GA bioactives ne restaure pas sa croissance ; il est ainsi caractérisé comme un mutant de réponse aux GA (Ueguchi-Tanaka et al., 2005). Un gène unique code pour GID1 chez le riz, tandis que trois orthologues de fonction redondante sont présents chez *Arabidopsis*, *GID1A*, *GID1B* et *GID1C* (Nakajima et al., 2006). Des analyses par cristallographie ont montré que GID1 forme une petite poche dans laquelle se loge une molécule de GA, et possède une extension en position N-terminale (Murase et al., 2008).

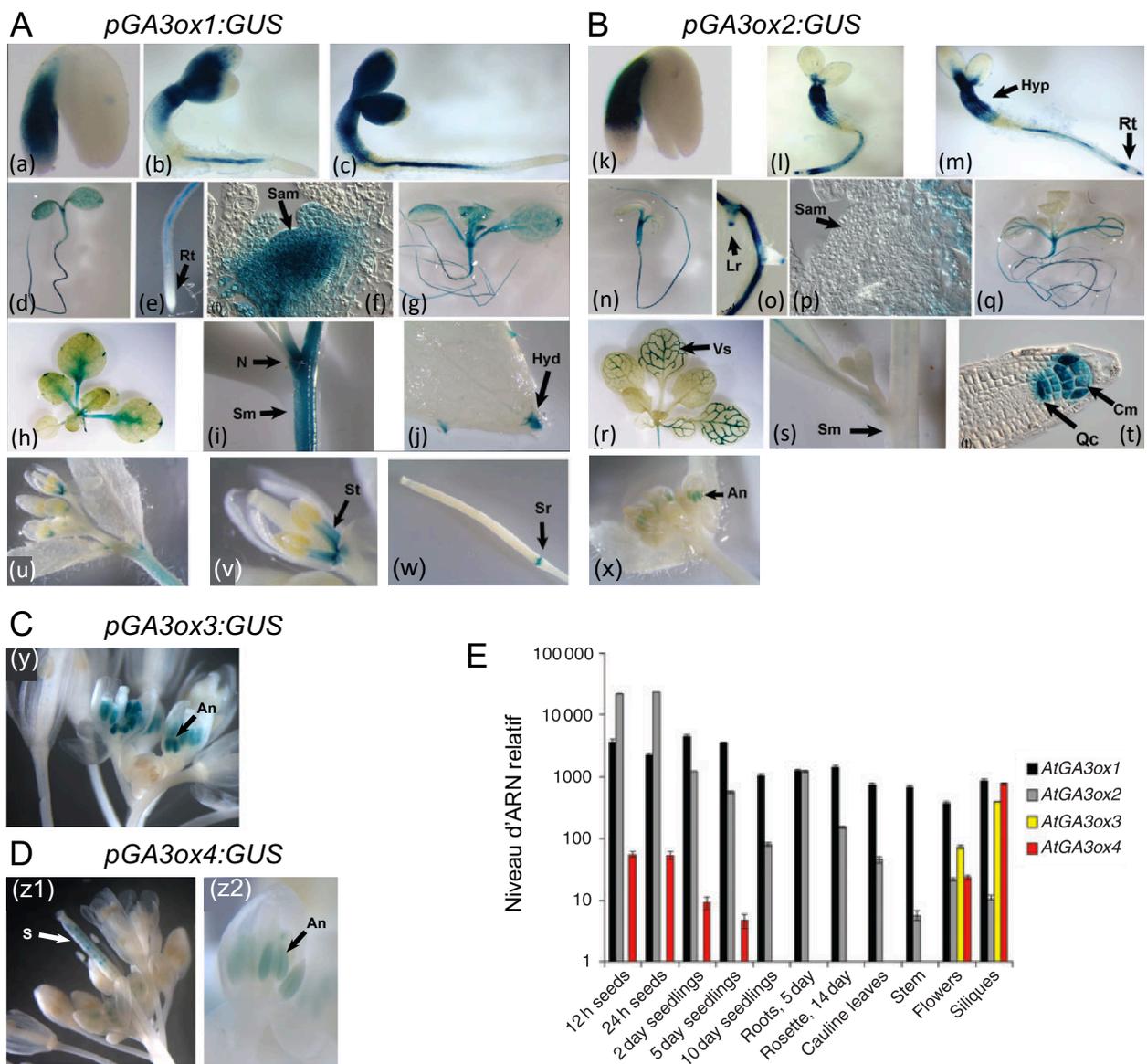


Figure 15. Patrons d'expression des GA3ox au cours du développement chez *Arabidopsis*.

Observations de la coloration GUS chez les lignées **A.** *pGA3ox1:GUS* **B.** *pGA3ox2:GUS* **C.** *pGA3ox3:GUS* **D.** *pGA3ox4:GUS* : (a, k) graine en germination ; (b, l) plantule de 2 jours ; (c, m) plantule de 2 jours ; (d, n) plantule de 5 jours ; (e, o) racine de 5 jours ; (f, p) méristème apical caulinaire de plantule de 5 jours ; (g, q) plantule de 10 jours ; (h, r) rosette de 14 jours ; (i, s) tige principale ; (j) extrémité d'une feuille caulinaire (t) coupe du méristème racinaire de plantules de 3 jours ; (u, x, y, z1) inflorescence ; (v, z2) fleur ; (w) silique mature. An, anthère ; Cm, cellules de la columelle ; Hyd, hydathode ; Hyp, hypocotyle ; Lr, racine latérale ; N, nœud ; Qc, centre quiescent ; Rt, apex racinaire ; Sam, méristème apical caulinaire ; S, sillique ; Sm, tige ; Vs, vaisseaux.

E. Analyse par PCR quantitative de l'expression des GA3ox.

(Adapté de Mitchum et al., 2006; Hu et al., 2008)

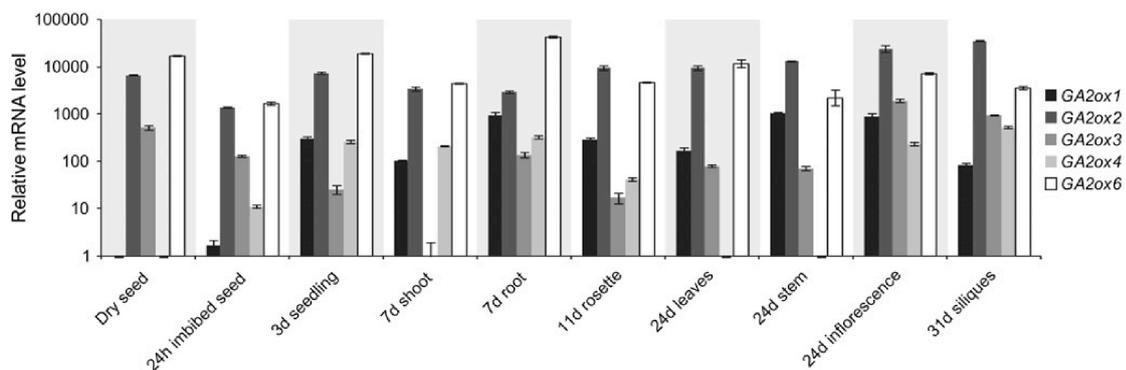


Figure 16. Analyse par PCR quantitative de l'expression des GA2ox au cours du développement chez *Arabidopsis*. (Rieu et al., 2008a)

Une fois la molécule de GA fixée, l'extension N-terminale se referme, modifiant ainsi la conformation initiale de GID1. Ce changement de conformation GID1 permet l'interaction d'une protéine DELLA pour former le complexe GA-GID1-DELLA (Figure 17) (Ueguchi-Tanaka et al., 2007; Davière et Achard, 2013).

2.3.2. Les DELLA, protéines clés de la signalisation GA

Les protéines nucléaires DELLA appartiennent à une famille de régulateurs transcriptionnels spécifiques aux plantes nommée GRAS suite à l'identification des trois premiers membres: GA-INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR OF *ga1-3* (RGA) et SCARECROW (SCR) (Pysh et al., 1999). Les DELLA possèdent un domaine GRAS en position C-terminal, conservé chez tous les membres de cette famille, et impliqué dans les interactions protéine-protéine (Figure 18) (Davière et Achard, 2013). A l'inverse, les DELLA se distinguent des autres protéines GRAS par une extension N-terminale spécifique comprenant deux motifs : le motif DELLA (séquence en acides aminés conservés Asp-Glu-Leu-Leu-Ala, origine du nom DELLA) et le motif TVHYNP. Cette extension N-terminale, appelée aussi domaine de perception des GA, est responsable de l'interaction avec le récepteur des GA, GID1. Lorsque ce domaine est absent, les protéines DELLA toujours fonctionnelles, ne peuvent interagir à GID1 et sont donc insensibles à l'action des GA. Ce sont donc des mutants « gain de fonction ».

Chez la plupart des monocotylédones, les DELLA sont codées par un gène unique comme *SLENDER RICE1* (*SLR1*) chez le riz et *Reduced height-1* chez le blé (une copie sur chacun des trois génomes notés A, B et D) (Peng et al., 1999; Ikeda et al., 2001), tout comme chez la vigne, la tomate et la pomme de terre. Le génome d'*Arabidopsis* fait partie des exceptions puisqu'il code pour cinq protéines DELLA nommées GA-INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR OF GA1-3 (RGA), RGA-LIKE 1 (RGL1), RGL2 et RGL3. Ces cinq protéines ont des fonctions partiellement redondantes dans le développement des plantes, identifiées à l'aide d'un crible génétique chez le mutant nain ne produisant pas de GA bioactive, *ga1-3*. En effet, la croissance du mutant *ga1-3* est progressivement restaurée par les mutations successives de *GAI* et *RGA*, puis RGL1, 2, 3, montrant que ces deux premières protéines DELLA sont les principaux répresseurs de croissance chez *Arabidopsis* (Figure 19) (Silverstone et al., 1998; King et al., 2001). Le double mutant *gai-t6 rga-24* a une croissance similaire au sauvage, tandis que le quintuple mutant DELLA, appelé aussi *global-DELLA*, a une stature significativement plus haute qu'une plante sauvage, mais perd sa capacité d'adaptation de croissance face à différents stress environnementaux (Colebrook et al., 2014). Par ailleurs, chez *Arabidopsis* une protéine DELLA, RGL3, s'accumule transitoirement face à certaines attaques de pathogènes, et contribue positivement à l'établissement des signalisations

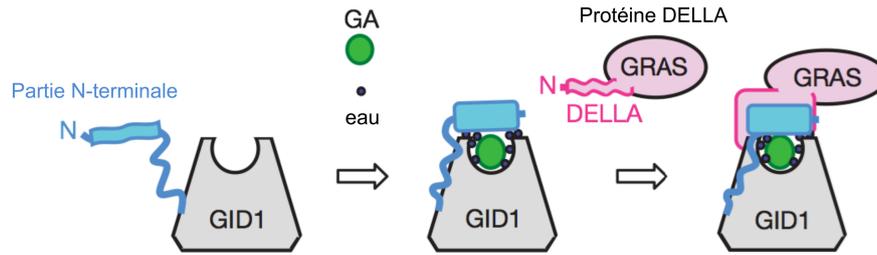


Figure 17. Formation du complexe GA-GID1-DELLA.

Les GA bioactives sont reconnues par leur récepteur GID1. La liaison entre une molécule de GA et GID1 provoque un changement de conformation du récepteur au niveau de son extrémité N-terminale. La partie N-terminale des protéines DELLA interagit avec GID1. (Adapté de Murase et al., 2008)

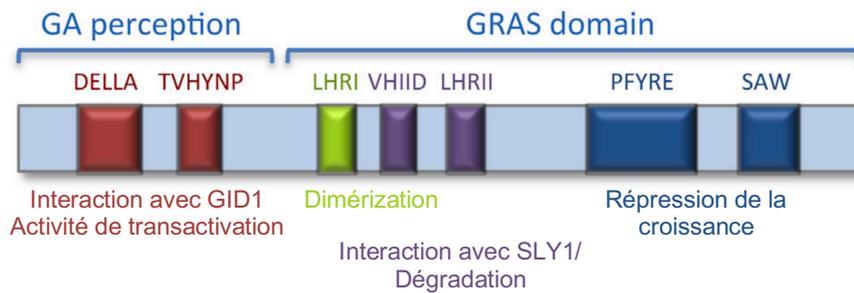


Figure 18. Structure d'une protéine DELLA.

La partie N-terminale comprend un domaine de perception aux GA, constituée de deux motifs DELLA et TVHYNP. La partie C-terminale, conservée chez toutes les protéines à domaine GRAS, comprend cinq motifs (LHRI, VHIID, LHRII, PFYRE et SAW) essentiels à l'activité de la protéine. (Adapté de Davière et Achard, 2016)

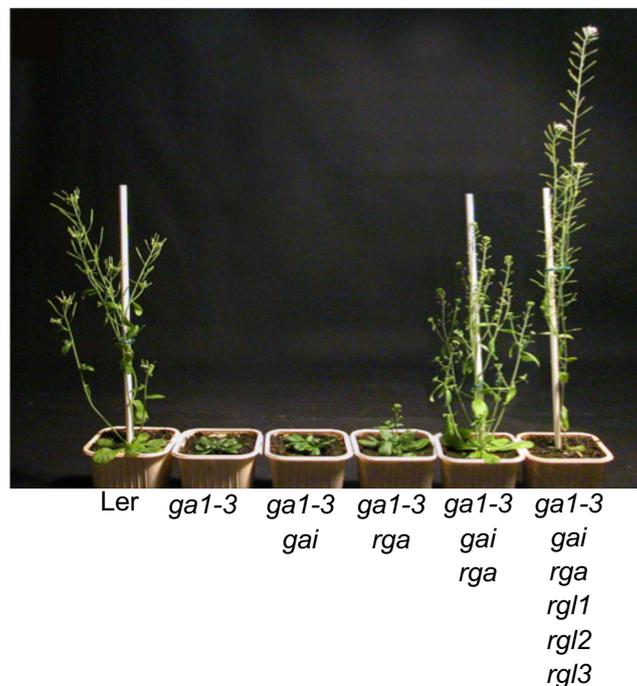


Figure 19. Les protéines DELLA répriment la croissance des plantes.

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 successive des différentes protéines DELLA chez *Arabidopsis*. (Crédit, Patrick Achard)

jasmonate/éthylène impliquées dans la défense des plantes pour lutter contre des agents pathogènes de type nécrotrophe (*Botrytis cinerea*) (Wild et al., 2012; Wild et Achard, 2013). Les autres DELLA, RGL1 et RGL2 sont impliquées dans le développement des organes floraux ou encore l'activité de GAI et RGA est requise pour le développement des étamines et la maturation des grains de pollens, spécifiquement chez *Arabidopsis* d'écotype Col-0 (Cheng et al., 2004; Plackett et al., 2014). De plus, l'activité d'inhibition notoire de la germination des graines a également été décrite pour RGL2 (Lee et al., 2002). Il est intéressant de noter que les différences de fonctions observées sont expliquées par le patron d'expression de ces cinq DELLA. En effet l'expression de RGA sous le contrôle du promoteur de RGL2 permet de compléter un mutant *rgl2* (Gallego-Bartolome et al., 2010).

2.3.3. Dégradation des DELLA par le protéasome

La présence de GA bioactives induit la déstabilisation des protéines DELLA (Silverstone et al., 2001). La formation du complexe GA-GID1-DELLA entraîne un changement de conformation du domaine GRAS des DELLA augmentant leur affinité pour les protéines F-box, sous-unité du complexe E3-ubiquitine ligase SPK1-Cullin-F-box (SCF) (Figure 20). Les F-box jouent un rôle primordial dans la reconnaissance des cibles du complexe SCF. Les F-box qui s'apparient spécifiquement aux DELLA ont été identifiées par cribles génétiques, et ont été nommées GA INSENSITIVE DWARF 2 (GID2) chez le riz, et SLEEPY1 (SLY1) et SNEEZY (SNE) chez *Arabidopsis*. SLY est exprimé dans toute la plante alors que l'expression de SNE est restreinte aux inflorescences. À la suite de la reconnaissance des DELLA par les F-box, le complexe E3-ligase SCF polyubiquitinye les DELLA, signal nécessaire pour leur reconnaissance par le protéasome 26S et leur dégradation consécutive. Ainsi les GA induisent la croissance des plantes en stimulant la dégradation des répresseurs de croissance DELLA (Figure 20). En conséquence, les mutants *gid2* et *sly* sont nains et insensibles à l'action des GA, due à l'accumulation des protéines DELLA.

2.3.4. Mécanisme d'action des DELLA

Les protéines DELLA sont des régulateurs transcriptionnels localisés dans le noyau des cellules modulant l'expression de gènes cibles (Zentella et al., 2007; Locascio et al., 2013b). Cependant, les DELLA ne possèdent pas de domaine de liaison à l'ADN, nécessitant alors le recours à des interactions avec des facteurs et régulateurs de la transcription, réunis sous le terme DIP pour DELLA-Interacting Proteins. Jusqu'à présent, deux mécanismes d'action principaux ont été décrits et expliquent comment les DELLA répriment la croissance des plantes ou modulent leur métabolisme et établissent des relations symbiotiques ou de défense avec les microorganismes.

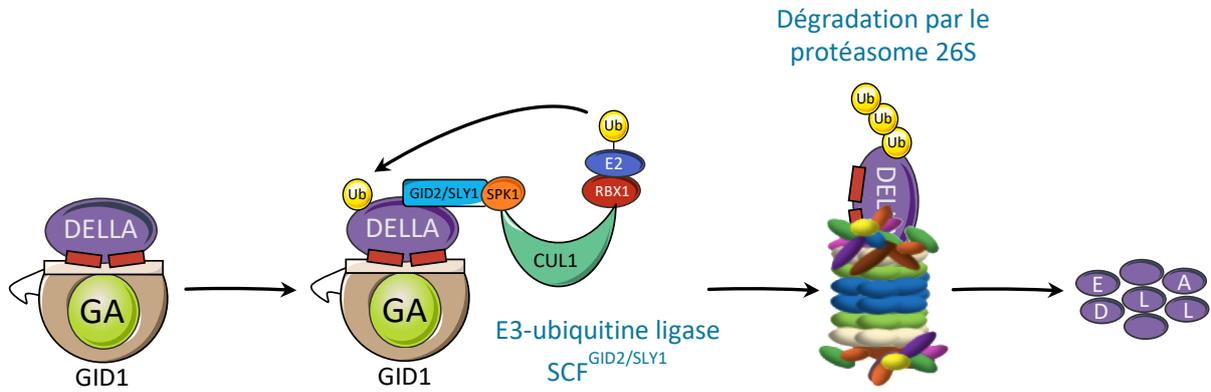


Figure 20. Dégradation des protéines DELLA par le protéasome 26S.

La formation du complexe GA-GID1-DELLA stimule l'interaction d'une protéine DELLA au complexe SCF^{GID2/SLY1}, une E3 ubiquitine ligase. La protéine DELLA est ensuite polyubiquitinylée puis dégradée par 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.

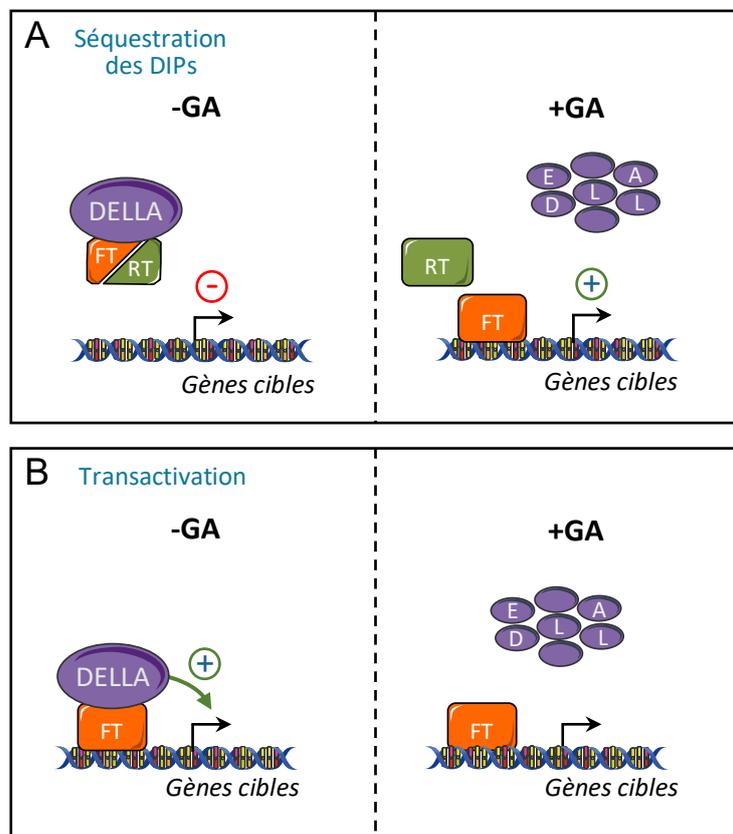


Figure 21. Mécanismes d'action des protéines DELLA.

A. Séquestration des DIPs : en absence de GA, les DELLA interagissent et séquestrent des facteurs de transcription (FT) ou régulateurs transcriptionnels (RT), les empêchant de se lier aux promoteurs de gènes cibles. La présence de GA stimule la dégradation des DELLA par le protéasome. Les FT ou RT sont libres de se fixer aux promoteurs de gènes cibles et d'induire ainsi les réponses biologiques.

B. Transactivation : en absence de GA, les DELLA interagissent avec les FT. Le complexe DELLA-FT se fixe aux promoteurs de gènes cibles et active leur transcription. Les GA, en promouvant la dégradation des DELLA, lève cette activité transactivatrice.

(Adapté de Davière et Achard, 2016)

La fonction biologique des DELLA repose sur leur capacité à interagir avec diverses protéines. En effet, en absence de GA bioactives, les DELLA s'accumulent dans les noyaux et ont la possibilité de former des complexes protéiques. Les premières interactions des DELLA avec des facteurs de transcription (FT) et régulateurs transcriptionnels (RT) ont été révélées en 2008 avec les facteurs de la famille bHLH (basic Helix-Loop-Helix), PIF (PHYTOHORMONE INTERACTING FACTORS) (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008). Les domaines respectifs engagés dans cette interaction correspondent au domaine GRAS des DELLA et des séquences recouvrant le domaine bHLH pour les FT PIF, impliquées dans la liaison à l'ADN. Les auteurs ont montré que cette interaction DELLA-PIF, inhibe la capacité de ce dernier à se fixer aux promoteurs de leurs gènes cibles ou protéines partenaires. Le mécanisme d'action décrit ainsi un mode de séquestration des FT, créant un complexe DELLA-DIP inactif. Par contre, en présence de GA, les DELLA sont dégradées, permettant aux DIP libres, d'exercer leurs fonctions (Figure 21A).

Le deuxième mécanisme décrit requiert l'activité de transactivation des DELLA sur gènes cibles (Hirano et al., 2012). En absence de GA bioactives, les DELLA interagissent avec d'autres facteurs de transcription partenaires, sans affecter leur capacité de se lier à l'ADN, et ainsi, activent l'expression des gènes cibles (Figure 21B). Le mécanisme précis de cette transactivation n'est pas encore connu, l'hypothèse la plus avancée est un changement de conformation de la chromatine puisqu'il a été montré récemment que les DELLA interagissaient avec des protéines de remodelage de la chromatine (Zhang et al., 2014a; Park et al., 2017).

Pendant cette décennie, une multitude d'interactants avec protéines DELLA ont été identifiés et sont impliqués dans diverses fonctions biologiques (Tableau 1) (Davière et Achard, 2013; Van De Velde et al., 2017), ce qui rend compte en partie, de l'action pléiotropique de la régulation des GA. Il faut également mentionner, que les DELLA ont des DIPs impliqués à différents niveaux, dans toutes les voies de signalisations des phytohormones (Davière et Achard, 2016), révélant ainsi des interconnexions multiples possibles, pour réguler finement des réponses biologiques des plantes et adapter leur développement face aux variations de l'environnement.

2.3.5. Modifications post-traductionnelles des DELLA

En plus de l'ubiquitinylation des protéines DELLA induite par les GA, plusieurs études montrent que des modifications post-traductionnelles changent l'activité des DELLA. En effet, la phosphorylation des DELLA jouerait un rôle important pour leur activité et stabilité, mais le mécanisme précis de régulation reste encore méconnu (Hussain et al., 2005). Récemment

Tableau 1. Protéines interagissant avec les DELLA (DIP). (Adapté de Van De Velde et al., 2017)

*DIP identifiés chez d'autres plantes qu'*Arabidopsis*.

CRC, complexe de remodelage de la chromatine ; FT, facteur de transcription ; RT, régulateur transcriptionnel.

Mécanisme	DIP	Fonction	Références
Transactivation avec FT	ABI3 et 5	Germination des graines	(Lim et al., 2013)
	ARR1	Taille méristème racinaire et dé-étiolation	(Marín-de la Rosa et al., 2015)
	IDD2/GAF1	Germination des graines et élongation	(Fukazawa et al., 2014)
	IDD3,4,5,9 et IDD10/JKD	Inconnue	(Fukazawa et al., 2014; Hirano et al., 2017)
	NF-YA1*	Infection rhizobienne et floraison	(Hou et al., 2014; Fonouni-Farde et al., 2016b)
	NSP2*	Infection rhizobienne	(Fonouni-Farde et al., 2016b)
Transactivation avec RT	BOIs	Germination, transition phase juvénile et adulte, floraison	(Park et al., 2013)
Séquestration de FT	ALC	Formation des fruits	(Arnaud et al., 2010)
Séquestration de FT Séquestration CRC	ARF6	Élongation de l'hypocotyle	(Oh et al., 2014)
	BES1	Élongation de l'hypocotyle	(Bai et al., 2012)
	bHLH 38 et 39	Prélèvement du fer dans la racine	(Wild et al., 2016)
	BZR1	Élongation de l'hypocotyle	(Bai et al., 2012)
	CO	Floraison	(Xu et al., 2016)
	EGL3	Développement des trichomes	(Qi et al., 2014)
	EIN3	Développement du crochet apical	(An et al., 2012)
	FIT	Prélèvement du fer dans la racine	(Wild et al., 2016)
	GL1 et 3	Développement des trichomes	(Qi et al., 2014)
	GRF4*	Assimilation de l'azote	(Li et al., 2018)
	ML1	Germination des graines	(Rombolá-Caldentey et al., 2014)
	MOC1*	Tallage	(Liao et al., 2019)
	MYC2	Production de composés volatils dans les fleurs	(Hong et al., 2012)
	NF-YC9	Germination des graines et floraison	(Hou et al., 2014)
	PDF2	Germination des graines	(Rombolá-Caldentey et al., 2014)
	PIF3	Élongation de l'hypocotyle	(Feng et al., 2008)
	PIF4	Élongation de l'hypocotyle	(de Lucas et al., 2008)
	PIF5	Développement du crochet apical	(Gallego-Bartolomé et al., 2011)
	RAP2.3	Développement du crochet apical	(Rosa et al., 2014)
	SPL9	Floraison et ramification	(Yu et al., 2012; Zhang et al., 2019b)
	IPA1 (SPL14), SPL7*	Ramification	(Lu et al., 2013; Liu et al., 2019b)
	SPL15	Floraison	(Hyun et al., 2016)
	SCL27	Skotomorphogénèse	(Ma et al., 2014b)
	SCL3	Germination des graines, élongation de l'hypocotyle et de la racine	(Zhang et al., 2011b)
	TCP14	Élongation de la tige, division cellulaire dans les méristèmes apicaux	(Davière et al., 2014)
	PKL	Skotomorphogénèse	(Zhang et al., 2014a)
	Séquestration co-chaperone	PFD5	Organisation des microtubules
Séquestration de RT	BBX24	Évitement de l'ombre	(Crocco et al., 2015)
	D14*	Tallage	(Nakamura et al., 2013)
	JAZ1	Croissance racinaire	(Hou et al., 2010)
	JAZ9	Défense et croissance	(Hou et al., 2010)
	DIP1*	Mycorhize	(Yu et al., 2014)
Inconnu	NF-YA2 et NF-YB2	Floraison	(Hou et al., 2014)
	NF-YC3, 4 et 9	Germination des graines et floraison	(Hou et al., 2014)
	IDD1/ENY	Maturation des graines et germination	(Feurtado et al., 2011)
	SWI3C	Unknown	(Sarnowska et al., 2013)
	FLC	Floraison	(Li et al., 2016)

Zentella et al., 2016, 2017 ont démontré chez *Arabidopsis*, par des approches biochimiques et génétiques, que les protéines DELLA pouvaient être glycosylées par deux enzymes, SPINDLY (SPY) et SECRET AGENT (SEC). En conséquence, ces modifications post-traductionnelles modulent leur activité de répresseurs de croissance (annexe 5 Camut et al., 2017). Le mutant *spy* a été identifié depuis longtemps comme un mutant de signalisation GA mais sa fonction exacte était alors inconnue et SEC a été identifié par homologie de séquence comme un proche homologue de SPY. Néanmoins, ces deux enzymes ont deux fonctions distinctes et opposées. SPY est une protéine nucléaire ayant une activité O-fucosyltransférase (POFUT), catalysant le transfert de fucose à partir de GDP-fucose sur un groupement hydroxyle d'une sérine ou thréonine de protéines cibles. Cette modification stabilise la fixation des DELLA à leurs protéines partenaires, stimulant ainsi l'activité de répresseurs de croissance des DELLA (Figure 22). A l'inverse, SEC est une O-linked N-acétylglucosamine (O-GlcNAc) transférase (OGT) qui transfère un résidu O-GlcNAc à partir d'UDP-GlcNAc sur une sérine ou thréonine de protéines cibles. L'O-GlcNAcylation des DELLA par la protéine SEC empêche leurs interactions avec les régulateurs et facteurs de transcription partenaires, bloquant ainsi l'activité des DELLA (Figure 22). Ces deux modifications post-traductionnelles des DELLA montrent donc qu'il existe des mécanismes de régulation dynamique de l'activité des DELLA, afin d'adapter la croissance des plantes aux variations environnementales (Zentella et al., 2016, 2017).

Il a également été démontré que les protéines DELLA peuvent être conjuguées à des protéines SUMO (small ubiquitin-like modifier) en réponse aux stress salins (Conti et al., 2014). Les protéines DELLA SUMOylées interagissent et séquestrent le récepteur GID1 indépendamment des GA. En conséquence, les DELLA non-SUMOylées s'accumulent et répriment la croissance de la plante (Conti et al., 2014).

2.3.6. Influence de la voie de signalisation GA sur l'homéostasie des GA

Les concentrations en GA bioactives sont finement régulées afin de coordonner la croissance et le développement des plantes. En effet, une réduction de GA bioactive restreint la croissance de la plante, à l'inverse un excès de GA provoque une croissance excessive et un défaut de fertilité. Cette régulation fine intervient essentiellement au niveau du métabolisme et de la perception des GA, et est en partie contrôlée par la voie de signalisation GA.

Le premier niveau de régulation de la production des GA bioactives se réfère à un processus de rétrocontrôle. Celui-ci affecte la transcription des enzymes 2ODD impliquées dans les étapes finales de la biosynthèse des GA. Par exemple, chez le mutant *ga1-3* déficient en GA bioactives, les niveaux d'expression des gènes *GA20ox1*, *GA20ox2*, *GA20ox3* et *GA3ox1* se

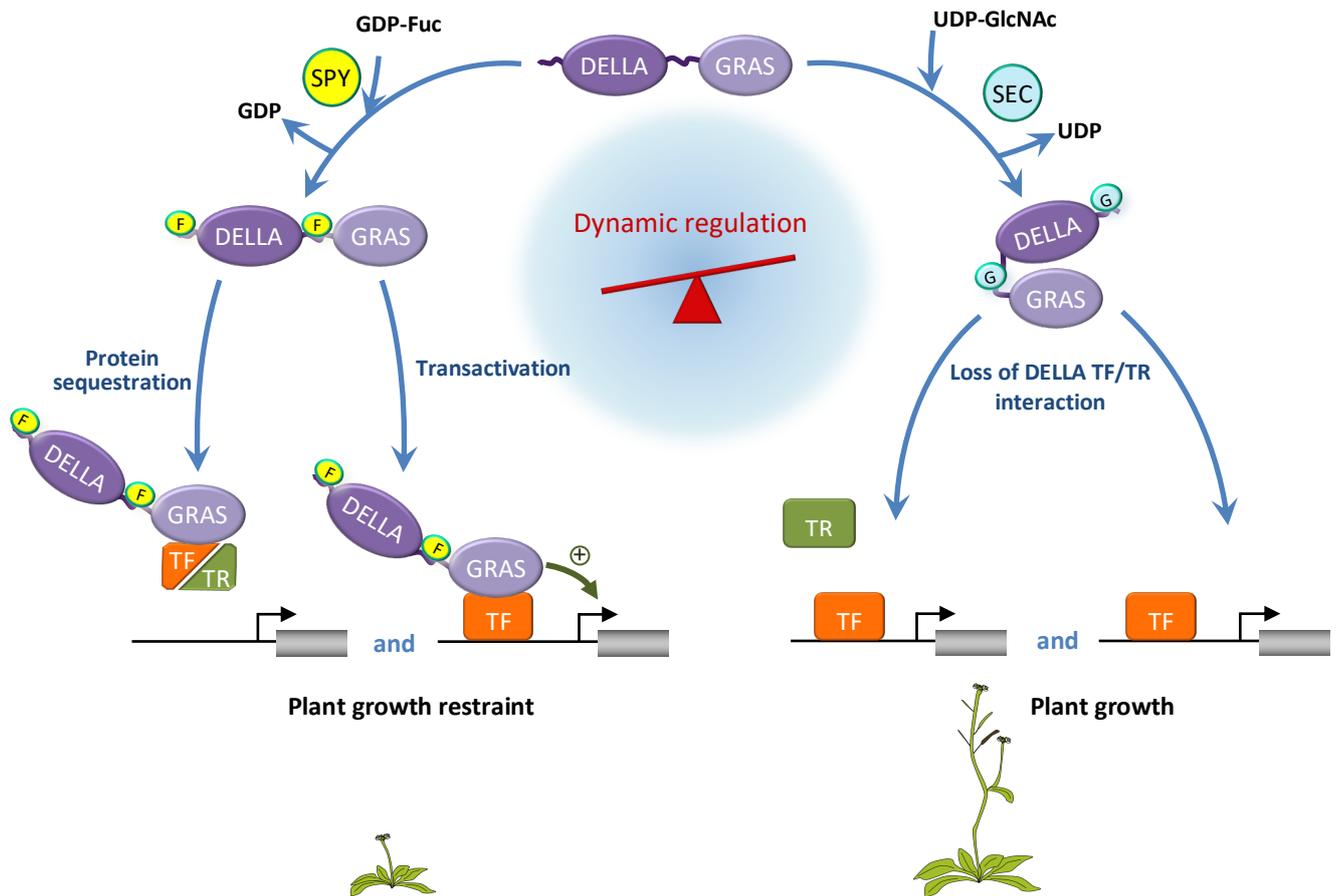


Figure 22. Effets de SEC et SPY sur l'activité des protéines DELLA.

L'O-fucosyltransférase SPY et l'O-GlcNAc transférase SEC activent et inhibent respectivement l'activité des protéines DELLA. SPY et SEC induisent des changements de conformation des DELLA qui stimulent ou empêchent leur interaction avec des TF ou TR partenaires. En conséquence, ces modifications post-traductionnelles régulent la croissance des plantes. SPY, SPINDLY ; SEC, SECRET AGENT ; TF, facteur de transcription, TR, régulateurs transcriptionnels. (Adapté de Camut et al., 2017)

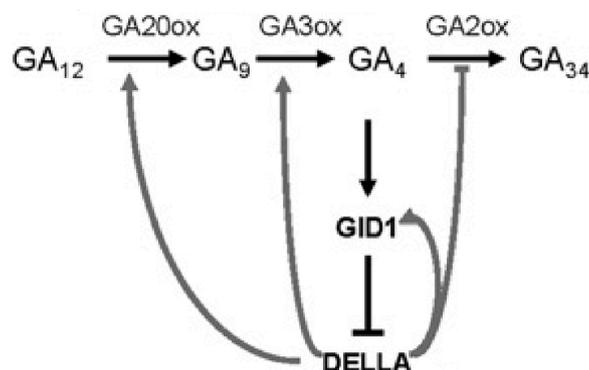


Figure 23. Rétrocontrôle des protéines DELLA sur la voie de biosynthèse et de signalisation des GA.

L'accumulation des protéines DELLA stimule la synthèse de GA bioactives *via* une augmentation de l'expression des *GA20-oxydases* (*GA20ox*) et des *GA3-oxydases* (*GA3ox*), associée à une diminution de l'expression des *GA2-oxydases* (*GA2ox*). Les protéines DELLA opèrent également une régulation positive sur l'expression des gènes codant le récepteur *GID1*. Ces mécanismes contribuent de façon importante à l'homéostasie des GA chez les plantes. (Adapté de Hedden et Thomas, 2012)

maintiennent élevés comparés à ceux d'une plante sauvage, et leur expression diminue fortement après un traitement GA (Mitchum et al., 2006; Rieu et al., 2008b). À l'inverse, les gènes *GA2ox* codant pour les enzymes du catabolisme sont sous-exprimés et l'apport exogène de GA augmente leur expression (Thomas et al., 1999; Rieu et al., 2008a). Ces observations montrent que le rétrocontrôle des GA intervient au niveau des étapes tardives de la biosynthèse et du catabolisme. Aucune étude n'indique un rétrocontrôle sur les étapes précoces de la biosynthèse des GA, de plus la surexpression de la *CPS* n'augmente pas les niveaux d'accumulation des GA bioactives, confirmant que seules les dernières étapes sont la cible du rétrocontrôle. Par ailleurs, plusieurs études ont montré que les GA régulaient l'expression des *GA20ox*, *GA3ox* et *GA2ox* par l'intermédiaire de sa voie de signalisation (Figure 23). En effet, chez le mutant de perception des GA *gid1* chez le riz, la protéine DELLA SLR1 s'accumule et promeut la surexpression de *OsGA20ox1* et en conséquence induit une augmentation de la production de GA₁ (Sasaki, 2003). Contrairement aux mutants de biosynthèse, un apport exogène de GA n'a aucun effet sur l'expression des enzymes 2ODD démontrant le rétrocontrôle positif des DELLA sur les gènes de biosynthèse des GA (Sasaki, 2003; Ueguchi-Tanaka et al., 2005; Griffiths et al., 2006). Par ailleurs, chez le pois, les gènes *PsGA2ox1* et *PsGA2ox2* sont sur-exprimés en absence des DELLA montrant que la régulation des gènes du catabolisme est aussi sous le contrôle des protéines DELLA (Weston et al., 2008). Du fait que les DELLA ne peuvent interagir directement à l'ADN (introduction, paragraphe 2.3.4), la régulation transcriptionnelle de la voie de biosynthèse nécessite d'autres partenaires non identifiés.

Il est important de noter que le récepteur des GA, *GID1* est également soumis à ce rétrocontrôle positif assuré par les DELLA (Figure 23). Les niveaux d'expression des trois gènes *GID1* chez *Arabidopsis* diminuent, suite à un apport de GA (Griffiths et al., 2006).

2.4. Mise en place de la voie de signalisation GA au cours de l'évolution

Les GA sont retrouvées dans de nombreuses espèces de plantes, plus largement dans les organismes photosynthétiques et quelques champignons et bactéries. Le signal GA est transmis *via* la voie de signalisation précédemment décrite, ainsi l'absence ou la non-fonctionnalité d'un ou plusieurs composants de cette voie, empêcherait potentiellement l'activation des réponses aux GA. La diversification des organismes modèles en biologie végétale, ainsi que le séquençage de leur génome ont permis de mieux comprendre l'évolution de la voie de signalisation des GA. L'élément initial clé de la signalisation GA est l'interaction entre *GID1* et les protéines DELLA en présence de GA. Chez la mousse *Physcomitrella patens*, deux gènes *GID1-like* et deux gènes *DELLA-like* ont été identifiés par homologie de séquence (Yasumura et al., 2007). Cependant, *in vitro*, PpGID1 ne peut se lier aux GA

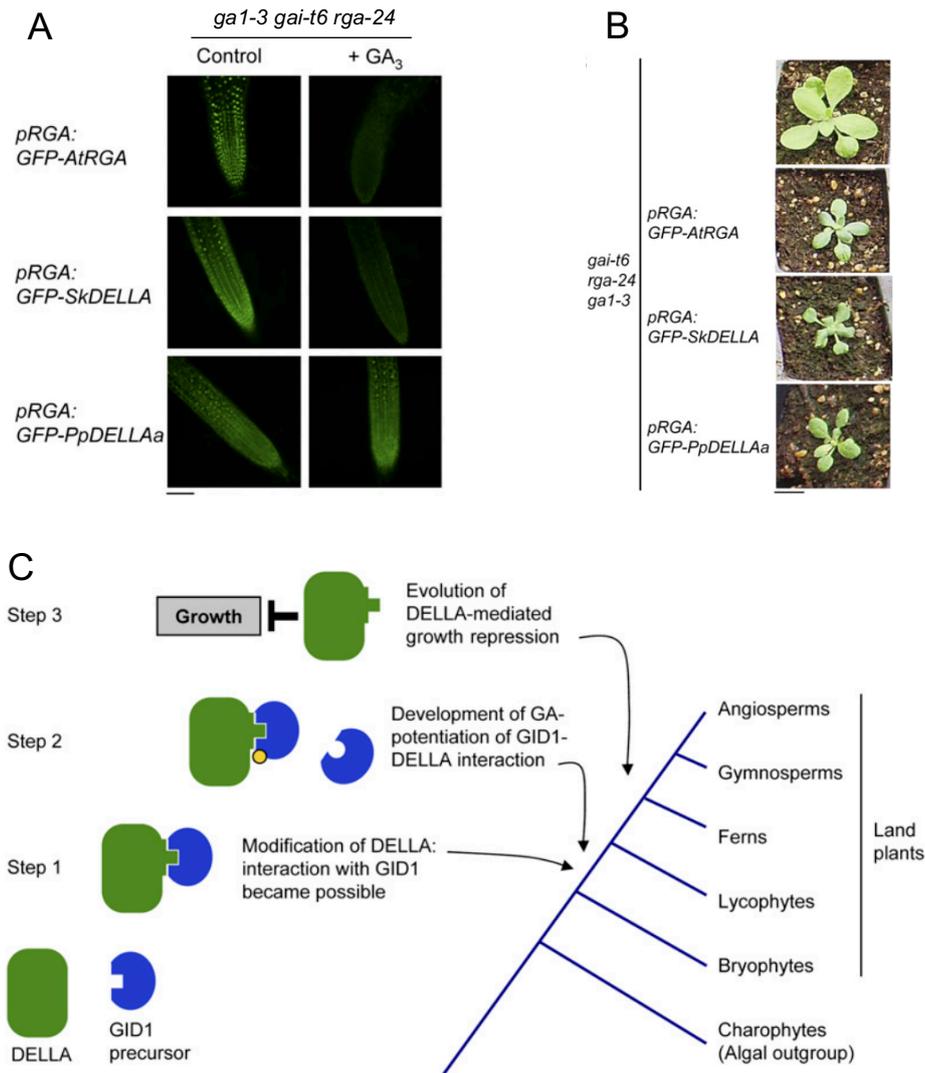


Figure 24. Les protéines DELLA de la mousse *Physcomitrella patens* et du lycophyte *Selaginella kraussiana* répriment la croissance d'*Arabidopsis*.

A. Fluorescence GFP dans l'apex racinaire du mutant *ga1-3 gai-t6 rga-24* d'*Arabidopsis* exprimant les protéines GFP-AtRGA, GFP-PpDELLA et GFP-SkRGA. Un traitement GA₃ entraîne la dégradation des protéines GFP-AtRGA et GFP-SkRGA mais pas de la protéine GFP-PpDELLA.

B. L'expression de GFP-AtRGA, GFP-PpDELLA et GFP-SkRGA chez le mutant *ga1-3 gai-t6 rga-24* restaure le phénotype nain et complète l'absence de GAI et RGA.

C. Modèle de l'acquisition du mécanisme de régulation de la croissance par GA-GID1-DELLA au cours de l'évolution.

(Adapté de Yasumura et al., 2007)

bioactives et n'interagit pas non plus avec les protéines PpDELLA. Par ailleurs, un traitement GA₃ ne stimule pas la dégradation d'une PpDELLA exprimée chez *Arabidopsis* (Figure 24A). En revanche, chez le lycophyte *Selaginella kraussiana*, SkGID1 est capable d'interagir avec la protéine SkDELLA par double hybride en levure (Hirano et al., 2007). L'apport de GA₄ stimule cette interaction, ainsi que la dégradation des protéines SkDELLA (Figure 24A). De manière intéressante, les deux protéines PpDELLA et SkDELLA répriment la croissance chez *Arabidopsis*, par contre, n'ont pas cette fonction dans leur organisme original (Figure 24B). Ceci montre d'une part, que la fonctionnalité du complexe GA-GID1-DELLA est apparue après la divergence entre les mousses et les lycophytes, et d'autre part, que la capacité des DELLA à réprimer la croissance à évoluer, après la divergence des lycophytes mais avant celle des Gymnospermes, probablement suite à l'évolution des cibles des DELLA, plutôt qu'à leurs propriétés intrinsèques (Figure 24C) (Yasumura et al., 2007; Hirano et al., 2007).

De nouvelles études phylogénétiques ont récemment montré que l'origine des protéines DELLA coïncidait avec la colonisation terrestre par les plantes (Hernández-García et al., 2019). Les récepteurs GID1 sont apparus tôt au cours de l'évolution des plantes terrestres (chez les mousses), mais leur fonctionnalité n'a eu de cesse d'évoluer pour devenir un système de perception des GA très sophistiqué, permettant aux plantes une meilleure adaptation aux différentes conditions environnementales rencontrées (Yoshida et al., 2018). Ainsi, l'acquisition de la voie de signalisation des GA pleinement fonctionnelle s'est établie par étapes successives au cours de l'évolution des plantes terrestres, et ces études ont mis en évidence que les GA ont joué un rôle majeur dans l'adaptation des plantes aux nouvelles conditions environnementales.

2.5. Transport des GA

Les plantes sont des organismes sessiles capables de continuellement s'adapter aux variations de l'environnement. Cela nécessite donc une communication entre les différents organes de la plante, afin de coordonner notamment le développement du système racinaire à celui des parties aériennes. Il est classiquement admis que les phytohormones représentent les molécules vectrices de signaux (Lacombe et Achard, 2016), avec une action locale, ou entre organes distants. Les tissus vasculaires constituent alors des voies de communication privilégiées (Lacombe et Achard, 2016). Par exemple, en réponse au nitrate, les cytokinines sont synthétisées dans les racines et transportées vers les parties aériennes pour induire leur croissance (Rahayu et al., 2005). Aujourd'hui, le transport longue-distance de nombreuses phytohormones a été bien caractérisé, et implique essentiellement deux grandes familles de transporteurs, les ABC (ATP-BINDING CASSETTE TRANSPORTER) et les NPF (NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER) (Lacombe et Achard, 2016). Le transport de

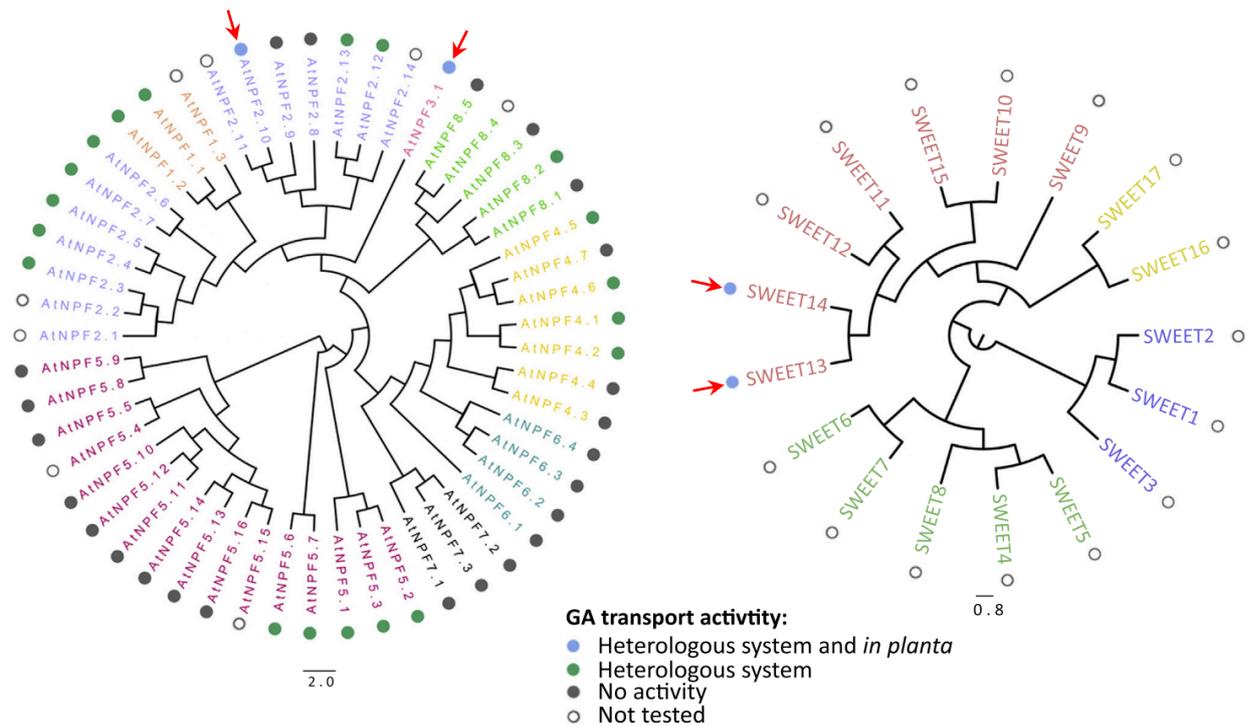


Figure 25. Arbres phylogénétiques des familles de transporteurs NPF et SWEET chez *Arabidopsis*.

Les flèches indiquent les transporteurs identifiés comme transporteurs de GA *in planta*.

Système hétérologue : levures ou oocytes de *Xenopus laevis*.

(Adapté de Binenbaum et al., 2018)

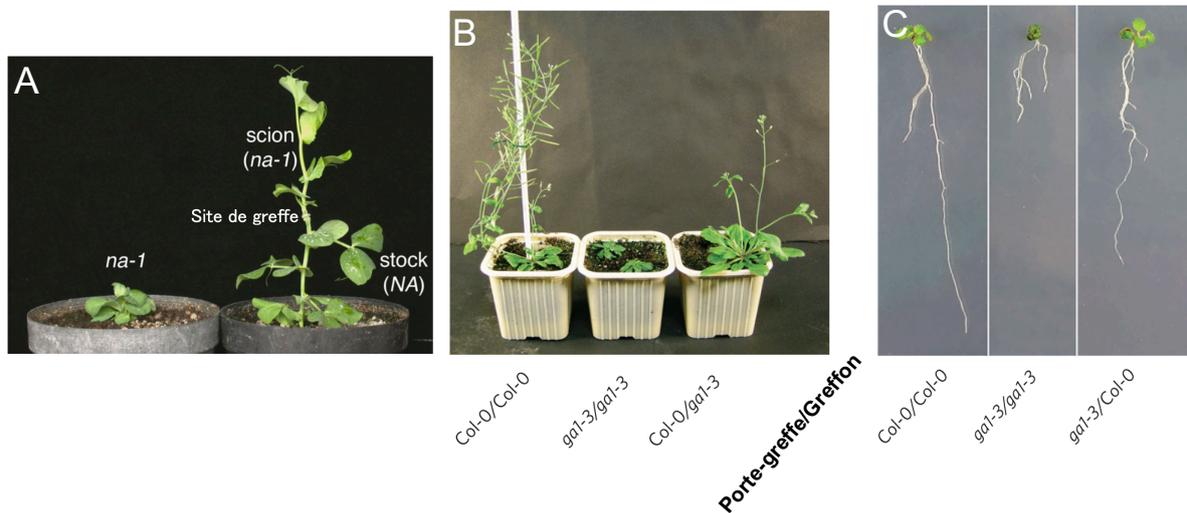


Figure 26. Transport longue-distance de GA chez le pois (*Pisum sativum*) et *Arabidopsis*.

A. Restauration de croissance d'un mutant du pois nain déficient en GA (*na-1*) greffé sur un porte-greffe sauvage (NA).

B. Restauration de croissance d'un mutant d'*Arabidopsis* déficient en GA (*ga1-3*) greffé à des racines produisant des GA (Col-0).

C. Restauration de la croissance des racines déficientes en GA (*ga1-3*) greffées à un greffon sauvage (Col-0).

(Adapté de Ross, 2006; Regnault et al., 2015)

GA est quant à lui relativement méconnu, cependant plusieurs études récentes apportent des réponses sur l'identité des transporteurs et des formes de GA transportées ainsi que sur la fonction biologique de ce transport (Binenbaum et al., 2018).

Les deux premiers transporteurs de GA identifiés appartiennent à la famille des NPF qui comprend 53 membres (Figure 25). Le premier, NPF2.10 (précédemment nommé GTR1), importe des GA bioactives dans les filaments des étamines en élongation. De manière consistante, le mutant *npf2.10* présente des filaments courts et une baisse de fertilité, et l'application exogène de GA permet la restauration d'un phénotype sauvage (Saito et al., 2015). Le deuxième transporteur identifié, NPF3.1, est localisé dans la membrane plasmique des cellules de l'endoderme de la racine, et semble impliqué dans la translocation de GA bioactives dans l'endoderme dans la zone d'élongation de la racine (Tal et al., 2016). L'originalité de cette étude réside dans le fait que ce transport a été mis en évidence grâce à des GA₃ et GA₄ fluorescentes. Néanmoins, il a été démontré que NPF3.1 pouvait importer des GA bioactives, mais aussi certains précurseurs, dans un système hétérologue (oocytes de *Xenopus laevis*). Chez le mutant *npf3.1*, bien qu'aucune GA fluorescentes ne s'accumulent dans l'endoderme, la croissance racinaire n'est pas altérée, suggérant la présence d'autres transporteurs impliqués dans le transport local de GA dans la racine (Tal et al., 2016; David et al., 2016). Les NPF ne sont pas les seuls transporteurs de GA. En effet, deux autres transporteurs de GA, SWEET13 et SWEET14, appartenant à la famille des transporteurs SWEET, ont été identifiés (Figure 25) (Kanno et al., 2016). Les transporteurs SWEET transportent essentiellement des sucres et SWEET13 et SWEET14 sont des protéines membranaires, principalement localisées dans les anthères, les tissus vasculaires des racines et feuilles ainsi que dans les pétioles. SWEET13 et SWEET14 importent *in vitro*, à la fois des formes bioactives et des précurseurs de GA et la fertilité du double mutant *sweet13 sweet14* est réduite, mais restaurée suite à un traitement avec des GA exogènes. Cette étude montre que SWEET13 et SWEET14 transportent localement les GA dans les inflorescences.

Le mouvement des GA chez les plantes a suscité un grand intérêt dès leur découverte par Margaret Radley en 1956. En effet, dès les années 1960, des GA ont été retrouvées dans le xylème et le phloème de plusieurs espèces comme le pois (*Pisum sativum*), le féverole (*Vicia faba*), le lupin blanc (*Lupinus albus*) ou encore le tournesol (*Helianthus annuus*) (Carr et al., 1964; Hoad et Bowen, 1968). Plus tard, ces résultats ont été confirmés par des expériences de greffes chez le pois, le maïs et *Arabidopsis* (Figure 26). Ainsi, il a été démontré qu'un greffon nain déficient en GA récupérait un développement et une croissance proche d'une plante sauvage, lorsque ce dernier était greffé sur un porte-greffe sauvage produisant des GA, confirmant l'existence d'un transport acropète de GA, assuré par le xylème (Figure 26A)

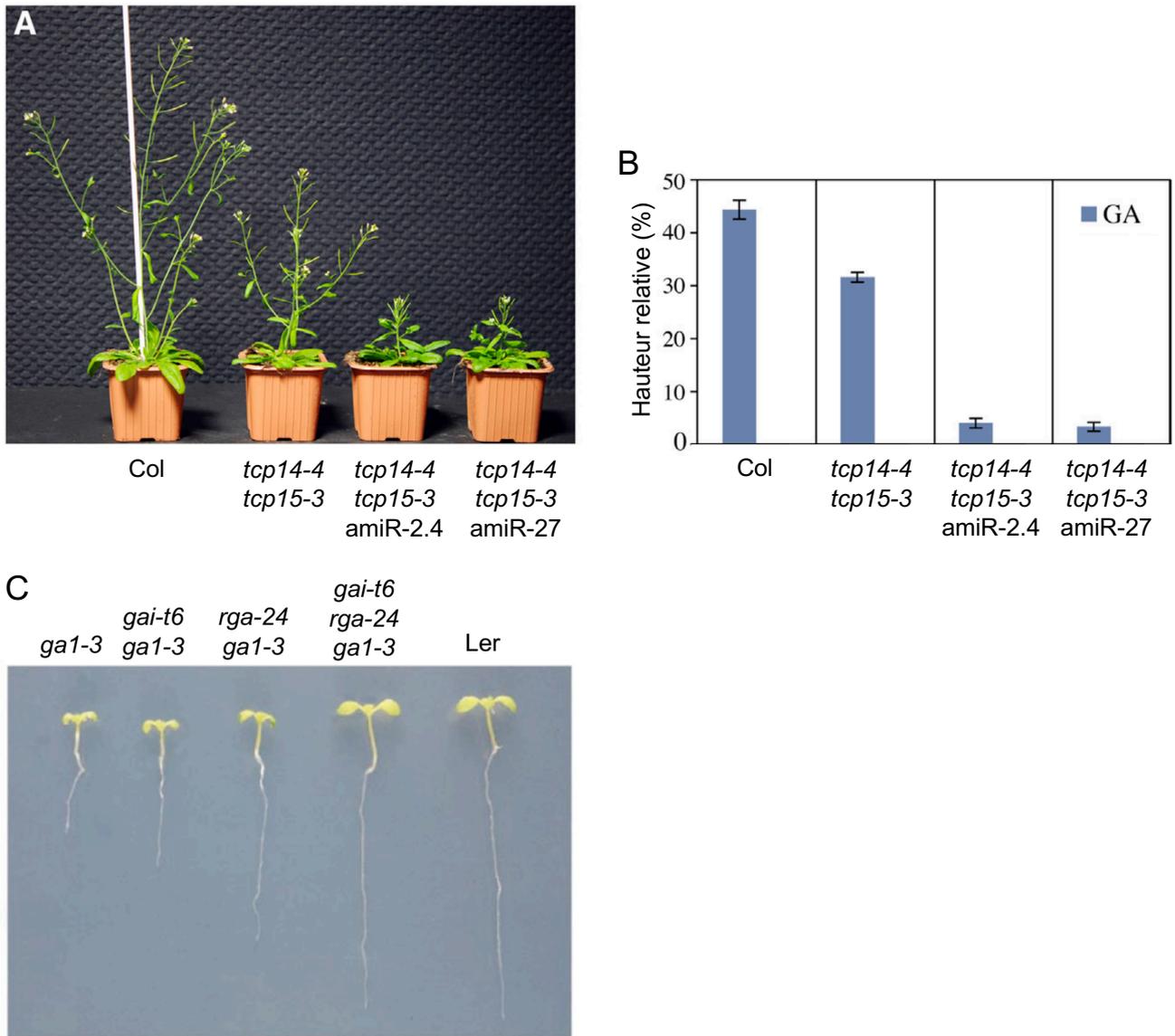


Figure 27. Les GA stimulent la croissance aérienne *via* les facteurs de transcription TCP et la croissance racinaire chez *Arabidopsis*.

A. Phénotypes du double mutant *tcp14-4 tcp15-3* et des quadruples mutants *tcp14-4 tcp15-3 amiR-tcp8/tcp22* (lignées 2.4 et 2.7) comparés à une plante sauvage (Col-0).

B. Hauteur relative de plantes sauvages (Col-0) et du double et quadruple mutants *tcp* en réponse à un traitement GA, exprimée en pourcentage par rapport à des plantes non traitées.

C. La croissance racinaire du mutant déficient en GA *ga1-3* est sévèrement inhibée comparée au sauvage (Ler). L'absence des protéines DELLA GAI et RGA chez le mutant *ga1-3 gai-t6 rga-24* restaure une croissance racinaire similaire au sauvage (Ler). Plantules âgées de 5 jours.

(Adapté de Fu et Harberd, 2003; Davière et al., 2014)

et B), (Katsumi et al., 1983; Proebsting et al., 1992; Ragni et al., 2011). Des études précédemment menées au laboratoire, ont montré également l'existence d'un transport basipète de GA des organes photosynthétiques vers les racines (Figure 26C) (Regnault et al., 2015). Récemment, des expériences de micro-greffes chez *Arabidopsis*, utilisant différents mutants de biosynthèse de GA, ont mis en évidence que la GA₁₂, la première forme de GA synthétisée, était la principale molécule signal endogène, transportée sur de longues distances *via* le xylème et le phloème (se référant aux transports acropète et basipète) (Figure 3 et 6) (Regnault et al., 2015) et qui contribue à la communication entre organes distants afin de coordonner le développement de la plante.

2.6. Rôle des GA dans le développement végétatif des plantes

Comme introduit précédemment, les mutants de biosynthèse de GA sont plus ou moins sévèrement affectés dans leur croissance et développement, à l'exemple du mutant *ga1-3* d'*Arabidopsis* au développement extrêmement compacte. Ce mutant présente une diminution sévère de l'élongation des tiges et de la croissance racinaire, qui est restaurée par un apport de GA, montrant le rôle essentiel des GA dans les processus de croissance des parties aériennes et des racines. Il est aujourd'hui bien établi que les GA stimulent à la fois la division et l'élongation cellulaire en induisant la dégradation des répresseurs de croissance DELLA (de Lucas et al., 2008; Achard et al., 2009). Les GA contrôlent également certaines étapes de transition du développement des plantes, comme la germination de la graine, la transition juvénile-adulte, la floraison et la reproduction, mais ces aspects ne seront pas développés dans ma thèse.

Au niveau des jeunes tiges, les GA stimulent la croissance des entre-nœuds en activant l'élongation cellulaire, qui résulte du relâchement de la paroi des cellules (introduction, paragraphe 2.7.1.2), ainsi que la prolifération cellulaire aux niveaux des méristèmes apicaux caulinaires et chez les monocotylédones, des méristèmes intercalaires. Les GA contrôlent la hauteur des tiges en modulant l'interaction des protéines DELLA avec les facteurs de transcription TCP (TEOSINTE BRANCHED 1 [TB1], CYCLOIDEA [CYC], and PROLIFERATING CELL FACTOR [PCF]) (Davière et al., 2014). Les TCP activent la transcription de régulateurs clés de la prolifération cellulaire au niveau des méristèmes apicaux caulinaires, telle la cyclineB1 (CYCB1) responsable de la transition entre la phase G2 et la mitose pendant le cycle cellulaire. En absence de GA, les DELLA s'accumulent et séquestrent les TCP, empêchant l'activation de l'expression de nombreux gènes cibles. A l'inverse, la dégradation des DELLA induite par les GA, libère les TCP, qui par la suite activent la prolifération cellulaire. De manière consistante, les mutants *tcp* présentent une réduction de croissance et sont en partie insensibles à l'action des GA (Figure 27A et B).

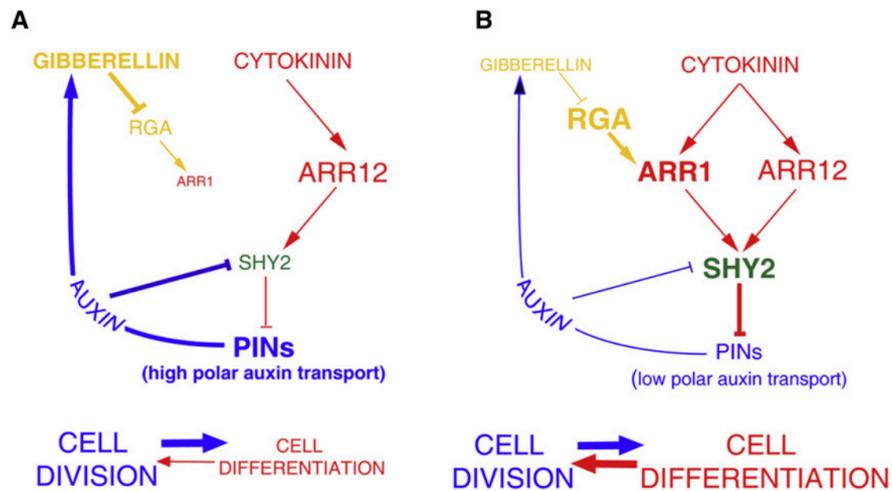


Figure 28. Modèle illustrant l'effet de l'auxine (en bleu), des cytokinines (en rouge) et gibbérellines (en jaune) sur la division et la différenciation cellulaire.

Dans le méristème racinaire à **(A)** 3 jours après la germination, l'auxine est transportée dans l'ensemble du méristème grâce aux transporteurs PIN-FORMED (PINs) et active la division cellulaire. **(B)** 5 jours après la germination, ARABIDOPSIS RESPONSE1 (ARR1), composant clé de la signalisation cytokinines (CK), active l'expression du répresseur transcriptionnel *SHORT HYPOCOTYL2* (SHY2), inhibant l'expression des gènes *PINs*. La protéine DELLA RGA renforce la signalisation CK en interagissant et activant l'activité transcriptionnelle de ARR1. Ainsi, les CK activent la différenciation cellulaire en restreignant l'accumulation d'auxine à l'extrémité de la racine. (Adapté de Moubayidin et al., 2010)

Certains mutants « faibles » de biosynthèse, comme le simple mutant *ga20ox1* ont une taille légèrement réduite et possèdent plus de ramifications que les plantes sauvages. À l’opposé, le nombre de ramification est fortement réduit chez le mutant *global-DELLA*. De plus, il a été montré chez la rose que la biosynthèse de GA augmentait lors du débourrement des bourgeons (Choubane et al., 2012). Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que les GA sont impliquées en partie dans la formation des ramifications. Le facteur de transcription BRC1 (BRANCHED1) de la famille des TCP est l’un des régulateurs majeurs de la formation des rameaux (Aguilar-Martínez et al., 2007; Seale et al., 2017). Son expression est régulée par de nombreux signaux comme les phytohormones et la lumière (Shimizu-Sato et al., 2009; Rameau et al., 2015). Étant donné que certains membres de la famille des TCP interagissent avec les DELLA (Davière et al., 2014), il est envisageable qu’une interaction BRC1/DELLA existe et modulerait l’architecture des plantes. Une régulation indirecte de BRC1 par les GA serait également envisageable.

De façon similaire, les GA stimulent la croissance de la racine principale en activant à la fois les taux relatifs de division et d’élongation cellulaire au niveau du méristème et de la zone d’élongation de la racine (Ubeda-Tomás et al., 2008; Achard et al., 2009; Ubeda-Tomás et al., 2009). Le mutant *ga1-3* présente une diminution de la croissance racinaire qui est restaurée par les mutations de deux DELLA *gait6 rga-24* (Figure 27C) (Fu et Harberd, 2003). L’utilisation d’une lignée rapporteur de l’activité de division cellulaire *pCYCB1;1:D-box-GUS*, a permis de montrer que les GA stimulaient la division cellulaire en s’opposant à l’action des protéines DELLA (Achard et al., 2009). De manière intéressante, l’expression d’une protéine DELLA stable et non-dégradable spécifiquement dans l’endoderme provoque un retard de croissance de la racine. L’action des GA dans l’endoderme est donc primordiale pour assurer l’élongation cellulaire et une croissance optimale de la racine (Ubeda-Tomás et al., 2008).

Au sein du méristème racinaire, l’équilibre entre division et différenciation cellulaire est essentiellement régulé par le jeu de deux hormones, l’auxine et les cytokinines (CK) (Dello Iorio et al., 2007; Moubayidin et al., 2010). Dans les premiers jours qui suivent la germination de la graine, l’auxine est distribuée de manière homogène dans tout le méristème par les transporteurs PIN-FORMED (PINs) et active la prolifération cellulaire (Figure 28A). Plus tard au cours du développement (environ 5 jours après la germination), les CK activent la différenciation cellulaire en s’opposant à l’action de l’auxine. En présence de CK, le facteur de transcription ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR1 (ARR1), composant clé de la signalisation CK, active l’expression de SHORT HYPOCOTYL2 (SHY2), un répresseur qui inhibe l’activité des PINs et en conséquence le transport de l’auxine (Figure 28B) (Moubayidin et al., 2010). SHY2 a donc un rôle central dans le contrôle de la croissance du méristème. De

manière intéressante, l'expression de *SHY2* et *ARR1* est réduite chez le simple mutant *DELLA rga-24*, montrant que les GA activent la transcription de ces deux facteurs de transcription (Moubayidin et al., 2010). Une étude récente a également montré que les protéines DELLA, dont RGA, interagissaient avec *ARR1* et augmentaient son activité transcriptionnelle (Marín-de la Rosa et al., 2015). Il est donc vraisemblable que les GA contrôlent la taille du méristème racinaire en modulant la balance hormonale CK/auxine.

2.7. Rôle des GA dans l'adaptation aux facteurs environnementaux

2.7.1. La lumière et la température

2.7.1.1. Effet de la lumière et température sur le métabolisme des GA

La lumière et la température, deux facteurs environnementaux majeurs, affectent la croissance des plantes. Les plantes ont la capacité de percevoir des changements de température et d'intégrer également la qualité, l'intensité et la période d'exposition à la lumière grâce aux photorécepteurs. La lumière rouge et rouge lointain est détectée par les phytochromes (Phy) et la lumière bleue par les crytochromes et phototropines. Les phytochromes sont au nombre de cinq chez *Arabidopsis* (PhyA – PhyE), parmi lesquels PhyA et PhyB jouent un rôle majeur dans la régulation de croissance (Clack et al., 1994). L'activation de PhyA et PhyB par la lumière retient l'élongation et la croissance de l'hypocotyle (photomorphogénèse). À l'inverse, à l'obscurité, PhyA et PhyB sont inactifs, ce qui a pour conséquence l'induction de l'élongation de l'hypocotyle (skotomorphogénèse ou étioilation). En plus de la croissance, la lumière régule également la germination et la floraison. Une élévation de température ambiante a un effet inverse à la lumière sur l'élongation et la croissance de l'hypocotyle (thermomorphogénèse) (Casal et Balasubramanian, 2019) (précisions dans le paragraphe 2.7.1.2 de l'introduction).

Plusieurs études montrent que la lumière régule la biosynthèse des GA (Alabadí et al., 2004; Achard et al., 2007). Chez *Arabidopsis*, lorsque les plantules sont cultivées à l'obscurité, la transcription des gènes *GA20ox1* et *GA3ox1* est activée, augmentant la synthèse de GA et en conséquence l'allongement de l'hypocotyle. Aussi, la croissance de l'hypocotyle du mutant de biosynthèse *ga1-3* demeure fortement réduite même à l'obscurité, car incapable de produire des GA bioactives ; ce qui détermine le rôle essentiel des GA dans ce processus. À l'opposé, en présence de lumière, l'expression des gènes du catabolisme des GA (*GA2ox*) est fortement induite, provoquant une diminution du niveau d'accumulation des GA bioactives et une répression de la croissance de l'hypocotyle. Cette régulation de la biosynthèse des GA est dynamique puisque lors d'un transfert des plantules de l'obscurité à la lumière, les transcrits *GA20ox* et *GA3ox* sont réprimés en moins d'une heure. Il faut ajouter que les niveaux d'accumulation des DELLA suivent également le rythme circadien, avec une forte

accumulation en GA bioactives à la fin de la nuit et une diminution le jour (Achard et al., 2007; Arana et al., 2011). Il en résulte une plus grande stabilité des protéines DELLA pendant le jour et une plus grande sensibilité aux GA la nuit. Il a été montré que cette sensibilité accrue aux GA la nuit impliquait une régulation transcriptionnelle du récepteur GA-GID1 (Arana et al., 2011), néanmoins, le mécanisme précis de cette régulation reste méconnu.

La température régule également le métabolisme des GA. La stratification des graines au froid est largement utilisée afin de lever la dormance des graines et d'accélérer la germination chez plusieurs espèces de plantes. Chez *Arabidopsis*, ce traitement au froid (4°C) stimule l'expression de gènes de biosynthèse des GA tels que *GA20x2* et *GA3ox1* et diminue également l'expression de *GA2ox2*, menant à l'augmentation de GA bioactives. À un stade plus tardif, lorsque les plantules sont soumises au froid, les gènes du catabolisme *GA2ox3* et *GA2ox6* sont induits afin de freiner la croissance des plantules et ainsi, d'augmenter leur tolérance au froid (Achard et al., 2008a). À l'inverse lors d'une élévation de température ambiante (29°C versus 20°C) la croissance de l'hypocotyle et du pétiole des feuilles est accélérée chez *Arabidopsis* (Stavang et al., 2009; Casal et Balasubramanian, 2019). Par ailleurs, quelques heures après un transfert des plantes de 20°C à 29°C, l'expression des gènes de biosynthèse *GA20ox1* et *GA3ox1* est rapidement induite tandis que l'expression de *GA2ox1*, codant pour une enzyme du catabolisme des GA, est réprimée. De manière consistante, l'accumulation de la protéine RGA diminue dans l'hypocotyle des plantes après une élévation de la température (Stavang et al., 2009).

Les plantes ont également la capacité de percevoir de subtils changements de températures lors des transitions du jour et de la nuit, et d'adapter leur croissance en conséquence. Les GA jouent un rôle essentiel dans ces réponses au thermopériodisme, les changements de températures entre le jour et la nuit (Yamaguchi, 2008). Ainsi, une étude chez le pois a montré que des plantes cultivées avec une alternance de température de 13°C le jour et 21°C la nuit ont des tiges plus courtes par rapport à des températures de 21°C le jour et de 13°C la nuit (Stavang et al., 2005). La concentration en GA₁ chez les plantes de petite taille est plus faible due à une augmentation de l'expression de *PsGA2ox2*. En accord avec cette observation, un mutant de réponse aux GA, où les protéines DELLA sont insensibles à l'action des GA, ne répond plus à ces changements de températures. Les GA sont donc les intégrateurs du thermopériodisme, permettant aux plantes d'adapter leur croissance en fonction des fluctuations des températures du jour et de la nuit (Yamaguchi, 2008).

2.7.1.2. Rôle de la signalisation GA dans la photo- et thermomorphogénèse

En plus de leur activité de photorécepteurs, les phytochromes sont également des thermorécepteurs (Jung et al., 2016; Legris et al., 2016). L'intégrateur central de la

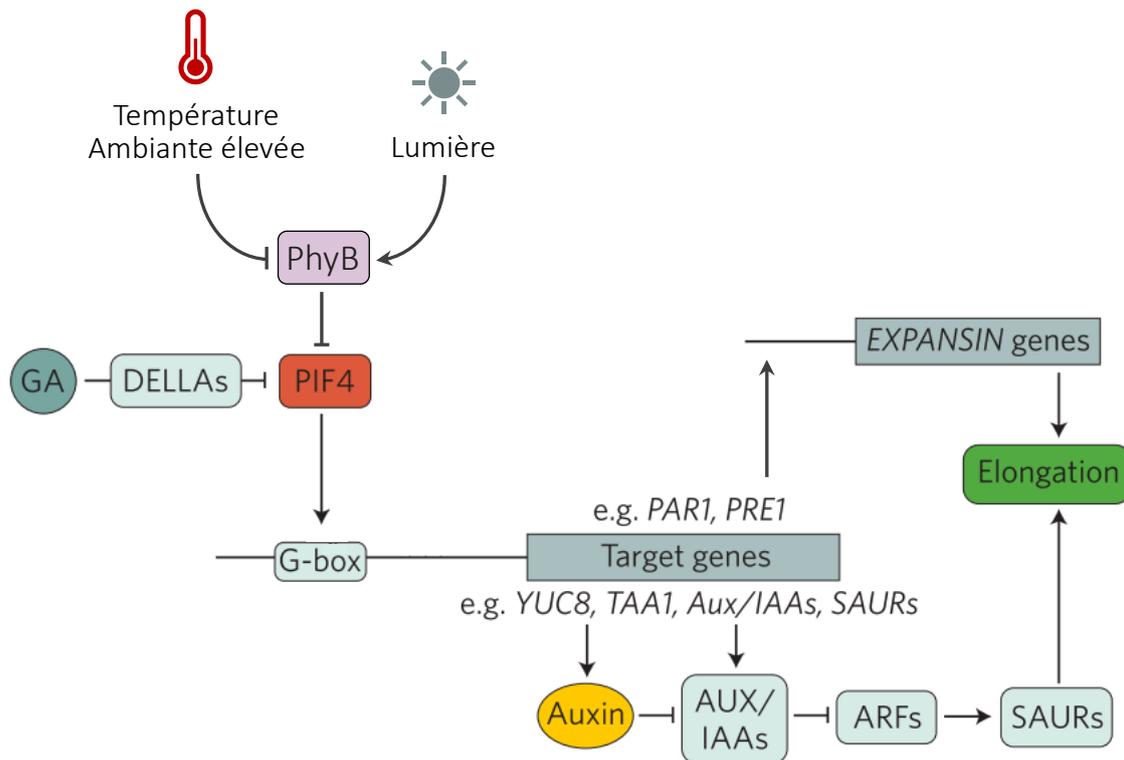


Figure 29. Modèle simplifié du rôle central de PIF4 dans l'intégration de la température et de la lumière.

La température ambiante et la lumière régulent la stabilité de PIF4 de manière antagoniste. La lumière active PhyB entraînant la dégradation de PIF4 par le protéasome. À l'inverse, lors d'une augmentation de la température, phyB est inactif et en conséquence PIF4 se fixe sur le motif G-box de promoteurs de gènes cibles. Ces gènes ciblent sont impliqués dans la biosynthèse de l'auxine tels que *YUC8* (*YUCCA 8*) et *TAA1* (*TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1*) et la signalisation de l'auxine, les *AUX/IAA* (*AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID*). L'activation de la signalisation auxine induit les *SAURs* (*SMALL AUXIN UP RNA*) qui stimulent l'élongation cellulaire. PIF4 régule une seconde cascade de signalisation impliquant entre autres, *PAR1* (*PHYTOCHROME RAPIDLY REGULATED 1*) et *PRE1* (*PACLOBUTRAZOL RESISTANCE 1*) qui induisent l'expression des gènes *EXPANSIN*. Les GA régulent positivement l'élongation cellulaire en stimulant la déstabilisation des DELLA, libérant ainsi le facteur de transcription PIF4.

(Adapté de Quint et al., 2016)

température ambiante et de la lumière chez *Arabidopsis* est le facteur de transcription PIF4 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR4) appartenant à la famille des bHLH. En réponse à une augmentation de la température ambiante et en l'absence de lumière, PIF4 active la transcription de gènes contrôlant l'élongation cellulaire, tels que des gènes impliqués dans la signalisation de l'auxine (Figure 29) (Quint et al., 2016; Casal et Balasubramanian, 2019). PIF4 est également régulé par d'autres signaux environnementaux et phytohormones comme les brassinostéroïdes (de Lucas et al., 2014). L'activation de PhyA et PhyB par la lumière induit la dégradation de PIF4 par le protéasome. Lorsque les protéines DELLA s'accumulent, elles séquestrent PIF4, empêchant son interaction aux promoteurs de gènes cibles impliqués dans l'élongation cellulaire (de Lucas et al., 2008). La signalisation GA joue donc un rôle majeur dans l'adaptation de la croissance des plantes en réponse à la lumière et la température ambiante.

2.7.2. Rôle des GA dans le développement d'endosymbioses

Lorsque les éléments nutritifs sont très peu disponibles, certaines plantes ont la capacité de former des symbioses avec des micro-organismes. Les plantes de la famille des Fabacées forment des endosymbioses rhizobiennes avec des bactéries du genre *Rhizobium* et environ 80% des familles de plantes vasculaires peuvent former des endosymbioses mycorhiziennes à arbuscules (AM) avec des champignons comme *Glomeromycota* (Suzaki et Kawaguchi, 2014; Choi et al., 2018). Ces associations avec des micro-organismes permettent à la plante d'améliorer le prélèvement des éléments nutritifs du sol par le système racinaire, majoritairement le phosphate pour les AM et l'azote *via* la fixation du diazote (N₂) par les bactéries symbiotiques (Wang et al., 2017). En échange, les micro-organismes reçoivent des molécules carbonées. L'établissement de ces symbioses se fait en plusieurs étapes complexes, régulées en partie par les phytohormones dont les GA (Gutjahr, 2014; Liu et al., 2018). Les GA ont été décrites comme régulant négativement la pénétration de l'hyphe des champignons AM chez *Lotus japonicus* et la formation des arbuscules chez *Medicago trunculata* (Foo et al., 2013; Floss et al., 2013; Takeda et al., 2015). La nodulation est impossible en absence de GA mais restaurée par des applications exogènes de GA ou par greffe (Figure 30A et B). À l'inverse des niveaux élevés de GA inhibent la formation des nodosités, suggérant qu'une concentration optimale en GA est requise pour que la nodulation soit induite (Ferguson et al., 2005, 2011). La signalisation GA est également importante dans la mise en place et le développement de ces symbioses. Chez des mutants de signalisation DELLA, la formation des nodosités et de l'AM est fortement réduite (Figure 30C) (Ferguson et al., 2011; Floss et al., 2013). Les DELLA interagissent avec de nombreux facteurs afin de réguler la transcription de gènes symbiotiques (Fonouni-Farde et al., 2016a).

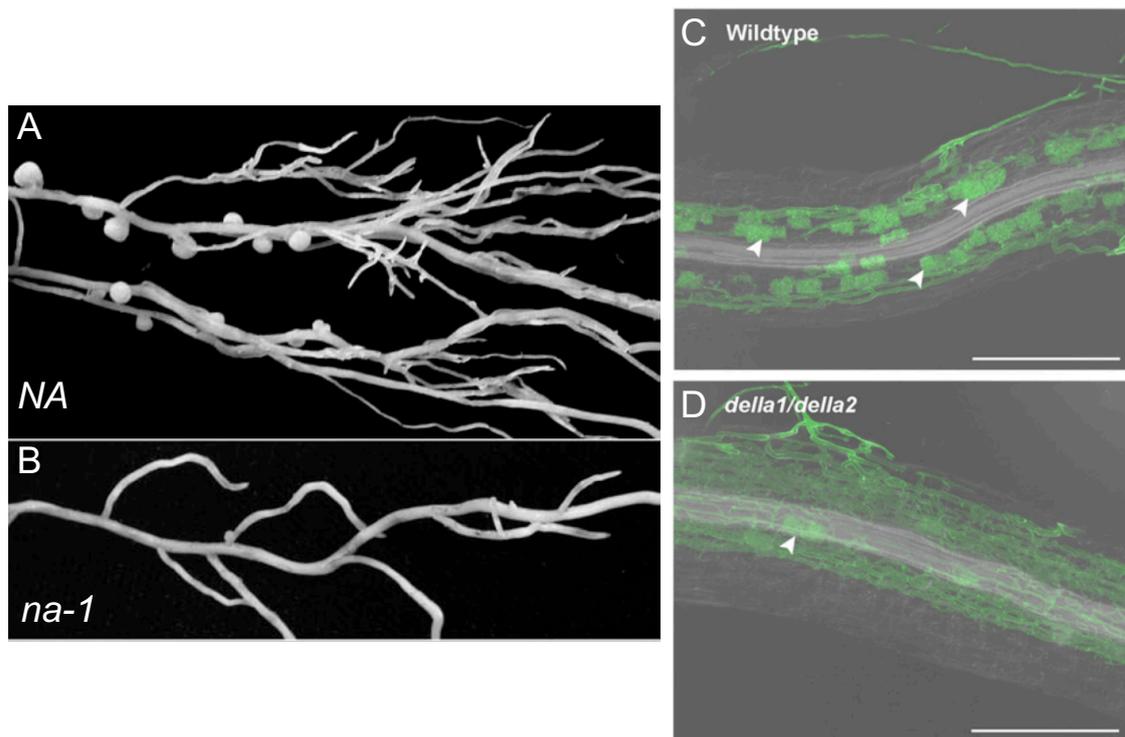


Figure 30. Les GA régulent la formation des endosymbioses chez le pois (*Pisum sativum*) et la luzerne (*Medicago trunculata*).

A. Racines de pois sauvage (NA), nodulées.

B. En absence de GA chez le mutant de biosynthèse *na-1*, la formation des nodules est inhibée.

C. Racines de *Medicago trunculata* sauvage et **D.** double mutante *della1/della2*, colonisées par le champignon *Glomus versiforme*. La formation des mycorhizes à arbuscules (AM; flèche blanche) est réduite en absence des protéines DELLA.

(Adapté de Ferguson et al., 2005; Floss et al., 2013)

2.7.3. Rôle des GA dans la nutrition minérale des plantes

Dans leur environnement, les plantes sont continuellement soumises à différents stress biotiques ou abiotiques, ayant un impact plus ou moins important sur leur développement. En effet, dans des conditions environnementales défavorables (ex. stress salin, sécheresse, froid), la croissance et le rendement des plantes sont réduits. En conséquence, les plantes ont su élaborer au cours de l'évolution plusieurs mécanismes d'adaptation dans le but d'optimiser leur croissance. Il est maintenant admis que la signalisation GA joue un rôle essentiel dans l'adaptation et la tolérance des plantes aux contraintes environnementales (Colebrook et al., 2014).

La signalisation GA est également impliquée dans les mécanismes d'adaptation des plantes à certaines carences en éléments minéraux, comme le fer ou le phosphate. En réponse à une déficience en fer, les plantes activent un ensemble coordonné de réponses maximisant l'absorption du fer par les racines. De récents travaux ont montré une double fonction des protéines DELLA et une régulation tissu-spécifique en cas d'une déficience en fer. L'une de ces fonctions est de restreindre la croissance racinaire en s'accumulant dans le méristème. L'autre est de réguler l'absorption du fer dans la racine au niveau de la zone de différenciation. En condition normales les DELLA séquestrent le facteur de transcription FIT (FER-like IRON-DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR), inhibent leur activité transcriptionnelle et ainsi répriment l'expression du transporteur *IRT1* (IRON-REGULATED TRANSPORTER1). Lorsque la disponibilité du fer diminue, les DELLA sont spécifiquement déstabilisées dans l'épiderme de la zone de différenciation des racines par les GA, ce qui en conséquence active l'expression de *IRT1* et l'absorption du fer (Matsuoka et al., 2014; Wild et al., 2016).

Par ailleurs, lors d'une carence en phosphate, Jiang et ses collaborateurs (2007) ont démontré chez *Arabidopsis* que les niveaux d'expression des gènes de biosynthèse des GA (*GA20x1* et *GA3ox1*) sont diminués et ceux responsables du catabolisme des GA sont augmentés. En conséquence, les contenus en GA bioactives diminuent et les protéines DELLA s'accumulent, réprimant ainsi la croissance de la plante et racinaire secondaire (Jiang et al., 2007). Cependant, au contraire de la réponse à une carence en fer, l'efficacité de l'absorption du phosphate par les racines et les niveaux des transcrits spécifiques à une carence en phosphate, ne dépendent pas de la signalisation GA (Jiang et al., 2007). De manière surprenante, une étude récente a montré un rôle différent des GA et des protéines DELLA lors d'une carence en phosphate chez la tomate (*Solanum lycopersicum*) (Zhang et al., 2019). En effet, chez la tomate, l'absence de phosphate stimule la croissance des racines. Il a été démontré que la signalisation GA médiée par la protéine DELLA PRO (PROCERA) régula à la fois la croissance de la racine et l'expression des gènes impliqués dans l'assimilation du

Tableau 2. Éléments minéraux essentiels à la majorité des plantes vasculaires et leurs fonctions
(Adapté de Raven et al., 2014).

Éléments (symbole chimique)	Forme(s) disponible(s) pour les plantes	Fonctions
Macroéléments		
Hydrogène (H)	H ₂ O	Nécessaire à la synthèse des sucres.
Carbone (C)	CO ₂	Constituant majeur des plantes ; retrouvé dans le squelette de nombreuses biomolécules comme l'amidon ou la cellulose ; fixé grâce à la photosynthèse pour former des hydrates de carbone servant comme stockage d'énergie à la plante.
Oxygène (O)	O ₂	Nécessaire à la respiration cellulaire ; retrouvé dans de très nombreux autres composants cellulaires.
Azote (N)	NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺	Composant des acides aminés, des acides nucléiques, des chlorophylles et des coenzymes.
Potassium (K)	K ⁺	Intervient dans l'osmose et l'équilibre ionique, ainsi que dans l'ouverture et la fermeture des stomates ; activateur de nombreuses enzymes.
Calcium (Ca)	Ca ²⁺	Composant de la lamelle moyenne et des parois cellulaires ; cofacteur d'enzymes ; intervient dans la perméabilité des membranes cellulaires ; messenger secondaire dans la transduction des signaux.
Magnésium (Mg)	Mg ²⁺	Composant de chlorophylle ; activateur de nombreuses enzymes.
Phosphore (P)	H ₂ PO ₄ ⁻ , HPO ₄ ²⁻	Intervient dans les composés phosphatés transporteurs d'énergie (ATP et ADP), les acides nucléiques, plusieurs coenzymes, les phospholipides.
Soufre (S)	SO ₄ ²⁻	Composant de certains acides aminés et de la coenzyme A.
Microéléments		
Chlore (Cl)	Cl ⁻	Intervient dans l'osmose et l'équilibre ionique ; probablement indispensable aux réactions photosynthétiques produisant l'oxygène.
Fer (Fe)	Fe ³⁺ , Fe ²⁺	Nécessaire à la synthèse de la chlorophylle ; composant des cytochromes et de la nitrogénase.
Bore (B)	H ₃ BO ₃ , H ₂ BO ₃ ⁻	Intervient dans l'utilisation du Ca ²⁺ , la synthèse des acides nucléiques, l'intégrité des membranes ; en relation avec la stabilité des parois cellulaires.
Manganèse (Mn)	Mn ²⁺	Activateur de certaines enzymes ; nécessaire à l'intégrité de la membrane chloroplastique et pour la libération d'oxygène au cours de la photosynthèse.
Zinc (Zn)	Zn ²⁺	Activateur ou composant de nombreuses enzymes.
Cuivre (Cu)	Cu ²⁺	Activateur ou composant de certaines enzymes intervenant dans les oxydations et réductions.
Nickel (Ni)	Ni ²⁺	Composant essentiel de la nitratre réductase impliquée dans le métabolisme de l'azote.
Molybdène (Mo)	MoO ₄ ²⁻	Nécessaire à la fixation de l'azote et la réduction des nitrates.

phosphate (Zhang et al., 2019c). Pris dans leur ensemble, ces études montrent que le rôle de la signalisation GA peut être différent suivant les espèces.

3. La nutrition azotée des plantes

3.1. La nutrition minérale

Comme tout être vivant, les plantes doivent trouver dans leur environnement les ressources nécessaires à leur croissance et leur développement. Contrairement aux animaux, les plantes sont des organismes sessiles, devant s'adapter continuellement aux variations de leur environnement. Au cours de leur évolution, les plantes ont développé de multiples structures et fonctions, permettant un accès efficace aux éléments minéraux essentiels, leur distribution dans la plante et leur utilisation dans le métabolisme et la croissance (Raven et al., 2014).

Depuis les années 1980, 17 éléments sont considérés comme indispensables à la croissance des plantes vasculaires (Trachéophytes), c'est-à-dire que (1) leur présence est nécessaire pour que la plante puisse accomplir son cycle de vie (i.e. production de graines viables) et/ou (2) ces éléments font partie d'une molécule ou de l'un de ses constituants, eux-mêmes indispensables (Tableau 2 ; Raven et al., 2014). Parmi tous les éléments essentiels, l'hydrogène, le carbone et l'oxygène proviennent de l'eau et du dioxyde de carbone, tous les autres sont assimilés par le système racinaire dans la rhizosphère.

La teneur en un élément minéral varie selon l'espèce considérée, mais généralement, les éléments minéraux sont classés en deux catégories en fonction des quantités exigées pour une croissance optimale. Par conséquent, les éléments nommés « macroéléments » doivent être assimilés en grande quantité. Par exemple l'azote (N) représente environ 1,5% de matière sèche totale de la plante. Les autres éléments, appelés « microéléments », ne sont nécessaires qu'en très faible quantité, sous forme de trace (Raven et al., 2014). Ces éléments essentiels possèdent de nombreuses fonctions bien caractérisées chez les plantes : rôles dans la structure de molécules, comme cofacteurs enzymatiques ou messagers secondaires (Tableau 2). En conséquence, la carence en un quelconque élément affecte le développement et la croissance des plantes.

3.2. Rôle de l'azote dans le développement des plantes

L'azote est l'un des macroéléments essentiels pour les plantes ainsi que le facteur le plus limitant pour la productivité agricole (Vidal et Gutiérrez, 2008). En effet l'azote est un composant majeur des acides nucléiques (ADN et ARN), des acides aminés (protéines) et d'autres macromolécules essentielles comme la chlorophylle (Crawford et Forde, 2002). Le

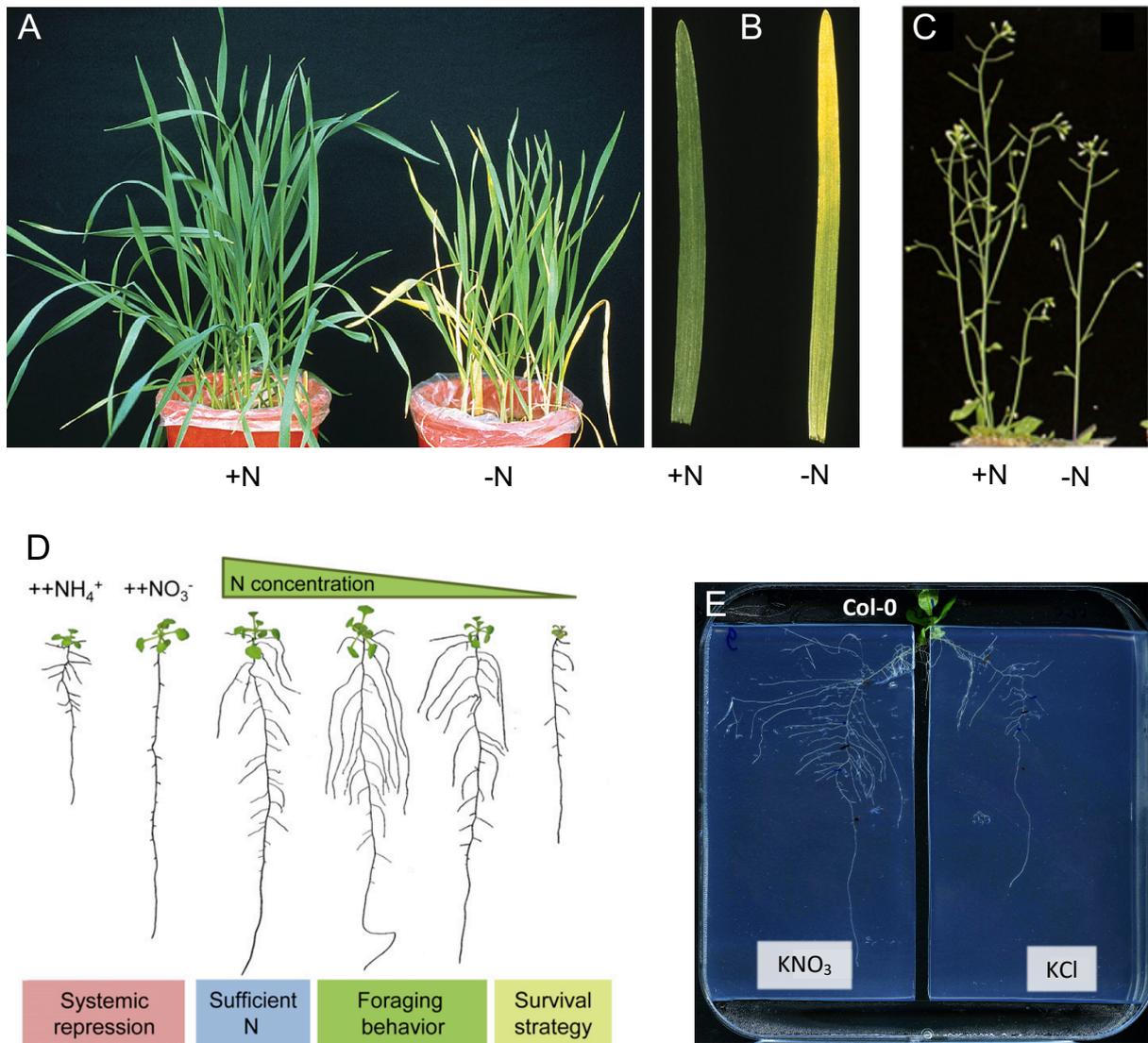


Figure 31. Effet de l'azote sur la croissance du blé (*Triticum aestivum*) et *Arabidopsis*.

A-B. Chez le blé, l'absence d'azote se traduit par une diminution de la hauteur des plantes (**A**) Les feuilles sont chlorosées suite à un défaut de synthèse de la chlorophylle. (**B**) Les vieilles feuilles sont les premières altérées par la chlorose, qui commence à l'extrémité distale de la feuille.

C. Les mêmes symptômes de carences sont présents chez *Arabidopsis*. Une carence en azote réduit également le nombre de ramifications.

D. Architecture du système racinaire en réponse à la disponibilité en azote.

E. Croissance racinaire d'une plante sauvage (Col-0) âgées de 25 jours, après transfert sur milieu hétérogène en nitrate (culture « split-root » *in vitro*). La plasticité adaptative d'une plante en réponse à un environnement hétérogène en nitrate, se manifeste par une importante reprogrammation génétique qui conduit à des changements considérables du métabolisme et morphologique, notamment de l'architecture racinaire. La densité et l'élongation des racines latérales sont plus importantes du côté riche en nitrate (KNO₃) par rapport au côté pauvre en nitrate (KCl).

(Source photos blé : Flickr/CIMMYT ; Adapté de Giehl et von Wieren, 2014; de Jong et al., 2014)

développement et la croissance de la plante sont ainsi régulés en fonction de la disponibilité en azote dans l'environnement, dont le nitrate, principale source azotée pour les plantes (introduction, paragraphe 3.3).

Le nitrate stimule la croissance des organes photosynthétiques, ayant une incidence directe sur la biomasse de la plante (Fredes et al., 2019). En conséquence, une faible disponibilité ou une carence en azote/nitrate cause un retard de croissance de la plante, avec des tiges fines et frêles (Figure 31A). La ramification est également réduite due à un retard dans l'activation des bourgeons axillaires (Figure 31C) (de Jong et al., 2014). La floraison est avancée, peu de grains se développent et contiennent un faible taux de protéines. Les feuilles deviennent pâles en raison d'un défaut de synthèse de chlorophylle (Figure 31A et B). La chlorose affecte en premier lieu les vieilles feuilles, l'azote est remobilisé vers les jeunes tissus en croissance (Wendler et al., 1995; Rossato et al., 2001; Fan et al., 2009). La quantité d'azote appliquée (un excès ou très peu) peut également avoir un impact sur les risques de maladie et d'infections par les pathogènes (Fagard et al., 2014).

Les plantes ont également la capacité de moduler l'architecture du système racinaire en fonction de la disponibilité et de la source de l'azote dans le sol afin d'optimiser son prélèvement (Figure 31D et E) (Giehl et von Wiren, 2014). Chez *Arabidopsis*, sur un milieu homogène, une sévère carence en nitrate inhibe à la fois l'élongation de la racine principale, ainsi que l'émergence et l'élongation des racines latérales (Araya et al., 2016). Une disponibilité faible en nitrate (≤ 1 mM) entraîne une élongation à la fois de la racine principale et des racines latérales. Pour une concentration intermédiaire (entre 5 et 10 mM), le développement des racines latérales est restreint contrairement à la croissance de la racine principale. Enfin, pour une concentration excessive (> 10 mM), la croissance des racines latérales et principale est inhibée à des degrés divers (Figure 31D) (Zhang et al., 1999; Krouk et al., 2010a; Gruber et al., 2013; Araya et al., 2016). Cette inhibition de croissance est médiée par une accumulation de nitrate et métabolites azotés dans la plante, qui régulent négativement la croissance racinaire (Kant et al., 2011).

Dans le sol, la disponibilité du nitrate est très souvent hétérogène. Dans ces conditions, la croissance et le développement des racines latérales sont favorisés en direction des zones riches en nitrate, afin d'optimiser son prélèvement. Au contraire, dans les zones appauvries en nitrate, la croissance des racines latérales est inhibée (Figure 31E) (Forde, 2014; O'Brien et al., 2016). En plus de ces réponses morphologiques à l'apport en nitrate, l'architecture racinaire est différente en présence de sources alternatives en azote. Par exemple, l'ammonium et le glutamate inhibent la croissance de la racine primaire mais stimulent la formation des petites racines latérales (Forde, 2014; Araya et al., 2016). Ces différences dans

la morphologie du système racinaire illustrent les différentes stratégies mises en place par la plante pour palier à un déficit en azote et optimiser son prélèvement.

3.3. Sources azotées disponibles pour les plantes

L'azote est l'élément le plus abondant dans l'atmosphère terrestre, cependant, présent sous forme de N_2 , il est difficilement assimilable par les plantes (Roycewicz et Malamy, 2012). Seules les plantes de la famille des Fabacées sont capables de former des nodosités - symbioses avec des bactéries du genre *Rhizobium* (introduction, paragraphe 2.7.2) - lorsque les conditions en N sont limitantes (Dechornat et al., 2011). Les autres plantes assimilent l'azote dans le sol, présent sous différentes formes. La solution du sol peut contenir des composés azotés inorganiques tels que l'ammonium (NH_4^+) ou le nitrate (NO_3^-) et des composés organiques comme des protéines ou des acides aminés (Näsholm et al., 2009; Roycewicz et Malamy, 2012). L'ammonium et le nitrate sont obtenus d'une part, grâce à l'action de bactéries fixatrices du N_2 qui convertissent le diazote en ammoniac (NH_3) ou en NH_4^+ , et d'autre part, par des bactéries nitrifiantes réduisant le NH_3 en nitrite (NO_2^-) puis en NO_3^- . Au cours de l'évolution, certaines plantes ont développé une stratégie d'adaptation spécifique, les plantes carnivores. Cette adaptation leur permet d'assimiler efficacement l'azote (ici sous forme organique) lorsque les formes azotées inorganiques sont peu disponibles dans le sol ou sur leur substrat (Adamec, 1997).

Dans des conditions tempérées, l'azote est principalement présent sous forme inorganique. Ainsi, l'ammonium et le nitrate représentent les formes d'azote les plus importantes dans les sols agricoles (Crawford et Glass, 1998). Cependant, l'équilibre entre ces deux ions a un rôle important dans la nutrition des plantes. Une nutrition strictement ammoniacale peut être toxique pour la plante et entraîne le « syndrome ammoniacal » (Chaillou et al., 1986). Ce syndrome est causé par une acidification du cytoplasme, perturbant la physiologie de la plante ainsi que par un ralentissement de croissance pouvant aller jusqu'à la mort de la plante (von Wiren et al., 2000). Dans les sols bien aérés, le processus de nitrification est également très rapide, donc le nitrate est la forme la plus communément absorbée et assimilée par les racines (Crawford et Glass, 1998). En revanche, il est rapidement solubilisé dans la solution du sol et donc sujet au lessivage (Krapp et al., 2014). Ceci induit d'importantes variations de concentrations en nitrate dans les sols cultivés, dans le temps et l'espace, favorisant également l'eutrophisation des cours d'eau (Gruber et Galloway, 2008).

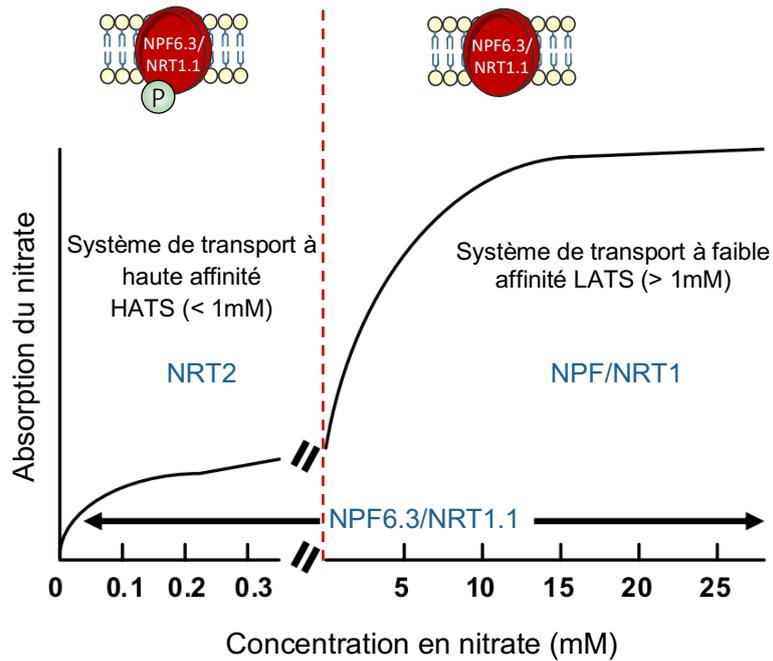


Figure 32. Systèmes de prélèvement du nitrate chez *Arabidopsis*.

Les transporteurs de la famille NRT2 sont principalement impliqués dans le transport de nitrate à haute affinité (HATS).

Pour des concentrations en nitrate supérieures à 1 mM, le transport de nitrate implique les transporteurs à faible affinité appartenant à la famille des NPF/NRT1 (LATS).

NPF6.3/NRT1.1 est un transporteur nitrate à double affinité (HATS et LATS). Son affinité pour le nitrate est régulée par son état de phosphorylation. (Adapté de Tsay et al., 2007)

3.4. Absorption, transport et assimilation du nitrate chez *Arabidopsis*

L'absorption du nitrate est médiée par deux systèmes distincts, dépendants de la concentration en azote dans le sol (Dechornat et al., 2011). Lorsque la concentration en NO_3^- est supérieure à 1 mM, celui-ci est pris en charge par le système de transport de faible affinité (LATS). Tandis qu'à une concentration plus faible (<1 mM), le transport de nitrate est assuré par un système de haute affinité (HATS), dont l'expression peut être constitutive (cHATS) ou induite par le nitrate lui-même (iHATS) (Figure 32) (Siddiqi et al., 1989). L'import du nitrate dans la racine puis sa redistribution dans les cellules, tissus et organes de la plante, implique essentiellement quatre familles de transporteurs : les NPF (NITRATE TRANSPORTER 1 / PEPTIDE TRANSPORTER FAMILY), les NRT2 (NITRATE TRANSPORTER 2), les CLCs (CHLORIDE CHANNELS) et SLAC/SLAH (SLOW ANION ASSOCIATED CHANNEL HOMOLOG) (Wang et al., 2012; Krapp et al., 2014) (Figure 33). Chez *Arabidopsis*, les protéines membranaires NPF et NRT2 transportent le NO_3^- par un mécanisme de co-transport avec des protons H^+ (symport) (Krapp et al., 2014).

La famille des transporteurs NPF, anciennement nommée NRT1, composée de 53 membres (Figure 25), appartient pour la grande majorité au système LATS (Léran et al., 2014). Le premier membre caractérisé est NPF6.3 (également nommé CHL1 ou NRT1.1), principal senseur et transporteur de nitrate, est appelé aussi « transcepteur » (Tsay et al., 1993; Ho et al., 2009). Ce transporteur localisé au niveau de la membrane plasmique des cellules, en outre, à l'apex des racines principales et latérales, est le seul à posséder une double affinité pour le nitrate (Liu et Tsay, 2003). Sous un état phosphorylé, NPF6.3/NRT1.1 a une plus forte affinité pour le nitrate se traduisant par une plus grande capacité de transport (Figure 32) (Ho et al., 2009). Ainsi NPF6.3/NRT1.1 optimise le prélèvement du nitrate selon sa disponibilité dans le sol. En plus de l'import de nitrate dans la racine, le transport et la distribution du nitrate *in planta* sont essentiels pour la croissance de la plante. D'autres NPF sont ainsi impliqués dans le transport du nitrate en direction de tous les organes de la plante (Figure 33). Ainsi, NPF7.3 et les membres de la sous-famille NPF2 en général, acheminent le nitrate dans le xylème, assurant son transport longue-distance des racines vers les parties aériennes de la plante. Dans les feuilles de la rosette, le nitrate peut-être relocalisé *via* le phloème depuis les feuilles sénescentes vers les jeunes feuilles par NPF1.1 et NPF1.2, et lors d'une carence en azote, par NPF2.13 (Figure 34) (Fan et al., 2009; Hsu et Tsay, 2013). Certains transporteurs participent également au stockage du nitrate dans la graine comme NPF2.12 (Almagro et al., 2008; Wang et al., 2018). Par ailleurs, il est important de rappeler que les NPF ne transportent pas exclusivement le nitrate mais aussi des peptides ou des hormones telles que l'auxine, l'ABA et les GA (Corratgé-Faillie et Lacombe, 2017).

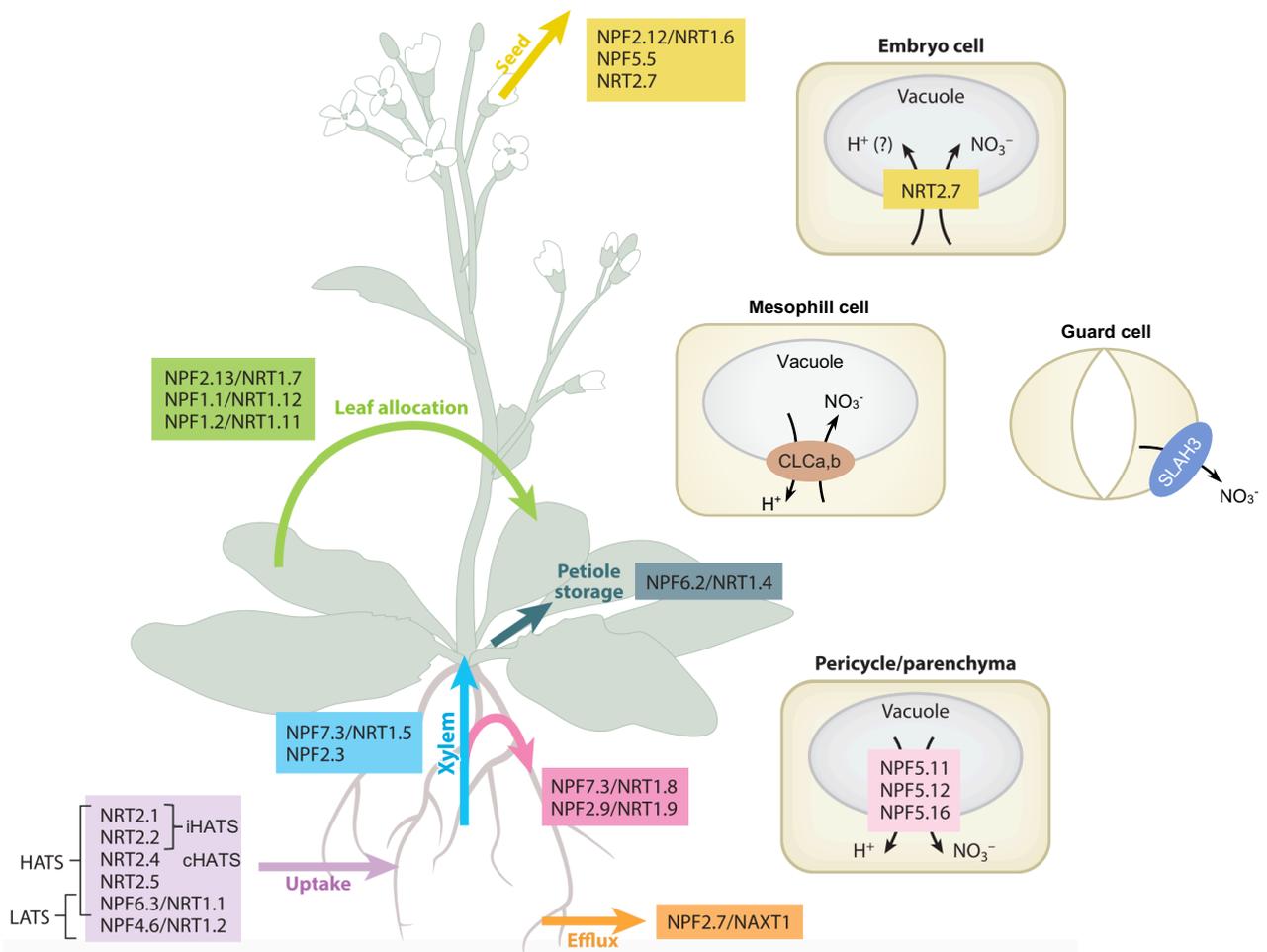


Figure 33. Transport du nitrate chez *Arabidopsis*.

Principaux transporteurs de nitrate appartenant à la famille des NPF (NRT1), NRT2, CLC et SLAC/SLAH.

NPF, NITRATE TRANSPORTER 1 / PEPTIDE TRANSPORTER FAMILY ; NRT2, NITRATE TRANSPORTER 2 ; CLC, CHLORIDE CHANNELS ; SLAC/SLAH, SLOW ANION ASSOCIATED CHANNEL HOMOLOG ; NAXT, NITRATE EXCRETION TRANSPORTER ; LATS, Système de Transport de Faible Affinité ; HATS, Système de Transport de Haute Affinité ; c, constitutif ; i, inducible. (Adapté de Wang et al., 2018)

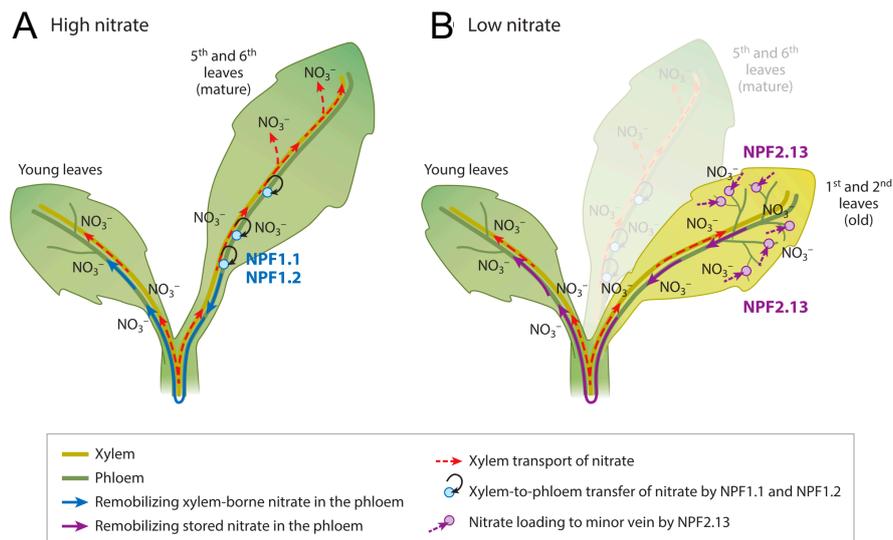


Figure 34. Remobilisation du nitrate chez *Arabidopsis*.

A. Lorsque la disponibilité en nitrate est optimale, ce dernier est transporté vers les feuilles par le xylème. NPF1.1 et NPF1.2 localisées dans les feuilles matures (5^e et 6^e feuille rosette) transfèrent le nitrate du xylème au phloème pour être redistribué dans les jeunes feuilles en croissance.

B. Lorsque la disponibilité en nitrate diminue, le nitrate stocké dans les vieilles feuilles (1^{ère} et 2^{ème} feuille rosette) est remobilisé par NPF2.13 dans le phloème pour subvenir aux besoins des jeunes feuilles. (Wang et al., 2018)

Contrairement aux NPF, les membres de la famille NRT2 transportent spécifiquement le nitrate (Figure 33). Seulement au nombre de 7 chez *Arabidopsis*, ces importeurs appartiennent au système de haute affinité (HATS) et nécessitent l'interaction avec une autre protéine, NAR2.1 (famille des NRT3) pour être maintenue au niveau de la membrane plasmique (Kotur et al., 2012). NRT2.1 représente le principal membre impliqué dans le prélèvement de nitrate du sol vers la racine ; l'absorption de nitrate étant réduite de 75% chez le mutant *nrt2.1* « perte de fonction » (Filleur et al., 2001; Cerezo et al., 2001). NRT2.2 est quant à lui complémentaire à l'action de NRT2.1 ; l'expression de ces deux transporteurs étant induite par le nitrate (Cerezo et al., 2001). NRT2.4 et NRT2.5 importent également le nitrate dans la racine lorsque celui-ci est très peu disponible, mais sont également impliqués dans la translocation du nitrate dans le phloème. L'expression de ces deux transporteurs est par ailleurs induite lorsque la plante expérimente une longue carence en nitrate (Kiba et al., 2012; Lezhneva et al., 2014).

Deux membres de la familles des CLCs, CLCa et CLCb sont responsables du stockage du nitrate dans la vacuole des cellules du mésophylle et transportent le nitrate et des protons en sens opposé (antiport) (Figure 33) (De Angeli et al., 2006; Wang et al., 2012). Les membres de la famille des SLAC/SLAH sont également localisés au niveau de la membrane plasmique des cellules du mésophylle, mais aussi, des cellules de garde comme pour SLAH3 (Figure 33) (Wang et al., 2012). Tous ces transporteurs montrent une activité d'import de nitrate dans des systèmes hétérologues, mais pour un grand nombre d'entre eux, leur activité n'a pas été confirmée *in planta* (Krapp et al., 2014).

Après son absorption, le nitrate est métabolisé directement dans la racine, stocké dans la vacuole ou transféré *via* le xylème dans les parties aériennes de la plante. La répartition de l'assimilation du nitrate entre les feuilles et les racines dépend de l'espèce végétale, de la concentration en nitrate dans le milieu, de la température et de l'intensité lumineuse (Nunes-Nesi et al., 2010). Le nitrate est premièrement réduit en nitrite (NO_2^-) par la nitrate réductase (NR) dans le cytoplasme des cellules, puis réduit en NH_4^+ dans les plastes par la nitrite réductase (NiR) (Figure 35) (Wilkinson et Crawford, 1993; Crawford, 1995). Chez *Arabidopsis*, deux gènes codent la NR, *NIA1* et *NIA2*, contre un seul pour la NiR. L'ammonium est ensuite pris en charge par le cycle GS/GOGAT, au cours duquel la glutamine synthétase (GS) fixe le NH_4^+ à une molécule de glutamate pour former la glutamine dans les plastes (Figure 35). La glutamine associée au 2-oxoglutarate forme deux molécules de glutamate grâce à l'action de la glutamine 2-oxoglutarate amino transférase (GOGAT). Par transamination, l'azote est ensuite transféré à d'autres substrats carbonés (α -cétoniques) pour former l'ensemble des acides aminés nécessaires à la synthèse des protéines (Figure 35) (Masclaux-Daubresse et al., 2010).

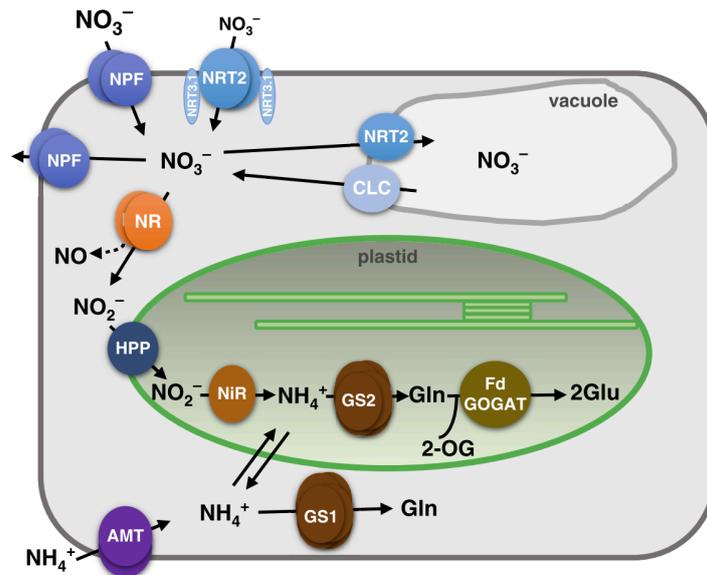


Figure 35. Mécanisme d'assimilation du nitrate dans la cellule.

AMT, ammonium transporter ; NPF, Nitrate transporter 1/Peptide transporter Family ; NRT2, Nitrate Transporter 2 ; CLC, chloride channels ; HPP, histidin-prolin-prolin containing protein ; NO, oxyde nitrique ; NO_3^- , nitrate ; NO_2^- , nitrite ; NH_4^+ , ammonium ; Gln, glutamine ; Glu, glutamate ; 2-OG, 2-oxaloglutarate ; NR, Nitrate Réductase ; NiR, Nitrite Réductase ; GS, Glutamine Synthétase ; Fd-GOGAT, ferredoxin-glutamine-2-oxoglutarate aminotransferase.

(Krapp, 2015)

3.5. Signalisation du nitrate

Le nitrate n'est pas seulement un nutriment essentiel pour les plantes, c'est aussi une molécule signal qui active des réponses locales et systémiques, incluant l'expression de nombreux gènes, le métabolisme et les mécanismes de croissance et développement.

Chez *Arabidopsis*, un apport de nitrate à des plantules cultivées en absence de N induit l'expression de plus de 1000 gènes dans les racines et les parties aériennes. Cette induction transcriptionnelle appelée « Primary Nitrate Response ou PNR » est très rapide (quelques minutes) et est indépendante de la synthèse *de novo* de protéines (Krouk et al., 2010b; Medici et Krouk, 2014). Cette réponse transcriptionnelle est spécifique au nitrate puisqu'elle est conservée chez le double mutant *nia1 nia2*, où l'activité nitrate réductase est absente (Wang et al., 2004). Les gènes induits par le nitrate sont impliqués dans divers mécanismes de régulation incluant son transport (comme les *NPF6.3/NRT1.1* ou *NRT2.1*), son assimilation (les gènes *NIA1*, *NIA2*, *NIR*) ou encore dans le métabolisme des acides aminés.

En réponse à la disponibilité du nitrate dans le sol, la plante est capable de réguler l'expression génique à l'échelle de la plante entière très rapidement mais également sur le long terme, afin d'adapter et de coordonner l'architecture de son système racinaire au développement des parties aériennes. De manière intéressante, des analyses transcriptomiques ont révélé des différences de réponses entre les racines et les parties aériennes, en fonction de la concentration en nitrate et du délai de la réponse. En effet, suite à un traitement nitrate à 0,25 mM pendant 20 minutes, les racines ont une réponse plus importante que les parties aériennes, en termes de nombre de gènes régulés. Au contraire, suite à un traitement nitrate à 5 mM pendant 2 heures, la reprogrammation de l'expression des gènes est similaire entre les racines et les parties aériennes. (Guan, 2017). Le mécanisme de régulation reste cependant méconnu.

3.5.1. Signalisation primaire du nitrate.

Au niveau moléculaire, les réponses au nitrate dans la racine mettent en scène un réseau complexe de différents acteurs (Figure 36). Chez *Arabidopsis*, la concentration externe en nitrate est perçue par le transcepteur *NPF6.3/NRT1.1*, dont l'affinité pour le nitrate change en fonction de son état de phosphorylation par l'action des protéines kinases CIPK (CBL-INTERACTION PROTEIN KINASE) et partenaires CBL (CALCINEURIN B-LIKE PROTEIN) (Figure 36) (Ho et al., 2009; Hu et al., 2009). Récemment il a été montré que le calcium jouait un rôle de messenger secondaire entre le nitrate et les facteurs de transcription en aval (Liu et al., 2017; Krouk, 2017). En réponse au nitrate, les protéines kinases CPKs (CALCIUM-

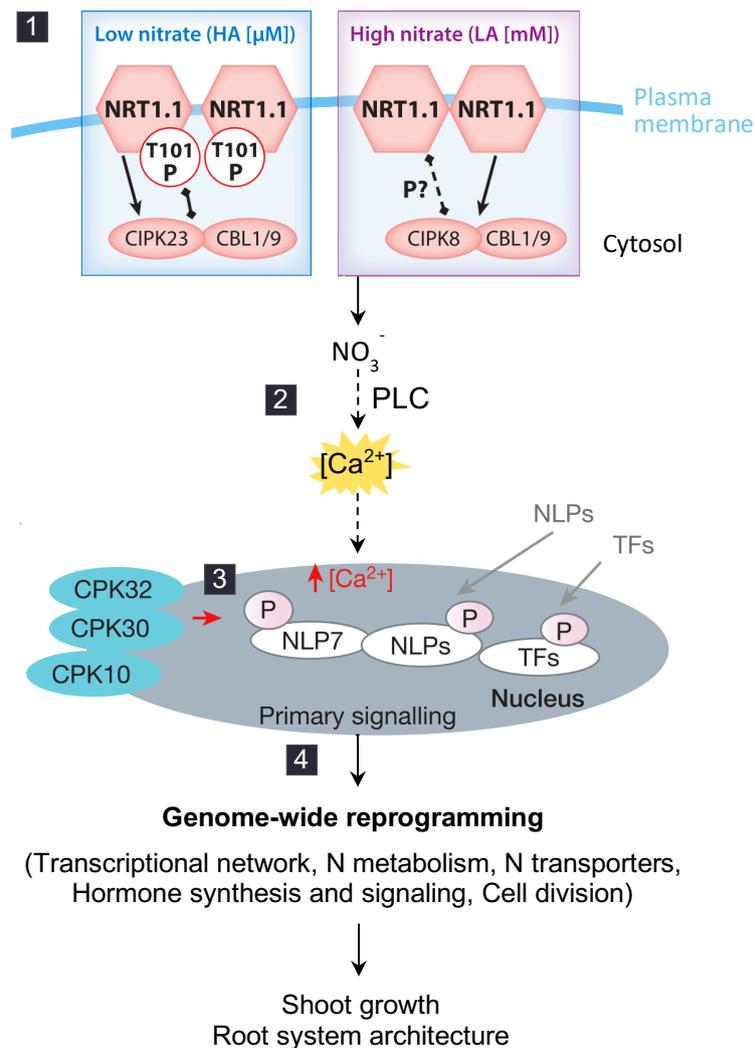


Figure 36. Signalisation primaire du nitrate.

(1) La disponibilité en nitrate dans le sol est perçue par le transcepteur NPF6.3/NRT1.1. Lorsque la concentration en nitrate est élevée, il est proposé que CIPK8 régule NPF6.3/NRT1.1 pour diminuer son activité. Lorsque la disponibilité en nitrate est faible, CIPK23 phosphoryle la thréonine 101 de NPF6.3/NRT1.1 et augmente son affinité pour le nitrate. (2) L'activité de transport de NPF6.3/NRT1.1 induit des vagues calciques dans le cytoplasme, potentiellement grâce à l'activité enzymatique d'une phospholipase C. (3) La concentration en Ca^{2+} dans le noyau augmente et active les protéines kinases CPKs. Ces kinases phosphorylent NLP7 entraînant sa rétention dans le noyau. (4) NLP7 régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans les réponses au nitrate (métabolisme N, transporteurs...), qui en retour adaptent la croissance et l'architecture du système racinaire et aérien de la plante. CIPK, CBL-INTERACTION PROTEIN KINASE ; CBL, CALCINEURIN B-LIKE PROTEIN ; PLC, PHOSPHOLIPASE C ; CPK, CALCIUM-SENSOR PROTEIN KINASE ; NLP, NIN-LIKE PROTEIN ; TF, facteur de transcription ; P, phosphorylation.
(Adapté de Liu et al., 2017; Wang et al., 2018)

SENSOR PROTEIN KINASE) sont localisées dans le noyau et phosphorylent le facteur de transcription NLP7 (NIN-LIKE PROTEIN 7), un des régulateurs centraux de la signalisation nitrate (Figure 36) (Castaings et al., 2009; Liu et al., 2017). Suite à sa phosphorylation, NLP7 est alors retenu au niveau du noyau (Marchive et al., 2013). NLP7 régule ainsi l'activité d'autres facteurs de transcription impliqués dans la signalisation nitrate. Ces facteurs de transcription sont des régulateurs de la PNR, du métabolisme azoté, du transport du nitrate ou encore de la croissance aérienne et de l'architecture racinaire (Figure 36).

En aval ou indépendamment de la signalisation CPK-NLP, d'autres facteurs de transcription (dont les principaux sont détaillés ci-dessous) régulent la réponse au nitrate (Vidal et al., 2015; O'Brien et al., 2016; Wang et al., 2018; Liu et al., 2017). Par exemple, les facteurs de transcription TGA1/TGA4 (TGACG MOTIF-BINDING FACTOR 1/4) de la famille des bZIP (basic leucine zipper), régulent l'expression de *NRT2.1* et *NRT2.2* en réponse au nitrate. L'analyse du double mutant *tga1 tga4* montre que ces deux facteurs de transcription stimulent la croissance de la racine principale, ainsi que l'émergence des racines latérales (Alvarez et al., 2014). SPL9 (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN- LIKE 9), identifié par des analyses transcriptomiques, régule l'expression de nombreux gènes comme *NPF6.3/NRT1.1*, *NRT2.1*, *NIA1* et *NIA2* (Krouk et al., 2010b). Enfin, les facteurs de transcription LBD37 et LBD38 (LATERAL BOUNDARYDOMAIN-CONTAINING PROTEIN 37 et 38) régulent également l'expression de nombreux gènes en réponse au nitrate, tels que les gènes *NIA1*, *NIA2*, *NPF6.3/NRT1.1*, *NRT2.1*, *NRT2.2*, et *NRT2.5*, impliqués dans l'assimilation et le transport du nitrate (Rubin et al., 2009; Wang et al., 2018).

3.5.2. Signalisation du nitrate en milieux hétérogènes

Comme précédemment évoqué, la disponibilité du nitrate dans les sols fluctue dans l'espace et le temps. Face à cette contrainte, les plantes ont développé un ensemble de réponses physiologiques et développementales adaptées visant à améliorer leur efficacité de prélèvement. Ces réponses impliquent notamment la prolifération de racines latérales et un prélèvement accru de nitrate dans les zones riches en nitrate (Remans et al., 2006; Ruffel et al., 2011; Poitout et al., 2018). Pour assurer cette régulation, deux voies de signalisations interconnectées opèrent : (i) une signalisation dite locale, au niveau de l'apex racinaire ; (ii) une signalisation systémique ou longue-distance qui implique une communication réciproque entre les parties aériennes et les racines, afin de coordonner la croissance et le développement de l'ensemble de la plante (O'Brien et al., 2016).

Pour étudier ces deux voies de signalisation impliquées dans le contrôle du développement racinaire en réponse à un apport hétérogène en nitrate, le dispositif de culture en « split-root »

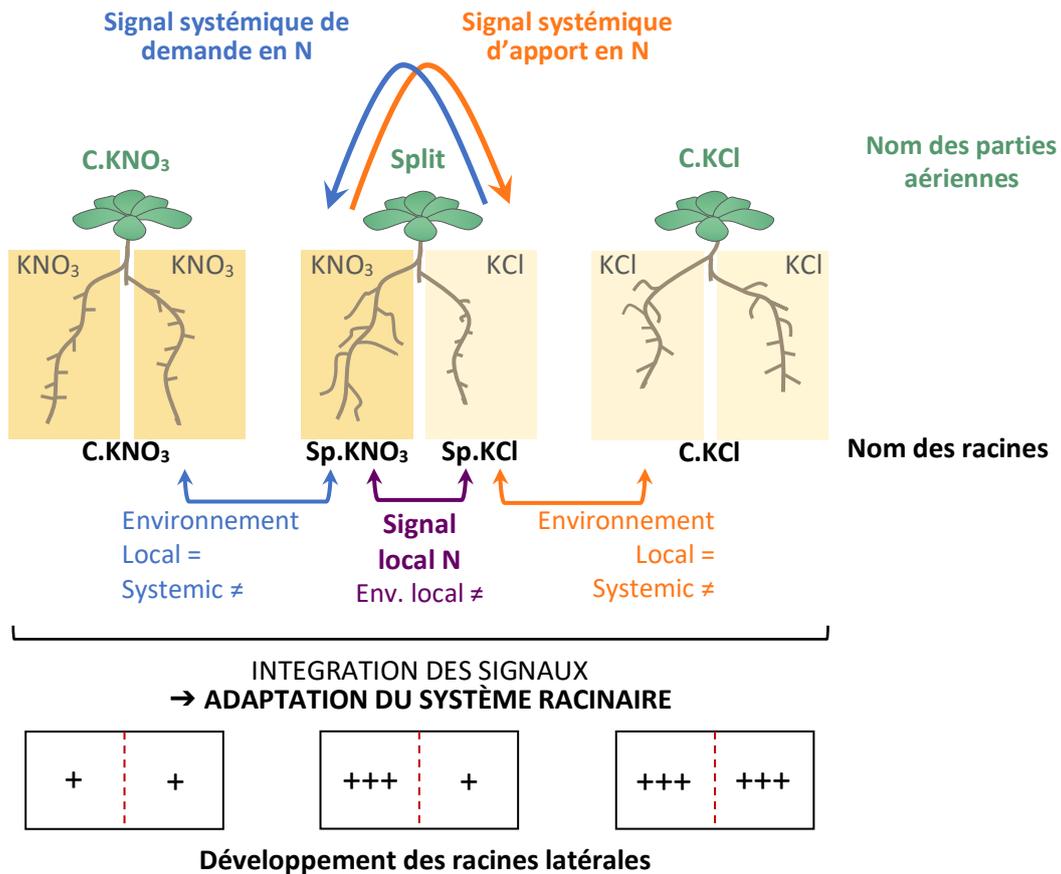


Figure 37. Le système de culture « split-root » et les signalisations associées.

Le système « split-root » *in vitro* permet de mettre en évidence et de distinguer les signalisations systémiques et locales.

La comparaison des réponses développementales et moléculaires des racines de plantes cultivées en condition homogène *versus* hétérogène (C.KNO₃ *versus* Sp.KNO₃ et C.KCl *versus* Sp.KCl) met en évidence les signalisations systémiques de demande en N et d'apport en N, respectivement. Les différences de réponses des racines de plantes cultivées sur milieux hétérogènes (Sp.KNO₃ *versus* Sp.KCl) met en évidence les signalisations locales.

C., contrôle ; Sp., split ; =, identique ; ≠, différent ; env., environnement.
(Adapté de O'Brien et al., 2016; Ruffel et al., 2016)

est la méthode de choix (Figure 37). Ce dispositif consiste à séparer le système racinaire en deux parties isolées et les soumettre à des concentrations homogènes ou hétérogènes en nitrate (Ruffel et al., 2011) (Figure 37). Dans ces conditions de culture, il est possible de distinguer les effets d'une signalisation locale de ceux d'une signalisation systémique. Les réponses moléculaires et morphologiques des racines à une signalisation locale sont visibles chez les plantes où une partie du système racinaire est en contact avec une zone riche en nitrate (Sp.KNO₃), et l'autre, en contact avec une zone sans nitrate (Sp.KCl) (Figure 37). Au contraire, les signalisations systémiques sont mises en évidence en comparant les réponses des racines exposées à des conditions hétérogènes en nitrate (Sp.KNO₃/Sp.KCl) de celles exposées à des conditions homogènes en présence (C.KNO₃) ou en absence de nitrate (C.KCl) (Figure 37). En effet, les racines du côté Sp.KNO₃ et C.KNO₃ sont soumises au même environnement local mais l'environnement systémique est différent. Ainsi, les différences observées impliquent un signal systémique de « demande en N » (Figure 37). Ce signal est marqué par le développement plus important des racines latérales sur Sp.KNO₃ comparé aux racines sur C.KNO₃, pour compenser l'absence de nitrate sur Sp.KCl. À l'inverse un signal systémique d'« apport en N » est observé par la répression du développement des racines latérales sur Sp.KCl par rapport aux racines sur C.KCl (Figure 37) (Ruffel et al., 2011).

Grâce au système « split-root », deux acteurs majeurs de la signalisation systémique nitrate ont été élucidés : les peptides CEP/CEPD et les cytokinines.

Le rôle des peptides CEP (C-terminally encoded peptides) dans la signalisation de demande en N a été récemment démontré (Figure 38A) (Tabata et al., 2014; Ohkubo et al., 2017). Une hétérogénéité en nitrate dans le sol induit la synthèse et le transport *via* le xylème de peptides CEP depuis les racines exposées à des zones pauvres en nitrate vers les parties aériennes de la plante. Ces peptides, reconnus par les récepteurs CEPR1 et CERP2 (CEP RECEPTOR) de type LRR-RK (Leucine Rich Repeat-Receptor Kinase), activent dans les feuilles une cascade de signalisation impliquant la synthèse de polypeptides CEPD (CEP DOWNSTREAM) appartenant à la famille des glutarédoxines. Les CEPDs agissent comme un signal qui retourne dans le système racinaire (*via* le phloème), et activent l'expression de *NRT2.1* spécifiquement dans les racines exposées à des zones riches en nitrate afin de promouvoir son acquisition (Figure 38A). Le rôle des peptides CEP/CEPD pour le développement des racines latérales reste méconnu.

Le deuxième signal longue-distance élucidé implique les cytokinines, une classe d'hormones essentielles dans la mise en place de la réponse à la signalisation de demande en N (Figure 38B) (Ruffel et al., 2011, 2016; Poitout et al., 2018). Le nitrate active la synthèse de trans-zéatine (tZ, une des formes bioactives des CK) dans les racines, et son transport vers les feuilles, facilité par le transporteur ABCG14 (ATP-BINDING CASSETTE

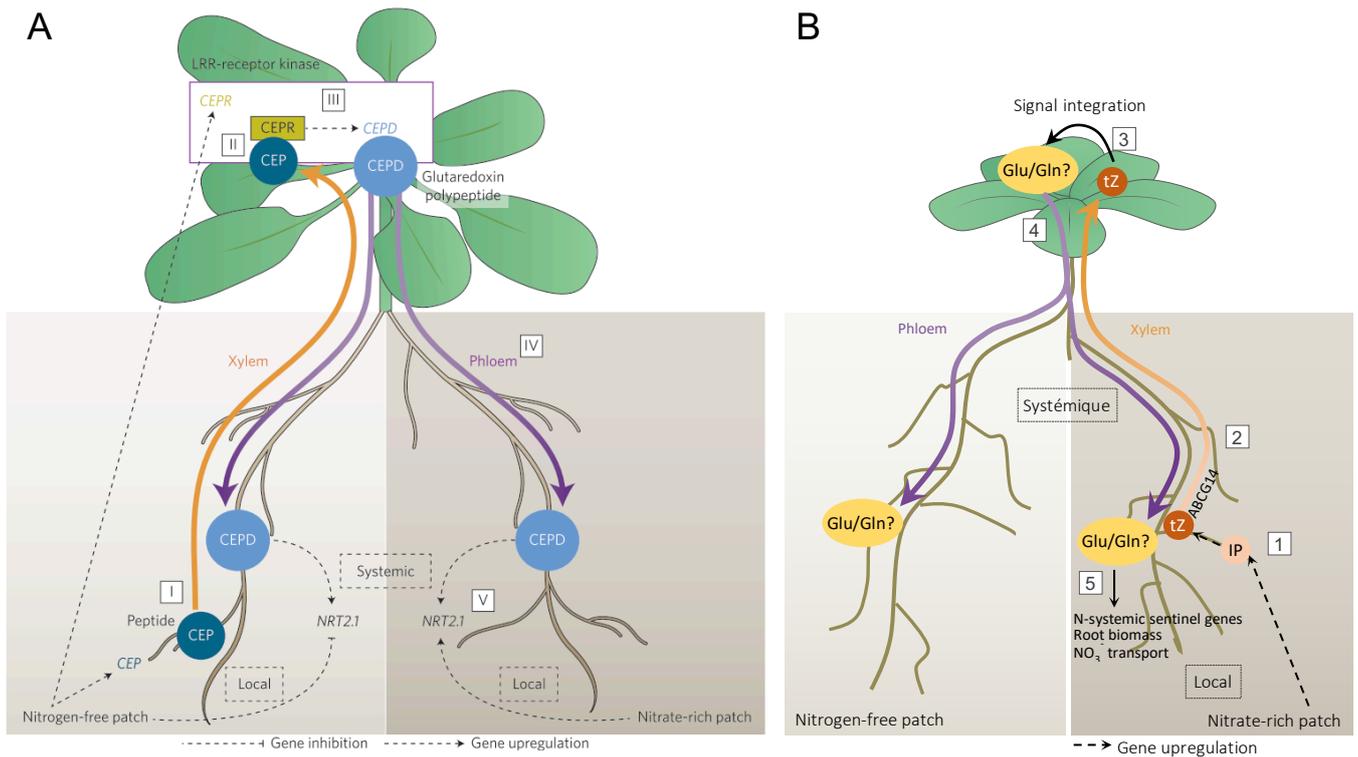


Figure 38. Les peptides CEP et les CK sont des signaux systémiques de demande en N.

A. Signalisation de demande en N par les peptides CEP.

(I) L'absence de N d'un côté du système racinaire induit l'expression des peptides CEP qui sont transportés dans les feuilles *via* le xylème ; (II) Les CEP sont reconnus dans les feuilles par les récepteurs CEPR, dont l'expression est également induite en absence de N ; (III) La formation du complexe CEP/CEPD active la synthèse des polypeptides CEPD et leur translocation dans le phloème ; (IV) les CEPD sont transportés dans les racines et induisent l'expression du transporteur *NRT2.1* ; (V) L'expression de *NRT2.1* est spécifiquement induite dans la zone riche en nitrate. La signalisation locale participe également à la régulation de l'expression de *NRT2.1*.

B. Signalisation systémique de demande en N par les CK.

(1) Dans la zone riche en nitrate, la synthèse de tZ est activée *via* l'induction du gène *IPT3* ; (2) Les tZ sont transportées dans les feuilles *via* leur chargement dans le xylème par le transporteur *ABCG14* ; (3) Dans les feuilles, le signal tZ est intégré et entraîne une régulation de l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de glutamine et glutamate ; (4) Ces acides aminés pourraient être un signal envoyé en retour dans les racines *via* le phloème ; (5) En plus de la présence locale de nitrate, ce signal stimulerait l'expression des gènes sentinelles, le transport du nitrate, le développement racinaire et en conséquence la biomasse des racines dans la zone riche en nitrate.

Ces deux signalisations systémiques CEP et CK ont lieu en parallèle, elles ont été séparées par soucis de représentation.

CEP, C-TERMINALLY ENCODED PEPTIDES ; CEPR, CEP RECEPTOR ; LRR-RK, Leucine Rich Repeat-Receptor Kinase ; CEPD, CEP DOWNSTREAM ; IP, N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)adenine ; tZ, *trans*-zeatine ; ABCG14, ATP-BINDING CASSETTE TRANSPORTER SUBFAMILY G 14 ; Gln, Glutamine ; Glu, Glutamate.

(Adapté de Ruffel et Gojon, 2017; Poitout et al., 2018)

TRANSPORTER SUBFAMILY G 14) qui charge la tZ dans le xylème (Zhang et al., 2014b; Ko et al., 2014; Osugi et al., 2017; Poitout et al., 2018). La tZ régulerait l'expression de nombreux gènes impliqués dans le développement des parties aériennes, mais aussi des gènes impliqués dans la synthèse de glutamate et glutamine. Il est proposé que ces acides aminés seraient transportés en direction des racines par le phloème et participeraient à l'adaptation de la croissance racinaire (et notamment la densité des racines latérales) en fonction des fluctuations de la disponibilité en nitrate (Figure 38B) (Ruffel et al., 2016).

Au niveau moléculaire, une multitude de gènes codant des transporteurs nitrate et facteurs de transcription sont rapidement activés dans les racines, permettant aux plantes d'adapter l'architecture de leur système racinaire aux fluctuations de la disponibilité en nitrate dans les sols. Des analyses transcriptionnelles effectuées sur des racines exposées à des conditions hétérogènes en nitrate (en système « split-root » *in vitro*) ont révélé qu'un ensemble de gènes, appelés « gènes sentinelles », étaient induits en moins de 2 heures après transfert sur milieu hétérogène. La réponse moléculaire est donc très rapide au niveau des racines. Parmi ces gènes, sont retrouvés les transporteurs de nitrate tels que *NRT2.1* et *NRT3.1/NAR2* et les gènes impliqués dans l'assimilation et le métabolisme de l'azote comme *NIR1*, *UPM1* (*UROPHORPHYRIN METHYLASE 1*), *G6PD3* (*GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE 3*) ou *FNR2* (*ROOT FERREDOXIN NAPD(H) OXIDOREDUCTASE 2*) (Ruffel et al., 2011).

Le transcepteur NPF6.3/NRT1.1 exerce également un rôle important dans la signalisation nitrate sur milieu hétérogène. Alors que sur milieu homogène, NPF6.3, qui possède une activité de transport d'auxine, diminue l'accumulation d'auxine dans les racines latérales et en conséquence leur croissance sur un milieu appauvri en nitrate, sur milieu hétérogène (en système « split-root »), NPF6.3/NRT1.1 favorise la prolifération des racines latérales dans les zones riches en nitrate par un mécanisme qui est indépendant du transport de l'auxine (Remans et al., 2006; Krouk et al., 2010a; Mounier et al., 2014). Le facteur de transcription ANR1 régule également la croissance des racines latérales. ANR1 est un facteur de transcription appartenant à la famille des MADS-box qui est induit par le nitrate et active la formation et la croissance des racines latérales dans les zones où la teneur en nitrate est la plus élevée (Zhang et Forde, 1998; Gan et al., 2012).

Le facteur de transcription TCP20 représente aussi un régulateur clé de la signalisation systémique, contrôlant l'architecture du système racinaire. En absence de nitrate TCP20 interagit avec les facteurs NLP6 et NPL7, contrôlant une multitude de gènes impliqués dans la réponse au nitrate. Ainsi, en fonction du statut azoté, TCP20 régule la prolifération cellulaire (*via* notamment l'expression de la cycline mitotique CYCB1;1), stimulant la croissance des

racines latérales du côté riche en nitrate et inhibant leur croissance du côté pauvre en nitrate (Guan et al., 2014 et 2017).

3.5.3. Rôle de TOR dans la signalisation du nitrate

La protéine kinase TOR est un régulateur central de la croissance, conservé chez tous les eucaryotes dont la levure, les animaux et les plantes. Chez *Arabidopsis*, le complexe TOR (TORC) est composé de trois partenaires essentiels à son activité : TOR, RAPTOR (REGULATORY ASSOCIATED PROTEIN OF TOR) et LST8 (LETHAL with SEC THIRTEEN 8) (Dobrenel et al., 2016). La protéine kinase TOR est connue pour avoir divers rôles dans le développement et la croissance des plantes et active à la fois les mécanismes de transcription et traduction, et favorise la division cellulaire (Dobrenel et al., 2016). TOR est également un intégrateur central de multiple signaux environnementaux, afin de coordonner le développement et la croissance de la plante (Xiong et Sheen, 2014; Dobrenel et al., 2016; Shi et al., 2018). Ainsi, le complexe TORC pourrait jouer un rôle clé dans la perception du statut azoté interne des plantes comme chez la levure ou les animaux (Gent et Forde, 2017; Wu et al., 2019). Plusieurs études chez *Arabidopsis* montrent que TORC est impliqué dans la régulation du métabolisme N, ainsi que la coordination entre le métabolisme N et C (Deprost et al., 2007; Caldana et al., 2013; Gent et Forde, 2017). La diminution de l'expression de TOR, ou des protéines associées, entraîne une accumulation d'acides aminés et autres composés carbonés (Caldana et al., 2013). Cette accumulation d'acides aminés en absence de TOR pourrait être la conséquence d'une diminution de la synthèse de protéines (Caldana et al., 2013; Gent et Forde, 2017). De plus, l'apport de composés azotés comme le nitrate ou l'ammonium à des plantules cultivées en absence de N, entraîne une phosphorylation rapide de la protéine ribosomique S6K (S6 Kinase 1), une cible directe de TOR (Wu et al., 2019).

De manière intéressante, l'inhibition de croissance racinaire observée chez des plantules cultivées en excès de nitrate est abolie lors de la surexpression de TOR (Deprost et al., 2007). Ces études suggèrent que la signalisation TOR pourrait être un intégrateur du statut N et en conséquence régulerait la croissance et le développement de la plante. De manière consistante, il a été rapporté que le nitrate activait la kinase TOR par phosphorylation *via* un mécanisme inconnu (Xiong et Sheen, 2015).

Une étude récente montre également un lien entre la signalisation TOR et la signalisation GA (Zhang et al., 2018b). En effet chez un mutant *raptor* (*rb*), les transcrits des trois récepteurs *GID1A*, *B* et *C* sont réprimés et le niveau d'accumulation des DELLA est plus élevé que chez le contrôle. Par ailleurs, l'absence des DELLA (chez un multiple mutant DELLA perte de fonction) supprime l'effet négatif de TOR sur le développement de la plantule

(Zhang et al., 2018b). Pris dans leur ensemble, ces résultats indiquent que l'activité TOR (régulée par le statut azoté) inhibe la signalisation GA.

3.5.4. L'oxyde nitrique (NO), une molécule signal

Les premières étapes d'assimilation du nitrate dans la cellule par l'enzyme nitrate réductase produit une autre molécule signal, l'oxyde nitrique (NO) (Figure 35). D'autres voies de production du NO existent chez les plantes mais ne seront pas décrites dans ma thèse (Astier et al., 2018; León et Costa-Broseta, 2019).

Le NO régule différents processus biologiques en induisant des modifications post-traductionnelles, comme les S-nitrosylations de cystéine et les nitrations de tyrosine (Astier et al., 2011; Schopfer et al., 2003). Ces modifications peuvent affecter la stabilité des protéines, induire des changements de conformation, moduler leur activité ou affecter leur localisation (Besson-Bard et al., 2008; León et Costa-Broseta, 2019). Par des approches protéomiques, les cibles ainsi que la fonction de ces modifications post-traductionnelles ont commencé à être révélées (Kolbert et al., 2017; Feng et al., 2019). Parmi les cibles, sont retrouvés des composants clés des signalisations auxines, cytokinines et acide abscissique (Feng et al., 2019; León et Costa-Broseta, 2019; Zhang et al., 2019a).

Le NO régule différents aspects du développement des plantes comme la germination, la photomorphogénèse, le temps de floraison et la défense contre les pathogènes (Astier et al., 2018). Cette régulation du développement des plantes est interconnectée avec les signalisations hormonales. Par exemple, le NO stimule la photomorphogénèse en induisant l'accumulation des protéines DELLA dans l'hypocotyle. De manière intéressante, l'expression du gène *SLY*, codant pour une protéine F-box impliquée dans la dégradation des protéines DELLA, est fortement réprimée par le NO. Ainsi, en réponse au NO, les protéines DELLA s'accumulent et répriment l'allongement de l'hypocotyle (Lozano-Juste et Leon, 2011).

3.6. Hormones et nutrition azotée

Le développement et la croissance des plantes sont contrôlés, entre autres, par les phytohormones et la nutrition azotée. De nombreuses études ont révélé une multitude d'interconnexions intervenant à différents niveaux entre les signalisations hormonales et nitrate. Je me focaliserais dans ce paragraphe uniquement sur les effets du nitrate sur la biosynthèse et/ou transport des cytokinines et de l'auxine, deux hormones de croissance, ainsi que sur une étude récente reliant la signalisation GA à la nutrition azotée.

3.6.1. Le nitrate contrôle la biosynthèse des cytokinines

Comme précédemment exposé, les CK constituent un relai majeur à la signalisation nitrate, assurant les communications « longue-distance » entre les racines et les feuilles. Par ailleurs, les CK contrôlent plusieurs processus développementaux tels que la croissance aérienne, la dominance apicale et la ramification, ou encore la senescence foliaire (Sakakibara et al., 2006; Kieber et Schaller, 2014; Rahayu et al., 2005; Müller et al., 2015; Osugi et al., 2017; Landrein et al., 2018; Waldie et Leyser, 2018). Il est maintenant admis que le nitrate active la production de CK dans les racines en induisant l'expression des gènes *ISOPENTENYL TRANSFERASE 3 (IPT3)* et *IPT5*, responsables de la première étape (limitante) de biosynthèse des CK (Takei et al., 2004; Wang et al., 2004; Miyawaki et al., 2004). Des études d'expressions ont révélé que l'induction du gène *IPT3* était plus rapide (mois d'une heure) que celle du gène *IPT5*, qui ne s'observe qu'après plusieurs jours de traitement au nitrate (Miyawaki et al., 2004; Takei et al., 2004; Guan, 2017). Outre les gènes *IPT*, une récente analyse transcriptomique a révélé que les niveaux des transcrits codant l'enzyme *CYP735A2*, responsable de la synthèse de tZ, étaient plus élevés en réponse au nitrate, et régulés *via* le module CPK-NLP (Liu et al., 2017). La co-régulation des gènes *IPT* et *CYP735A2* par le nitrate pourrait être un mécanisme de régulation majeur assurant une distribution spatiotemporelle de CK dans la plante en fonction de la disponibilité en azote dans le sol. Une fois synthétisé dans les racines, les tZ (et leur précurseur ribose-tZ) sont relocalisés dans le xylème par le transporteur ABCG14 puis distribués dans toute la plante par le système vasculaire (Zhang et al., 2014b; Ko et al., 2014; Osugi et al., 2017). Il est important de noter que le gène *IPT3* est aussi exprimé dans les feuilles, et que par conséquent, le nitrate stimule également la synthèse *de novo* de CK dans les parties aériennes de la plante (Guan, 2017).

3.6.2. Le nitrate contrôle la biosynthèse et le transport d'auxine

L'auxine est une classe de phytohormone essentielle pour le développement et la croissance des plantes. La forme principalement retrouvée en majeure partie chez les plantes est l'IAA (indole-3-acetic acide) (Zhao, 2012). L'IAA a une action antagoniste aux CK, puisque l'auxine inhibe la ramification et promeut la dominance apicale. L'auxine régule également l'architecture du système racinaire, en stimulant l'initiation et la croissance des racines latérales (Wolters et Jürgens, 2009). Plusieurs études réalisées chez différentes espèces ont montré qu'une diminution de la disponibilité en nitrate stimulait le transfert de l'auxine des parties aériennes vers les racines (Krouk, 2016). Par ailleurs, Ma et al., 2014 ont montré que l'azote régulait l'expression des tryptophane-aminotransférases *TAA1*, *TAR1* et *TAR2*, responsables de la première étape de la biosynthèse d'IAA. Alors qu'une carence en azote stimule l'expression de *TAR2* (et plus modérément *TAA1*) dans les racines, elle réprime

l'expression de *TAA1* et *TAR1* dans les parties aériennes de la plante (Ma et al., 2014a). Chez le mutant *tar2*, la synthèse d'auxine et le développement des racines latérales sont réduits. Il est proposé que *TAR2* serait impliqué dans la synthèse locale d'auxine à l'extrémité de la racine et au niveau du péricycle afin de stimuler la formation des racines latérales en condition faible d'azote (introduction, paragraphes 3.2 et 3.5.2) (Ma et al., 2014a).

Il est important de noter que le recouplement de plusieurs analyses transcriptomiques (Gutiérrez et al., 2007; Medici et Krouk, 2014; Krouk et al., 2015) a révélé que des gènes impliqués dans le transport de l'auxine pourraient être régulés par le nitrate. Cependant, étant donné que ces régulations sont perdues chez le mutant *nia* de la nitrate réductase, il est vraisemblable que ces gènes soient régulés par le statut azoté de la plante et non le nitrate. Enfin, il est important de rappeler que NPF6.3/NRT1.1, qui transporte efficacement l'auxine et le nitrate, fournit à la plante un mécanisme efficace reliant la nutrition azotée à la signalisation auxine pour la régulation de la croissance des racines latérales (Krouk et al., 2010a ; introduction, paragraphe 3.5.2).

3.6.3. La signalisation GA contrôle l'assimilation du nitrate

Lors de la Révolution Verte dans les années 1960, l'introduction de gènes semi-nains dans les variétés céréalières à haut-rendement a permis de réduire substantiellement la hauteur des plantes, limitant ainsi les risques de verses et les pertes de rendement (Hedden, 2003). Ces gènes, décrits dans le paragraphe 4.1.2 (ci-après), sont impliqués dans la biosynthèse et la signalisation GA, et résultent en l'accumulation des répresseurs de croissance DELLA. De manière intéressante, alors que l'accumulation des protéines DELLA chez ces variétés bloque l'effet positif de l'azote sur la croissance de la plante, elle n'altère pas la redistribution de l'azote vers les grains (Hedden, 2003). Grâce à ces propriétés, les variétés semi-naines ont permis d'augmenter significativement les rendements et sont depuis largement utilisées en agriculture (Hedden, 2003).

Cependant, une étude récente réalisée par Li et al., 2018 chez des cultivars de riz et blé issus de la Révolution Verte, ont montré que l'accumulation des protéines DELLA réduisait significativement le prélèvement et l'assimilation de l'azote (Nitrogen Use Efficiency, NUE). Les auteurs ont identifié chez le riz GROWTH-REGULATOR FACTOR 4 (GRF4), comme principal régulateur de la croissance et du métabolisme azoté et carboné. GRF4 est un facteur de transcription qui régule l'expression de multiples gènes impliqués dans l'assimilation du nitrate et de l'ammonium. La protéine DELLA SLR1 du riz, en interagissant avec le domaine d'interaction protéine-protéine de GRF4, bloque la capacité de ce dernier à interagir avec son partenaire GIF1 (GRF-interacting factor 1) et indirectement de se lier aux promoteurs de gènes cibles. En conséquence la NUE est diminuée par SLR1 (Li et al., 2018). De manière

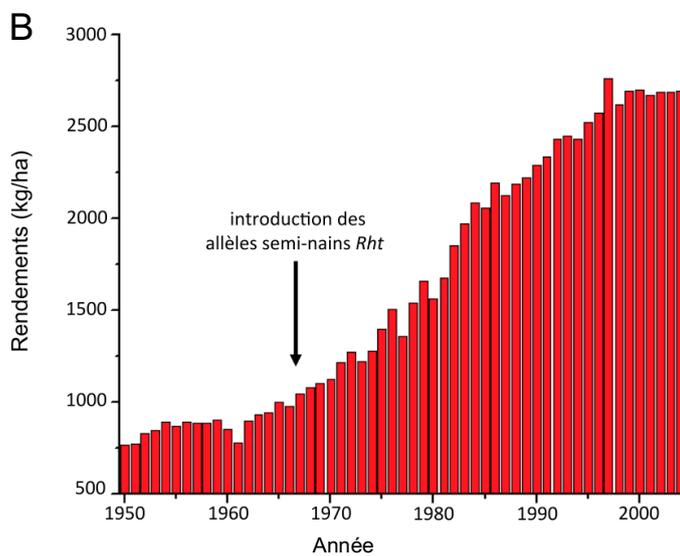
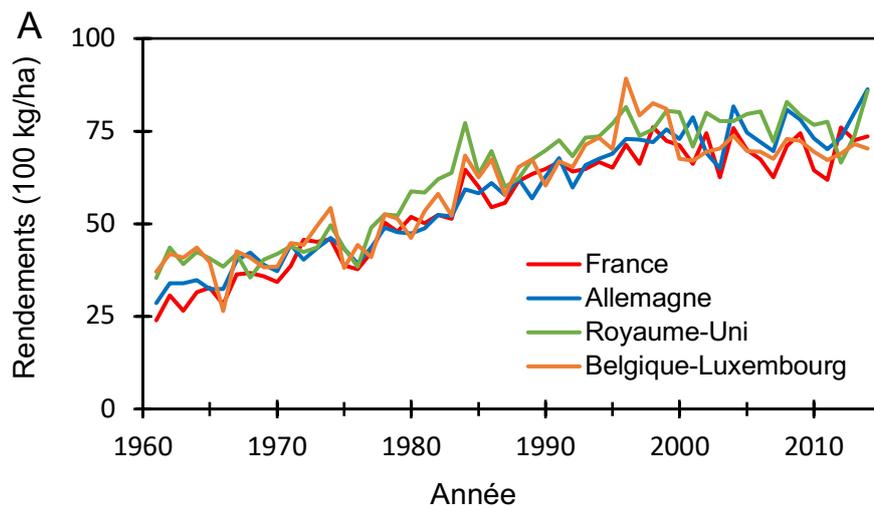


Figure 39. Évolution des rendements en blé en Europe (A) (France, Allemagne, Royaume-Uni, Belgique et Luxembourg) de 1961 à 2017 et dans les pays en voie de développement (B) de 1950 à 2004. (www.faostat.fao.org).

intéressante, la surexpression de *GRF4* chez les cultivars de la Révolution Verte améliore la NUE et ainsi les rendements en grains, sans affecter la croissance de la plante. Ainsi le trait « semi-nain » sélectionné lors de la Révolution Verte est maintenu, la NUE est améliorée, permettant ainsi une augmentation des rendements tout en limitant l'apport d'engrais azotés (Li et al., 2018).

4. Évolution de l'agriculture moderne : enjeux économiques, environnementaux et sociétaux

4.1. La Révolution Verte

L'augmentation de la population mondiale de ces 60 dernières années (3 milliards au début des années 1960 à plus de 8,5 milliards en 2018) s'est heureusement accompagnée d'une augmentation de la production mondiale de céréales (principales sources de nourriture). Dans les années 1960, la mécanisation et l'utilisation de nouvelles variétés de céréales à hauts rendements combinées à l'utilisation d'engrais azotés et de produits phytosanitaires ont permis une augmentation considérable des rendements agricoles (Hedden, 2003), d'environ 2,5 tonnes/ha en 1961 à en moyenne 8 tonnes/ha en 2017 pour le blé en France (Figure 39A) et de moins de 1 tonne/ha en 1950 à plus de 2,5 tonnes/ha dans les pays en voie de développement (Figure 39B). Ces innovations techniques, scientifiques et agronomiques sont à l'origine des progrès dans l'agriculture, ainsi nommés « Révolution Verte ».

4.1.1. Progrès de l'industrie chimique

Depuis le XIXe siècle, les engrais minéraux ou chimiques (azote, acide phosphorique (P_2O_5) et la potasse (K_2O)) sont utilisés en Europe. Cet essor a été rendu possible par la multiplication des sources extractives (e.g. guanos au Pérou, nitrates au Chili et chlorure de potassium en Allemagne) et par le développement des industries de synthèse et de transformation des engrais (e.g. superphosphate) (Mazoyer et Roudart, 2002). L'usage des engrais azotés a par la suite, explosé après la Seconde Guerre mondiale, lors de la Révolution Verte, grâce à la production d'azote ammoniacale (NH_3) à partir du N_2 atmosphérique via le processus Haber-Bosch (Mulvaney et al., 2009). Cependant ce processus est extrêmement coûteux en énergie, puisqu'il nécessite environ 1% de l'énergie mondiale globale (Smith, 2002). Le NH_3 est utilisé par la suite pour produire les engrais azotés synthétiques les plus utilisés aujourd'hui : l'urée et le nitrate d'ammonium. Grâce à cette production à grande échelle, l'utilisation d'engrais azoté a été multipliée par 10 environ depuis 1961, avec environ 108 millions de tonnes utilisées dans l'agriculture mondiale en 2013 (Lu et Tian, 2017).

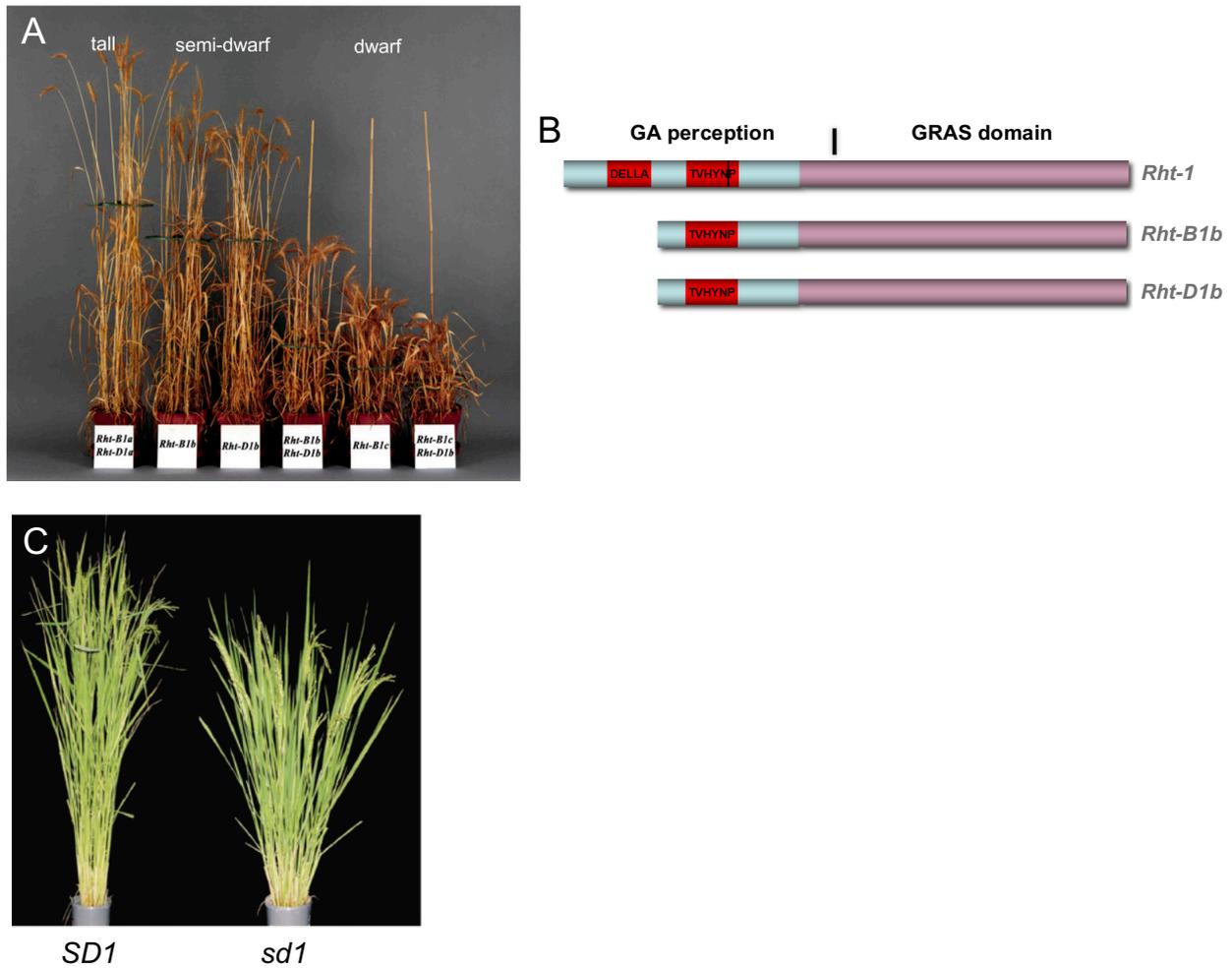


Figure 40. Mutants de la Révolution Verte.

A. Phénotypes des allèles mutants *Rht-B1* et *Rht-D1* chez le blé (cutilvar April Bearded). Les allèles *Rht-B1a* et *Rht-D1a* sont des homologues aux gènes sauvages sur les génomes B et D. Les blés semi-nains comportent l'allèle *Rht-B1b* ou *Rht-D1b*. La combinaison de ces deux allèles résulte en un nanisme plus important. L'allèle *Rht-B1c* a un effet plus sévère sur la hauteur du blé.

B. Les allèles *Rht-B1* et *Rht-D1* codent pour des DELLA tronquées dans leur partie N-terminale, insensibles à l'action des GA.

C. Phénotype du riz semi-nain portant la mutation *semi-dwarf1* (*sd1*). Le gène *SD1* code pour l'enzyme de biosynthèse GA20ox1.

(Adapté de Hedden, 2003; Davière et Achard, 2013)

4.1.2. Sélection variétale : rôle clé des gibbérellines

Au cours des premières années de cette révolution, l'application d'engrais azotés sur des variétés céréalières à forts rendements a eu pour conséquence d'augmenter à la fois le nombre de grains et la hauteur des plantes. Cependant, ces variétés plus hautes sur tige, avec un épi plus lourd, étaient alors sensibles aux phénomènes de verse, face aux intempéries, ayant pour conséquence une perte de rendement considérable (Silverstone et Sun, 2000; Hedden, 2003).

Afin de limiter ces risques, des gènes de nanisme ont été introduits par croisements, pour restreindre la hauteur des plantes. Pour le blé, de nombreux programmes de sélection aux États-Unis et au Mexique (Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo, CIMMYT) ont contribué à la création de nouveaux cultivars semi-nains à forts rendements adaptés aux climats tempérés (blé d'hiver) ou aux climats tropicaux (blé de printemps) (Hedden, 2003). Ces cultivars portent deux allèles dominants responsables du phénotype semi-nain, au niveau du gène *Reduced height-1* (*Rht-B1* et *Rht-D1*) (Figure 40A). Aujourd'hui les allèles *Rht-B1b* et *Rht-D1b* sont présents dans plus de 70% des variétés de blé commercialisées dans le monde (Hedden, 2003). Le gène *Rht*, identifié par Peng et al. (1999), est un orthologue de *GAI* chez *Arabidopsis*, de *DWARF8* (*D8*) chez le maïs ou *SLENDER1* (*SLN1*) chez l'orge. Les variétés céréalières semi-naines expriment une protéine DELLA tronquée de sa partie N-terminale, empêchant sa dégradation induite par les GA (Peng et al., 1999) (Figure 40B). De nombreux autres programmes de sélection ont été mis en place notamment chez le riz, comme à Taïwan et aux Philippines (International Rice Research Institute, IRRI). Pour ce dernier, le caractère semi-nain est apporté par des allèles mutants du gène récessif *SEMIDWARF1* (*SD1*), codant pour la *GA20ox2*, une enzyme de biosynthèse des GA (introduction, paragraphe 2.2.2.3.) (Figure 40C) (Monna et al., 2002; Spielmeier et al., 2002; Sasaki et al., 2002). Ces riz semi-nains sont donc déficients dans la production de GA.

Il est important de noter que toutes ces plantes céréalières semi-naines ont un rendement plus élevé, causé en partie par une meilleure répartition des produits assimilés par la photosynthèse entre la tige et les grains (Hedden, 2003). L'utilisation des engrais azotés, la modernisation de l'agriculture et la sélection de variétés semi-naines sont donc responsables de l'augmentation de la productivité agricole après les années 1960.

4.2. Nouvelle Révolution Verte

Les organisations mondiales comme les Nations Unies estiment que la population mondiale atteindra 9 milliards d'ici 2050 et qu'en conséquence, la production céréalière devra augmenter

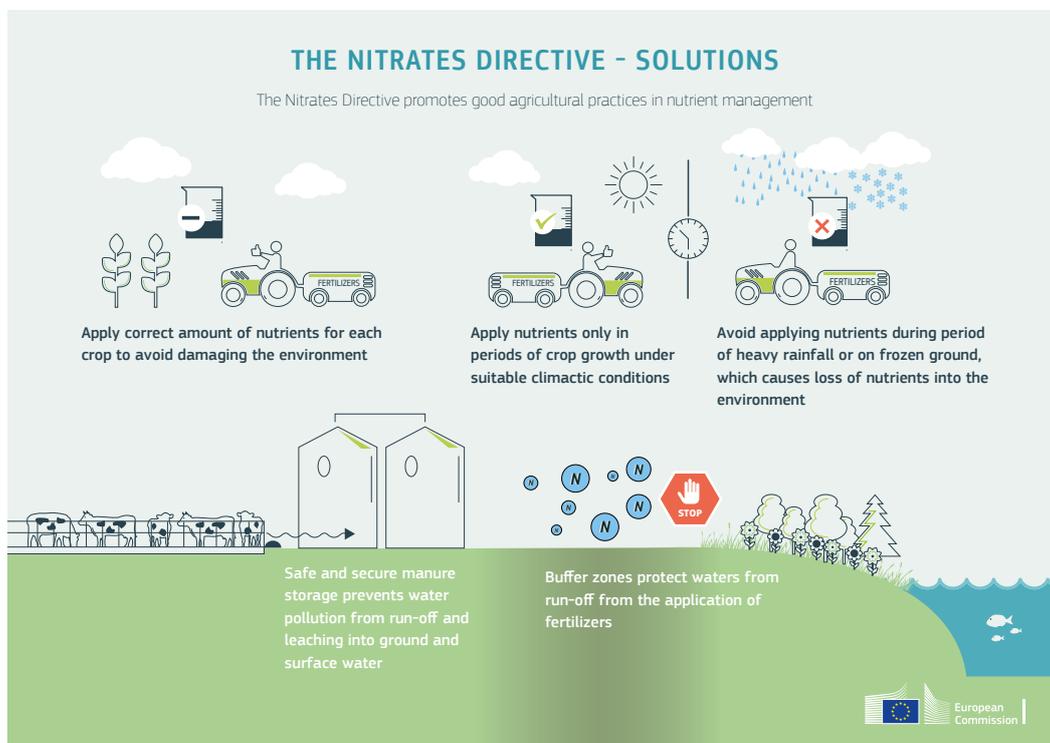


Figure 41. Bonnes pratiques agricoles pour réduire la pollution de l'eau par les nitrates. Ces pratiques concernent principalement les périodes et la quantité des engrais appliquées, leur stockage et la création de zones tampons à proximité des cours d'eau. (Commission européenne)

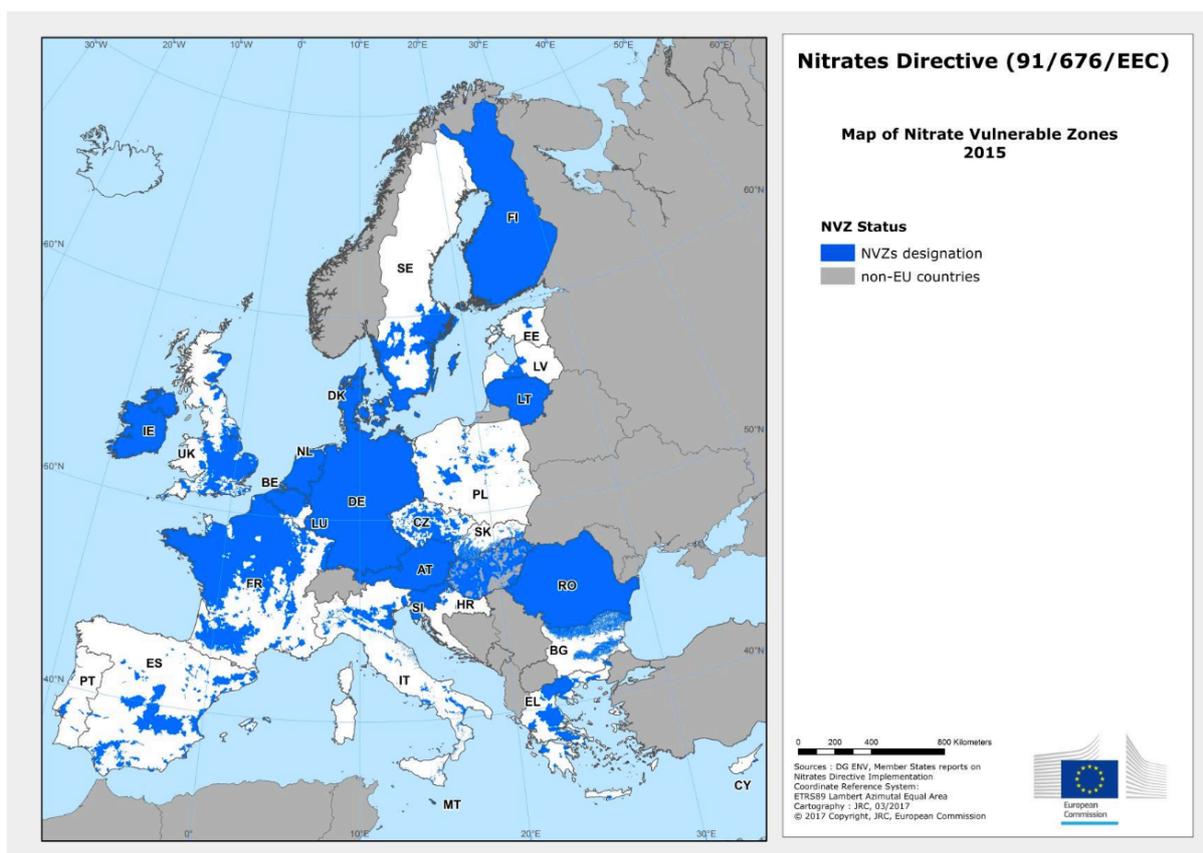


Figure 42. Cartes des zones vulnérables aux nitrates (NVZ) dans l'Union Européenne en 2015. Certains pays comme l'Allemagne ont désigné l'ensemble de leur territoire comme NVZ pour y appliquer leurs programmes d'actions. En France, les NVZ couvrent 34% du territoire et 68% de la surface agricole utilisée. (Commission européenne)

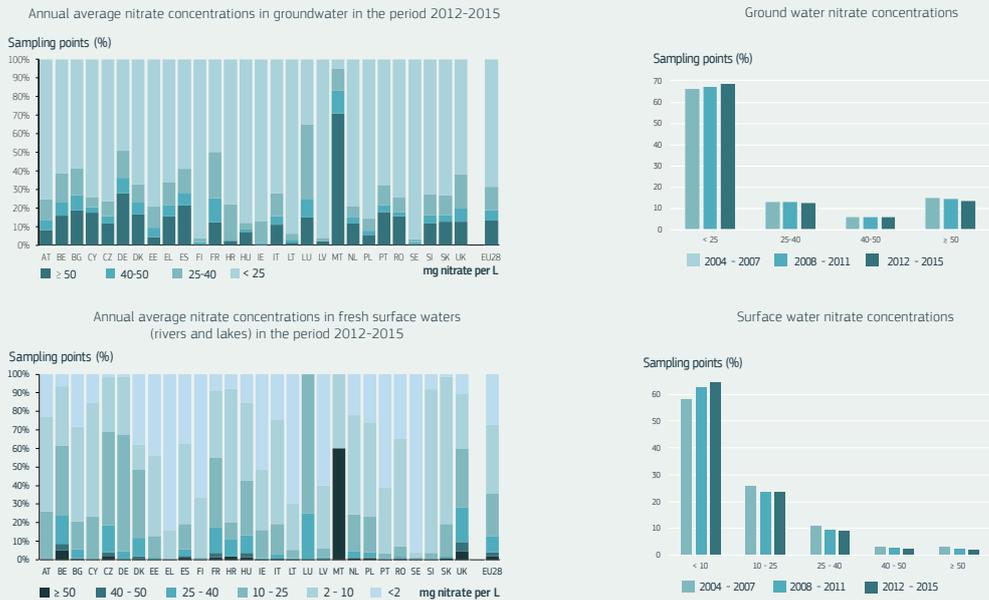
de près de 50% pour nourrir la population mondiale (Horlings et Marsden, 2011). Si la première Révolution Verte dans les années 1960 a permis d'augmenter considérablement la production céréalière, en mettant la science au service de l'agriculture, cette révolution a atteint ses limites depuis plusieurs années (Herder et al., 2010). En effet, les rendements en blé atteignent un plateau en Europe depuis le début des années 2000 (Figure 39A) et la proportion de terres cultivables dans le monde diminue. Par ailleurs, l'utilisation intensive d'intrants (eau, produits phytosanitaires et engrais) entraîne une pollution importante de l'environnement et représente des dangers écologiques et pour la santé humaine. En conséquence, l'enjeu majeur d'une seconde Révolution Verte est de « nourrir le monde » tout en adoptant une agriculture raisonnée, plus respectueuse de l'environnement et adaptée aux changements climatiques (Horlings et Marsden, 2011).

4.2.1. La Directive « Nitrate » et sa mise en application en Europe

L'utilisation intensive en agriculture de nitrate dans les engrais organiques et chimiques représente une source majeure de pollution de l'eau à cause du lessivage des nitrates (Good et Beatty, 2011). Cette pollution présente un risque pour la santé humaine mais également pour les écosystèmes aquatiques par l'eutrophisation des cours d'eau. En 1991 l'Union Européenne a donc mis en place la directive « Nitrates » (91/676/CEE), qui a pour but de préserver la qualité des eaux à travers l'Europe, en empêchant la pollution des eaux souterraines et de surface par les nitrates d'origine agricole et en soutenant l'utilisation de bonnes pratiques agricoles (<http://ec.europa.eu/environment/water/water-nitrates>) (Figure 41). Les États membres ont pour obligation : (1) d'identifier et désigner des zones dites vulnérables au nitrate (NVZ) où la pollution et/ou les risques de pollution sont importants (concentration en nitrate dans l'eau supérieure à 50 mg/L) (Figure 42), (2) d'établir un ensemble de mesures à mettre en œuvre sous forme de programmes d'actions dans les NVZ ou sur l'ensemble du territoire, (3) de faire un suivi de la qualité de l'eau et un rapport à la Commission Européenne tous les quatre ans. Cette directive s'est révélée efficace sur l'ensemble de l'Union Européenne : entre 2004 et 2007, les concentrations en nitrates dans les eaux superficielles sont restées stables ou ont chuté dans 70% des sites contrôlés. Pour 66% des sites de surveillance, la qualité des eaux souterraines était stable ou en voie d'amélioration. Le dernier rapport en date de mai 2018 atteste que la qualité des eaux de surfaces et souterraines a augmenté globalement dans l'Union Européenne lors des dix dernières années, mais nécessite des efforts supplémentaires dans certains pays (Figure 43). Aujourd'hui, la directive « Nitrates » est étroitement liée aux autres politiques de l'UE concernant la gestion de l'eau, la qualité de l'air, et le changement climatique visant à protéger l'environnement.

WATER QUALITY IN THE EU

Ground and surface water quality in the EU has improved over the last decade, but more efforts are needed



The comparability of data between Member States is limited by differences in the monitoring networks and strategies.



Figure 43. Évolution de la qualité des eaux souterraines et de surface dans l'Union Européenne. Entre 2012 et 2015, les concentrations en nitrate dans les eaux ont diminué. Le nombre de zones où la concentration en nitrate est inférieure à 25 mg/L dans les eaux souterraines, a augmenté. De même, pour le nombre de zones où la concentration en nitrate est inférieure à 10 mg/L dans les eaux de surfaces. À l'inverse, le nombre de zones où cette concentration excède la limite de 50 mg/L diminue. Néanmoins pour certains pays comme Malte, la pollution des eaux reste très importante.

AT, Autriche ; BE, Belgique ; BG, Bulgarie ; CY, Chypre ; CZ, République tchèque ; DE, Allemagne ; DK, Danemark ; EE, Estonie ; EL, Grèce ; ES, Espagne ; FI, Finlande ; FR, France ; HR, Croatie ; HU, Hongrie ; IE, Irlande ; IT, Italie ; LT, Lituanie ; LU, Luxembourg ; LV, Lettonie ; MT, Malte ; NL, Pays-Bas ; PL, Pologne ; PT, Portugal ; RO, Roumanie ; SE, Suède ; SI, Slovénie ; SK, Slovaquie ; UK, Royaume-Uni.

(Commission européenne)

Cette directive « Nitrate » fait également écho à l'agriculture dite « raisonnée », qui a émergé dans les années 1990 remplaçant progressivement l'agriculture intensive dérivant des avancées scientifiques et techniques de la Révolution Verte des années 1960. L'agriculture raisonnée est un système de production dont l'objectif premier est d'optimiser le résultat économique en maîtrisant les quantités d'intrants, et notamment les substances chimiques utilisées (pesticides, engrais) dans le but de limiter leurs impacts sur l'environnement. L'objectif est d'adapter les apports en engrais azotés avec les besoins réels des cultures, tout en tenant compte des éléments présents dans le sol et du rendement potentiel de la plante.

4.2.2. Amélioration de l'efficacité d'utilisation de l'azote (NUE)

Les normes fixées par la directive « Nitrate » imposent de diminuer l'utilisation d'engrais azotés sur 48% du territoire l'Union Européenne. Cependant, seulement 30 à 50% de l'azote appliqué sous forme d'engrais est utilisé par les plantes suivant les espèces et cultivars (McCallister et al., 2012). L'excédent d'azote est perdu par une combinaison de lessivage, de ruissellement de surface, d'émissions de gaz à effet de serre dans l'atmosphère et de processus de dénitrification par les bactéries. Il est donc nécessaire d'améliorer l'efficacité de l'utilisation de l'azote par les plantes (NUE) afin d'augmenter la production agricole tout en pratiquant une agriculture plus respectueuse de l'environnement.

La NUE est un trait agronomique complexe, impliquant plusieurs étapes interconnectées d'assimilation, de transport et de signalisation de l'azote (Wang et al., 2018). La NUE est un indicateur permettant d'évaluer l'efficacité du prélèvement de l'azote et de son utilisation (assimilation ou remobilisation) au sein de la plante (McCallister et al., 2012) et peut être calculée en utilisant différentes formules (Good et al., 2004). La plus simple est de la définir comme une augmentation du rendement en grains par unité d'azote disponible, de sorte qu'une quantité moindre d'azote puisse être appliquée tout en maintenant ou en augmentant la productivité.

De manière générale, la NUE peut être divisée en deux étapes pendant le cycle de la plante. Dans un premier temps, la NUE se réfère au prélèvement et au stockage de l'azote, ainsi que son assimilation en acides aminés et autres métabolites dans les jeunes tissus pendant le développement végétatif. Ces acides aminés sont ensuite utilisés dans la synthèse de protéines et d'enzymes impliquées dans différentes voies biochimiques et dans la machinerie photosynthétique régulant la croissance, l'architecture et le développement des plantes. Plus tard, au cours de la phase de reproduction, un apport accru de composés azotés est nécessaire pour une floraison et un remplissage optimal des grains. À ce stade, l'assimilation

et la remobilisation de l'azote deviennent critiques et les feuilles fournissent les acides aminés aux organes de reproduction et de stockage (Kant et al., 2011).

Ainsi la recherche de gènes candidats pour améliorer la NUE des plantes cultivées se concentre sur les voies liées au prélèvement de N, à son assimilation, sa remobilisation, sa voie de signalisation ainsi que la biosynthèse des acides aminés, au stockage et au métabolisme de C/N (balance carbone/azote) (Liu et al., 2015; Wang et al., 2018).

En combinant les avancées scientifiques à une meilleure gestion et utilisation des intrants, il sera possible dans un future proche de diminuer l'apport des engrais azotés tout en maintenant ou augmentant les rendements de la production agricole.

5. Objectifs de la thèse

Les phytohormones GA contrôlent de nombreux mécanismes de croissance durant le cycle de vie de la plante, comme la germination, l'allongement des tiges et des racines ou encore la formation des organes de reproduction. Ces phytohormones jouent également un rôle central dans la plasticité et l'adaptation des plantes aux variations de leur environnement. Comme décrit précédemment, les GA régulent le développement des plantes en réponse aux signaux environnementaux tels que la lumière, la température ou encore la disponibilité des éléments nutritifs comme le fer et le phosphate. Les GA ont été un facteur clé lors de la Révolution Verte, puisque la sélection de variétés céréalières semi-naines, altérées dans la biosynthèse ou dans leur réponse aux GA, associée à la large utilisation des engrais azotés, ont contribué à l'augmentation de la production agricole mondiale.

L'azote représente l'un des nutriments essentiels à la croissance et au développement des plantes et est principalement assimilé sous forme de nitrate. Le nitrate correspond également à une molécule signal, régulant différents mécanismes moléculaires, physiologiques et développementaux. Il existe des interconnexions entre la signalisation du nitrate et les signalisations de phytohormones comme l'auxine ou les cytokinines (Guan, 2017), afin de moduler la croissance et le développement de la plante en fonction de la disponibilité de l'azote dans l'environnement. Par ailleurs certains transporteurs de nitrate de la famille des NPF transportent également des phytohormones, dont les GA. Enfin, une étude récente a démontré que les GA régulaient l'assimilation du nitrate, ouvrant la porte à une meilleure compréhension de la relation entre les GA et le nitrate (Li et al., 2018).

Aujourd'hui l'utilisation des engrais azotés est très règlementée en Europe, mais la nécessité de maintenir ou d'augmenter la production de denrées alimentaires est inévitable en vue de la

croissance démographique mondiale. Ainsi, il est devenu primordial de mieux comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels l'azote, et plus particulièrement le nitrate, régule la croissance de la plante.

Malgré les liens scientifiques et historiques entre l'azote et les GA, peu d'études se sont intéressées à l'effet du nitrate sur la biosynthèse, la signalisation et le transport de GA chez les plantes. Afin d'apporter des réponses à cette problématique, mon travail de thèse a été divisé en deux grandes parties :

1. Le rôle du nitrate et des GA dans le développement des plantes.
2. Le rôle de l'azote dans le transport longue-distance de GA_{12} et le rôle biologique de ce transport, notamment lors d'une augmentation de température de l'environnement.

Résultats

Chapitre 1

Effet du nitrate sur le métabolisme, le transport et la signalisation GA au cours du développement de la plante

1. Introduction du chapitre 1

L'azote constitue l'un des macronutriments les plus importants, limitant la croissance et le rendement des plantes (Vidal et Gutiérrez, 2008). La plupart des plantes cultivées acquière l'azote dans le sol, essentiellement à partir de formes inorganiques, tel que le nitrate. Cependant, la disponibilité en nitrate varie considérablement dans le temps et l'espace, obligeant les agriculteurs à appliquer régulièrement des engrais azotés, pour assurer un rendement optimal des cultures.

L'utilisation d'engrais azotés synthétiques a débuté dans les années 1960, lors de la Révolution Verte. Néanmoins, la croissance excessive des plantes en réponse à l'application d'engrais, a eu pour conséquence d'augmenter les risques de verse, suite aux intempéries, causant ainsi de lourdes pertes de rendements. Afin de réduire la hauteur des plantes, des allèles mutants ont été recherchés, sélectionnés puis introduits par croisement chez le blé et le riz (Hedden, 2003). L'application d'engrais azotés sur ces variétés céréalières semi-naines a permis d'augmenter considérablement les rendements, sans modifier notablement la croissance des plantes. 40 ans plus tard, les études ont montré que les « gènes de nanisme » correspondent à des allèles mutants qui interfèrent spécifiquement avec la biosynthèse ou l'action des phytohormones de croissance GA, chez le riz et le blé respectivement (Peng et al., 1999; Monna et al., 2002; Spielmeyer et al., 2002; Sasaki et al., 2002). Ainsi, la réduction de croissance des plants de riz et blé semi-nains a pour cause, une accumulation des répresseurs de croissance DELLA, protéines clés de la signalisation GA. Aujourd'hui, 70% des variétés de blé commercialisées dans le monde, portent ces allèles responsables du phénotype semi-nain (Hedden, 2003).

L'activation de la croissance des plantes par l'azote se trouve quasiment abolie chez les cultivars issus de la Révolution Verte, altérés dans leurs réponses aux GA. Ainsi dans ce chapitre, j'ai étudié le rôle des GA dans les mécanismes de croissance activés par le nitrate, principale source d'azote, chez *Arabidopsis* et le blé. Afin de répondre à cette problématique, les paramètres morphologiques de mutants de biosynthèse et de la signalisation GA chez *Arabidopsis* et des mutants de la Révolution Verte du blé, ont été analysés en réponse à différents apports en nitrate. Par des approches biochimiques et moléculaires, j'ai étudié l'effet du nitrate sur le métabolisme, le transport et la signalisation des GA. Les mécanismes cellulaires par lesquels le nitrate induit la croissance ont également été mis en évidence chez

Arabidopsis. Enfin, du fait que la signalisation GA permet à la plante d'optimiser sa croissance et son développement en fonction des contraintes environnementales (Achard et al., 2006), j'ai évalué la contribution des GA dans l'adaptation des plantes à une disponibilité hétérogène en nitrate, en utilisant le système de culture « split-root » chez *Arabidopsis*.

2. Rôle des GA dans les mécanismes de croissance activés par le nitrate.

Manuscrit en préparation :

Nitrate-regulated growth processes are gibberellin-dependent

Lucie Camut¹, Barbora Gallova², Esther Carrera³, Lali Sakvarelidze-Achard¹, Julie Zumsteg¹, Dimitri Heintz¹, Stephen Thomas², Peter Hedden^{2,4}, Andrew L. Phillips², Jean-Michel Davière¹ and Patrick Achard^{1*}

¹Institut de biologie moléculaire des plantes, University of Strasbourg, 67084 Strasbourg, France.

²Plant Science Department, Rothamsted Research, Harpenden, AL5 2JQ, United Kingdom.

³Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, CSIC-UPV, 46022 Valencia, Spain.

⁴Laboratory of Growth Regulators, Institute of Experimental Botany & Palacky University, CZ-78371 Olomouc, Czech Republic

Dans ce manuscrit, j'ai participé à l'ensemble des expériences présentées, à l'exception des dosages de GA et des expériences présentées dans la figure S6.

Nitrate-regulated growth processes are gibberellin-dependent

Lucie Camut¹, Barbora Gallova², Esther Carrera³, Lali Sakvarelidze-Achard¹, Julie Zumsteg¹, Dimitri Heintz¹, Stephen Thomas², Peter Hedden^{2,4}, Andrew L. Phillips², Jean-Michel Davière¹ and Patrick Achard^{1*}

¹Institut de biologie moléculaire des plantes, University of Strasbourg, 67084 Strasbourg, France.

²Plant Science Department, Rothamsted Research, Harpenden, AL5 2JQ, United Kingdom.

³Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, CSIC-UPV, 46022 Valencia, Spain.

⁴Laboratory of Growth Regulators, Institute of Experimental Botany & Palacky University, CZ-78371 Olomouc, Czech Republic.

*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

Abstract

Nitrate, one of the main nitrogen (N) sources for crops, acts as a nutrient and key-signaling molecule coordinating gene expression, metabolism and various growth processes throughout the plant life cycle. There is increasing evidence of coordination between nitrate-specific developmental programs and hormone synthesis and transport, to finely adapt plant architecture to N availability. Here, we propose that nitrate through its signaling pathway promotes growth in *Arabidopsis* and wheat, in part by modulating the accumulation of DELLAs, a family of nuclear growth-repressing proteins, the degradation of which is stimulated by gibberellins (GA). We show that nitrate reduces the accumulation of DELLAs in root and shoot by increasing GA contents, most likely via the regulation of the early steps in the GA biosynthetic pathway. Thus, when nitrate availability decreases, DELLAs accumulate in root meristem, thereby restraining primary root growth. Consistently, this growth restraint is partially rescued by loss-of-function mutations in genes encoding the DELLAs. At cellular level, we show that nitrate enhances both cell proliferation and elongation in a DELLA-dependent and -independent manner, respectively. Our findings establish a link between nitrate and GA-DELLA signaling pathways that enables adaptively significant regulation of plant growth in response to nitrate availability.

Introduction

Nitrogen (N) is one of the most important macronutrients limiting plant growth and yield (O'Brien et al., 2016; Fredes et al., 2019). Except for a few plant species that are able to use atmospheric N₂ gas through symbiotic association with specific soil bacteria, most of crops acquire N in the soil from inorganic forms such as nitrate (NO₃⁻), the main N source for plants in agricultural lands (Dechorgnat et al., 2011). Nitrate serves as an essential element found in macromolecules and a signal molecule regulating global gene expression and both root and shoot system architecture (Wang et al., 2018; Fredes et al., 2019). Within minutes, nitrate induces the expression of the primary nitrate response (PNR) genes including nitrate transporter families such as the transceptor *NITRATE TRANSPORTER 1 (NRT1)/PEPTIDE TRANSPORTER (PTR) FAMILY 6.3 (NPF6.3*, also known as *CHLORATE RESISTANT 1, CHL1* or *NRT1.1*), *NRT2.1* and *NRT2.2*, the nitrate assimilation genes *NITRITE REDUCTASE (NiR)* and *NITRATE REDUCTASE (NIA1* and *NIA2)* and a multitude of transcription factors functioning in diverse signaling pathways (Marchive et al., 2013; Wang et al., 2018; Fredes et al., 2019). According to the current model, changes in cytoplasmic Ca²⁺ levels downstream to NPF6.3, activate several members of calcium-sensor protein kinases (CPK10/30/32) that phosphorylate conserved NIN-LIKE PROTEIN (NLP) transcription factors (NLP6/7) to reprogram nitrate-regulated genes ensuring adaptive growth to nitrate availability (Liu et al., 2017).

Despite sophisticated nitrate uptake, storage and assimilation mechanisms, the fluctuation of nitrate concentration in both time and space, in part due to its high solubility and predisposition to leaching, forced the farmers to supply their soil with N-fertilizers to ensure optimal crop yield. Hence, since the 1960's, the application of N-fertilizers associated with the mechanization and the adoption of high-yielding semi-dwarf varieties led to impressive yield increases, an intensive agricultural practice known as the "Green Revolution" (Hedden, 2003). The introduction of semi-dwarfing genes into high-yielding varieties was crucial to this revolution. The resulting semi-dwarf stature not only improves the harvest index (a greater proportion of assimilate partitioned into the grain) but also prevents lodging and thus enables higher N-fertilizer applications. The genes responsible for the semi-dwarf growth habit of the rice (*semidwarf1, sd1*) and wheat (*Reduced height 1, Rht-1*) varieties were characterized and shown to prevent, respectively, the synthesis and the action of the gibberellin (GA) growth hormone (Hedden, 2003). Strikingly, despite that more than 70% of wheat cultivated worldwide carry a GA-insensitive *Rht-1* mutant dwarfing gene (Thomas, 2017), little is known on whether and how GA contribute to nitrate-regulated growth processes.

GA constitute a class of diterpenoid molecules controlling major aspects of plant growth and development. Mutants deficient in GA biosynthesis or responses are typically dwarfs and late flowering, while elevated GA activity results in taller plants. Bioactive GA promote growth by opposing the functions of DELLA growth repressing proteins (DELLAs), members of the GRAS family of transcriptional regulators (Davière and Achard, 2013). While cereals usually harbor a single DELLA gene, such as *RHT1* in wheat (Peng et al., 1999), the *Arabidopsis* genome encodes five DELLAs, GA-

INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR of GA1-3 (RGA), RGA-LIKE1 (RGL1), RGL2 and RGL3, which display distinct but also overlapping functions in repressing GA responses (Davière and Achard, 2013). GA responses are mediated by the binding of bioactive GA to the GA receptors GIBBERELLIN INSENSITIVE 1 (GID1) that trigger the destruction of DELLAs through the ubiquitin-dependent proteasome pathway (Davière and Achard, 2013). DELLAs repress GA responses by interacting with and modulating the activity of DELLA-interacting partners (DIP) such as transcription factors or regulators, and chromatin-remodeling complexes (Van De Velde et al., 2017). By doing so, DELLAs regulate the expression of a wide array of target genes involved in distinct pathways.

In common with other phytohormones, GA act as mediators of environmental signals, allowing plants to respond, often rapidly, to changes in light conditions, temperature, water and nutrient status (Achard et al., 2006; Jiang et al., 2007; de Lucas et al., 2008; Achard et al., 2008; Wild et al., 2016). Usually, DELLA accumulation reduces growth to prioritize resources to defense mechanisms, whereas GA-mediated DELLA degradation stimulates growth under favorable conditions (Colebrook et al., 2014). Hence, it has been proposed that GA signaling permits flexible and appropriate modulation of plant growth in response to environmental changes (Achard et al., 2006; Colebrook et al., 2014). Interestingly, recent experiments have shown that physical interactions between rice GROWTH-REGULATOR FACTOR 4 (GRF4) transcription factor and DELLA SLENDER 1 (SLR1) co-regulate growth and the metabolism of carbon and nitrogen (Li et al., 2018). Whereas GRF4 promotes N assimilation, carbon fixation and plant growth, DELLAs repress these processes. Thus, if it becomes clear that GA signaling regulates growth and nitrogen-use efficiency, at present, it is unclear whether the nitrate response pathway interacts with the GA pathway. Here, we undertook a molecular and genetic approach to evaluate the role of GA metabolism and signaling in nitrate-regulated growth processes in *Arabidopsis* and wheat. Essentially, we show that nitrate increases bioactive GA levels (and its inactive precursor GA₁₂), thus promoting the degradation of DELLAs. We also show that increased nitrate availability enhances the amount of GA₁₂ transported from root to shoot. Reduced DELLA accumulation in turn activates cell proliferation, and as a consequence, root and shoot growth. Plant growth adaptation to fluctuating nutrient environment can be understood as a feed-forward cycle, where nutrients promote plant growth through regulating hormones biosynthesis and transport, and in turn, hormonal pathways control nutrient provision to growth rate (Krouk et al., 2011; Krouk, 2016). Taken together, our data and those reported by Li et al. (Li et al., 2018) lead to the proposal that GA pathway is a major regulator of this feed-forward loop interconnecting plant growth to nitrate provision.

Results

Nitrate regulates plant growth in a DELLA-dependent manner

In response to nitrate availability, the root and shoot system architecture undergoes important developmental changes. Thus, while adequate nitrate availability increases the length of both primary

and lateral roots, low and high nitrate supplies inhibit their growth (Araya et al., 2016). Similarly, nitrate limitation reduces shoot growth and delays axillary bud activation and therefore shoot branching (de Jong et al., 2014). Although well characterized as growth inhibitors preventing excessive elongation in response to high N fertilizer supply, it is still unclear whether the GA-regulated DELLA proteins inhibit growth under low N regimes (Hedden, 2003; Thomas, 2017). To address this question, we first investigated the involvement of DELLAs in the regulation of primary root growth in N-deficiency conditions and in response to increasing amounts of nitrate. For this purpose, we compared the primary root length of *Arabidopsis* wild-type and *global DELLA* mutant seedlings (lacking all five *Arabidopsis* DELLAs) grown with nitrate supply ranging from 0 to 50 mM (Fig. 1A,B). As previously reported (Araya et al., 2016), the growth of the primary roots was proportionally correlated with the amount of nitrate, from low to adequate concentrations (10 mM NO₃⁻ in our growth conditions), and then inversely correlated under high nitrate supply (50 mM NO₃⁻). Interestingly, we found that the primary root growth of 7-d-old *global DELLA* mutant seedlings was less affected by low and high nitrate supply than that of the wild-type (Figure 1A). Whereas the length of *global-DELLA* mutant seedling roots grown on 0.5, 1 and 50 mM NO₃⁻ was significantly longer than wild-type roots, their differences decreased on adequate nitrate supply (10 mM NO₃⁻). Thus, DELLA function restrains primary root growth in response to low and high nitrate availability, but becomes less critical on optimal nitrate supply (Fig. 1A,B).

Next, to investigate the contribution of DELLAs to nitrate-mediated growth processes during shoot development, we grew *Arabidopsis* wild-type, *global DELLA* and *ga20ox1* (a weak GA biosynthesis mutant accumulating the DELLAs (Rieu et al., 2008b; Hedden and Thomas, 2012) mutants on a perlite vermiculite soil supplemented with increasing amounts of nitrate (ranging from 2 to 50 mM NO₃⁻). Whereas the height of 7-week-old wild-type plants increased proportionally to the concentration of nitrate present in the soil, the mutants lacking or accumulating the DELLAs were relatively insensitive to the effect of nitrate on growth (Fig. 1C,D). Thus, as suggested above, nitrate promotes growth via a DELLA-dependent mechanism.

Concerning shoot branching, there is considerable evidence suggesting that nitrate-dependent regulation of bud activation and elongation are triggered by changes in hormone activity (de Jong et al., 2014). GA have long been known to repress shoot branching; GA-deficient mutants displaying high degree of branching (Rameau et al., 2015). Consistent with the above results, we found that nitrate supply increased the number of primary branches of wild-type and *ga20ox1* mutant plants in contrast to *global-DELLA* mutant plants (Fig. S1A). As a consequence, *global-DELLA* mutant plants exhibited reduced seed yields compared with wild-type, irrespective to nitrate availability (Fig. S2B). Taken together, these results demonstrate that nitrate promotes bud outgrowth in a DELLA-dependent manner.

Low nitrate availability enhances DELLA protein level

Next, we investigated whether the nitrated-regulated growth processes are associated with DELLA protein accumulation. To this end, we used *pRGA:GFP-RGA* transgenic seedlings expressing a functional GFP-RGA fusion protein that is detectable in root cell nuclei (Silverstone et al., 2001). We found a significant decrease of the GFP-RGA signal in root apical meristem of seedlings grown on 1 and 10 mM NO₃⁻ compared to those grown on low nitrate conditions (Fig. 2A). Remarkably, consistent with the above growth phenotypes, we also observed an increase in GFP-RGA signal in seedling roots grown on high nitrate conditions (50 mM NO₃⁻). In a subsequent experiment, we determined the effect of nitrate supply on GFP-RGA protein accumulation in seedling roots and shoots. Accordingly, we found that nitrate substantially decreases the accumulation levels of GFP-RGA protein in both roots and shoots, but their sensitivity to nitrate was different. Indeed, while 1 mM NO₃⁻ was sufficient to trigger a significant reduction in GFP-RGA level in roots, 10 mM NO₃⁻ was required to induce the same response in shoots (Fig. 2B,C).

Finally, to further substantiate the effect of nitrate on DELLA protein accumulation, we determined the accumulation levels of endogenous RGA protein in shoots of seedlings transferred from low nitrate (0.5 mM NO₃⁻) to adequate nitrate conditions (10 mM NO₃⁻), and inversely. Time-course analysis revealed that nitrate supply decreases RGA protein abundance within 24 hr, while nitrate deficiency increases RGA accumulation within 48 hr (Fig. 2D,E). A similar response was also observed in roots, although the differences were less pronounced (Fig. S2A,B).

The effect of nitrate on RGA protein levels could be the consequence of a decrease in *RGA* transcript levels or to a post-translational effect, as both mechanisms regulate DELLA abundance (Oh et al., 2007; Dill et al., 2004; Fu et al., 2004). To distinguish between these two possibilities, we determined the expression levels of *RGA* in the shoots of seedlings grown on 0.5 and 10 mM NO₃⁻. We found that nitrate had no statistical effect on *RGA* transcript levels (Fig. 2F). Thus, nitrate decreases RGA protein accumulation via a post-translational effect, likely through the regulation of GA synthesis, thereby promoting plant growth.

DELLA accumulation is regulated by nitrate-dependent signaling pathway

To assess whether nitrate availability directly controls DELLA abundance through its signaling pathway, we determined the effect of nitrate on RGA protein accumulation in a nitrate reductase (NR)-null mutant (*nia1 nia2*; Wang et al., 2004). We found that nitrate decreases the abundance of RGA protein at the same rate in the shoots of wild-type and *nia1 nia2* mutant seedlings (Fig. 3A). Thus, DELLA accumulation is regulated by nitrate alone, independent of nitrate reduction and therefore the N status. This last result indicates that nitrate acts as a local (in roots) but also long-distance systemic signal regulating DELLA abundance in shoots in response to nitrate availability in the soil, consistent with previous reports (Wang et al., 2004; Ruffel et al., 2011).

To strengthen this conclusion, we also analyzed the accumulation of RGA protein in *nrt2.1 nrt2.2* mutant, two linked genes responsible for high-affinity nitrate uptake in *Arabidopsis* roots (Cerezo et al., 2001). As previously reported, *nrt2.1 nrt2.2* double mutant displayed a reduction in shoot biomass compared with the wild-type, caused by a decrease of nitrate uptake (Fig. S3). As expected, we found that RGA accumulated to higher levels in *nrt2.1 nrt2.2* mutant rosettes of 4-week-old plants grown on both low (0.5 mM) and non-limiting (10 mM) nitrate supply, compared with the wild-type (Fig. 3B). Altogether, these results strongly suggest that nitrate, the signal molecule, regulates growth, at least in part, by modulating the accumulation of DELLA proteins.

Nitrate enhances GA synthesis and transport

Reduced bioactive GA contents cause an increase in DELLA protein accumulation, which in turn inhibit growth (Silverstone et al., 2001). Moreover, GA metabolism is regulated by various environmental signals including nutrient availability (Colebrook et al., 2014; Jiang et al., 2007; Wild et al., 2016). We next investigated if nitrate-deficiency-induced DELLA accumulation was attributable to a decrease in GA synthesis. Thus, we determined the endogenous GA contents in 7-d-old wild-type seedlings grown on low (0.5 mM) and adequate (10 mM) nitrate conditions, and 48 hr after a transfer from 0.5 to 10 mM NO_3^- . Interestingly, the levels of the major biologically active GA in *Arabidopsis*, GA_4 , and its precursors (GA_{12} and GA_{24}), were significantly increased in seedlings grown with 10 mM NO_3^- compared with those of seedlings grown on low nitrate (Fig. 4A). Surprisingly, their contents in GA_{34} (the inactive 2 β -hydroxylated product of GA_4) were also increased in seedlings grown with 10 mM NO_3^- (Fig. 4A), hence suggesting that the activity of C19-GA 2-oxidases ($\text{GA}2\text{ox}$), catalyzing the conversion of GA_4 into GA_{34} , is increased by nitrate to maintain GA_4 homeostasis (Rieu et al., 2008). Taken together, these above results indicate that nitrate increases GA synthesis, likely via activation of the early steps in the GA biosynthetic pathway producing GA_{12} .

To test this hypothesis, we determined, in the same growth conditions, the expression levels of genes encoding the *ent*-copalyl diphosphate (CPS), *ent*-kaurene synthase (KS), *ent*-kaurene oxidase (KO) and *ent*-kaurenoic acid oxidase (KAO) catalyzing the conversion of the geranylgeranyl diphosphate (GGDP) into GA_{12} (Hedden and Thomas, 2012). In parallel, we also analyzed the expression levels of *GA2ox7* and *GA2ox8* encoding a CA20- $\text{GA}2\text{ox}$ involved in GA_{12} catabolism (Hedden and Thomas, 2012). As positive control of nitrate treatment, we included in the analysis the nitrate reductase *NIA1*, a gene that is transcriptionally induced by nitrate (Medici and Krouk, 2014). We found that 7-day-old seedlings transferred from low (0.5 mM) to adequate (10 mM) nitrate concentrations, accumulated substantially higher levels of *KS*, *KAO2* and *GA2ox7* in shoots (Fig. 4B). Because the KS and KAO-mediated reactions are not rate-limiting steps in GA biosynthesis and that *GA2ox7* is a catabolic enzyme (Hedden and Thomas, 2012), it is unlikely that nitrate-induced accumulation of GA_{12} is caused by an increase in *KS*, *KAO2* or *GA2ox7* expression. Meanwhile, we also monitored the expression levels of the other GA metabolism and signaling genes. In general, we found that all GA biosynthesis genes such as *GA 20-*

oxidases (GA20ox) and *GA 3-oxidases (GA3ox)* are up-regulated in seedling shoots grown with 10 mM NO_3^- compared with those of seedlings grown with 0.5 mM NO_3^- (Fig. S4). Moreover, the *C19-GA2ox* genes *GA2ox1* and *GA2ox3* were also induced by nitrate, and might be the cause of nitrate-induced accumulation of GA_{34} (Fig. S4; Fig. 4A). By contrast, none of the GA signaling genes such as those encoding the DELLAs, GA receptors (GIBBERELLIN INSENSITIVE 1, *GID1*) or the F-box proteins *SLEEPY (SLY)* and *SNEEZY (SNZ)* was regulated by nitrate (Fig. S4).

A previous work has reported that GA_{12} acts as a long-distance growth signal in *Arabidopsis* (Regnault et al., 2015). It has been proposed that GA_{12} moves through the plant vascular system from root to shoot, in which GA_{12} can be converted to bioactive GA_4 to support growth via activation of GA-dependent processes. Because nitrate induces the production of GA_{12} , we suspected that nitrate might enhance the transport of GA_{12} , such as with cytokinins (Osugi et al., 2017). To test this hypothesis, we determined the concentration of GA_{12} in xylem sap collected from 6-week-old wild-type plants grown on a perlite vermiculite soil supplemented with 2 and 10 mM NO_3^- . Whereas the concentration of GA_{12} was unchanged between the two nitrate conditions, the volume of xylem collected after 3 hr of exudation was increased by 1.5 fold in the plants grown with 10 mM NO_3^- compared to those grown on 2 mM NO_3^- (Fig. 4C). As a consequence, the amount of GA_{12} transported from root to shoot is substantially increased by nitrate, and after its metabolic conversion into GA_4 mediated by the activities of *GA20ox* and *GA3ox* (which are also transcriptionally induced by nitrate), might be involved, at least in part, in the nitrate-mediated growth processes in the shoot.

Effect of nitrate on GA metabolism and growth processes in wheat

To test whether the role of GA/DELTA in nitrate-mediated growth processes is conserved in diverse angiosperms, we analyzed the effect of nitrate (used as the only N source) on the growth of wild-type (*Rht-1* tall) and semi-dwarf *Rht-D1b* and *Rht-B1c* gain-of-function mutants wheat (cv. Cadenza), expressing a truncated DELLA (*Rht-1*) protein conferring dwarfism through increased repression of GA signaling (Pearce et al., 2011; Peng et al., 1999). For this experiment, wild-type, *Rht-D1b* and *Rht-B1c* mutants were grown on a perlite vermiculite soil supplemented 3 times per week with the Letcombe nutrient solution containing nitrate (+N; 1.5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 5 mM KNO_3 and 2 mM NaNO_3) or without N (-N; 1.5 mM CaCl_2 , 5 mM KCl , 2 mM NaCl), and the length of primary leaf sheath was measured. As previously reported with other semi-dwarf *Rht-1* mutant alleles (Hedden, 2003; Thomas, 2017), the *Rht-D1b* and *Rht-B1c* mutants wheat were relatively insensitive to nitrate supply (Fig. 5A). Whereas the length of the primary leaf sheath was substantially longer in 3-week-old wild-type plants grown with nitrate (compared with those grown without N), nitrate supply had respectively little or no effect on the primary leaf sheath length of *Rht-D1b* and *Rht-B1c* mutants (Fig. 5A,B). Thus, as demonstrated above with *Arabidopsis*, nitrate enhances wheat growth via a DELLA-dependent mechanism.

To further test the effect of nitrate on GA accumulation, we determined the contents of GA in the first internode of 3-week-old wild-type plants grown with NO_3^- or without N. In wheat, the 13-hydroxylation pathway leading to active GA_1 is the main GA biosynthetic pathway (Hedden and Thomas, 2012). Similar to *Arabidopsis*, the level of bioactive GA_1 , its precursors (GA_{53} , GA_{44} and GA_{19}) and catabolite (GA_8) were increased in wild-type plants grown with nitrate compared with those grown without N, although the difference was not significant for GA_1 (Fig. 5C). Surprisingly, GA_{12} contents were unchanged in wild-type plants grown in presence of nitrate compared with those grown without N, nor the expression of *GA 13-oxidase (GA13ox)* genes encoding enzymes involved in the metabolic conversion of GA_{12} into GA_{53} (Fig. S5). Based on the results obtained with *Arabidopsis*, it is likely that GA13ox reaction is not rate limiting.

We also investigated the effect of nitrate on growth and GA synthesis at a later stage, in 7-week-old wheat. In this experiment, the plants were grown with nitrate and then N was sequentially withdrawn week after week, over a time scale of 6 weeks until booting stage. Noteworthy, the main tillers were removed from all plants as they appeared, to avoid that N resources are distributed across tillers. In this growth context, we found that the two first internodes were gradually shorter as time with N decreases (Fig. S6A). By contrast, there was no significant difference in the lengths of the third and fourth internode across treatment groups when compared to control (Fig. S6A). Consistent with these physiological traits, we found that N withdrawal had a gradual effect on endogenous GA contents in the first internode at booting stage. All GA quantified displayed a steady gradual increase with increasing length of time that the plants were supplied with nitrate (Fig. S6B). Taken together, these two series of data indicate that nitrate increases bioactive GA levels, which in turn stimulate DELLA degradation thereby promoting growth.

Nitrate increases cell division in a DELLA-dependent manner in root meristem

Plant growth is regulated through the activity of apical and intercalary meristems where the cells divide before elongating and differentiating. Moreover, GA promote growth through cell proliferation and cell elongation by stimulating the degradation of nuclear DELLAs (Davière and Achard, 2013; Ubeda-Tomás et al., 2008). Previous works reported a key role for DELLAs in controlling root apical meristem (RAM) activity (Ubeda-Tomás et al., 2009; Achard et al., 2009). To investigate whether DELLAs play an essential function in regulating RAM activity in response to nitrate availability, we measured the size of the RAM of *Arabidopsis* wild-type and *global-DELLA* mutant seedlings throughout their development (from 3 to 7-d-old) on low (0.5 mM) and adequate (10 mM) NO_3^- conditions. Root meristem length was expressed as the number of cortical cells in a file extending from the quiescent center (QC) to the first elongated cell displaying vacuolization (Achard et al., 2009). We found that nitrate increases root meristem size in a DELLA-dependent manner. Although the growth of the root meristem of wild-type seedlings grown on 10 mM NO_3^- was increased compared to those grown on 0.5

mM NO₃⁻, the *global-DELLA* mutant root meristem was relatively insensitive to the effect of nitrate (Fig. 6A). Thus, whereas low nitrate supply significantly reduced the root meristem size of 5 days post-imbibed (dpi) wild-type seedlings (compared with those grown with 10 mM NO₃⁻), the lack of DELLA function in *global-DELLA* mutant suppressed the growth restraint conferred by limited nitrate availability (Fig. 6A). Hence, the root meristem size of *global-DELLA* mutant was indistinguishable throughout their development, at either low or adequate NO₃⁻ conditions. Altogether, these results suggest that nitrate controls RAM growth via DELLA-dependent action on cell proliferation.

To further substantiate the role of nitrate and DELLAs in controlling cell proliferation, we introgressed a *pCYCB1;2:Dbox-GUS* construct into *gai-t6 rga-24* mutant (lacking GAI and RGA). The cyclin B1;2-GUS reporter allows to monitor cells at the G2-M transition phase of the cell cycle (Colon-Carmona et al., 1999). We found that the number of dividing cells was strongly reduced in the RAM of wild-type seedlings grown on N deficient or low (0.5 mM) nitrate availability compared with those grown on 10 mM NO₃⁻ (Fig. 6B). In contrast, the number of dividing cells in *gai-t6 rga-24* RAM was less affected by the reduction of nitrate availability, thus confirming that DELLAs contribute substantially in the nitrate-induced cell division activity.

Root growth is determined by the combinatory effects of both cell division and cell expansion. We next determined the effects of nitrate and DELLAs on root cell elongation. To this end, we measured the length of differentiated cortical cells in the root differentiation zone of 7-d-old wild-type and *global-DELLA* mutant seedlings grown on low (0.5 mM) and adequate (10 mM) NO₃⁻ conditions. Nitrate increased the length of the cells at a similar level in wild-type and *global-DELLA* mutant seedlings (Fig. 6C). Thus despite that GA/DELLA regulate cell elongation in root (Ubeda-Tomás et al., 2008), adequate nitrate supply (10 mM NO₃⁻) enhances cell expansion in a DELLA-independent fashion.

Discussion

Plants are sessile organisms that must perpetually adapt their growth and development to spatiotemporal fluctuations of nitrate concentrations in the soil. It is now established that GA signaling plays a critical role in modulating plant growth in response to environmental changes including nutrient availability (Achard, 2006; Jiang et al., 2007; de Lucas et al., 2008; Achard et al., 2008; Wild et al., 2016). While semi-dwarfing genes interfering with the action or production of GA contributed to substantial yield increases during the green revolution because they prevent excessive stem elongation in response to high nitrogen fertilizer regimes (Hedden, 2003), the role of GA signaling in adapting plant growth to nitrate availability remained unclear. The experiments described here investigate the connections between the GA pathway and the nitrate-dependent signaling pathway.

Plant root development is strongly influenced by nitrate concentrations in the soil. Whereas, limited nitrogen conditions inhibit the primary root length, excess supply of nitrate also leads to a repression of root elongation (Giehl and von Wiren, 2014; Araya et al., 2016). We found that low (0.5 mM NO₃⁻) and high (50 mM NO₃⁻) nitrate concentrations promoted the accumulation of RGA in roots and that the growth of *global-DELLA* mutant roots was less affected by these extreme nitrate concentrations than those of wild-type seedlings. Furthermore, the abundance of RGA in wild-type roots and the difference in root growth between wild-type and *global-DELLA* mutant seedlings decreased progressively with increase in nitrate supply, from low (0.5 mM NO₃⁻) to adequate (10 mM NO₃⁻) concentrations. Thus, low (and high) nitrate conditions repress root growth in part via a DELLA-dependent pathway. Consistent with our results, a previous work has reported a similar effect of high nitrate supply on plant growth and GFP-RGA accumulation in *pRGA:GFP-RGA* seedlings roots, except that the range of NO₃⁻ concentrations used by the authors was ten fold less than in our growth conditions (Gras et al., 2018). The composition of the N-free medium, which is different between the two works, could explain this discrepancy. Interestingly, we also found that seedling shoots had similar response than roots in term of RGA accumulation, even though the shoots tend to be less sensitive to nitrate than roots. Consistent with this observation, global gene expression analyses revealed that while roots treated with low nitrate have a much wider response than shoots in term of the number of genes altered, the shoots can be as responsive as roots to adequate nitrate concentrations (Wang et al., 2004, 2000). Thus, it is likely that in our growth conditions, 1 mM NO₃⁻ supply is the minimal concentration to trigger a decrease in RGA abundance in seedling roots, while 10 mM NO₃⁻ is required to observe the same phenomenon in shoots. Moreover, the kinetics of DELLA disappearance in response to a transfer from low to adequate nitrate conditions (and reciprocally) is similar in both roots and shoots, despite the time required for the nitrate to be translocated from root to shoot. Of note, although this slow response depends on nitrate signaling (the response is confirmed in NR-null mutant), DELLAs are not primary targets in the nitrate-CPK-NLP signaling network, as usually the PNR marker genes are activated within few minutes after nitrate treatment (Marchive et al., 2013; Liu et al., 2017). Remarkably, we have also shown that nitrate promotes stem elongation and shoot branching in *Arabidopsis* and internode elongation in wheat via a DELLA-dependent mechanism. Thus altogether, we conclude that nitrate-mediated regulation of DELLA accumulation is a general mechanism that is conserved among flowering plants and throughout plant development.

Because GA relieve DELLA restraint by stimulating the degradation of DELLAs (Davière and Achard, 2013), we next determined the levels of GA contents and gene transcripts encoding GA metabolic enzymes. These analyses revealed that a transfer from low to adequate nitrate supply increases the contents in bioactive GA and their inactive precursors GA₁₂ and GA₅₃, in *Arabidopsis* and wheat, respectively. Hence, this result suggests that nitrate induces the early steps in the GA biosynthetic pathway. However, even though nitrate increased the levels of the *KS* and *KAO2* transcripts encoding

two non-rate limiting enzymes, it is unlikely that nitrate-induced accumulation of GA contents is due to a transcriptional regulation of GA metabolism genes. It is noteworthy that previous work has shown that TARGET OF RAPAMYCIN (TOR) kinase, which is at the interface of growth and nutrient availability, acts upstream of the GA signaling pathway (Zhang et al., 2018). Well characterized to modulate protein synthesis and metabolism in eukaryotic cells (González and Hall, 2017), TOR can be phosphorylated and activated by nitrate in *Arabidopsis* by a still unknown mechanism (Xiong and Sheen, 2015). Taken together, these data raise the possibility that TOR contributes to nitrate-induced GA contents via (post)-translational regulation of GA biosynthetic enzyme levels or activity. Further work with *tor* mutants is required to validate this hypothesis.

It has recently been shown that the GA precursor GA₁₂ acts as a long-distance growth signal in *Arabidopsis* (Regnault et al., 2015). As a next step, we investigated whether nitrate, which induces GA₁₂ synthesis, also enhances root-to-shoot GA₁₂ transport. Root-derived GA₁₂ are transported to the shoots along with the xylem sap flow driven by water loss during transpiration and photosynthesis (Regnault et al., 2015; Lacombe and Achard, 2016). We found that adequate nitrate supply has no direct effect on GA₁₂ transport (compared to limiting N conditions), however it increases the xylem stream likely caused by the enhanced growth of the plants and therefore the increased transpiration and photosynthesis rates. Hence, the amount of GA₁₂ collected in xylem exudates over the time is increased by nitrate. Thus, nitrate enhances the concentration of GA in shoot via the increase of both root-derived and shoot-synthesized GA₁₂ levels.

Previous works revealed that bioactive GA promote root growth through cell division and expansion by stimulating the degradation of DELLAs in endodermal cells of root apical meristem and elongation zone of the root, respectively (Ubeda-Tomás et al., 2008, 2009; Achard and Genschik, 2009). In elongating roots, bioactive GA are translocated in the endodermis by the GA transporter NITRATE TRANSPORTER1/PEPTIDE TRANSPORTER FAMILY 3 (NPF3) localized in the plasma membrane of endodermal cells (Tal et al., 2016; David et al., 2016). We also observed that adequate nitrate supply enhances primary root growth by activating both cell proliferation and elongation. However, unexpectedly, whereas nitrate increased the number of cortical cells in root meristem via a DELLA-dependent mechanism, it increased cell elongation in a DELLA-independent manner. DELLAs restrain cell cycle activity by enhancing the expression of cell cycle inhibitors (Achard et al., 2009). Accordingly, we found that mitotic activity (monitored with CYCB1;2-GUS reporter) was less reduced in root meristem of DELLA loss of function mutant (in *gai-t6 rga-24* seedlings) grown on low nitrate conditions than those of wild-type. By contrast, low nitrate restrained cell length of both wild-type and *global-DELLA* mutant seedling roots. Thus, it is likely that nitrate-induction of cell size is driven by other hormonal pathways such as auxin and cytokinins (Krouk, 2016).

In summary, this study provides compelling evidence that nitrate through its signaling pathway activates the early steps in the GA biosynthetic pathway producing GA₁₂ and GA₅₃, respectively in *Arabidopsis* and wheat, which after metabolic conversion into bioactive GA enhance plant growth (Fig. 7). In *Arabidopsis*, root-borne GA₁₂ can move to shoot and be combined with shoot-synthesized GA₁₂ to enhance shoot growth. Increased bioactive GA levels activate in turn DELLA protein degradation by the ubiquitin-dependent proteasome pathway, thereby contributing in the regulation of cell division.

It is now well established that nitrate signaling pathway activates plant growth by controlling the hormonal status of the plants (Krouk et al., 2011; Krouk, 2016). Reciprocally, hormone-signaling pathways regulate nitrate acquisition and assimilation, constituting a retro-control of growth on N provision. A recent report revealed that *Rht-1* dwarfing genes restrain nitrate uptake and assimilation by interacting with and inhibiting the activity of GRF4, a transcription factor that positively regulates N metabolism (Li et al., 2018). We propose that GA-nitrate interplay provides a highly regulated mechanism permitting flexible and appropriate growth in response to N availability.

Material and Methods

Plant materials

Mutants and transgenic lines in *Arabidopsis* were derived from Landsberg *erecta* (*global DELLA; ga20ox1; gai-t6 rga-24; pRGA:GFP-RGA*) or Columbia-0 (*nia1 nia2; nrt2.1-2; pCYCB1,2:Dbox-GUS*) ecotypes, as previously described (Achard et al., 2008; Regnault et al., 2015; Lozano-Juste and Leon, 2010). To generate *gai-t6 rga-24 pCYCB1,2:Dbox-GUS*, the *pCYCB1,2:Dbox-GUS* (Col-0 ecotype) was crossed to *gai-t6 rga-24* (Ler background) to obtain an F1 population. The F3 plant was selected and then backcrossed one time into *pCYCB1,2:Dbox-GUS* Col-0 genetic background. Two independent *gai-t6 rga-24 pCYCB1,2:Dbox-GUS* homozygous lines (#7 and #18) were used in the study. Seeds of wheat (*Triticum aestivum*) for semi-dwarf *Rht-B1c* and *Rht-D1b* mutant alleles and wild-type *Rht-1* tall in the variety Cadenza were provided by Dr SG. Thomas (Rothamsted research).

Growth conditions for Arabidopsis

In vitro, plants were grown on 1x Murashige-Skoog (MS) modified medium without nitrogen (Ref 30630200; bioWORLD plantmedia) supplemented with adequate KNO₃ concentration or 0.5 mM glutamine (as indicated in the figures), 0.5 mM NH₄-succinate, 1% sucrose and 1% ultrapure agar (Merck) or 1% type A agar (Sigma) under a 16 h photoperiod at 22°C, except for the analysis of the GA metabolism genes expression, for which the plants were grown in continuous light. In soil, plants were grown in pots on a mix perlite/vermiculite (1/2 v/v) completed with 5% soil under long day photoperiod (16h light at 21°C / 8h dark at 18°C). The pots were watered once a week with 5 ml of 1x MS modified medium without N supplemented with KNO₃ as indicated (K⁺ were adjusted with KCl).

Growth conditions for wheat

Rht-1 tall, *Rht-B1c* and *Rht-D1b* plants were grown on a mix perlite/vermiculite (1/2 v/v) completed with 5% soil under long day photoperiod (16h light at 20°C / 8h dark at 15°C). The pots were watered three times a week with 13 ml of 1x Letcombe modified nutrient solution without N (N-deficiency condition) or with nitrate (N⁺ condition; 1.5 mM Ca(NO₃)₂, 5 mM KNO₃ and 2 mM NaNO₃). The composition of Letcombe modified nutrient solution is listed in Table S1. For N withdrawal experiment, the seeds were sown on sand/perlite pots and watered three times per week. The first week, all plants were watered with N⁺ solution, then with either N⁺ or N⁻ solution. N was sequentially withdrawn week after week over a time scale of 6 weeks until booting stage.

Immunoblot analyses

Seedling roots or shoots were ground in 2x SDS-PAGE sample buffer followed by boiling for 5 min. After centrifugation, the protein extracts were fractionated on a 8% or 10% SDS-PAGE gel and blotted onto membrane. Immunoblots were performed using a 2000-fold dilution of anti-RGA (Agriser) or anti-GFP (Clontech), and a 5000-fold dilution of peroxidase-conjugated goat anti-rabbit or mouse IgG (Molecular Probes). Signals were detected by film (within linear range of detection) using the Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore) or Clarity MaxTM Western ECL substrate (Biorad). The blot was subsequently probed with anti-cdc2 (PSTAIRE) antibody (Santa Cruz Biotechnology) for loading control or stained with Coomassie blue. Quantification of the signals was performed using ImageJ package version 1.48v (www.imagej.nih.gov).

Gene expression analyses

Total RNA 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 Supplemental Information) in a total volume of 10 µL SYBR Green Master mix (Roche) on a Lightcycler LC480 apparatus (Roche) according to manufacturer's instructions. AT2G28390 (*SAND*) and AT4G26410 genes were used as internal reference genes for *Arabidopsis* and *Actin* in wheat (Pearce et al., 2015). The relative expression level of each gene was calculated using Lightcycler 480 software, release 1.5.0 SP3. The sequence of the primers used in the study is shown in Table S2.

Observation of GFP fluorescence

Confocal microscopy images were obtained with a Zeiss LSM510 inverted confocal laser microscope with x20 objectives. The excitation wavelength for GFP detection was 488 nm. All images were

obtained with the same modifications and intensity parameters. GFP-RGA fluorescence was determined on 7 day-old *pRGA:GFP-RGA* root tip of the primary root. Root cell walls were stained with propidium iodide (10 µg/mL, Sigma).

GUS analyses

Histochemical detection of GUS activity was carried out on roots of 5-d-old *pCYCB1.2:Dbox-GUS* and *gai-t6 rga-24 pCYCB1.2:Dbox-GUS* seedlings grown in N-deficient, low nitrate (0.25 mM NO₃⁻) or adequate nitrate (10 mM NO₃⁻) conditions. Plant material was infiltrated in GUS solution (250 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 overnight. 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. For root observations, 70% (v/v) ethanol was replaced with 0,24N HCl in 20% methanol during 15 min at 57°C. Then, this solution was replaced by 7% NaOH in 60% ethanol during 15 min at room temperature. Finally, seedlings were rehydrated with successive bath of 40%, 20% and 10% ethanol during 5 min each and kept in 5% ethanol 25% glycerol (adapted from Malamy and Benfey, 1997). Roots were observed in 50% glycerol using AxioImager Z1 (Zeiss) microscope.

Root meristem size and cell length analyses

Seeds of wild-type (Ler) and *global-DELLA* mutant were plated on 1x MS modified medium without nitrogen supplemented with 0.5 mM or 10 mM NO₃⁻ and placed at 4°C at least 2 days to synchronize germination. Plates were then placed vertically in a growth chamber (22°C; 16h photoperiod). As *global-DELLA* mutant seeds germinate earlier than wild-type (Lee et al., 2002), the plates containing wild-type seeds were disposed in the growth chamber 8h before those containing *global-DELLA* mutant seeds. Meristem size was expressed as the number of cells in cortex files from the QC to the first elongated cell exhibiting vacuolization. Measurements were performed at 3, 5 and 7 days post-germination (DPG) by microscopy (AxioImager Z1, Zeiss) on at least 12 roots for each genotype. Length of differentiated root cortical cells was measured with Image J software (<http://rsb.info.nih.gov>).

Xylem sap exudations

Stems of 6-week-old plants (few days after booting) grown on 2 mM or 10 mM NO₃⁻ were decapitated 2 cm above the rosette with a razor blade and placed in closed box to maintain high humidity. Exudate was collected every 30 min for 3 h (the first drop was discarded), pooled and concentrated under vacuum centrifugation (Savant ThermoFisher).

GA determinations

GA contents in *Arabidopsis* seedlings grown in liquid MS modified medium without nitrogen and supplemented with indicated nitrate concentrations (Fig. 4A) and in the primary internode of 3-week-old wheat grown perlite/vermiculite supplemented with Letcombe modified nutrient solution (Fig. 5C) were determined by ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UHPLC-MS) using a Q-Exactive spectrometer (Orbitrap detector; ThermoFisher Scientific). Dry grounded material was suspended in 80% methanol-1% acetic acid including $17\text{-}^2\text{H}_2$ -labeled GA internal standards (Olchemim) and mixed by shaking during one hour at 4°C. The extract was kept at -20°C overnight, centrifuged and the supernatant dried in a vacuum evaporator. The dry residue was dissolved in 1% acetic acid and passed through an Oasis HLB column. The dried eluate was dissolved in 5% acetonitrile-1% acetic acid, and the GAs were separated by UHPLC (Accucore RP-MS column 2.6 μm , 50 x 2.1 mm; ThermoFisher Scientific) with a 5 to 50% acetonitrile gradient containing 0.05% acetic acid, at 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ over 14 min. The concentrations of GAs in the extracts were analyzed by selected ion monitoring (SIM) using embedded calibration curves and the Xcalibur 2.2 SP1 build 48 and TraceFinder programs.

GA₁₂ content in xylem sap collected from *Arabidopsis* plants grown on various N conditions (Fig. 4C) was determined by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 UHPLC coupled MS Bruker EVOQ Elite) as described previously (Regnault et al., 2015).

GA contents in peduncle and peduncle nodes of 7-week-old wheat grown on different N status (Fig. S6B) were determined by gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring (SIM) of endogenous and $17\text{-}^2\text{H}_2$ -labeled GA internal standards as described previously (Plackett et al., 2012).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using InfoStat 2014d software (Universidad Nacional de Córdoba, Argentine, www.infostat.com.ar). Phenotypic characterization was analyzed using Student's *t*-test ($P < 0.01$ or 0.05) or by analysis of variance (ANOVA). Tukey's Honest Significant Difference (HSD) was used to compare between genotypes using a significance threshold of 5%. Statistical analyses of the figure S6 were performed using the GenStat statistical software (14th edition, 2011, VSN International Ltd., Hemel Hempstead, UK).

Acknowledgment

We thank Tp. Sun for providing seeds of *pRGA:GFP-RGA*, J. Leon for *nial nia2* mutant and the NASC for *pCYCB1;2:Dbox-GUS* and *nrt2.1-2* mutant. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and the French ministry of research and higher education.

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.** (2008). 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., 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.
- Araya, T., Kubo, T., von Wirén, N., and Takahashi, H.** (2016). Statistical modeling of nitrogen-dependent modulation of root system architecture in Arabidopsis thaliana. *J. Integr. Plant Biol.* **58**: 254–265.
- Cerezo, M., Tillard, P., Filleur, S., Muños, S., Daniel-Vedele, F., and Gojon, A.** (2001). Major Alterations of the Regulation of Root NO₃ – Uptake Are Associated with the Mutation of Nrt2.1 and Nrt2.2 Genes in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **127**: 262–271.
- Colebrook, E.H., Thomas, S.G., Phillips, A.L., and Hedden, P.** (2014). The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. *J. Exp. Biol.* **217**: 67–75.
- Colon-Carmona, A., You, R., Haimovitch-Gal, T., and Doerner, P.** (1999). Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J.* **20**: 503–508.
- David, L.C., Berquin, P., Kanno, Y., Seo, M., Daniel-Vedele, F., and Ferrario-Méry, S.** (2016). N availability modulates the role of NPF3.1, a gibberellin transporter, in GA-mediated phenotypes in Arabidopsis. *Planta* **244**: 1315–1328.
- Davière, J.-M. and Achard, P.** (2013). Gibberellin signaling in plants. *Development* **140**: 1147–51.
- Dechorgnat, J., Nguyen, C.T., Armengaud, P., Jossier, M., Diatloff, E., Filleur, S., and Daniel-Vedele, F.** (2011). From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. *J. Exp. Bot.* **62**: 1349–1359.
- Dill, A., Thomas, S.G., Hu, J., Steber, C.M., and Sun, T.** (2004). The Arabidopsis F-Box Protein SLEEPY1 Targets Gibberellin Signaling Repressors for Gibberellin-Induced Degradation. *Plant Cell* **16**: 1392–1405.
- Fredes, I., Moreno, S., Díaz, F.P., and Gutiérrez, R.A.** (2019). Nitrate signaling and the control of Arabidopsis growth and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **47**: 112–118.
- 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.
- Giehl, R.F.H. and von Wiren, N.** (2014). Root Nutrient Foraging. *PLANT Physiol.* **166**: 509–517.
- González, A. and Hall, M.N.** (2017). Nutrient sensing and <sc>TOR</sc> signaling in yeast and mammals. *EMBO J.* **36**: 397–408.
- Gras, D.E., Vidal, E.A., Undurraga, S.F., Riveras, E., Moreno, S., Dominguez-Figueroa, J., Alabadi, D., Blázquez, M.A., Medina, J., and Gutiérrez, R.A.** (2018). SMZ/SNZ and gibberellin signaling are required for nitrate-elicited delay of flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **69**: 619–631.
- Hedden, P.** (2003). The genes of the Green Revolution. *Trends Genet.* **19**: 5–9.
- Hedden, P. and Thomas, S.G.** (2012). Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem. J.* **444**: 11–25.
- Jiang, C., Gao, X., Liao, L., Harberd, N.P., and Fu, X.** (2007). Phosphate Starvation Root Architecture and Anthocyanin Accumulation Responses Are Modulated by the Gibberellin-DELLA Signaling Pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **145**: 1460–1470.
- de Jong, M., George, G., Ongaro, V., Williamson, L., Willetts, B., Ljung, K., McCulloch, H., and Leyser, O.** (2014). Auxin and Strigolactone Signaling Are Required for Modulation of *Arabidopsis* Shoot Branching by Nitrogen Supply. *Plant Physiol.* **166**: 384–395.
- Krouk, G.** (2016). Hormones and nitrate: a two-way connection. *Plant Mol. Biol.* **91**: 599–606.
- Krouk, G., Ruffel, S., Gutiérrez, R.A., Gojon, A., Crawford, N.M., Coruzzi, G.M., and Lacombe, B.** (2011). A framework integrating plant growth with hormones and nutrients. *Trends Plant Sci.* **16**: 178–182.
- Lacombe, B. and Achard, P.** (2016). Long-distance transport of phytohormones through the plant vascular system. *Curr. Opin. Plant Biol.* **34**: 1–8.
- 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**: 646–58.
- Li, S., Tian, Y., Wu, K., Ye, Y., Yu, J., Zhang, J., Liu, Q., Hu, M., Li, H., Tong, Y., Harberd, N.P., and Fu, X.** (2018). Modulating plant growth–metabolism coordination for sustainable agriculture. *Nature* **560**: 595–600.
- Liu, K. et al.** (2017). Discovery of nitrate–CPK–NLP signalling in central nutrient–growth networks. *Nature* **545**: 311–316.
- 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.
- Malamy, J.E. and Benfey, P.N.** (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**: 33–44.

- Marchive, C., Roudier, F., Castaings, L., Bréhaut, V., Blondet, E., Colot, V., Meyer, C., and Krapp, A.** (2013). Nuclear retention of the transcription factor NLP7 orchestrates the early response to nitrate in plants. *Nat. Commun.* **4**: 1713.
- Medici, A. and Krouk, G.** (2014). The Primary Nitrate Response: A multifaceted signalling pathway. *J. Exp. Bot.* **65**: 5567–5576.
- O’Brien, J.A., Vega, A., Bouguyon, E., Krouk, G., Gojon, A., Coruzzi, G., and Gutiérrez, R.A.** (2016). Nitrate Transport, Sensing, and Responses in Plants. *Mol. Plant* **9**: 837–856.
- Oh, E., Yamaguchi, S., Hu, J., Yusuke, J., Jung, B., Paik, I., Lee, H.-S., Sun, T., Kamiya, Y., and Choi, G.** (2007). PIL5, a Phytochrome-Interacting bHLH Protein, Regulates Gibberellin Responsiveness by Binding Directly to the GAI and RGA Promoters in Arabidopsis Seeds. *Plant Cell* **19**: 1192–1208.
- Osugi, A., Kojima, M., Takebayashi, Y., Ueda, N., Kiba, T., and Sakakibara, H.** (2017). Systemic transport of trans-zeatin and its precursor have differing roles in Arabidopsis shoots. *Nat. Plants* **3**: 17112.
- Pearce, S. et al.** (2011). Molecular Characterization of Rht-1 Dwarfing Genes in Hexaploid Wheat. *Plant Physiol.* **157**: 1820–1831.
- Pearce, S., Huttly, A.K., Prosser, I.M., Li, Y., Vaughan, S.P., Gallova, B., Patil, A., Coghill, J.A., Dubcovsky, J., Hedden, P., and Phillips, A.L.** (2015). Heterologous expression and transcript analysis of gibberellin biosynthetic genes of grasses reveals novel functionality in the GA3ox family. *BMC Plant Biol.* **15**: 130.
- Peng, J. et al.** (1999). ‘Green revolution’ genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* **400**: 256–261.
- Plackett, A.R.G. et al.** (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.
- Rameau, C., Bertheloot, J., Leduc, N., Andrieu, B., Foucher, F., and Sakr, S.** (2015). Multiple pathways regulate shoot branching. *Front. Plant Sci.* **5**: 1–15.
- Regnault, T., Davière, J.-M., Wild, M., Sakvarelidze-Achard, L., Heintz, D., Carrera Bergua, E., Lopez Diaz, I., Gong, F., Hedden, P., and Achard, P.** (2015). The gibberellin precursor GA12 acts as a long-distance growth signal in Arabidopsis. *Nat. Plants* **1**: 15073.
- Rieu, I., Eriksson, S., Powers, S.J., Gong, F., Griffiths, J., Woolley, L., Benloch, R., Nilsson, O., Thomas, S.G., Hedden, P., and Phillips, A.L.** (2008a). Genetic Analysis Reveals That C19-GA 2-Oxidation Is a Major Gibberellin Inactivation Pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**: 2420–2436.
- 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.** (2008b). The gibberellin biosynthetic genes AtGA20ox1 and AtGA20ox2 act, partially redundantly, to

- promote growth and development throughout the Arabidopsis life cycle. *Plant J.* **53**: 488–504.
- Ruffel, S., Krouk, G., Ristova, D., Shasha, D., Birnbaum, K.D., and Coruzzi, G.M.** (2011). Nitrogen economics of root foraging: Transitive closure of the nitrate-cytokinin relay and distinct systemic signaling for N supply vs. demand. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**: 18524–18529.
- 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**: 1555–66.
- Tal, I. et al.** (2016). The Arabidopsis NPF3 protein is a GA transporter. *Nat. Commun.* **7**: 11486.
- Thomas, S.G.** (2017). Novel Rht-1 dwarfing genes: tools for wheat breeding and dissecting the function of DELLA proteins. *J. Exp. Bot.* **68**: 354–358.
- 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.
- Ubeda-Tomás, S., Swarup, R., Coates, J., Swarup, K., Laplaze, L., Beemster, G.T.S., 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.
- Van De Velde, K., Ruelens, P., Geuten, K., Rohde, A., and Van Der Straeten, D.** (2017). Exploiting DELLA Signaling in Cereals. *Trends Plant Sci.* **22**: 880–893.
- Wang, R., Guegler, K., LaBrie, S.T., and Crawford, N.M.** (2000). Genomic Analysis of a Nutrient Response in Arabidopsis Reveals Diverse Expression Patterns and Novel Metabolic and Potential Regulatory Genes Induced by Nitrate. *Plant Cell* **12**: 1491–1509.
- Wang, R., Tischner, R., Gutiérrez, R.A., Hoffman, M., Xing, X., Chen, M., Coruzzi, G., and Crawford, N.M.** (2004). Genomic Analysis of the Nitrate Response Using a Nitrate Reductase-Null Mutant of Arabidopsis. *Plant Physiol.* **136**: 2512–2522.
- Wang, Y.-Y., Cheng, Y.-H., Chen, K.-E., and Tsay, Y.-F.** (2018). Nitrate Transport, Signaling, and Use Efficiency. *Annu. Rev. Plant Biol.* **69**: 85–122.
- Wild, M., Davière, J.-M., Regnault, T., Sakvarelidze-Achard, L., Carrera, E., Lopez Diaz, I., Cayrel, A., Dubeaux, G., Vert, G., and Achard, P.** (2016). Tissue-Specific Regulation of Gibberellin Signaling Fine-Tunes Arabidopsis Iron-Deficiency Responses. *Dev. Cell* **37**: 190–200.
- Xiong, Y. and Sheen, J.** (2015). Novel links in the plant TOR kinase signaling network. *Curr. Opin. Plant Biol.* **28**: 83–91.
- Zhang, Y.Y., Zhang, Y.Y., McFarlane, H.E., Obata, T., Richter, A.S., Lohse, M., Grimm, B., Persson, S., Fernie, A.R., and Giavalisco, P.** (2018). Inhibition of TOR Represses Nutrient Consumption, Which Improves Greening after Extended Periods of Etiolation. *Plant Physiol.* **178**: 101–117.

Author contributions

All the experimental work except GA quantification and figure S6 was performed by L.C., L.S.K, J.M.D and P.A. GA quantifications were performed by B.G., E.C., J.K., D.H., S.T., P.H. and A.L.P. Experimental work shown in figure S6 was performed by B.G., S.T., P.H. and A.L.P.

L.C., P.A., J.M.D, B.G., S.T., P.H. and A.L.P. designed the experiments; P.A., L.C., J.M.D and L.S.K. wrote the paper.

Additional information

Figure S1. Nitrate promotes shoot branching and seed yield in *Arabidopsis*

Figure S2. Nitrate enhances DELLA protein degradation in seedling roots

Figure S3. *nrt2.1-2* double mutant displays a reduction in shoot biomass

Figure S4. Effect of nitrate on GA metabolism and signaling gene expression

Figure S5. Effect of nitrate on *GAI3ox* gene expression in wheat

Figure S6. Effect of nitrogen withdrawal on internode elongation and GA contents in wheat

Table S1. Letcombe modified solution for wheat

Table S2. List of primers used in the study

Competing interests

The authors declare no competing financial interests.

Figures

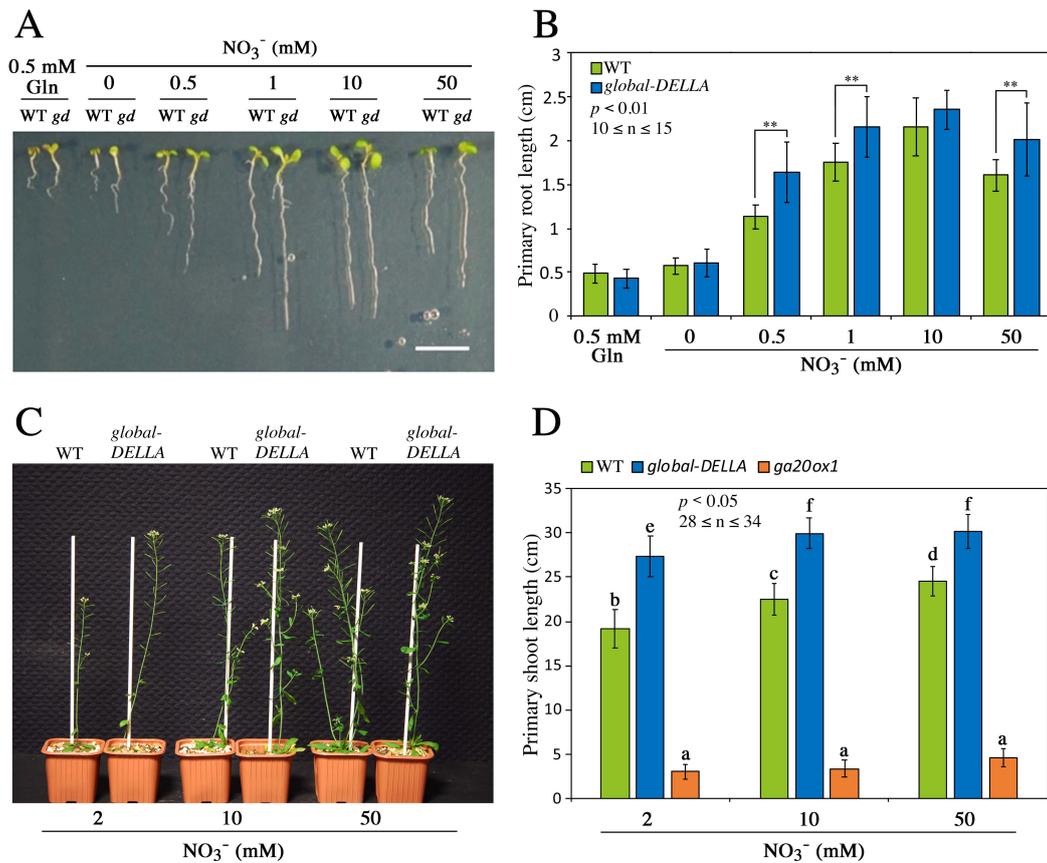


Figure 1. Nitrate regulates plant growth in a DELLA-dependent manner. **A**, Representative 7-day-old wild-type (*Ler*) and *global DELLA* mutant (*gd*) seedlings grown on media containing increasing concentration of nitrate (NO₃⁻), as indicated. Gln, glutamine. Scale bar represents 1 cm. **B**, Root length (mean ± s.d.) of 7-day-old wild-type (*Ler*; green) and *global DELLA* mutant (blue) seedlings grown on increasing concentration of nitrate, measured between day 2 to 7 post germination. The asterisks indicate significant differences ($p < 0.01$) from the wild-type by Student's *t* test. Gln, glutamine. **C**, Representative 7-week-old wild-type (*Ler*) and *global DELLA* mutant plants grown on perlite vermiculite soil supplemented once a week with a nutritive solution containing 2, 10 or 50 mM NO₃⁻. **D**, Height (mean ± s.d.) of 7-week-old wild-type (*Ler*; green), *global DELLA* (blue) and *ga20ox1* (orange) mutant plants grown on different nitrate conditions, such as in **C**. Different letters denote significant differences ($p < 0.05$) using one-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons.

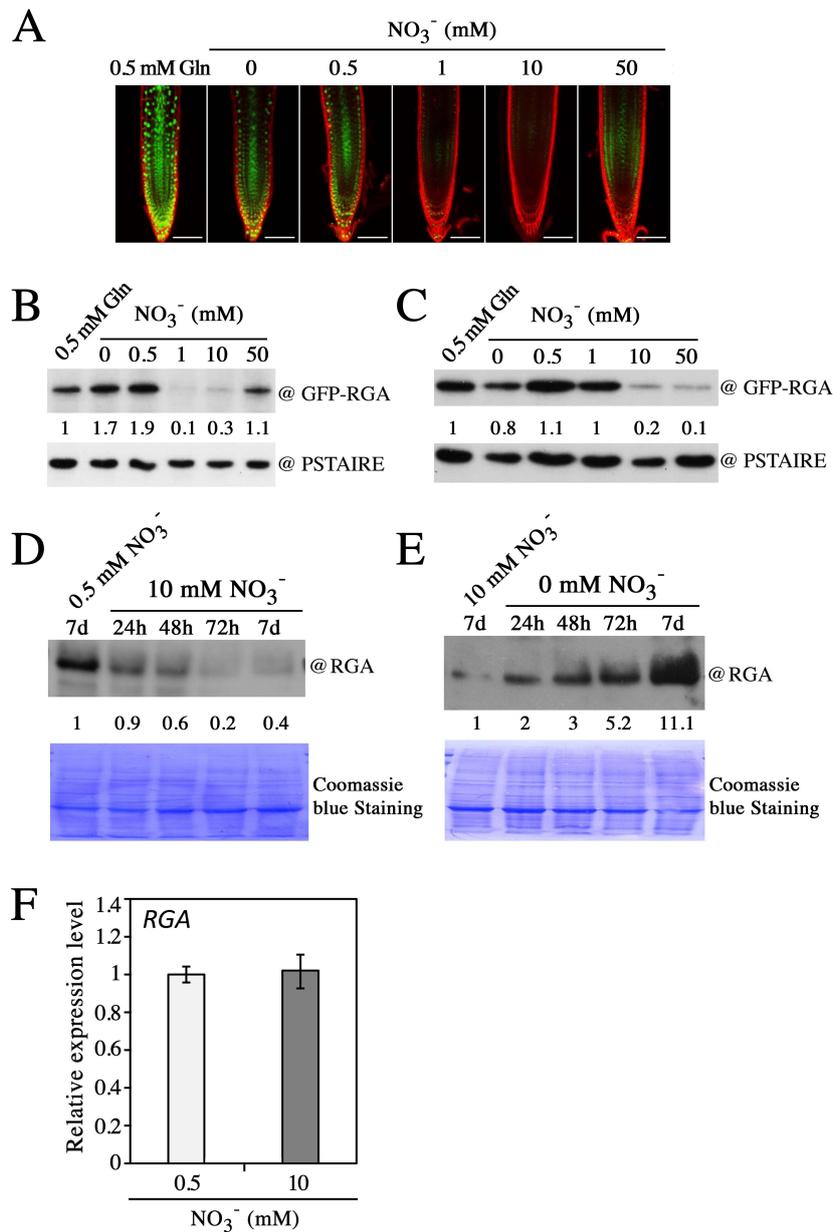


Figure 2. NO₃⁻-regulated growth processes are associated with DELLA accumulation. A, GFP fluorescence in nuclear cells of the root meristem of 7-day-old *pRGA:GFP-RGA* seedlings grown on media containing increasing concentration of nitrate (NO₃⁻), as indicated. Cell walls were stained with propidium iodide (red). All images were obtained with the same modifications and intensity parameters. Gln, glutamine. Scale bars represent 100 μm. **B-C**, Immunodetection of GFP-RGA (with an antibody to GFP) in roots (**B**) and shoots (**C**) of 7-day-old *pRGA:GFP-RGA* seedlings grown on media containing increasing concentration of NO₃⁻, such as in **A**. PSTAIRE serves as sample loading control. Numbers represent the fold increase in GFP-RGA protein levels relative to PSTAIRE levels. Similar results were obtained in two independent experiments. **D-E**, Immunodetection of RGA (with an antibody to RGA) in shoots of 7-day-old wild-type (Ler) seedlings transferred from 0.5 mM to 10 mM NO₃⁻ (**D**), or transferred from 10 mM NO₃⁻ to nitrogen (N)-deficient conditions (**E**) for the time indicated (1d, 2d, 3 days). Coomassie blue-stained protein signal is used as loading control. Numbers represent the fold increase in RGA protein levels relative to blue-stained protein signal. Similar results were obtained in two independent experiments. **F**, Expression of *RGA* in shoots of 7-day-old wild-type (Ler) seedlings grown on 0.5 mM or 10 mM NO₃⁻. Values are means (± s.d.) of one biological replicate. Similar results were obtained in three independent experiments.

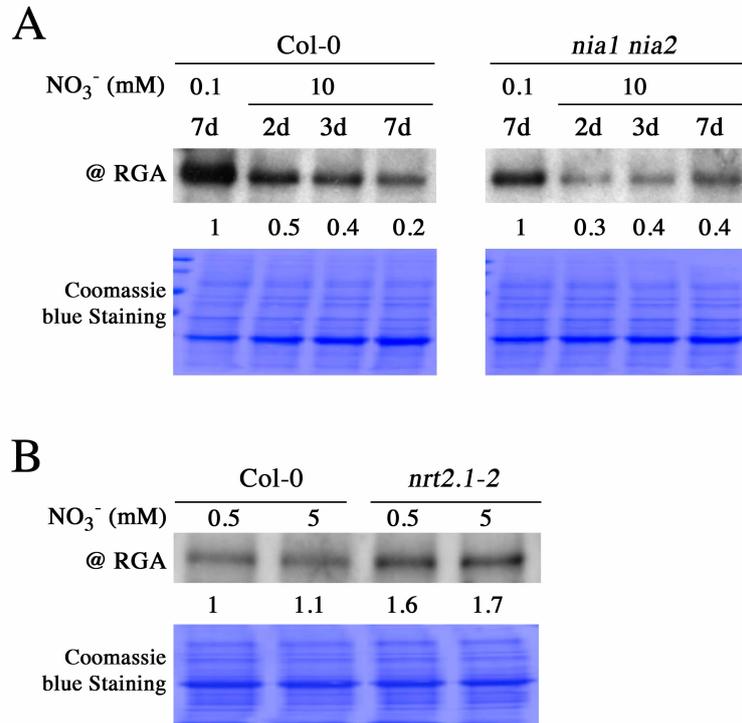


Figure 3. DELLA accumulation is regulated by NO₃⁻-dependent signaling pathway. A, Immunodetection of RGA in shoots of 7-day-old wild-type (Col-0) and *nia1 nia2* mutant seedlings transferred from 0.1 mM to 10 mM NO₃⁻ as indicated. **B,** Immunodetection of RGA in 4-week-old wild-type (Col-0) and *nrt2.1-2* mutant plants grown on 0.5 mM or 10 mM NO₃⁻. Coomassie blue-stained protein signal is used as loading control. Numbers represent the fold increase in RGA protein levels relative to blue-stained protein signal. Similar results were obtained in two independent experiments.

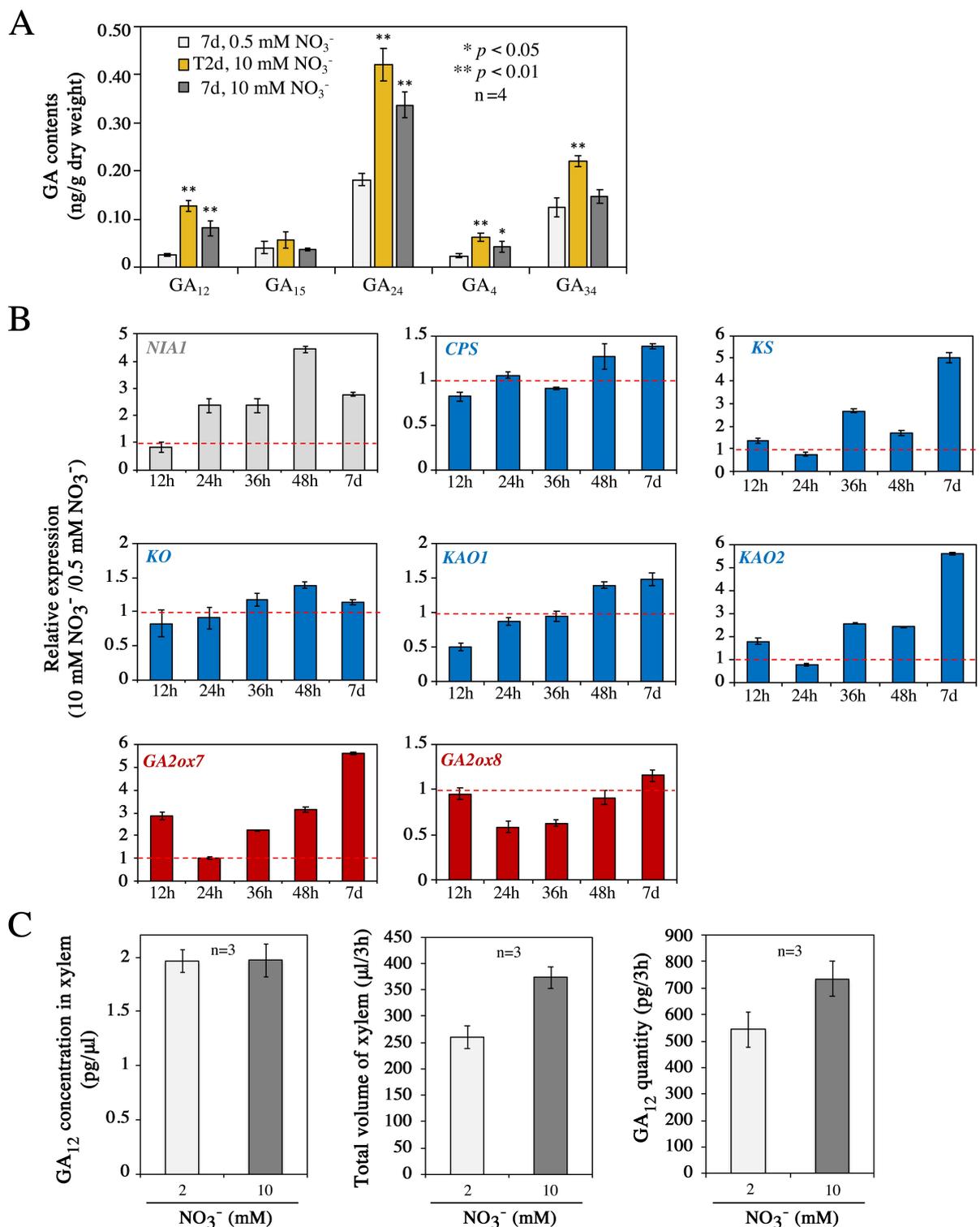


Figure 4. Nitrate promotes GA synthesis and transport. **A**, Concentration of GA (ng g⁻¹ dry weight) in 7-day-old wild-type (Ler) seedlings grown on 0.5 mM NO₃⁻ (white), 10 mM NO₃⁻ (grey), or two days after a transfer from 0.5 mM to 10 mM NO₃⁻ (yellow). The values are means ± s.d. of four biological replicates. Asterisks indicate significant differences (**p* < 0.05; ***p* < 0.01) for 10 mM *versus* 0.5 mM NO₃⁻ growth conditions by Student's *t* test. **B**, Expression levels of the GA biosynthesis genes (*CPS*, *KS*, *KO*, *KAO1* and *KAO2*; in blue) and GA catabolism genes (*GA2ox7* and *GA2ox8*; in red), and *NIA1* (in grey; used as a positive control of nitrate treatment) in shoots of 7-day-old wild-type (Ler) seedlings transferred from 0.5 mM NO₃⁻ to 10 mM NO₃⁻ as indicated. Values (means ± s.d. of one biological replicate) are ratio of 10 mM NO₃⁻ *versus* 0.5 mM NO₃⁻ conditions. Similar results were obtained in three independent experiments. **C**, GA₁₂ concentration (pg μl⁻¹) in xylem exudates, volume (μl) of xylem harvested in 3 hours of exudation, and amount of GA₁₂ (pg) found in xylem sap collected for 3 hours, in 6-week-old wild-type (Ler) plants grown on perlite vermiculite soil supplemented once a week with a nutritive solution containing 2 or 10 mM NO₃⁻. Values are means (± s.d.) of three biological replicates.

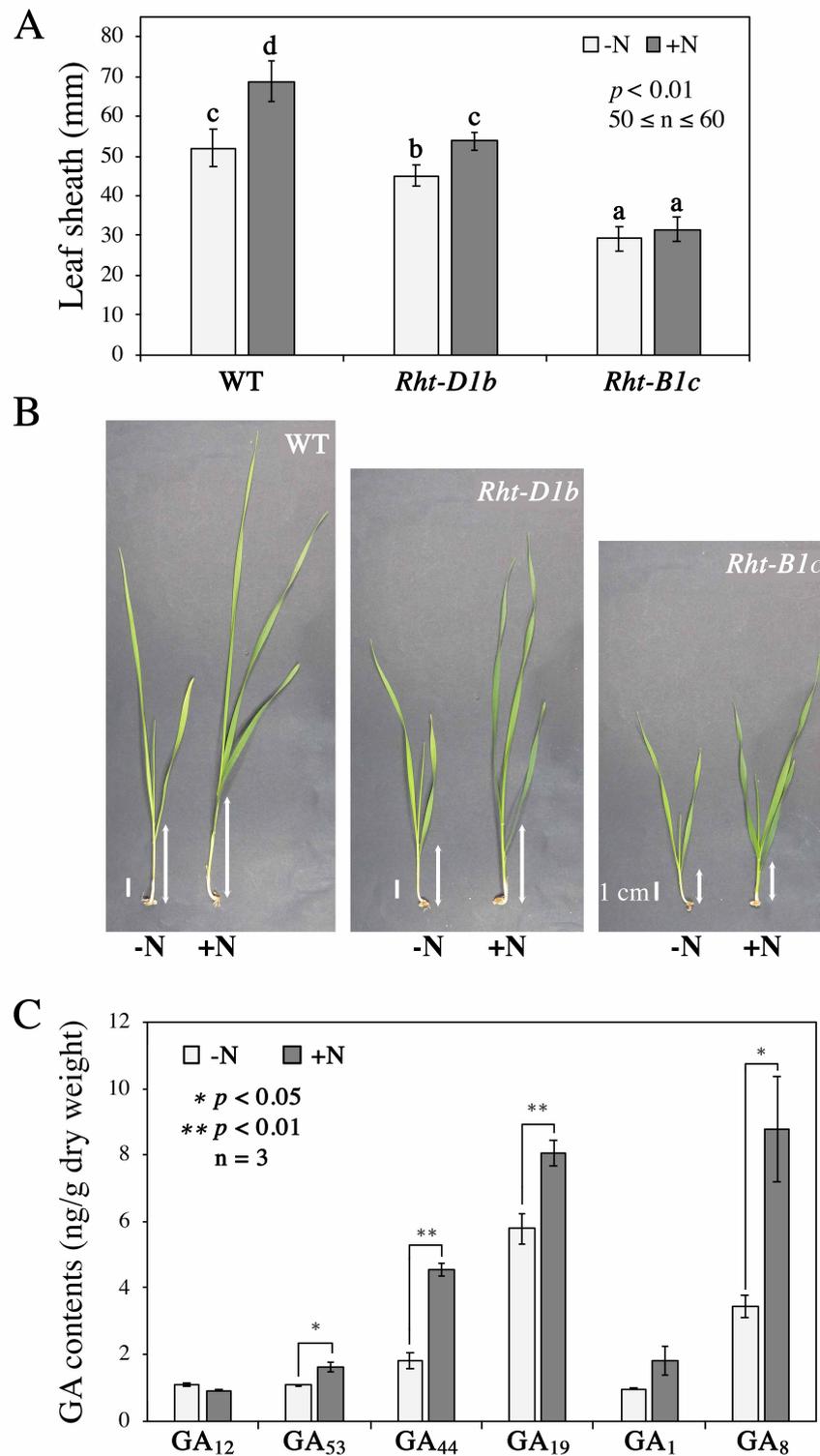


Figure 5. Effects of nitrate on GA metabolism and growth in wheat. **A**, Leaf sheath length (mean \pm s.d.) of 3-week-old wild-type (*Rht-1* tall), *Rht-D1b* and *Rht-B1c* mutant wheat (cv. Cadenza) grown on perlite vermiculite soil supplemented 3 times per week with a nutritive solution without nitrogen (-N; in white) or containing NO_3^- (+N; in grey). Different letters denote significant differences ($p < 0.05$) using one-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons. **B**, Representative 3-week-old wild-type (*Rht-1* tall), *Rht-D1b* and *Rht-B1c* mutant wheat grown as in **A**. The arrows indicate the length of first leaf sheath. Scale bars represent 1 cm. **C**, Concentration of GA (ng g⁻¹ dry weight) in the first internode of 3-week-old wild-type (*Rht-1* tall) wheat grown as in **A**. The values are means \pm s.d. of three biological replicates. Asterisks indicate significant differences (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) for +N versus -N by Student's *t* test.

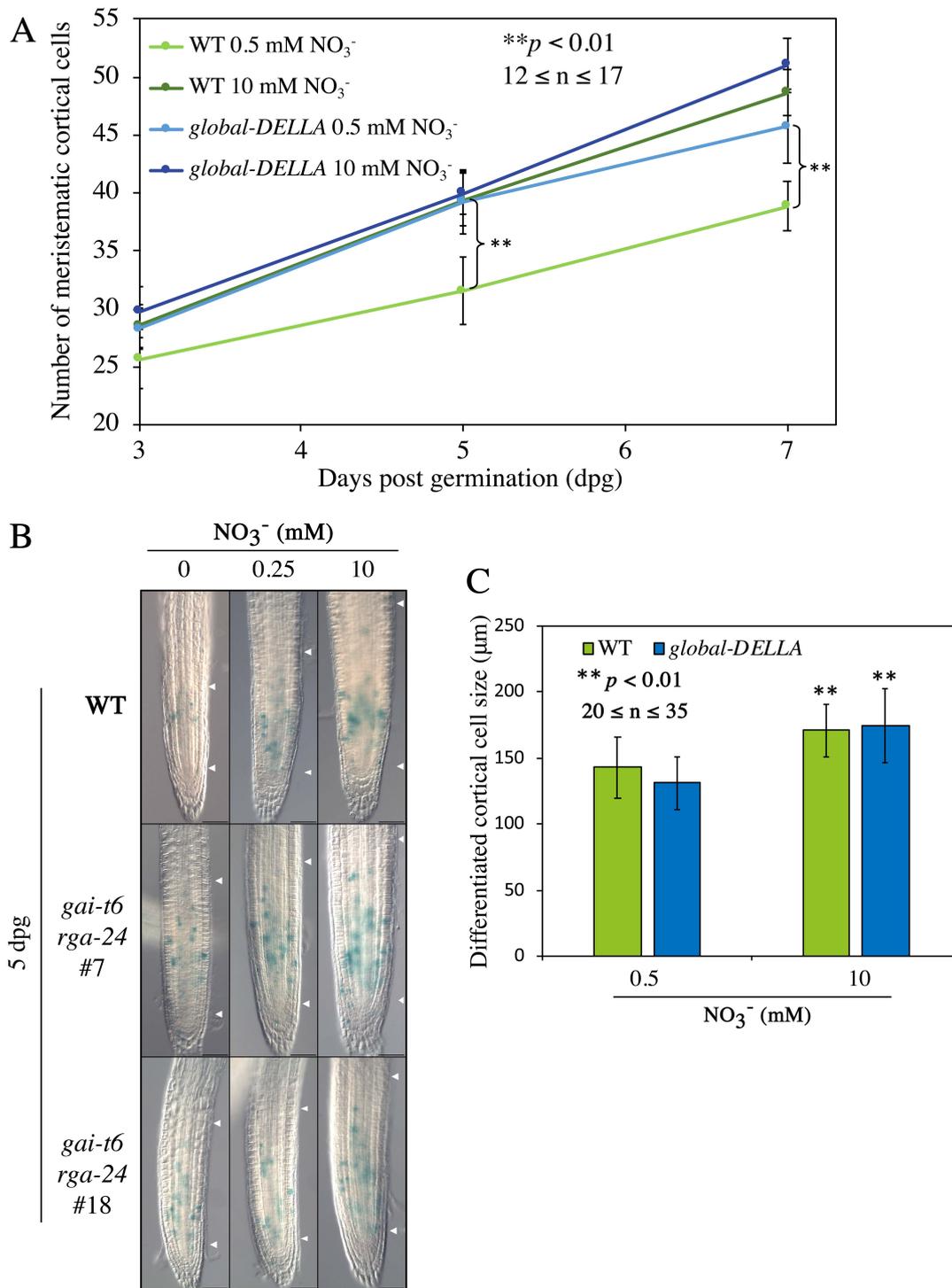


Figure 6. Nitrate promotes cell division in a DELLA-dependent manner. **A**, Root meristem cell number (mean \pm s.d.) of wild-type (Ler; in green) and *global DELLA* mutant (in blue) seedlings at 3, 5 and 7 days post germination (dpg), grown on 0.5 mM or 10 mM NO₃⁻ by Student's t test. The number of meristematic cells was determined in the cortex file between the quiescent center and the first differentiated cells. Asterisks indicate significant difference (** $p < 0.01$) for 10 mM NO₃⁻ versus 0.5 mM NO₃⁻ by Student's t test. **B**, Effect of NO₃⁻ treatment on Dbox CYCB1;2-GUS cell-division marker in wild-type (Col-0) and *gai-t6 rga-24* mutant (lines #7 and #18) roots. Photographs show representative 5-day-old root seedlings grown without nitrate (0 N) or with 0.25 mM or 10 mM NO₃⁻. White dots indicate the distance between the first and last dividing cells in the longitudinal axis of the root meristem as shown by β -glucuronidase staining. Scale bars represent 100 μ m. **C**, Length (mean \pm s.d.) of differentiated cortical cells of 7-day-old wild-type (Ler; in green) and *global DELLA* mutant (in blue) seedlings grown 0.5 mM or 10 mM NO₃⁻. Asterisks indicate significant difference (** $p < 0.01$) for 10 mM NO₃⁻ versus 0.5 mM NO₃⁻ by Student's t test.

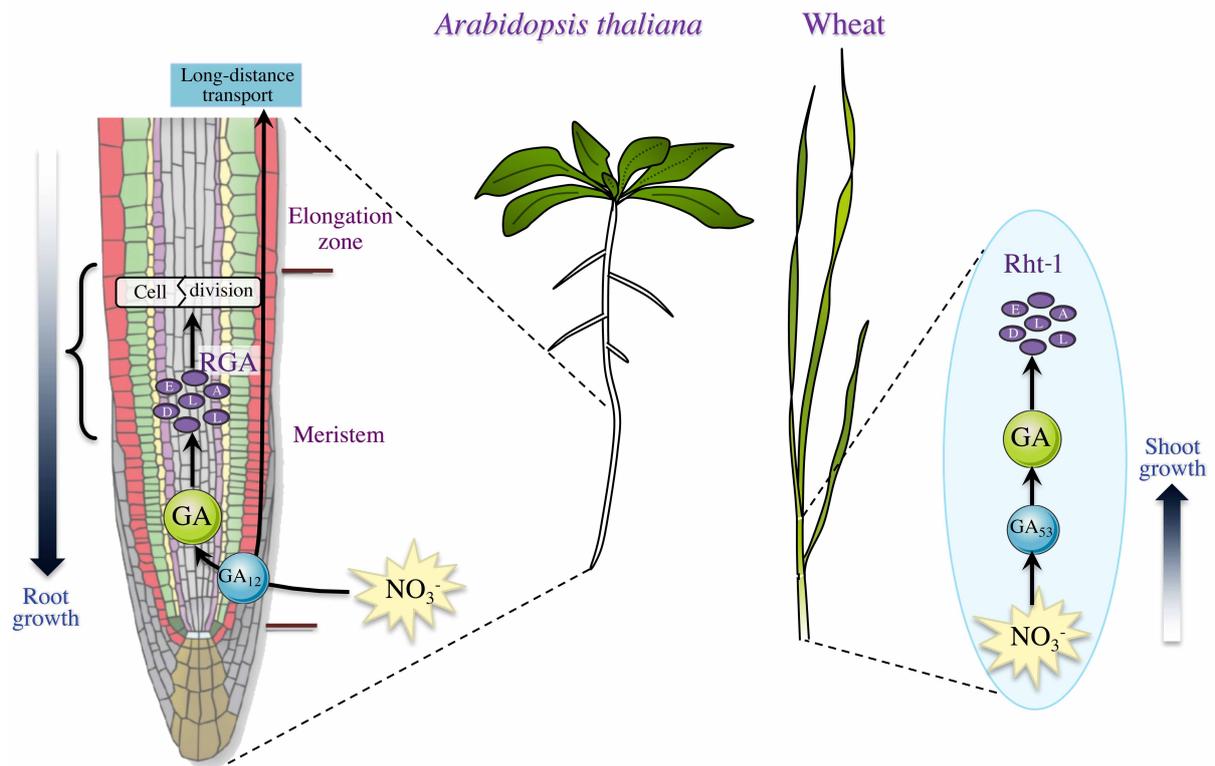


Figure 7. Nitrate-regulated growth processes are gibberellin-dependent. Nitrate through its signaling pathway activates the early steps in the GA biosynthetic pathway producing GA₁₂ in *Arabidopsis* and GA₅₃ in wheat, which after metabolic conversion into bioactive GA enhance plant growth. In *Arabidopsis*, root-derived GA₁₂ can move to the shoot, and combined with shoot-synthesized GA₁₂, enhance plant height. Increased bioactive GA contents activate in turn DELLA protein degradation, thereby increasing cell proliferation.

Supplementary information

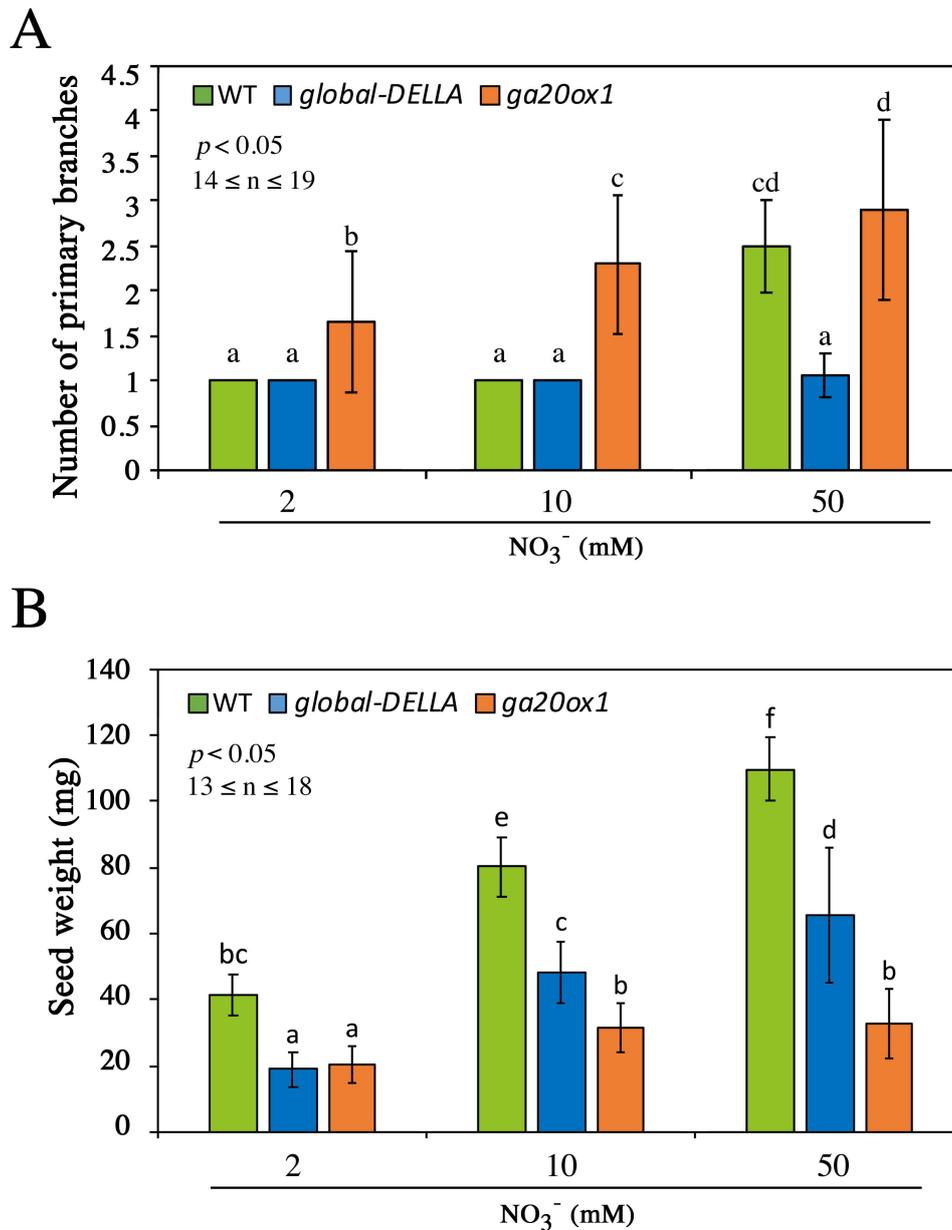


Figure S1. Nitrate promotes shoot branching and seed yield in *Arabidopsis*. **A**, Nitrate regulates shoot branching in a DELLA-dependent manner. Number of primary branches (mean \pm s.d.) of 8-week-old wild-type (Ler; green), *global DELLA* (blue) and *ga20ox1* (orange) mutant plants grown on 2, 10 or 50 mM NO_3^- . **B**, Nitrate regulates seed yield in a DELLA-independent manner. Seed weight per plant (mean \pm s.d.) produced by wild-type (Ler; green), *global DELLA* (blue) and *ga20ox1* (orange) mutant plants grown on 2, 10 or 50 mM NO_3^- . Different letters denote significant differences ($p < 0.05$) using one-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons.

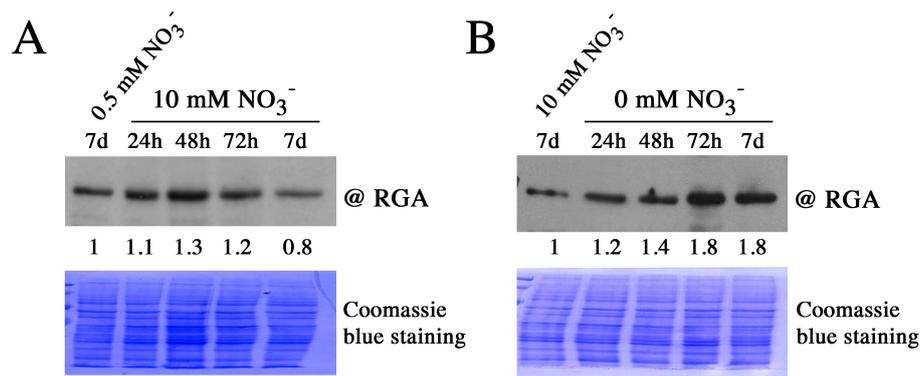


Figure S2. Nitrate enhances DELLA protein degradation in seedling roots. A-B, Immunodetection of RGA in roots of 7-day-old wild-type (Ler) seedlings transferred from 0.5 mM to 10 mM NO₃⁻ (**A**), or transferred from 10 mM NO₃⁻ to nitrogen (N)-deficiency conditions (**B**) for the time indicated. Coomassie blue-stained protein signal is used as loading control. Numbers represent the fold increase in RGA protein levels relative to blue-stained protein signal. Similar results were obtained in two independent experiments.

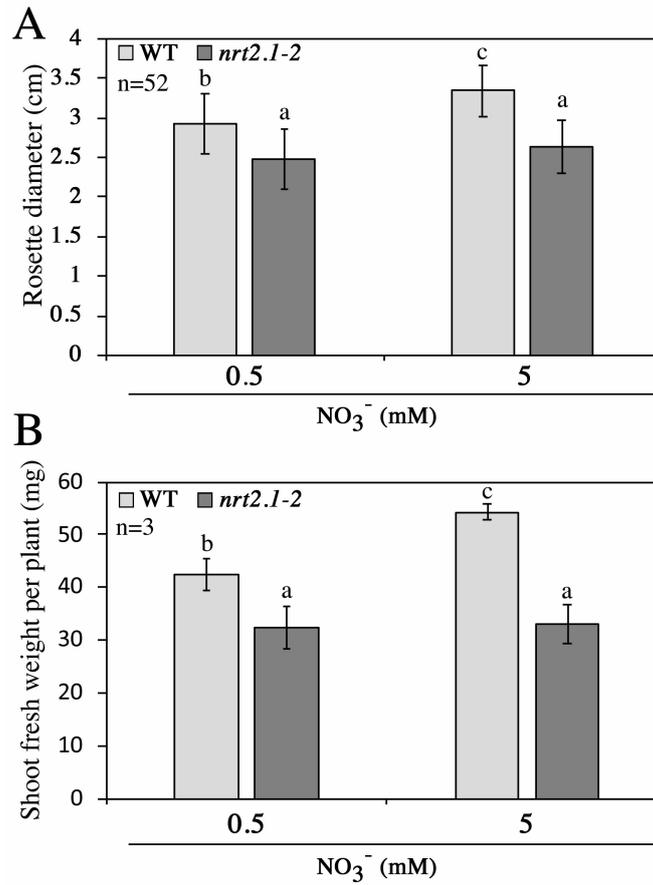


Figure S3. *nrt2.1-2* double mutant displays a reduction in shoot biomass. A-B, Rosette diameter (means \pm s.d. of at least 52 plants) (**A**) and shoot fresh weight (means \pm s.d. of three biological replicates; each replicate containing at least 14 plants) (**B**) of 4-week-old wild-type (Col-0) and *nrt2.1-2* mutant grown on 0.5 mM or 5 mM NO₃⁻. Different letters denote significant differences ($p < 0.05$) using one-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons.

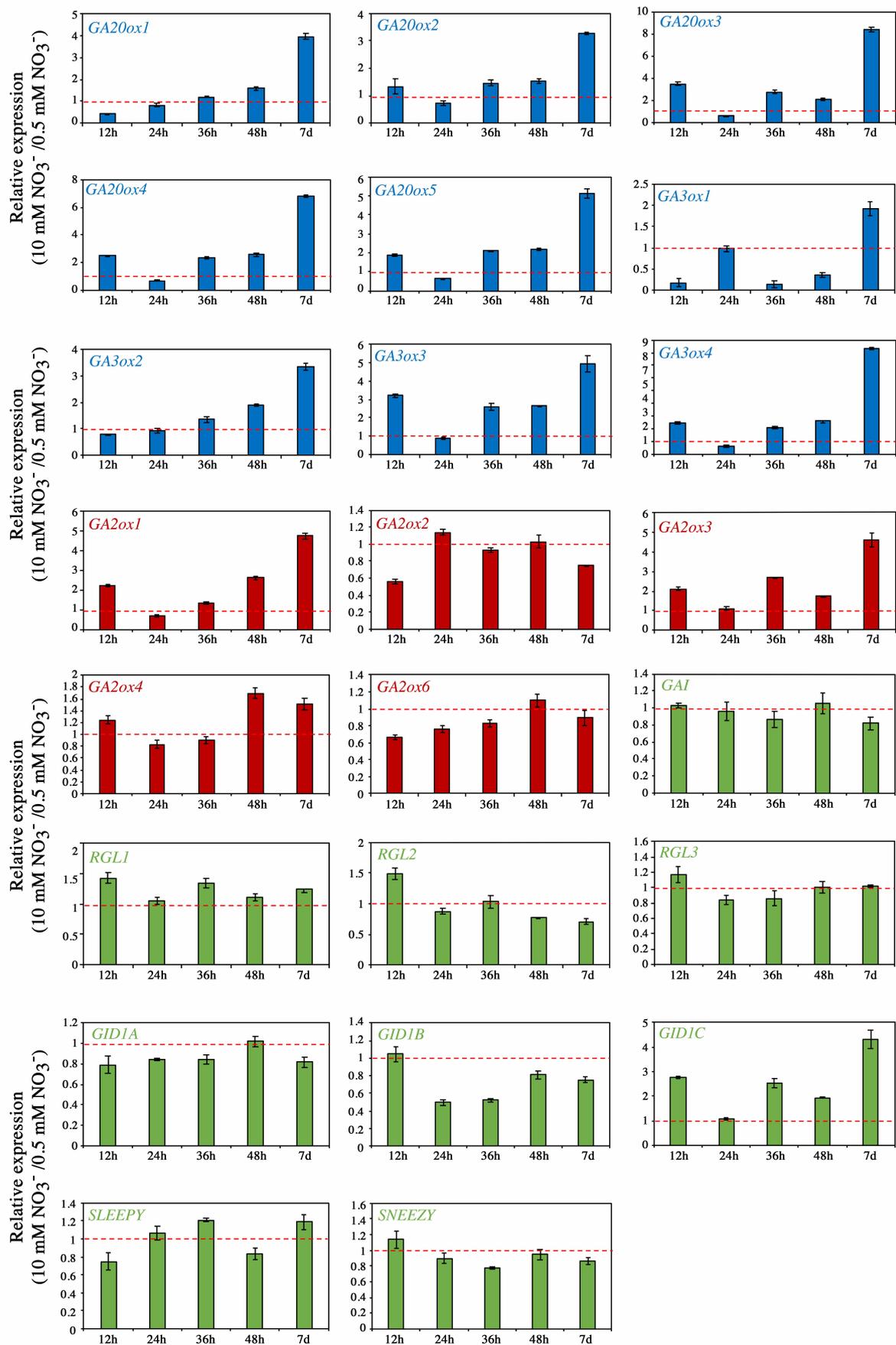


Figure S4. Effect of nitrate on GA metabolism and signaling gene expression. Expression levels of selected GA metabolism and signaling genes in shoots of 7-day-old wild-type (Ler) seedlings transferred from 0.5 mM NO₃⁻ to 10 mM NO₃⁻ as indicated. Values (means ± s.d. of one biological replicate) are ratio of 10 mM NO₃⁻ versus 0.5 mM NO₃⁻ conditions. Similar results were obtained in three independent experiments.

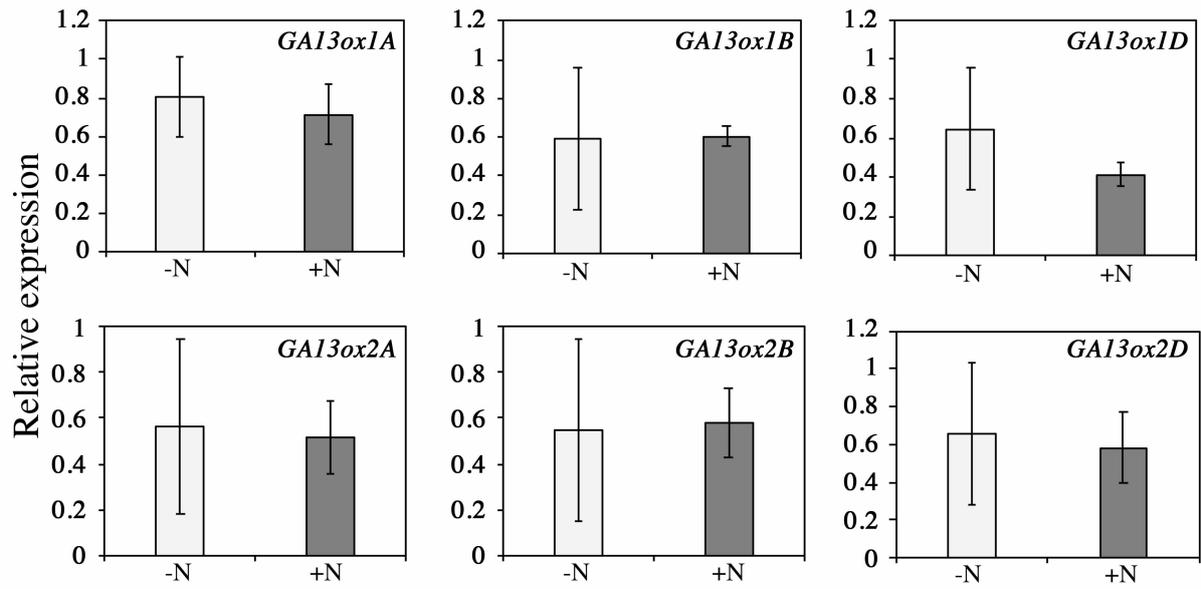


Figure S5. Effect of nitrate on *GA13ox* gene expression in wheat. Expression levels of *GA13ox1* and *GA13ox2* (in A, B and D genomes) in 3-week-old wild-type (*Rht-1* tall) wheat (c.v. Cadenza) grown on perlite vermiculite soil supplemented 3 times per week with a nutritive solution without nitrogen (-N; in white) or containing NO_3^- (+N; in grey). Values are means \pm s.d. of three biological replicates.

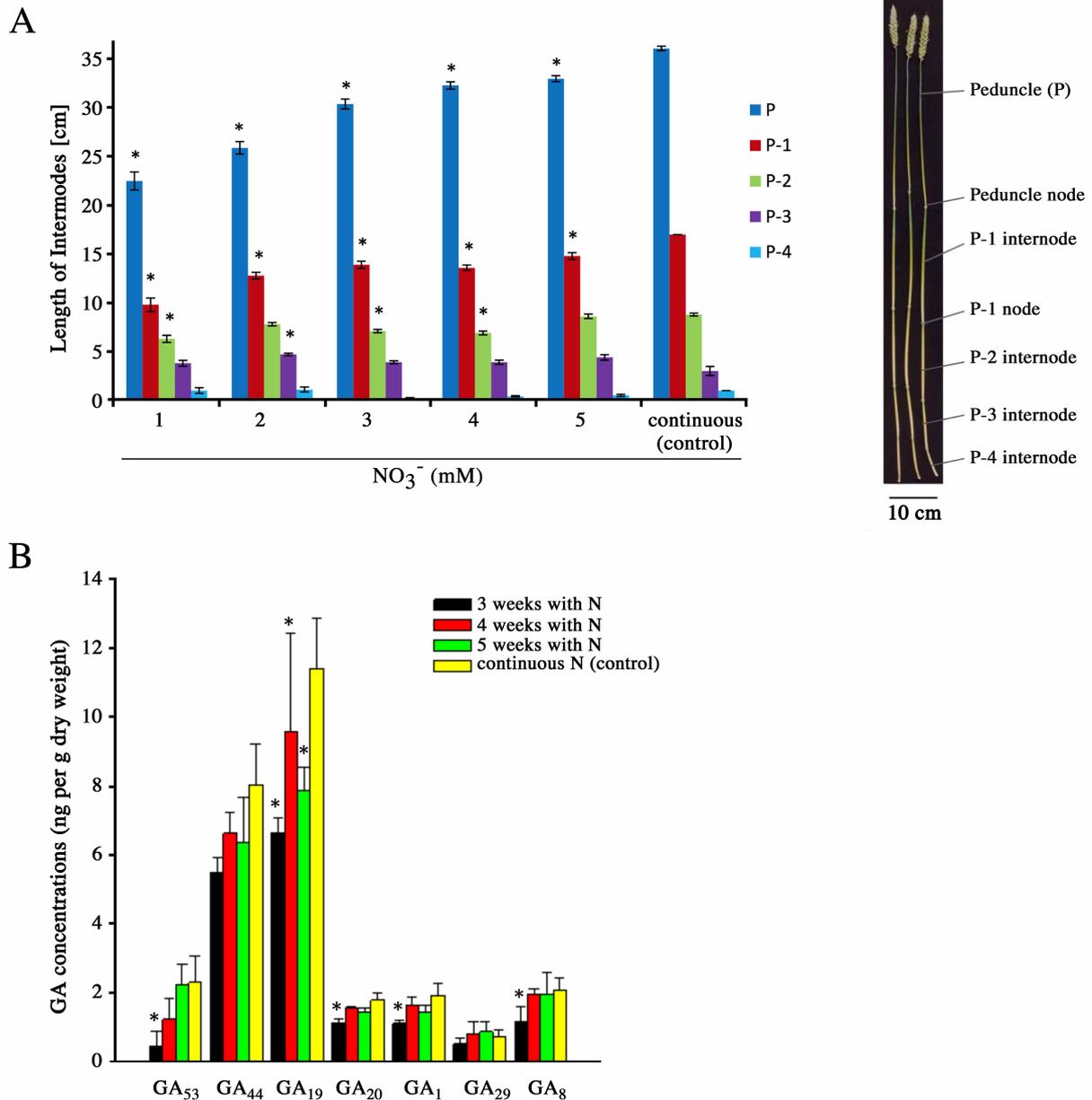


Figure S6. Effect of nitrogen withdrawal on internode elongation and GA contents in wheat. A, Internode length (mean \pm s.e.; $n=15$) of 7-week-old wild-type (*Rht-1* tall) wheat (cv. Cadenza) growing on different nitrogen (N) status. Plants were grown on sand perlite soil supplemented three times the first week with a nutritive solution containing NO₃⁻ (+N). The plants were then divided into six treatment groups for which N was sequentially withdrawn week after week, as indicated. Asterisks indicate significant difference ($p < 0.05$) for comparisons within internodes for treatments 1-5 weeks with N compared to control, according to two-way ANOVA followed by least significant difference (LSD) test. On the right side, the sections of elongated stem at anthesis are represented. P, peduncle (first internode); P1, second internode; P2, third internode; P3, further internode. **B,** Concentration of GA (ng g⁻¹ dry weight) in peduncle and peduncle nodes of 7-week-old wild-type wheat grown on different N status, such as in A. Asterisks indicate significant difference ($p < 0.05$) for comparisons within treatments (1-5 weeks with N compared to control) for each GA, according to residual maximum likelihood (REML) followed by LSD test.

Table S1. Letcombe modified solution for wheat.

Letcombe micronutrients 1000x	1x Letcombe modified solution +N	1x Letcombe modified solution -N
160 μ M CuSO ₄ . 5 H ₂ O	1.5 mM Ca(NO ₃) ₂ . 4 H ₂ O	1.5 mM CaCl ₂
160 μ M CuCl ₂ . 2 H ₂ O	5 mM KNO ₃	5 mM KCl
9.2 mM H ₃ BO ₃	2 mM NaNO ₃	2 mM NaCl
3.6 mM MnCl ₂ . 4 H ₂ O	1mM MgSO ₄ . 7 H ₂ O	1mM MgSO ₄ . 7 H ₂ O
16 μ M Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	1 mM KH ₂ PO ₄	1 mM KH ₂ PO ₄
5 mM KCl	25 μ M FeNaEDTA	25 μ M FeNaEDTA
770 μ M ZnCl ₂	1 mL/L of Letcombe micronutrients 1000x	1 mL/L of Letcombe micronutrients 1000x

Table S2. List of primers used in the study.

Primers used for RT-qPCR in *Arabidopsis*:

<i>NIA1-F</i>	AAGCCGTACACATTA AAAAGGCTA
<i>NIA1-R</i>	TCACCTCAACCCTCGTTACC
<i>CPS-F</i>	TCCATTCCAAGTACAACCTTTCT
<i>CPS-R</i>	TCTCTAGCGACATTGAGAGGAGA
<i>KS-F</i>	GAAAAAGAGATCTGGATCTTAAATGTG
<i>KS-R</i>	TTGTCCCCTCTAAAACATAGGC
<i>KO-F</i>	AAATCGGAGGCTATCATGTCC
<i>KO-R</i>	GCTTCTTATCCATGTTGCATCC
<i>KAO1-F</i>	CTTATCGCAGGTTGTCGATG
<i>KAO1-R</i>	TTCCAACCTTTTGGGATCAA
<i>KAO2-F</i>	CTAGAGGATAACAAGAGGTGGTC
<i>KAO2-R</i>	CCGTCATAGCTTCAGTCG
<i>GA20ox1-F</i>	CATGGGTTTCAGCCATTG
<i>GA20ox1-R</i>	CTCTAAAGTAGTCCCGTTTTACGC
<i>GA20ox2-F</i>	CGATCTCTCAAGCCAAGACTCG
<i>GA20ox2-R</i>	TCGCTGACGCCATGATTG
<i>GA20ox3-F</i>	ATGGCTCTAACGAATGGAAG
<i>GA20ox3-R</i>	CTTTCTCTCTCGCTGTTTAC
<i>GA20ox4-F</i>	ACGGATACAAAGATTTCTGGG
<i>GA20ox4-R</i>	TCTTTAGAGAGAGATTGCTCATGG
<i>GA20ox5-F</i>	TCAAGAGATCGGTCAAGTGT
<i>GA20ox5-R</i>	AGCTCCATCAAATCCATAACCA
<i>GA3ox1-F</i>	GTCTAGCAGCTCATAACCGAC
<i>GA3ox1-R</i>	CTTCTCTGTGATTTCTAATC
<i>GA3ox2-F</i>	GCCACCACCTCAAATACTGTG
<i>GA3ox2-R</i>	GGCCCATTGTATGTCCTTTTC
<i>GA3ox3-F</i>	TCTGCAGTTGAACTCCTACCC
<i>GA3ox3-R</i>	TGTGAGGGGCTAAACCCATA
<i>GA3ox4-F</i>	TCACACCAAGTACTGCGG

<i>GA3ox4-R</i>	AGCCTAATATGCAATACAGAAGTC
<i>GA2ox1-F</i>	ACGTTGGTGACTCTCTCC
<i>GA2ox1-R</i>	CGATTCTCTGAGTCAATGAAGG
<i>GA2ox2-F</i>	AGGTCGTAAACCACGGAGTC
<i>GA2ox2-R</i>	CAAGCCGAAGAAGCCAATAG
<i>GA2ox3-F</i>	CCAAAAGAGTAGACCATGGTAATTG
<i>GA2ox3-R</i>	CATTTTGGATTAACATAGAGGTTGC
<i>GA2ox4-F</i>	TAGGAGACTTGTTACAGGTGATG
<i>GA2ox4-R</i>	GTAGGTCAATGCTCTATGCCTT
<i>GA2ox6-F</i>	TCATGATGATCCTTTCAAGTTCAG
<i>GA2ox6-R</i>	CCAAATCTCTAACCGTGCGTA
<i>GA2ox7-F</i>	ATCGCAACAACCTCAGAAC
<i>GA2ox7-R</i>	TTTGTGCCACTCGAGCTATC
<i>GA2ox8-F</i>	AACACCGTGTGATGACGAAC
<i>GA2ox8-R</i>	GCGTCGTATGATGGACACA
<i>GAI-F</i>	CACCTCGGCTTGAAACTCTCTC
<i>GAI-R</i>	TGACAAAGGGAAAAACAGTAGGATTT
<i>RGAF-F</i>	AATAGTGGCCAAGGTTATCGTG
<i>RGAF-R</i>	AGTGTGCCAACCCAACATG
<i>RGL1-F</i>	CAAGCATGTTGTTGGCACTT
<i>RGL1-R</i>	GCAACAAACAACCTTCATTCTCT
<i>RGL2-F</i>	CTGCGTTTCAAAGGAAGAG
<i>RGL2-R</i>	GTCGGATCCTCTTGCTGCTA
<i>RGL3-F</i>	CGTCGAATTTACCGGATTCA
<i>RGL3-R</i>	AATCTCTTCGAAGGAAGGATCA
<i>GID1A-F</i>	GCTGCGAGCGATGAAGTTA
<i>GID1A-R</i>	AGTGTCGGTTAAAGGTTCCATC
<i>GID1B-F</i>	TTTGCTGGGTTTTGGAGACT
<i>GID1B-R</i>	AGGACCCATGTGTTGAGTGG
<i>GID1C-F</i>	GAACGGCGTTTAACTACTACCG
<i>GID1C-R</i>	TTTGGACGGTTCACAAACG
<i>SLEEPY-F</i>	CAAAACGGCACAAGACGAG
<i>SLEEPY-R</i>	GCAGCCGATGTTAGTCCAGT
<i>SNEEZY -F</i>	CCTGGCACGACTCCCTAAG
<i>SNEEZY -R</i>	CACAGTAAAGTGACAGAGAGAGCTG
<i>SAND-F</i>	AACTCTTATGCAGCATTGATCCACT
<i>SAND-R</i>	TGATTGCATATCTTTATCGCCATC
<i>AT4G26410-F</i>	GAGCTGAAGTGGCTTCAATGAC
<i>AT4G26410-R</i>	GGTCCGACATACCCATGATCC

Primers used for RT-qPCR in wheat:

<i>Actin-F</i>	ACCTTCAGTTGCCAGCAAT
<i>Actin-R</i>	CAGAGTCGAGCACAATACCAGTTG

GAI3ox1A-F TCATCTATATATAACCAAACCAAACCA
GAI3ox1A-R GTTTGCGCAGAATCTACCATC
GAI3ox1B-F GAGTCTTCTCATTAATTTGGACCAC
GAI3ox1B-R ATGCAGTGCAGGAGTACTTATTGT
GAI3ox1D-F ACACCATCGTACGCAGAGC
GAI3ox1D-R TCGTATAGGGGGTTGGGTTT
GAI3ox2A-F TCGATCTCTCCATTGATCTCG
GAI3ox2A-R AACGAACAACCGAGCTAATCA
GAI3ox2B-F ATGGCATCCTCAAGTCCAAC
GAI3ox2B-R GAAGAACTCAGGGGCGATG
GAI3ox2D-F CTGATCGACTTCCGTTTCCTA
GAI3ox2D-R GCTTCCCATGAACACACCA

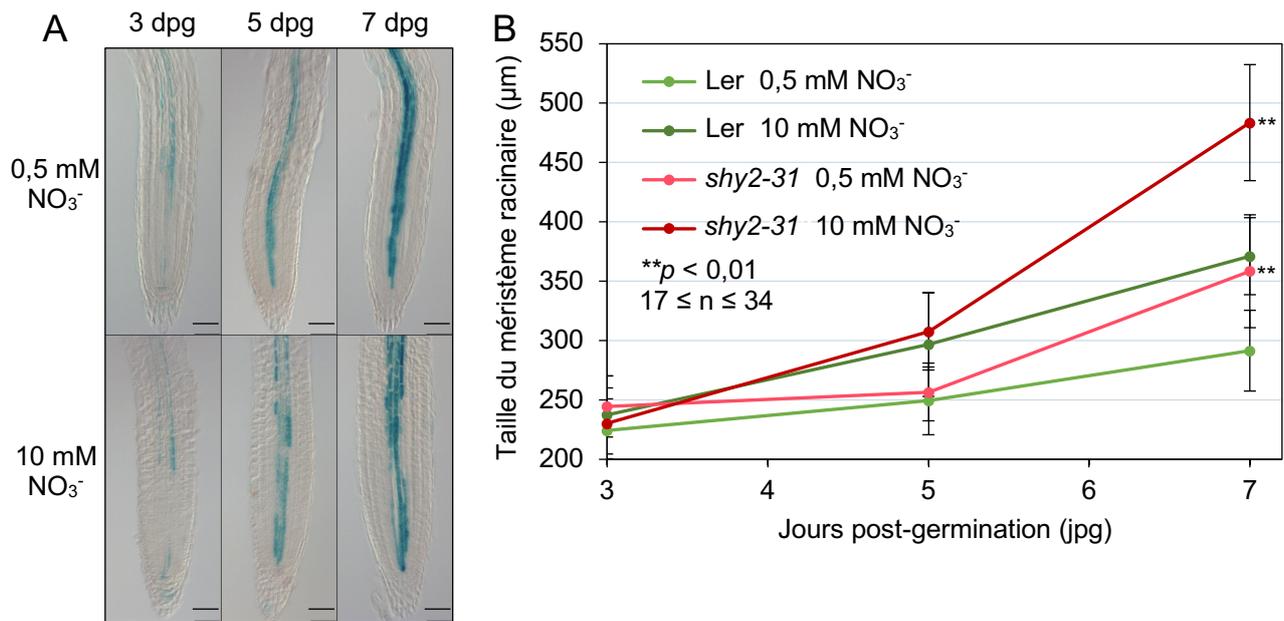


Figure 44. Effet du nitrate sur la différenciation cellulaire.

A. Images représentatives de l'activité GUS dans les méristèmes racinaires de plantules transgéniques *pSHY2:GUS* 3, 5 et 7 jours post-germination, cultivées avec 0,5 ou avec 10 mM NO₃⁻. Des résultats similaires ont été obtenus dans deux expériences indépendantes. Barre d'échelle = 100 µm.

B. Moyennes (± s.d., 17 ≤ *n* ≤ 34) de la longueur des méristèmes racinaires de plantules sauvages (Ler) et mutantes *shy2-31* cultivées pendant 7 jours sur 0,5 ou 10 mM NO₃⁻. Les astérisques indiquent des différences significatives pour le mutant *shy2-31* versus Ler (***p* < 0,01, test t de Student). Les études statistiques ont été réalisées sur deux expériences indépendantes, comprenant entre 17 et 34 racines.

3. Résultats additionnels

3.1. Le nitrate n'altère pas la différenciation cellulaire

La croissance racinaire est déterminée par l'action combinée des effets de la division et de l'expansion cellulaire, qui ont lieu respectivement dans l'apex et la zone d'élongation de la racine. Les résultats présentés dans le manuscrit du chapitre 1 montrent que le nitrate active à la fois la prolifération et l'élongation cellulaire, de manière DELLA-dépendante et indépendante, respectivement.

Suite à la germination de la graine, le méristème racinaire s'accroît dans un premier temps, grâce à l'activité de divisions cellulaires, qui prédomine sur la différenciation cellulaire, définie par les cellules qui sortent du méristème et initient leur élongation. Ce méristème atteint sa taille finale, généralement 5 jours après la germination, lorsque la division et la différenciation cellulaire atteignent un équilibre. Chez *Arabidopsis*, cet équilibre résulte d'une interconnexion entre les voies de signalisation cytokininine (activant l'élongation et la différenciation cellulaire) et auxine (stimulant la prolifération cellulaire) (Figure 28, introduction, paragraphe 2.6). Selon le modèle rapporté par Moubayidin et al., 2010, le facteur de transcription ARR1 régulé par les cytokinines, active le gène *SHORT HYPOCOTYL 2 (SHY2/IAA3)*, qui réprime l'expression des transporteurs d'auxine *PINs*. Ainsi, SHY2 représente le nœud d'intégration de cette interconnexion hormonale (Figure 28). Afin d'analyser l'effet du nitrate sur la différenciation cellulaire, j'ai étudié le niveau d'expression de *SHY2*, grâce à une lignée de fusion transcriptionnelle *pSHY2:GUS* (Figure 44A). Les plantules exprimant cette construction ont été cultivées pendant 7 jours sur une concentration faible (0,5 mM NO₃⁻) ou optimale (10 mM NO₃⁻) en nitrate. Les colorations GUS faites sur des plantules âgées de 3, 5 et 7 jours (après germination) montrent une augmentation graduelle de la coloration bleue, indépendamment de la concentration en nitrate (Figure 44A). Ce résultat suggère donc que le nitrate ne régule pas l'expression de *SHY2*. Pour confirmer ce résultat, j'ai également mesuré la taille du méristème de plantules sauvages et mutantes *shy2-31* cultivées pendant 7 jours sur 0,5 mM et 10 mM NO₃⁻ (Figure 44B). Pour ce faire, la taille du méristème racinaire a été mesurée du centre quiescent (QC) à la première cellule qui s'allonge (cellule différenciée, qui sort du méristème racinaire). Les observations montrent que jusqu'à 5 jours, la longueur des méristèmes des deux génotypes augmente avec le nitrate (Figure 44B), comme obtenu précédemment (Figure 6 du manuscrit du chapitre 1). Cependant, entre le 5^{ème} et 7^{ème} jour après germination, le méristème du mutant *shy2-31* s'allonge plus vite que celui des plantules sauvages, et est significativement plus grand à 7 jours, quelle que soit la concentration en nitrate (Figure 44B). En effet, à ce stade, chez le mutant *shy2-31*, les cytokinines ne peuvent exercer leur action sur l'intégrateur SHY2. Ainsi en absence de SHY2, la distribution d'auxine

n'est pas affectée et la division cellulaire demeure toujours active après 5 jours. L'ensemble de ces résultats montre que le nitrate régule principalement la croissance du méristème racinaire en activant la prolifération cellulaire, plutôt que la différenciation cellulaire.

3.2. Rôle de TOR et du NO dans la régulation du métabolisme des GA par le nitrate

Comme décrit dans le manuscrit du chapitre 1, la GA bioactive GA₄ et le précurseur inactif GA₁₂ s'accumulent chez des plantules cultivées en présence de nitrate. Le nitrate représente une molécule signal régulant de nombreux gènes, aussi, nous avons analysé l'expression des gènes des premières étapes de la biosynthèse des GA (*CPS*, *KS*, *KO*, *KAO*) et du catabolisme de la GA₁₂ (*GA2ox7* et *GA2ox8*) dans les jeunes tissus chlorophylliens de plantules sauvages âgées de 7 jours, cultivées pendant différents temps (de 12h à 48h) sur un milieu optimal en nitrate. Les résultats ont montré qu'aucun gène ne semble être significativement régulé en réponse au nitrate et ne peut donc expliquer l'accumulation de la GA₁₂. Donc, le nitrate régulerait la production de GA₁₂ par un mécanisme indépendant de la régulation transcriptionnelle des gènes codant pour les enzymes des premières étapes du métabolisme des GA.

Dans le but d'identifier le mécanisme moléculaire, nous avons étudié le rôle potentiel de la protéine kinase TOR et la molécule NO, deux acteurs de la signalisation nitrate.

TOR est une protéine kinase qui exerce divers rôles comme lors de la réinitiation de la traduction ou la modification post-traductionnelle des protéines, régulant ainsi le niveau d'accumulation des protéines ou leur activité (Shi et al., 2018). Comme évoqué précédemment, TOR aurait un rôle clé dans la perception du statut azoté de la plante, et il a également été montré que son activité régule la signalisation GA (introduction, paragraphe 3.5.3) (Zhang et al., 2018b).

Par ailleurs, le NO (produit lors de l'assimilation du nitrate) induit des modifications post-traductionnelles régulant la localisation, la stabilité ou encore l'activité de protéines. (introduction, paragraphe 3.5.4).

3.2.1. La voie de signalisation TOR régulerait le métabolisme des GA

Du fait que TOR a plusieurs modes d'actions et que chez le mutant *raptor* (partenaire du complexe TOR) les protéines DELLA sont accumulées (Zhang et al., 2018b), j'ai étudié dans un premier temps l'effet de l'activité TOR sur l'accumulation de RGA en fonction du statut azoté. Des plantules sauvages ont été cultivées en présence d'un inhibiteur de l'activité TOR (0,5 µM AZD-8055) sur un milieu pauvre en nitrate (0,1 mM NO₃⁻), puis transférées sur un milieu optimal en nitrate (10 mM NO₃⁻) pendant différents temps (de 1 à 3 jours). L'AZD-8055

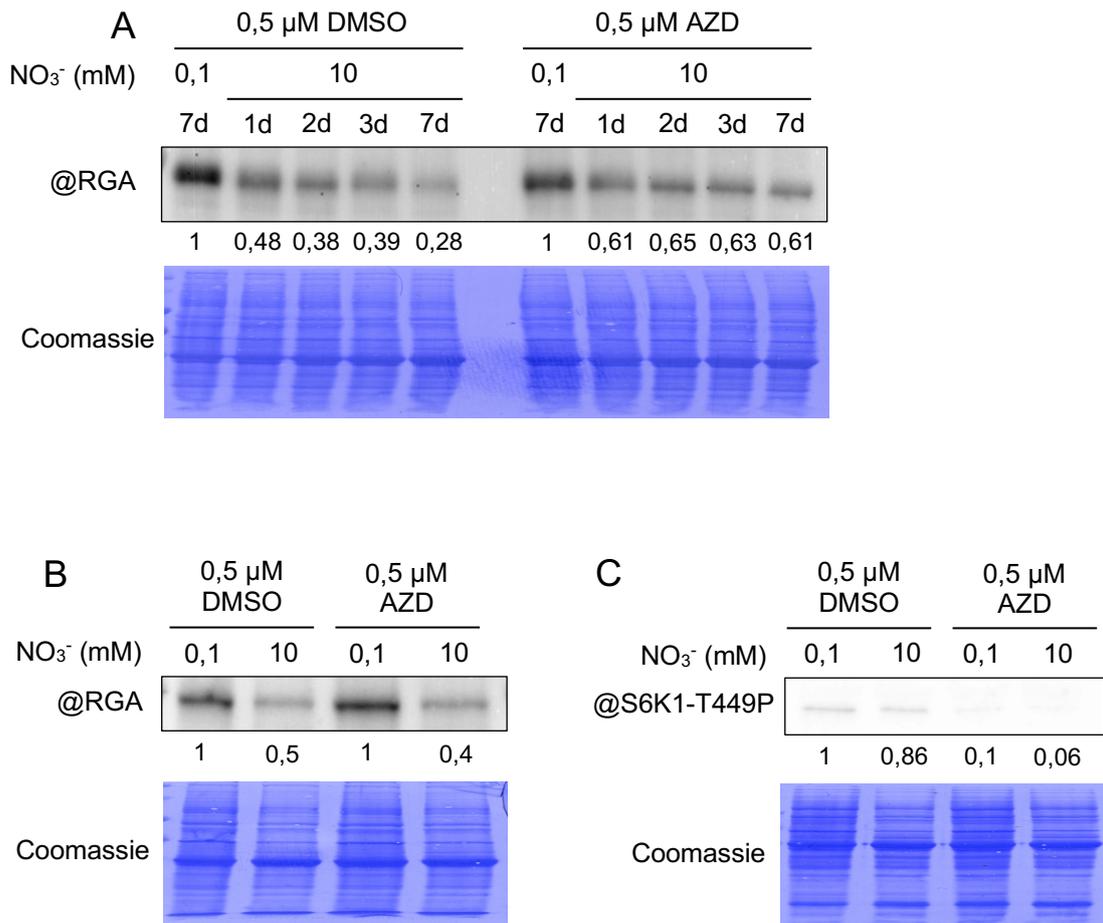


Figure 45. Rôle de l'activité TOR sur l'accumulation de la protéine RGA en réponse à un traitement nitrate.

A. Immuno-détection de la protéine RGA dans les jeunes tissus chlorophylliens de plantules sauvages (Col-0) âgées de 7 jours. Les plantules sont cultivées sur un milieu contenant un inhibiteur de l'activité TOR (0,5 μ M AZD-8055) ou sans (0,5 μ M DMSO) en présence d'une faible concentration en nitrate (0,1 mM NO_3^-) puis transférées sur un milieu optimal en nitrate (10 mM NO_3^-) pendant différents temps (1d, 1 jour ; 2d, 2 jours ; 3d, 3 jours). Des plantules sont cultivées sur un milieu pauvre et optimal en nitrate (7d, 7 jours). Tous les échantillons sont récoltés en même temps. L'intensité des bandes est normalisée avec la quantité en protéines totales colorées au bleu de Coomassie. Des résultats similaires ont été obtenus dans trois expériences indépendantes.

B-C. Immuno-détection de la protéine RGA (**B**) et de la protéine phosphorylée S6K1-T449P (**C**) dans les jeunes tissus chlorophylliens de plantules sauvages (Col-0) de 7 jours. Les plantules sont cultivées avec 0,5 μ M AZD-8055 ou 0,5 μ M DMSO, sur des milieux déficients (0,1 mM NO_3^-) et optimaux en nitrate (10 mM NO_3^-) pendant 7 jours. L'intensité des bandes est normalisée avec la quantité en protéines totales colorées au bleu de Coomassie. L'expérience a été effectuée une seule fois.

est une molécule qui entre en compétition avec l'ATP pour sa fixation au domaine kinase de TOR, inhibant ainsi son activité (Chresta et al., 2010; Montané et Menand, 2013). Les niveaux d'accumulation de RGA dans les jeunes tissus chlorophylliens ont ensuite été analysés par Western blot, à 7 jours (Figure 45A). En accord avec les données du manuscrit du chapitre 1, deux jours après le transfert sur un milieu optimal en nitrate, le niveau d'accumulation de la protéine RGA diminue. Lorsque l'activité TOR est inhibée, l'accumulation de la protéine RGA diminue légèrement et se stabilise après transfert sur un milieu optimal en nitrate (Figure 45A). Ce résultat montre que l'activité de TOR serait en partie nécessaire à la déstabilisation de RGA en présence de nitrate. Afin de déterminer par quel mécanisme TOR régule l'accumulation de RGA, je me suis d'abord intéressée à l'effet de TOR sur la réinitiation de la traduction des enzymes impliquées dans la biosynthèse de GA₁₂. À cette fin, j'ai purifié des polyribosomes (chaîne de ribosomes) de jeunes tissus chlorophylliens de plantules cultivées pendant 7 jours avec des concentrations faible (0,1 mM NO₃⁻) et optimale en nitrate (10 mM NO₃⁻), en présence ou en absence d'AZD-8055. Les niveaux relatifs des transcrits libres et associés aux polyribosomes sont ensuite analysés par RT-qPCR. Avant de réaliser ces extractions d'ARN, j'ai contrôlé l'accumulation de la protéine RGA dans les jeunes tissus chlorophylliens prélevés, par Western blot (Figure 45B). De manière inattendue, ce contrôle montre que la protéine RGA est déstabilisée en présence de nitrate lorsque TOR est actif, mais également en présence d'AZD-8055 (Figure 45B). Afin de vérifier si l'AZD-8055 a bien inhibé l'activité TOR, j'ai analysé le niveau d'accumulation de la forme phosphorylée de la protéine ribosomale S6 Kinase 1 (S6K1-T449P), substrat le mieux caractérisé du complexe TOR dans le mécanisme de traduction chez les plantes (Mahfouz et al., 2006; Schepetilnikov et al., 2011) (Figure 45C). En présence d'AZD-8055, la forme phosphorylée de S6K1 n'est pas détectée, confirmant que le traitement inhibant l'activité TOR a fonctionné (Figure 45C). Cette expérience nécessite donc d'être répétée. Par ailleurs, dans le cadre de ma thèse, je n'ai pas eu le temps d'analyser les autres mécanismes d'action de TOR sur l'activité ou la stabilité des enzymes impliquées dans la biosynthèse de GA₁₂.

3.2.2. Le métabolisme des GA ne semble pas être régulé pas le NO en réponse au nitrate

Déjà abordé dans l'introduction, le NO régule différents processus physiologiques et développementaux en modifiant post-traductionnellement des protéines cibles, *via* la S-nitrosylation de cystéine et la nitration de tyrosine (León et Costa-Broseta, 2019). L'hypothèse serait que le NO, issu de l'assimilation du nitrate, régulerait l'activité des enzymes impliquées dans les premières étapes de la biosynthèse de GA *via* ces modifications post-traductionnelles.

Tableau 3. Sites de prédiction des évènements des nitrations de tyrosine et des S-nitrosylations de cystéine chez les enzymes impliquées dans les premières étapes de la biosynthèse des GA et de catabolisme de la GA₁₂.

Ces sites ont été prédits à l'aide des algorithmes GPS-YNO₂ (<http://yno2.biocuckoo.org/>) et GPS-SNO (<http://sno.biocuckoo.org/>).

Y, tyrosine ; C, cystéine ; /, aucun site prédit.

Nom protéine	Numéros d'accèsion Gène / Uniprot	Nombre total de Tyrosines	Nombre total de Cystéines	Sites prédits par l'algorithme « Group-based Prediction System »	
				GPS-YNO ₂	GPS-SNO
CPS	AT4G02780 / Q38802	31	12	Y ₅ , Y ₅₈ , Y ₆₁₆	C ₁₇₀ , C ₃₀₅ , C ₃₅₄
KS	AT1G79460 / Q9SAK2	29	12	Y ₃₀₂ , Y ₄₀₄ , Y ₆₃₀ , Y ₇₇₄	C ₁₀ , C ₄₅₂
KO	AT5G25900 / Q93ZB2	16	7	Y ₂₁₀ , Y ₂₉₀ , Y ₄₉₈	C ₁₂₂
KAO1	AT1G05160 / O23051	15	5	Y ₁₆₀ , Y ₄₈₉	C ₄₈₃
KAO2	AT2G32440 / O23051	17	5	Y ₁₅₉ , Y ₃₅₂	/
GA2ox7	AT1G50960 / Q9C6I4	10	5	Y ₁₅₉	C ₅₉ , C ₁₇₁
GA2ox8	AT4G21200 / O49561	13	6	Y ₉	C ₆₁

J'ai vérifié cette hypothèse à l'aide d'outils bioinformatiques, d'analyses protéomiques publiées et par Western blot.

La S-nitrosylation est une modification qui consiste en la liaison covalente réversible de NO à un groupe thiol d'un résidu de cystéine chez une protéine cible, menant à la formation d'un S-nitrosothiol (SNO) (Astier et al., 2011). La nitration de tyrosine est une réaction irréversible, qui résulte de l'addition d'un groupe nitro (-NO₂) en position *ortho* au groupe hydroxyle du cycle aromatique des tyrosines, conduisant à la formation de 3-nitrotyrosine (YNO₂) (Schopfer et al., 2003). La modification de ces deux acides aminés est spécifique et dépend de la nature des acides aminés avoisinants. Jusqu'à présent, aucun motif consensus (succession d'acides-aminés), déterminant un site potentiel de modification, n'a été identifié. Cependant, des outils bioinformatiques ont été développés afin d'identifier les résidus cystéines et tyrosines potentiellement ciblés respectivement par les nitrosylations et nitrations. Les algorithmes de prédiction « Group-based Prediction System » (GPS-YNO₂, pour les nitrations de tyrosine et GPS-SNO pour les S-nitrosylations de cystéines) se basent sur les propriétés biochimiques des acides aminés avoisinants (Xue et al., 2010; Liu et al., 2011). À l'aide de ces deux logiciels, les sites potentiels de nitrations de tyrosine et S-nitrosylations de cystéines ont été prédits pour les premières enzymes de la voie de biosynthèse des GA (CPS, KS, KO, KAO1, KAO2) et celles du catabolisme de la GA₁₂ (GA2ox7 et GA2ox8) (Tableau 3). Toutes ces enzymes sont potentiellement ciblées par les nitrations ou les nitrosylations, exceptée KAO2 où aucun site de nitrosylation n'est prédit avec ces logiciels.

Afin de vérifier ces sites de prédictions *in vivo*, je me suis concentrée sur des analyses protéomiques réalisées chez *Arabidopsis* où les niveaux d'accumulation du NO sont modifiés pharmacologiquement ou par mutation, et non par l'induction de stress. Ces études sont effectuées par immuno-détection, séparation des protéines par chromatographie puis par des analyses par spectrométrie de masse. Ces approches ont permis d'identifier *in vivo* des protéines ciblées par ces modifications post-traductionnelles (Jaffrey et Snyder, 2001; Chen et al., 2013; Kolbert et al., 2017). Cependant, les enzymes de biosynthèses CPS, KS, KO, KAO1 et KAO2 ainsi que du catabolisme de la GA₁₂, GA2ox7 et GA2ox8, n'ont pas été identifiées (Lindermayr et al., 2005; Lozano-Juste et al., 2011; Hu et al., 2015).

Une des voies de synthèse du NO chez les plantes est la réduction du nitrate dans le cytoplasme par la nitrate réductase (NR). Ainsi, chez le mutant *nia1 nia2* (deux gènes codant pour la NR), le niveau d'accumulation du NO est significativement plus faible que chez des plantes sauvages (Lozano-Juste et Leon, 2010). Dans le but de vérifier si le NO régule le métabolisme des GA, des plantules sauvages et mutantes *nia1 nia2* ont été cultivées sur un

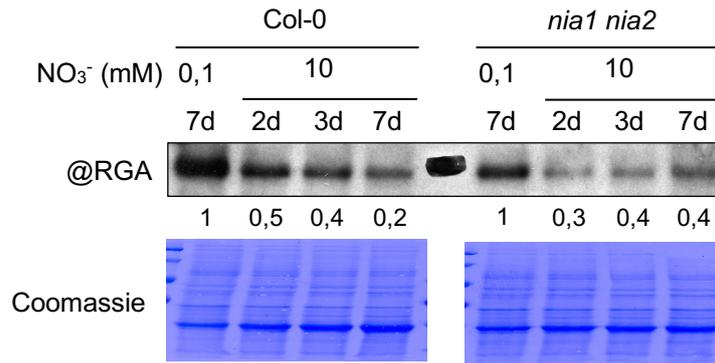


Figure 46. Accumulation de la protéine RGA chez le mutant *na1 nia2* en réponse à un traitement nitrate.

Immuno-détection de la protéine RGA dans les jeunes tissus chlorophylliens de plantules sauvages (Col-0) et mutants *nia1 nia2* de 7 jours. Les plantules sont cultivées sur un milieu contenant une faible concentration en nitrate (0,1 mM NO₃⁻) puis transférées sur un milieu optimal en nitrate (10 mM NO₃⁻) pendant différents temps (2d, 2 jours ; 3d, 3 jours). Des plantules sont cultivées sur un milieu pauvre et optimal en nitrate (7d, 7 jours). Tous les échantillons sont récoltés en même temps. L'intensité des bandes est normalisée avec la quantité en protéines totales colorées au bleu de Coomassie. Des résultats similaires ont été obtenus dans deux expériences indépendantes.

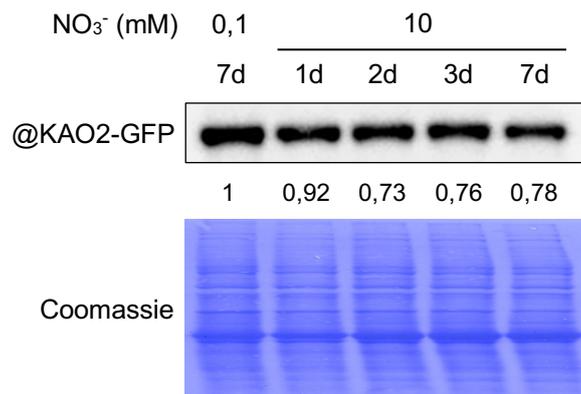


Figure 47. Accumulation de la protéine KAO2-GFP en réponse à un traitement nitrate.

Immuno-détection de la protéine KAO2-GFP dans les jeunes tissus chlorophylliens de plantules *pKAO2:KAO2-GFP* de 7 jours. Les plantules sont cultivées sur un milieu contenant une faible concentration en nitrate (0,1 mM NO₃⁻) puis transférées sur un milieu optimal en nitrate (10 mM NO₃⁻) pendant différents temps (2d, 2 jours ; 3d, 3 jours). Des plantules sont cultivées sur un milieu pauvre et optimal en nitrate (7d, 7 jours). Tous les échantillons sont récoltés en même temps. L'intensité des bandes est normalisée avec la quantité en protéines totales colorées au bleu de Coomassie. L'expérience a été réalisée une fois.

milieu supplémenté avec une concentration faible en nitrate (0,1mM NO₃⁻) puis transférées pendant différents temps (de 1 à 3 jours) sur un milieu supplémenté avec une concentration adéquate en nitrate (10 mM NO₃⁻). Le niveau d'accumulation de la protéine RGA est déterminé par Western blot dans les jeunes tissus chlorophylliens à 7 jours (Figure 46). Comme attendu, RGA est déstabilisée en présence de nitrate chez les plantules sauvages. Chez le mutant *nia1 nia2*, l'accumulation de RGA est semblable à celle observée chez les plantules sauvages (Figure 46). Ainsi la réduction de production de NO chez le mutant *nia1 nia2* n'altère pas la déstabilisation de RGA en présence de nitrate, suggérant que ce mécanisme est indépendant du NO.

Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que la déstabilisation de RGA en réponse au nitrate est indépendante du NO. Par ailleurs, aucune indication ne suggère que le NO induirait des modifications post-traductionnelles chez les enzymes des premières étapes de la biosynthèse des GA et du catabolisme de la GA₁₂. Cependant ces résultats sont préliminaires et nécessitent une étude plus approfondie.

3.2.3. Le nitrate n'a pas d'effet sur l'abondance de l'enzyme KAO2

Les modifications post-traductionnelles peuvent affecter, entre autres, la stabilité des protéines. Bien qu'il n'y ait pas d'évidence claire que TOR ou le NO modifient post-traductionnellement les enzymes du métabolisme des GA en réponse à un traitement au nitrate, j'ai vérifié si le niveau d'accumulation des enzymes KAO1 et KAO2, qui catalysent la formation de la GA₁₂, était altéré suite à un traitement au nitrate. Ainsi, des lignées transgéniques exprimant les fusions traductionnelles *pKAO1:KAO1-GFP* et *pKAO2:KAO2-GFP* ont été cultivées comme précédemment et les niveaux d'accumulation des protéines KAO1-GFP et KAO2-GFP ont été analysés par Western blot (avec un anticorps GFP) dans les jeunes tissus chlorophylliens de plantules âgées de 7 jours (Figure 47). La protéine KAO1-GFP n'a pu être détectée, probablement à cause de la faible expression du gène *KAO1* (Regnault et al., 2014). L'accumulation de la protéine KAO2-GFP diminue très légèrement mais reste relativement stable en présence de nitrate (Figure 47). Ainsi ce résultat, bien que préliminaire, semble indiquer que le nitrate n'affecterait pas la stabilité de la protéine KAO2, impliquée dans la formation de la GA₁₂.

3.3. Rôle des GA dans l'adaptation des plantes à une disponibilité hétérogène en N

J'ai démontré que le nitrate induisait la croissance des plantes *via* en partie la signalisation GA. Toutes ces expériences ont été réalisées sur des milieux homogènes en nitrate, cependant dans le sol, la concentration en nitrate est rarement uniforme et très hétérogène.

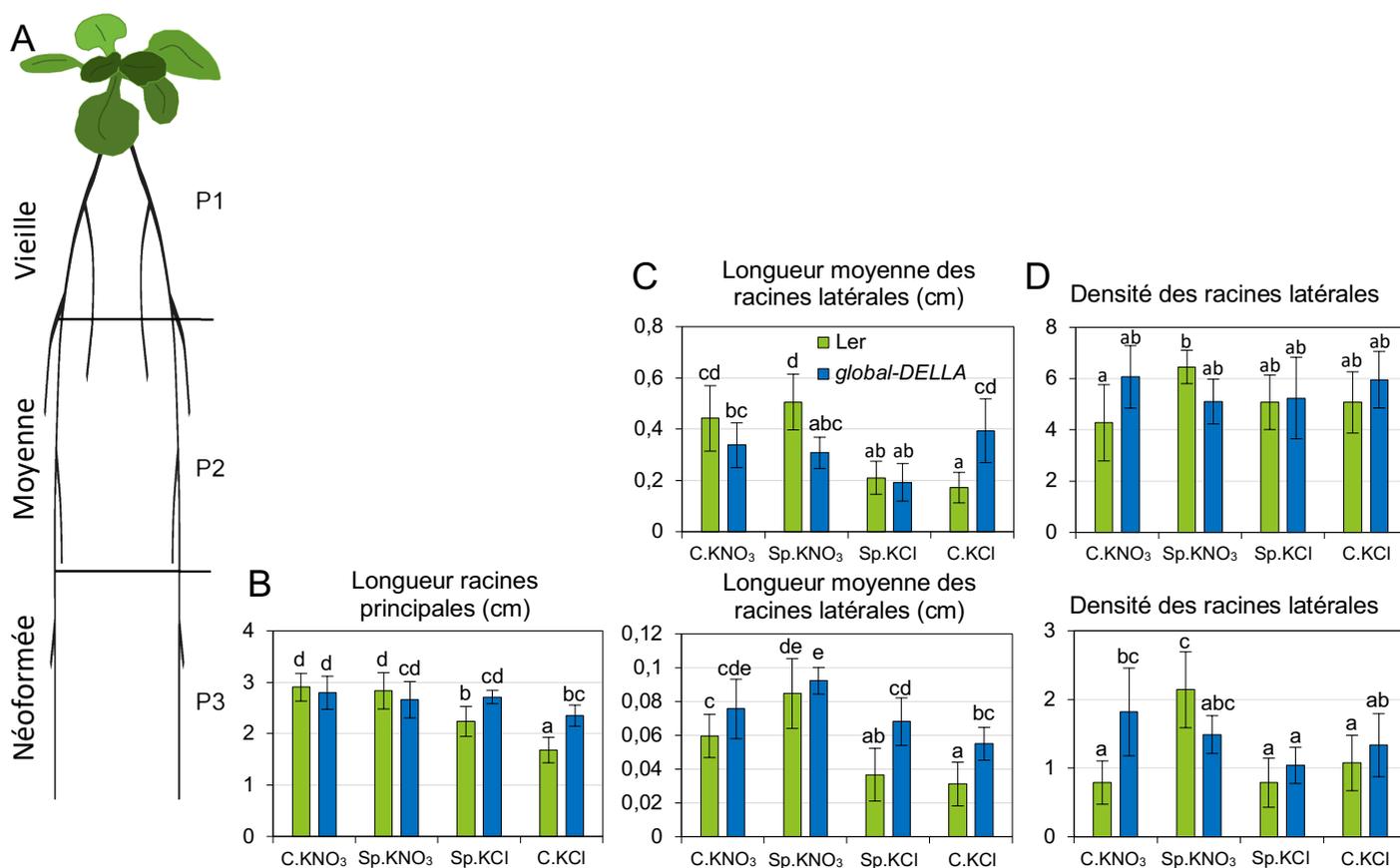


Figure 48. Étude du rôle de la signalisation GA dans l'adaptation des plantes à une disponibilité hétérogène en nitrate, grâce au système « split-root » *in vitro*.

A. Schéma présentant les 3 sections P1, P2 et P3 des racines en « split-root » (Ruffel et al, 2016). La 1ère section P1 (vieille) est la partie de la racine principale présentant déjà des racines latérales au moment du transfert sur les milieux hétérogènes et contrôles divisés ou « splitted », contrairement à la partie P2 (moyenne) où aucune racine latérale n'est visible au moment du transfert. La section P3 correspondra à la racine principale néoformée, après le transfert.

B-C-D. Moyennes (\pm s.d., $4 \leq n \leq 14$ racines) de la longueur des racines principales dans la section P3 (**B**), de la longueur moyenne des racines latérales dans la section P2 (en haut) et P3 (en bas) (**C**) et de la densité des racines latérales (nombre de racines par cm de la racine principale) dans la section P2 (en haut) et P3 (en bas) (**D**) de plantes sauvages (Ler) et mutantes *global-DELLA*, 4 jours après le transfert sur les milieux contrôles séparés ou « splitted » (C.KNO₃ et C.KCl) contenant 5 mM KNO₃ ou 5 mM KCl de chaque côté du système « split-root », et hétérogènes divisés ou « splitted » (Sp.KNO₃ et Sp.KCl) où une partie des racines est en contact avec 5 mM KNO₃ (Sp.KNO₃) et l'autre partie en contact avec 5 mM KCl (Sp.KCl). Les mesures sont réalisées sur des plantes âgées de 22 jours. Les différentes lettres sur les graphes indiquent des différences significatives ($p < 0,05$, ANOVA (one-way) suivie du test de comparaisons multiples de Tukey).

C., contrôle ; Sp., Split.

Les plantes ont donc développé des mécanismes pour s'adapter à ces conditions. Cela consiste à moduler l'architecture du système racinaire pour optimiser le prélèvement du nitrate. Comme précédemment indiqué (introduction, paragraphe 3.5.2), les phytohormones cytokinines agissent comme un signal systémique modulant la croissance du système racinaire en fonction de l'hétérogénéité de la concentration en nitrate dans le sol (Figure 38) (Ruffel et al., 2016; Poitout et al., 2018). Pour étudier le rôle des GA dans l'adaptation des plantes à une disponibilité hétérogène en nitrate, le système racinaire des plantes a été séparé en deux parties égales ou « split-root » et exposé à différentes concentrations en nitrate, en condition *in vitro* ou en hydroponie.

Le dispositif du « split-root » *in vitro* consiste à cultiver des plantules pendant 10 jours sur un milieu faible en nitrate puis à couper la racine principale en dessous des deux premières racines latérales, ces dernières devenant ainsi les nouvelles racines principales. Quatre jours après la coupe de la racine principale, les plantules sont transférées sur un milieu sans nitrate pendant 4 jours, dans le but de les carencer en nitrate. Enfin, les plantes âgées de 18 jours, sont transférées sur les milieux « split-root » où le système racinaire est séparé en deux parties égales confrontées à divers environnements : (i) C.KNO₃, concentration homogène en nitrate (5 mM KNO₃) de chaque côté du système, (ii) C.KCl, absence homogène de nitrate, remplacé par du KCl (5 mM) de chaque côté, (iii) Sp.KNO₃/Sp.KCl, disponibilité hétérogène en nitrate 5 mM KNO₃ versus 5 mM KCl (Figure 37). Lors du transfert des plantes sur les milieux homogènes et hétérogènes, nous avons défini 3 sections du système racinaire, précédemment décrit par Ruffel et al., 2016 (Figure 48A) : la 1ère section P1 est la partie de la racine principale présentant déjà des racines latérales au moment du transfert, contrairement à la partie P2 où aucune racine latérale n'est visible au moment du transfert. Enfin la section P3 correspond à la racine principale néoformée, après le transfert.

Afin de montrer si les GA ont un rôle dans l'adaptation des plantes à une disponibilité hétérogène en nitrate, des plantes sauvages et mutantes *global-DELLA* ont été cultivées en système « split-root » *in vitro*. Dans les sections P2 et P3 des racines, j'ai mesuré la croissance des racines principales et latérales ainsi que la densité de racines latérales (nombre de racines latérales par centimètre de racine principale) (Figure 48).

Chez les plantes sauvages âgées de 22 jours, la racine principale dans la section P3 ainsi que les racines latérales en P2 et P3 sont deux fois plus grandes sur le milieu contrôle C.KNO₃ par rapport aux racines des plantes cultivées sur C.KCl (Figure 48B et C). En revanche, la densité des racines latérales est identique entre les conditions C.KNO₃ et C.KCl pour les deux sections racinaires (Figure 48D). Sur les milieux hétérogènes, la longueur de la racine principale dans la section P3 augmente de 22% chez les racines en contact avec le nitrate (Sp.KNO₃)

comparée aux racines cultivées sans nitrate (Sp.KCl). La longueur des racines latérales est également plus importante pour les racines en contact avec le nitrate (Sp.KNO₃), quelle que soit la section de la racine observée (+60% environ) (Figure 48B et C). La même tendance s'observe pour la densité des racines latérales, et s'accroît dans la section P3 de la racine avec environ deux fois plus de racines du côté Sp.KNO₃ par rapport au côté Sp.KCl (Figure 48D). La longueur de la racine principale des plantes sauvages est identique entre la condition contrôle C.KNO₃ et hétérogène Sp.KNO₃, en revanche les racines latérales dans la section P3 en condition hétérogène Sp.KNO₃ sont significativement plus grandes que celles sur C.KNO₃. La même tendance s'observe pour le nombre de racines latérales en P2 et P3 (Figure 48). Ce développement différentiel des racines latérales entre les conditions C.KNO₃ et Sp.KNO₃ marque la signalisation systémique de demande en N, comme attendu (Figure 37). La croissance de la racine principale en P3 est moindre pour la condition C.KCl par rapport à la condition Sp.KCl, tandis que la longueur et le nombre de racines latérales sont identiques entre ces deux conditions en P2 et P3 (Figure 48). Ainsi l'effet de la signalisation d'apport en N, mise en évidence par une inhibition de croissance des racines sur Sp.KCl par rapport à la condition C.KCl, n'est pas visible chez les plantes sauvages dans cette expérience (Figure 37).

Par ailleurs, il est également décrit dans la littérature que la croissance de la racine principale de plantes sauvages est identique pour les conditions contrôles C.KNO₃ et C.KCl (Ruffel et al., 2011, 2016). Or ce n'est pas le cas dans mes conditions et ce résultat concorde avec ceux obtenus sur milieux homogènes non « divisés » (voir Figure 1 du manuscrit du chapitre 1). De plus, il est connu que la croissance des racines latérales soit supérieure ou identique chez les racines de plantes cultivées sur le milieu contrôle sans nitrate (C.KCl) comparée à celles cultivées en présence de nitrate (C.KNO₃) (Ruffel et al., 2016). Dans mes conditions, j'ai obtenu le résultat inverse. Bien que ces résultats obtenus soient préliminaires (réalisés deux fois) et présentent une variabilité importante due au faible nombre de plantes analysées (entre 4 et 14), des tendances peuvent être dégagées de ces résultats.

En effet, le mutant *global-DELLA* est en général moins sensible que la plante sauvage pour une déficience en nitrate. Ainsi, l'inhibition de croissance de la racine principale en P3 induite par une déficience en N sur C.KCl et Sp.KCl (Figure 48B et C) se trouve moins prononcée chez le mutant *global-DELLA* que chez le sauvage, comme précédemment observé chez des plantules âgées de 7 jours cultivées en milieux homogènes non « divisés » (Figure 1 du manuscrit du chapitre 1). Cet effet est également observé pour les racines latérales dans la section P3 (Figure 48C). Par ailleurs, la densité des racines latérales demeure identique entre le sauvage et mutant *global-DELLA* dans ces conditions. Sur le milieu contrôle C.KNO₃, la longueur des racines principales et latérales dans la section P2 et P3 reste comparable à celle

des plantes sauvages. De manière surprenante, la densité des racines latérales du mutant *global-DELLA* sur le milieu contrôle C.KNO₃ est deux fois supérieure à celle des plantes sauvages (Figure 48D), suggérant un rôle des DELLA dans la formation des racines latérales. En absence des protéines DELLA, sur les milieux hétérogènes Sp.KNO₃/Sp.KCl, il n'y a pas de différence pour la longueur de la partie P3 de la racine principale, comme pour la longueur des racines latérales dans la section P2 de la racine. Tandis que dans la section P3, la taille des racines latérales en contact avec le nitrate (Sp.KNO₃) est plus grande que celle du côté sur Sp.KCl, la différence de croissance entre Sp.KNO₃ et Sp.KCl reste restreinte par rapport aux plantes sauvages (Figure 48B et C). La densité des racines latérales demeure également semblable entre les conditions hétérogènes pour le mutant *global-DELLA* (Figure 48D). Ainsi, pris dans leur ensemble, ces résultats semblent indiquer que les protéines DELLA font partie de la signalisation locale régulant la croissance de la racine principale et le développement des racines latérales en réponse au nitrate (Figure 37). L'effet de la signalisation systémique de demande en N (C.KNO₃ vs Sp.KNO₃), visible chez le sauvage, est perdu chez le mutant *global-DELLA*. Cet effet est probablement causé par une réponse locale accrue pour la condition C.KNO₃ où la densité des racines latérales et leurs longueurs augmentent dans les sections P3 du mutant *global-DELLA* (Figure 48C et D). Enfin, comme mentionné précédemment, la signalisation systémique d'apport en N, marquée par la répression du développement des racines latérales sur Sp.KCl par rapport aux racines sur C.KCl est absente chez les plantes sauvages. Même s'il est difficile d'émettre une conclusion avec ces résultats préliminaires, l'augmentation de croissance racinaire observée chez le mutant *global-DELLA* en absence de nitrate (C.KCl) résulte vraisemblablement d'un effet local.

Pris dans leurs ensembles, ces résultats préliminaires suggèrent que la signalisation GA est impliquée dans la mise en place de la signalisation locale en réponse au nitrate, afin de réguler la croissance des racines principales et latérales. Toutefois, la taille de la population étudiée devra être augmentée pour réaliser une analyse statistique plus robuste.

Afin de mieux comprendre le rôle de la signalisation GA dans l'adaptation des plantes à une disponibilité hétérogène en nitrate, les niveaux d'accumulation de la protéine RGA ont été analysés par Western blot dans les plantes sauvages, cultivées en « split-root » en hydroponie. La culture des plantes en hydroponie a été effectuée par Dr. Sandrine Ruffel de l'Institut Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes à Montpellier. Les expériences de « split-root » en hydroponie permettent d'obtenir plus de matériel biologique pour les analyses moléculaires, et sont réalisées sur le même principe que le « split-root » *in vitro* avec des ajustements pour le temps de culture et les concentrations utilisées.

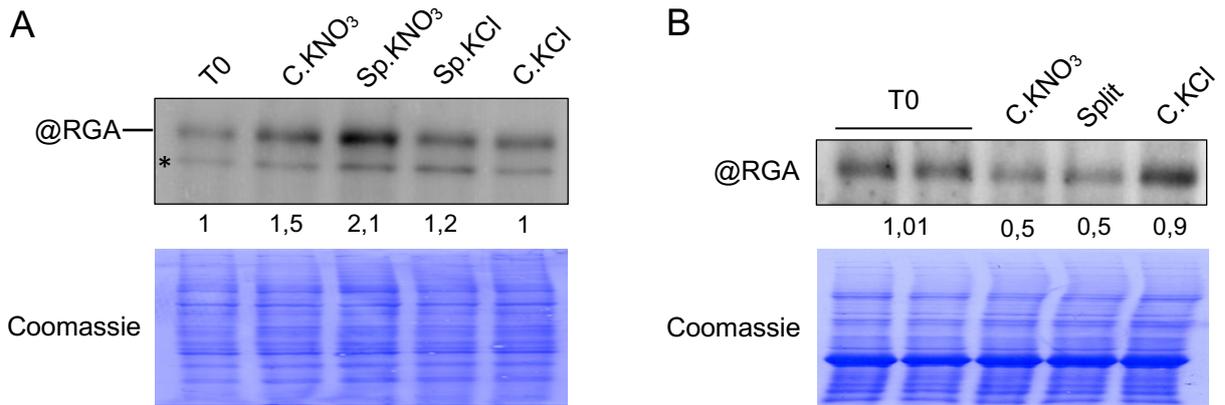


Figure 49. Étude du rôle de la signalisation GA dans l'adaptation des plantes à une disponibilité hétérogène en nitrate, grâce au système « split-root » en hydroponie.

A-B. Immuno-détection de la protéine RGA dans les racines (**A**) et les feuilles (**B**) de plantes sauvages (Col-0) âgées de 51 jours cultivées en hydroponie sur un milieu appauvri en NO_3^- (0,1 mM KNO_3) et transférées pendant deux jours sur des milieux contrôles « splités » où les deux parties du système racinaires sont en contact 1 mM KNO_3 ou 1 mM KCl (C. KNO_3 et C. KCl), ou sur un milieu hétérogène compartimentés ou « splitted » où une partie des racines est en contact avec 1 mM KNO_3 (Sp. KNO_3) et l'autre partie en contact avec 1 mM KCl (Sp. KCl). Des échantillons ont été récoltés avant les traitements KNO_3 et KCl (T0). L'intensité des bandes est normalisée avec la quantité en protéines totales colorées au bleu de Coomassie. *bande aspécifique. Des résultats similaires ont été obtenus dans deux réplicats biologiques, comprenant chacun entre 9 et 15 plantes par condition. C., contrôle ; Sp., split ; Split, rosette des plantes cultivées sur le milieu hétérogène divisé « splitted ».

Contrairement au système *in vitro*, les plantes sont cultivées avec 1 mM KNO₃ ou 1 mM KCl pendant deux jours, et les analyses ont été faites sur des plantes âgées de 51 jours.

De manière surprenante, la protéine RGA s'accumule dans les racines des plantes cultivées en présence de nitrate (C.KNO₃ et Sp.KNO₃) comparée à celles cultivées en absence de nitrate (C.KCl et Sp.KCl) (Figure 49A). De plus, le niveau d'accumulation de RGA s'accroît dans les racines en contact avec du nitrate en condition hétérogène, comparé à la condition contrôle C.KNO₃. Ces résultats ne reflètent pas les mesures de croissance racinaire réalisées en système « split-root » *in vitro*. Au contraire, les niveaux d'accumulation de RGA dans les feuilles sont opposés à ceux obtenus à partir des racines (Figure 49B). Tout comme au stade plantule (Figure 2 du manuscrit du chapitre 1), le niveau d'accumulation de la protéine RGA est plus important dans les feuilles de plantes cultivées sans nitrate (C.KCl) que chez les plantes dont au moins une partie du système racinaire a été en contact avec du nitrate (C.KNO₃ et Split). En conclusion, ces analyses montrent que les niveaux d'accumulation de la protéine RGA sont opposés entre les racines et les parties aériennes (en fonction du statut azoté) et ne concordent pas avec les mesures de croissance racinaire réalisées chez les plantes cultivées en système « split-root » *in vitro*.

4. Discussion complémentaire

Les phytohormones, comme les GA, jouent un rôle essentiel dans l'adaptation et la tolérance des plantes aux contraintes environnementales. L'accumulation rapide (en quelques heures) des protéines DELLA en cas de stress salin ou en réponse au froid diminue la croissance des plantes afin d'augmenter leur survie (Colebrook et al., 2014). En réponse à ces différents stress abiotiques, les gènes codant pour les enzymes du catabolisme des GA (*GA2ox*) sont sur-exprimés entraînant une diminution des contenus en GA bioactives. Contrairement à cette adaptation rapide, lors d'une carence en nitrate, l'accumulation des protéines DELLA est beaucoup plus lente (observée un à deux jours après la déficience en nitrate), tout comme la déstabilisation des DELLA lors d'un transfert des plantes d'un milieu appauvri en nitrate à des conditions plus favorables, riches en nitrate. De manière consistante, la déstabilisation des DELLA en présence de nitrate est précédée par une accumulation (toute aussi lente) en GA bioactives. De façon remarquable, cette accumulation en GA bioactives en réponse à un traitement nitrate, est également visible chez le blé. Il est important de noter que les gènes du catabolisme des GA bioactives (*C19-GA2ox*) sont en général réprimés lorsque les plantes sont cultivées sur des milieux appauvris en nitrate, suggérant un mécanisme de régulation différent de ceux mis en place en réponse à un stress salin ou au froid (Achard et al., 2008a, 2008b). De manière intéressante, c'est la GA_{12} , un précurseur inactif, qui s'accumule en réponse au nitrate, et qui après conversion métabolique en GA bioactives, promeut la croissance de la plante. Une observation similaire avait été faite en réponse à un autre nutriment, le fer (Wild et al., 2016). Tout comme en réponse au fer, le mécanisme moléculaire responsable de l'augmentation de l'accumulation des GA en réponse au nitrate n'a pas été identifié. Comme indiqué dans le manuscrit du chapitre 1, le nitrate ne régule pas le niveau d'expression des gènes de biosynthèse de GA impliqués dans les premières étapes amenant à la production de GA_{12} . C'est dans ce contexte, que je me suis intéressée à d'autres mécanismes de régulation potentiels : les régulations traductionnelles et post-traductionnelles.

La protéine kinase TOR intègre de multiples signaux environnementaux et développementaux comme les nutriments, la lumière ou les phytohormones afin de coordonner un développement optimal de la plante. Plusieurs études montrent que TOR a un rôle majeur dans la régulation du métabolisme et la synthèse de protéines (Shi et al., 2018). Chez *Arabidopsis*, la diminution de l'expression de *TOR* réduit significativement l'abondance de polysomes, suggérant l'implication de TOR dans la régulation de la traduction (Deprost et al., 2007). Récemment, il a été montré que la voie de signalisation TOR était impliquée dans la traduction d'ARN messagers spécifiques, contenant des cadres de lecture ouverts en amont du cadre de lecture de la séquence codante principale, localisés dans la région 5'UTR (uORF, upstream open

reading frame). Ce mécanisme non canonique d'initiation de la traduction est appelée réinitiation (Schepetilnikov et al., 2013). Les uORF sont définis par un codon « start » et un codon « stop » dans la région 5'UTR de l'ARNm (Morris et Geballe, 2000; Calvo et al., 2009). Lorsque la région 5'UTR de l'ARNm contient un uORF de petite taille (<30–50 codons), dont la durée de la phase d'élongation de la traduction est courte, une partie des ribosomes (en général moins de 50%) peut reprendre la lecture de l'ARNm et ainsi réinitier la traduction d'un ORF consécutif (Kozak, 2001; Schepetilnikov et Ryabova, 2018). Ce mécanisme de réinitiation nécessite des facteurs initiateurs de la traduction, comme eukaryotic Initiation Factor 3 (eIF3) chez les plantes (Schepetilnikov et al., 2013). Recrutés lors de l'initiation de la traduction, ces facteurs restent liés au ribosome après la traduction de l'uORF, permettant au ribosome de reprendre la lecture de l'ARNm et de rapidement recruter les structures nécessaires à la traduction du prochain ORF. D'après le modèle, TOR, lorsqu'il est actif, est recruté au niveau des polysomes et phosphoryle eIF3, qui en conséquence stabilise l'association des ribosomes avec l'ARNm après la traduction d'uORF. Ainsi TOR favorise le chargement d'uORF-ARNm sur les polysomes et la réinitiation de leur traduction (Schepetilnikov et al., 2011, 2013).

Récemment, il a été montré que TOR régulate la signalisation GA et que son activité était augmentée par le nitrate par un mécanisme encore inconnu (Xiong et Sheen, 2015; Zhang et al., 2018b). Une première expérience a permis de montrer que l'activité TOR était en partie nécessaire à la déstabilisation de la protéine DELLA RGA après un traitement nitrate. Ainsi en réponse au nitrate, la protéine kinase TOR pourrait réguler la traduction des enzymes du métabolisme des GA (augmenter leur accumulation) et en conséquence moduler la biosynthèse de GA et donc l'accumulation des DELLA. Des analyses bioinformatiques ont permis de mettre en évidence que les ARNm du gène *KAO1* et *KAO2* ont des sites uORF dans leur région 5'UTR, suggérant que la traduction de ces deux ARNm pourrait être régulée par la voie de signalisation TOR (communication personnelle, Dr Mikhail Schepetilnikov). Dans le but d'analyser l'effet de l'activité TOR dans la régulation traductionnelle des enzymes du métabolisme des GA, nous avons purifié les polysomes de jeunes tissus chlorophylliens de plantules âgées de 7 jours cultivées sur deux conditions en nitrate (faible et optimale) et en inhibant ou non l'activité TOR (avec la drogue AZD-8055). Malheureusement, les contrôles n'ont pas fonctionné et en conséquence, les résultats sont inexploitable. Une répétition est envisagée. Par ailleurs, il est important de noter qu'un sous fractionnement des polysomes purifiés sera probablement nécessaire afin d'observer un effet sur la traduction. En effet, il a été démontré que TOR activait la traduction d'uORF-ARNm de la voie de signalisation de l'auxine (ARFs) en favorisant la formation de polysomes « lourds » comprenant plus de trois ribosomes au niveau des uORF (Schepetilnikov et al., 2013). Or, nos purifications de polysomes comprennent un mélange de polysomes « légers » à 2-3 ribosomes ainsi que de

polysomes « lourds ». En séparant en différentes fractions les polysomes, nous pourrions ainsi analyser les profils de liaison des ARNm des gènes *KAO1* et *KAO2* aux polysomes « légers » et « lourds » en réponse au nitrate.

La principale fonction de la protéine TOR est la phosphorylation de protéines cibles, pouvant modifier la stabilité ou l'activité de celles-ci (Shi et al., 2018). Il sera donc important de tester si TOR phosphoryle les enzymes de biosynthèse de GA. Des tests de « kinase assay » pourront être envisagés.

Le NO représente une molécule jouant un rôle majeur dans la physiologie des organismes vivants. Cette molécule signal est impliquée dans de nombreux mécanismes physiologiques pendant le développement et la croissance des plantes, de la germination à la floraison et la maturation des fruits (Corpas et Barroso, 2015). Le NO est également produit en réponse aux stress abiotiques comme la sécheresse ou le stress salin, mais aussi lors de stress biotiques pour orchestrer la défense contre des pathogènes (Moreau et al., 2010). Alors que la synthèse du NO est très bien caractérisée chez les animaux, sa production chez les organismes photosynthétiques reste partielle. Néanmoins, la voie de biosynthèse la plus connue chez les plantes implique plusieurs enzymes dont la nitrate réductase (NR) dans le cytoplasme des cellules (Astier et al., 2018). Tout comme avec TOR, une des caractéristiques clés du NO repose sur la modification post-traductionnelle de protéines cibles, régulant leur stabilité, activité, ou localisation subcellulaire. Ces modifications post-traductionnelles incluent les S-nitrosylations de cystéine et les nitrations de tyrosine. Plusieurs études ont montré que des acteurs des voies de signalisation de l'auxine, de l'acide abscissique (ABA) et des cytokinines sont ciblés par ces modifications (Feng et al., 2013; Albertos et al., 2015; Iglesias et al., 2018). Nous avons donc analysé si le nitrate régulait le métabolisme des GA *via* des modifications post-traductionnelles induites par le NO. Malgré la prédiction *in silico* de plusieurs sites de modifications chez les enzymes des premières étapes du métabolisme des GA, ces enzymes ne sont pas retrouvées dans les données d'analyses protéomiques rapportées chez *Arabidopsis* (Lindermayr et al., 2005; Lozano-Juste et al., 2011; Hu et al., 2015). Par ailleurs, la diminution de l'accumulation de RGA en réponse au nitrate est identique chez les plantules sauvages et le mutant de la NR (*nia1 nia2*) (Figure 46). Ainsi le nitrate ne régulerait pas le métabolisme des GA par l'intermédiaire du NO. Pour confirmer ce résultat, il serait important de quantifier les GA₁₂ et GA₄ chez le double mutant *nia1 nia2*. En revanche, ces résultats n'excluent pas une régulation post-traductionnelle des enzymes du métabolisme des GA par le NO, dans un contexte autre que nitrate, par exemple lors de stress biotiques. Les logiciels de prédiction utilisés (GPS-YNO2 et GPS-SNO) ne prennent pas en compte les structures di- et tridimensionnelles des protéines, importantes pour l'activité ou la stabilité d'une enzyme

(Kolbert et al., 2017). Par ailleurs la détection *in vivo* des protéines portant ces modifications est très difficile, due à la faible abondance des nitrations de tyrosine et à la réversibilité des S-nitrosylations de cystéine (León et Costa-Broseta, 2019).

Les modifications post-traductionnelles décrites ci-dessus peuvent affecter la stabilité ou l'activité d'une protéine. L'enzyme KAO catalyse la formation de la GA₁₂, qui s'accumule en réponse au nitrate. Des résultats préliminaires indiquent que les niveaux d'accumulations de l'enzyme KAO2 reste stable suite à un traitement nitrate dans les tissus chlorophylliens de plantules âgées de 7 jours. Ce résultat, bien que préliminaire, suggère aussi que la traduction de la KAO2 n'est pas affectée par le nitrate et par extension la signalisation TOR. La stabilité des autres enzymes du métabolisme (CPS, KS, KO, GA2ox7 et GA2ox8) pourra être vérifiée par Western blot grâce à des anticorps spécifiques ou chez des lignées transgéniques exprimant une fusion traductionnelle étiquetée pour chaque gène. Enfin, il sera intéressant d'analyser l'activité de ces enzymes en réponse au nitrate. Le recours au système hétérologue chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* sera approprié pour étudier l'activité des enzymes de la famille des terpènes synthases (CPS et KS) et des cytochrome P450 mono-oxygénases (KO et KAO) (Jiang et Morgan, 2004; Höfer et al., 2013).

Le mécanisme moléculaire par lequel le nitrate stimule la production de GA reste donc méconnu, les résultats obtenus ci-dessus sur de possibles régulations traductionnelles et post-traductionnelles encore préliminaires, nécessitent d'autres expériences pour les valider. La biosynthèse d'autres phytohormones, comme l'auxine ou les cytokinines, répond également à une régulation par le nitrate (Krouk, 2016). Des connections multiples, à différents niveaux, existent entre les GA et d'autres phytohormones afin d'orchestrer et de coordonner le développement des plantes face aux diverses conditions environnementales (Weiss et Ori, 2007; Davière et Achard, 2016). Ainsi, d'autres phytohormones pourraient servir d'intermédiaire entre le nitrate et la biosynthèse de GA ou moduler l'interconnexion. Enfin, l'azote est un macronutriment essentiel à la vie de la plante, ainsi une carence en azote pourrait induire différents niveaux de régulations pour que la plante s'adapte aux variations de sa disponibilité. Ainsi, la régulation de la biosynthèse des GA par le nitrate pourrait résulter de l'intégration de plusieurs niveaux de régulations, impliquant divers mécanismes moléculaires.

L'augmentation de la biosynthèse de GA bioactives par le nitrate a pour conséquence la déstabilisation des protéines DELLA, aussi bien dans les racines que dans les parties aériennes de la plante (Figure 2 du manuscrit du chapitre 1). Cette déstabilisation est observée entre 24h et 48h suite à un apport en nitrate, et de manière intéressante, la diminution de l'accumulation de RGA semble plus prononcée dans les parties aériennes par rapport aux racines chez les plantules âgées de 7 jours. Par ailleurs, la quantité de GA₁₂ dans le xylème,

principale forme de GA transportée sur de longues distances, des racines vers les parties aériennes augmente chez des plantes cultivées sur un milieu optimal en nitrate par rapport à un milieu appauvri en nitrate. La question se pose sur le rôle biologique de ce transport de GA, s'il est nécessaire à la croissance coordonnée et au développement des feuilles en réponse au nitrate, ou bien, si les parties aériennes produisent de manière autonome leur propre GA bioactives. Il est également possible que le nitrate soit dans le même temps transporté des racines vers les parties aériennes pour ensuite induire la synthèse *de novo* de GA. Pour répondre à ces hypothèses, il serait intéressant d'une part de quantifier les GA et le nitrate à la fois dans les parties aériennes et les racines, chez des plantules cultivées pendant 7 jours sur un milieu sans nitrate puis supplémentées avec une concentration optimale en nitrate. D'autre part, des expériences de micro-greffes pourront également être réalisées, où des plantes greffées, produisant uniquement des GA dans les racines (par exemple la combinaison Col-0/*ga1-3*), seront cultivées sur des milieux appauvri et optimal en nitrate, pour ensuite comparer la croissance des parties aériennes (par rapport à des plantes greffées sauvages Col-0/Col-0, et mutantes *ga1-3/ga1-3*).

La disponibilité du nitrate dans les sols varie considérablement dans l'espace et le temps, obligeant les plantes à développer un ensemble de mécanismes pour optimiser son prélèvement. Ainsi, l'architecture du système racinaire se trouve fortement modifiée en réponse à cette disponibilité hétérogène, où les racines latérales se développent dans les zones riches en nitrate. L'adaptation du système racinaire à une disponibilité hétérogène en nitrate est sous le contrôle de signalisations systémiques et locales (Figure 37). Plusieurs études ont montré que les cytokinines agissaient comme un signal systémique de demande en N et induisaient la formation des racines latérales dans les zones riches en nitrate (Ruffel et al., 2016; Poitout et al., 2018). Les peptides CEP ont également un rôle de signal systémique de demande N afin d'augmenter le prélèvement du nitrate *via* l'induction de l'expression du gène codant le transporteur *NRT2.1* dans les racines en contact avec le nitrate (Tabata et al., 2014; Ohkubo et al., 2017). Au niveau local, le développement des racines latérales en réponse au nitrate est régulé par le transcepteur NPF6.3/NRT1.1 (Mounier et al., 2014). En absence de nitrate, NPF6.3/NRT1.1 transporte l'auxine en dehors de l'apex racinaire, qui en conséquence inhibe le développement racinaire. En présence de nitrate, l'auxine n'est plus transportée et s'accumule dans l'apex racinaire induisant la croissance des racines latérales (Remans et al., 2006; Krouk et al., 2010a; Mounier et al., 2014). La perception du nitrate par NPF6.3/NRT1.1, conduit à l'induction de l'expression du gène codant le facteur de transcription *ANR1*, activant ainsi la croissance des racines latérales (Zhang et Forde, 1998; Gan et al., 2012). Le facteur de transcription TCP20 stimule également la croissance des

racines latérales dans les zones riches en nitrate, en régulant la prolifération cellulaire *via* l'expression de la *CYCB1;1* (Guan et al., 2014, 2017).

Nous avons montré que les GA régulaient la croissance racinaire de la plante en fonction de la disponibilité en nitrate sur des milieux homogènes. Étant donné que plusieurs phytohormones sont impliquées dans la régulation de l'architecture racinaire face à une disponibilité hétérogène en nitrate, nous avons étudié le rôle des GA dans ces mécanismes d'adaptation grâce au système « split-root ». Les mesures de croissance des racines latérales et principales réalisées *in vitro* chez le mutant *global-DELLA*, suggèrent que les protéines DELLA ont un rôle dans la signalisation locale face à une disponibilité hétérogène en nitrate. En absence des DELLA, la répression de croissance racinaire est perdue dans les zones pauvres en nitrate Sp.KCl par rapport aux zones riches en nitrate Sp.KNO₃. Par ailleurs, sur des milieux homogènes contenant une concentration optimale en nitrate, nous avons montré que les GA régulaient le cycle cellulaire *via* la dégradation des protéines DELLA. Il a été démontré que les protéines DELLA interagissaient et séquestraient les facteurs de transcription TCP de classe I, et en conséquence inhibaient la division cellulaire et donc la croissance (Davière et al., 2014). De manière intéressante, TCP20 fait partie de la famille des TCP de classe I, et il a été démontré par double-hybride chez la levure, que ce dernier interagissait avec les DELLA (Davière et al., 2014). La formation du complexe TCP20-DELLA dans le méristème des racines pourrait jouer un rôle important dans le contrôle de la prolifération cellulaire en fonction de la disponibilité en nitrate au niveau local. De même, il sera important d'évaluer si cette réponse est dépendante de NPF6.3/NRT1.1, étant donné que ce transcepteur favorise la croissance des racines latérales dans les zones enrichies en nitrate (Mounier et al., 2014).

De manière surprenante, les niveaux d'accumulation de la protéine DELLA RGA dans les racines de plantes cultivées en hydroponie et soumises à des concentrations hétérogènes en nitrate, ne concordent pas avec les mesures de croissance racinaires réalisées sur des plantes cultivées en système « split-root » *in vitro*. En effet, en culture hydroponique, RGA est significativement plus abondant dans les racines de plantes cultivées en présence de nitrate (en condition homogène C.KNO₃ et hétérogène Sp.KNO₃) par rapport aux plantes cultivées sur un milieu déficient en nitrate (conditions C.KCl et Sp.KCl). Au contraire, les racines de plantes sauvages cultivées en système « split-root » *in vitro* sont plus longues en présence de nitrate (conditions C.KNO₃ et Sp.KNO₃) qu'en absence de nitrate (conditions C.KCl et Sp.KCl). Par ailleurs, les niveaux d'accumulation de RGA des plantes cultivées en hydroponie sont opposés entre les parties aériennes et les racines ; RGA étant moins abondant dans les feuilles de plantes cultivées sur milieu homogène (C.KNO₃) ou hétérogène (Split) que dans les racines. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces résultats.

L'analyse des niveaux d'accumulation de la protéine RGA a été réalisée sur des plantes cultivées en hydroponie alors que les mesures de croissance racinaire ont été effectuées sur des plantes cultivées en système « split-root » *in vitro*. En conséquence, l'âge des plantes (22 jours en condition *in vitro* versus 51 jours en hydroponie), les concentrations en KCl et KNO₃ utilisées (5 mM en *in vitro* versus 1 mM en hydroponie), la durée des traitements (4 jours en *in vitro* versus 2 jours en hydroponie) ainsi que la photopériode (jours longs en *in vitro* versus jours courts en hydroponie) soulignent les différences principales entre les deux expériences, et pourraient expliquer au moins en partie ces résultats, même s'il s'agit de conditions de culture standard (Ruffel et al., 2011, 2016; Poitout et al., 2018). Par ailleurs, il est important de noter que les analyses du niveau d'accumulation de RGA en condition hétérogène en nitrate (Figure 49) ont été réalisées sur des racines entières issues de plantes adultes cultivées en hydroponie. Étant donné que les GA/DELLA adaptent la croissance de la racine en fonction de la disponibilité en nitrate, en contrôlant essentiellement la prolifération cellulaire dans le méristème apical racinaire (Figure 6 du manuscrit du chapitre 1), il est possible que l'effet du nitrate sur l'abondance en RGA soit différent ou plus marqué dans le méristème, que dans le reste de la racine. L'utilisation de la lignée transgénique *pRGA:GFP-RGA* en système « split-root » *in vitro* et en hydroponie sera essentielle pour analyser la distribution spatiale de la protéine RGA dans les racines principales et latérales de plantes adultes exposées à une disponibilité hétérogène en nitrate.

Concernant les niveaux d'accumulation de RGA opposés en réponse au nitrate dans les feuilles et les racines, cette distinction peut être expliquée par une différence de sensibilité au nitrate entre ces deux organes. En effet, même si les mesures de croissance racinaire réalisées en système « split-root » *in vitro* semblent indiquer un rôle des protéines DELLA dans la signalisation locale en réponse au nitrate, nous ne pouvons pas exclure qu'un transport de GA ait lieu entre les racines et les feuilles, et inversement en réponse au nitrate. Ainsi, la quantification des GA (en cours), et plus particulièrement de la GA₁₂, dans les racines et les feuilles de plantes cultivées en système « split-root » devrait nous permettre de répondre à cette question. Par ailleurs, une lignée biosenseur de GA créée au laboratoire, permettant d'analyser la distribution spatiotemporelle des GA dans la plante, pourrait être très utile pour appréhender le rôle des GA dans l'adaptation des plantes à une disponibilité hétérogène en nitrate.

Les GA ont un rôle primordial dans la plasticité et l'adaptation des plantes aux variations de l'environnement, comme la disponibilité des éléments nutritifs tels que le fer et le phosphate. Dans ce premier chapitre nous avons mis en évidence le rôle des GA dans la régulation de la croissance des plantes en fonction de la disponibilité en nitrate. Chez *Arabidopsis*, lorsque le nitrate est disponible, la production de GA est activée et la GA₁₂ est transportée des racines

vers les feuilles où elle sera convertie en GA bioactives. En conséquence, les protéines DELLA sont dégradées *via* le protéasome, promouvant la division cellulaire et la croissance de la plante. Ces mécanismes sont conservés chez le blé. Le mécanisme par lequel le nitrate active la biosynthèse de GA reste cependant méconnu. De même, face à une disponibilité hétérogène en nitrate, le rôle des GA reste à être déterminé.

Chapitre 2

Étude du transport de GA₁₂ sur de longues-distances chez *Arabidopsis*

1. Introduction du chapitre 2

Dans le premier chapitre, nous avons mis en évidence une induction la biosynthèse des GA par le nitrate. Le transport de GA₁₂ des racines aux parties aériennes par le xylème s'accroît chez des plantes cultivées en milieu adéquate en nitrate (comparé en milieu pauvre), suggérant un lien entre le nitrate et le transport de GA. Le nitrate est distribué dans toute la plante par 4 familles de transporteurs dont la large famille de protéines membranaires, les NPF (NITRATE TRANSPORTER 1 / PEPTIDE TRANSPORTER FAMILY). La famille des NPF appartient à la superfamille de transporteurs actifs secondaires MFS (MAJOR FACILITATOR SUPERFAMILY), qui utilisent le gradient électrochimique des protons pour le transport du substrat dans la cellule (Parker et Newstead, 2014; Sun et al., 2014). Les NPF présentent également des homologues de séquences protéiques avec les familles de transporteurs de peptides chez les bactéries, les champignons ou les animaux, où plusieurs noms sont utilisés pour décrire ces protéines : POT (PROTON-COUPLED OLIGOPEPTIDE TRANSPORTER), PepT/PTR (PEPTIDE TRANSPORTER) et SLC15 (SOLUTE CARRIER 15) (Léran et al., 2014). La structure des NPF se compose de 12 domaines transmembranaires reliés par de courtes boucles peptidiques (Léran et al., 2014). 17 NPF, parmi les membres testés, transportent du nitrate, dont certains ont de multiples substrats comme les glucosinolates, l'ABA, l'auxine ou encore les GA (Chiba et al., 2015; Corratgé-Faillie et Lacombe, 2017). En effet NPF3.1 et NPF2.10 ont déjà été identifiés pour leur transport de GA bioactives (introduction, paragraphe 2.5), mais les transporteurs de GA₁₂, principale forme mobile des GA sur de longues distances chez *Arabidopsis* (Regnault et al., 2015), restent à être caractérisés.

Dans la plante, la GA₁₂ est transportée des racines aux parties aériennes par le xylème et inversement *via* le phloème (Regnault et al., 2015). La sève du xylème transporte principalement de l'eau et des sels minéraux absorbés par les racines (sève brute). Chez les angiospermes, le xylème est formé par des cellules mortes de deux types : les trachées et les trachéides. Les trachées sont des rangées de cellules alignées dont les parois transversales ont disparu (partiellement ou totalement), formant un tube pour le passage de la sève. Les parois des trachées sont épaissies par des dépôts de lignine, assurant ainsi un rôle de soutien. Les trachéides sont des cellules de petites tailles et dont la paroi contient peu de lignine. La sève du phloème distribue dans toute la plante les assimilats de la photosynthèse, des sucres

à partir d'organes « sources » comme les feuilles, vers les organes « puits » comme les racines ou les autres feuilles et fleurs (sève élaborée). Contrairement au xylème, les éléments conducteurs du phloème consistent en des tubes criblés constitués de cellules vivantes allongées (ayant perdues leur noyau et la plupart des organites) placées bout à bout dont les parois transversales sont perforées (appelées plages criblées ou perforations). Ces tubes criblés sont entourés de cellules compagnes, possédant un noyau et assurant les échanges de molécules avec les éléments conducteurs du phloème. Ainsi, le transport longue-distance de molécule par le xylème et le phloème nécessite leur chargement et déchargement par des transporteurs situés à proximité des vaisseaux conducteurs.

Dans la première partie de ce chapitre je me suis focalisée sur la famille de transporteur NPF, afin d'identifier des transporteurs de GA₁₂. Des études *in silico* et transcriptomiques réalisées précédemment au laboratoire ont permis d'isoler deux NPF candidats, NPF2.12 et NPF2.13. La capacité de transport de GA par ces deux NPF a été vérifiée en système hétérologue, puis *in planta*. Comme ces deux transporteurs sont également des transporteurs de nitrate, nous avons vérifié si ces deux molécules entraient en compétition pour leur transport ou si au contraire, un effet synergique existait entre ces deux molécules. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec deux autres laboratoires, celui du Dr. Eilon Shani à Tel-Aviv en Israël et celui du Dr. Hussam Hassan Nour-Eldin à Copenhague au Danemark.

Au cours de leur cycle de vie, la plasticité développementale des plantes repose sur la perception des signaux environnementaux tels que les changements de la qualité et la quantité de lumière, la température ou l'accès au nutriment. Les GA jouent un rôle essentiel dans la perception de ces signaux, afin d'optimiser la croissance et le développement des plantes (Colebrook et al., 2014). Plusieurs études ont montré le rôle des GA dans la thermomorphogénèse, définie comme les effets de changement de température sur le développement et la croissance des plantes. Une élévation de quelques degrés de la température ambiante entraîne une induction de gènes de biosynthèse des GA, conduisant à une stimulation de la croissance de la plante, notamment de l'hypocotyle et le pétiole des feuilles (introduction, paragraphe 2.7.1.1.) (Stavang et al., 2009; Casal et Balasubramanian, 2019). Le mouvement des GA entre les différents organes de la plante, des sites de productions aux tissus et organes en croissance, est essentiel pour coordonner le développement des plantes et les fluctuations de l'environnement (Binenbaum et al., 2018). Dans la deuxième partie de ce chapitre, je me suis donc intéressée au rôle du transport longue-distance de GA dans la stimulation de la croissance aérienne de la plante, en réponse à une augmentation de la température ambiante. Pour répondre à cette hypothèse, cette étude s'est appuyée sur de multiples expériences de micro-greffes, réalisées entre des mutants de

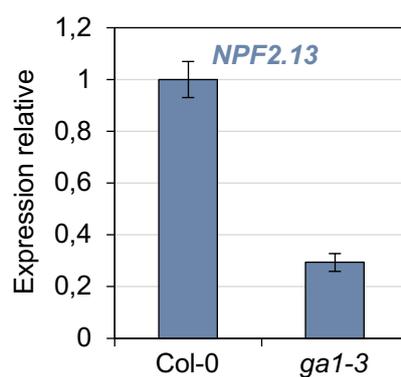


Figure 50. Analyse par RT-qPCR de l'expression de *NPF2.13*.

Analyse du niveau d'expression de *NPF2.13* par RT-qPCR sur des ARN totaux de jeunes tissus chlorophylliens de plantules *ga1-3*, comparé aux plantules sauvages (Col-0), âgées de 10 jours. L'erreur standard (moyenne de trois réplicats techniques) est indiquée. L'expérience a été reproduite deux fois avec des résultats similaires.

biosynthèse des GA et plantules sauvages soumises à deux températures ambiantes (20°C/28°C). Les niveaux d'accumulations des GA, déterminées par LC-MS/MS chez ces plantes greffées et dans le xylème, ont permis de mettre en évidence un rôle important du transport acropète de GA₁₂, soulignant une communication longue-distance pour optimiser la croissance d'organes distants, suivant les régimes de températures.

2. Partie 1 : Caractérisation des transporteurs NPF2.12 et NPF2.13

2.1. Résultats

2.1.1. Recherche de nouveaux NPF candidats

La recherche de nouveaux transporteurs de GA a été initiée par un précédent doctorant du laboratoire, Thomas Regnault. Thomas s'est basé sur la régulation transcriptionnelle de transporteurs de la famille des NPF et ABCG (ATP-BINDING CASSETTE TRANSPORTER SUBFAMILY G) par les GA. En effet, le niveau d'expression de certains gènes codant pour des composants clés de la signalisation GA, comme le récepteur GID1, sont régulés par les contenus en GA bioactives (introduction, paragraphe 2.3.6). Afin de sélectionner des transporteurs candidats, les profils d'expression de l'ensemble des gènes codant pour les transporteurs NPF et ABCG en réponse à un traitement au GA₃ sur des graines du mutant *ga1-3* (déficientes en GA), ont été analysés à partir de données publiques de microarrays (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). Ces analyses *in silico* ont permis de sélectionner 10 transporteurs de la famille NPF et 3 transporteurs de la famille ABCG, régulés positivement ou négativement par la GA₃ (Regnault, 2014). Les profils d'expression de ces gènes ont été par la suite validés par RT-qPCR chez des plantules mutantes *kao1 kao2* âgées de 7 jours, ne produisant pas de GA₁₂, et donc de GA bioactives. La régulation de l'expression de 8 des 10 transporteurs NPF présélectionnés, par les GA a été confirmée (Regnault, 2014). Parmi eux, nous avons retenu le transporteur NPF2.13, dont l'expression est induite chez le double mutant *kao1 kao2*. De manière surprenante, l'analyse du profil d'expression du gène NPF2.13 dans les tissus chlorophylliens chez le mutant *ga1-3* âgé de 10 jours, montre un résultat opposé au résultat préliminaire de Thomas, néanmoins reproductible, soit une diminution de son expression (Figure 50). Ainsi, les GA induiraient l'expression de NPF2.13. Il faut noter que NPF2.13 (anciennement nommé NRT1.7) demeure un candidat très intéressant puisqu'il a été décrit comme transporteur de nitrate, appartenant au système de transport de faible affinité pour le nitrate (LATS) (Fan et al., 2009). NPF2.13 importe le nitrate dans le phloème des vieilles feuilles et le redistribue aux jeunes feuilles, lorsque la plante est en situation de carence en azote (Figure 34) (Fan et al., 2009). L'activité de transport de GA de NPF2.13 a récemment été démontrée à l'aide d'un système double-hybride modifié en levure chez *Saccharomyces cerevisiae* (Chiba et al., 2015). Dans ce système double-hybride,

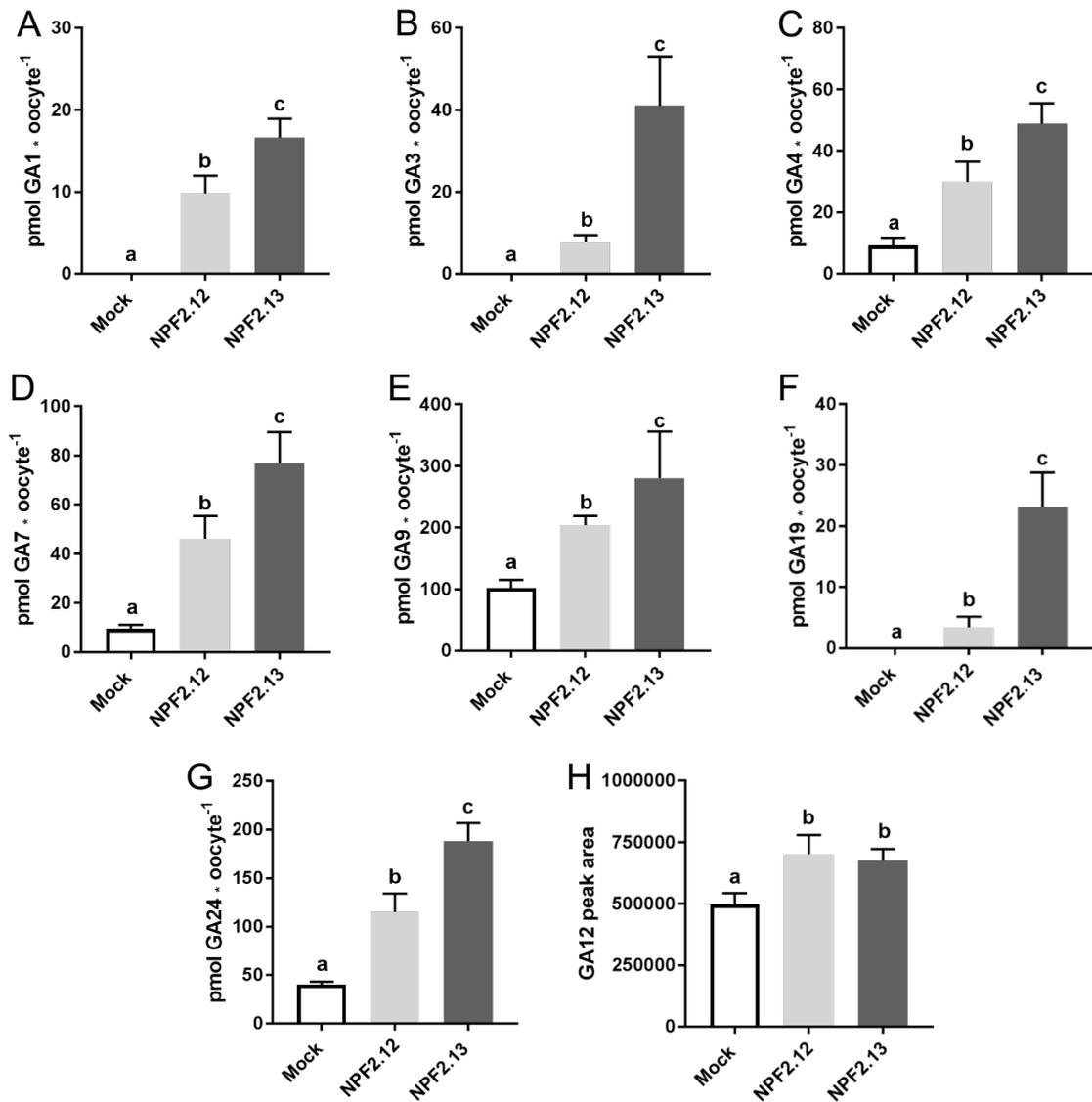


Figure 51. Transport de GA dans des oocytes de *Xenopus laevis* exprimant *NPF2.12* et *NPF2.13* (réalisé par Nikolai Wulff).

A à H. Les oocytes ont été incubés à **(A)** 50 μM GA₁ dans un tampon kulori pH 5 (n = 5 oocytes) ; **(B)** 50 μM GA₃ dans tampon kulori pH 5 (n = 5) ; **(C)** 50 μM GA₄ dans un kulori pH 5.5 (n = 5) ; **(D)** 50 μM GA₇ dans un tampon kulori pH 5.5 (n = 5) ; **(E)** 50 μM GA₉ dans un tampon kulori pH 6 (n = 5) ; **(F)** 50 μM GA₁₉ dans un tampon kulori pH 5 (n = 7) ; **(G)** 50 μM GA₂₄ dans un tampon kulori pH 5.5 (n = 6) et **(H)** 50 μM GA₁₂ dans un tampon kulori pH 6 (n = 5). La concentration en GA₁₂ n'a pas été normalisée par une courbe étalon. Les oocytes sont incubés avec les différents GA pendant 60 minutes à température ambiante puis, après différents lavages, analysés par LC-MS/MS. L'analyse statistique a été réalisée par une analyse ANOVA (one-way) suivie du test Holm Sidak, $p \leq 0,05$).

la levure exprime le récepteur des GA *GID1* fusionné au domaine de liaison à l'ADN de *GAL4* (*DBD-GID1*) et la protéine *DELLA GAI* fusionnée au domaine d'activation de *GAL4* (*AD-GAI*), ainsi que les transporteurs *NPF* testés. La levure est ensuite cultivée sur un milieu sélectif en présence des GA bioactives *GA*₁, *GA*₃ ou *GA*₄. L'expression d'un transporteur fonctionnel de GA permet l'entrée de GA bioactives dans la levure, qui stimulent l'interaction entre *DBD-GID1* et *AD-GAI*, reconstituant un facteur de transactivation fonctionnel, et conduit ainsi à la croissance de la levure sur ce milieu sélectif. À l'aide de ce système hétérologue, les auteurs ont montré que *NPF2.13* était capable d'importer les GA bioactives *GA*₁ et *GA*₃ (Chiba et al., 2015).

Au laboratoire, nous sommes intéressés par le transport longue-distance des GA par les tissus conducteurs, c'est-à-dire des parties aériennes aux racines et inversement. La *GA*₁₂ est la principale forme de GA transportée par le xylème et le phloème, assurant une communication entre les différents organes de la plante (Regnault et al., 2015). Dans le but de déterminer si *NPF2.13* était capable de transporter différentes formes de GA (dont la *GA*₁₂), des tests d'import de 8 formes de GA en oocytes de *Xenopus laevis* ont été réalisés par nos collaborateurs, Dr. Nikolai Wulff et Dr. Hussam Hassan Nour-Eldin de l'Université de Copenhague au Danemark (Figure 51). Ces tests confirment le rôle de *NPF2.13* dans l'import des GA bioactives *GA*₁ et *GA*₃ mais aussi des autres formes actives, *GA*₄ et *GA*₇ (Figure 51A, B, C et D). En dépit d'une diffusion passive importante, la *GA*₁₂ est également importée par *NPF2.13* dans les oocytes, comme d'autres précurseurs inactifs, tels que *GA*₁₉, *GA*₂₄ et *GA*₉. Des analyses phylogénétiques récentes, comparant les séquences protéiques des transporteurs *NPF*, ont révélé la présence d'un très proche homologue à *NPF2.13* chez *Arabidopsis*, *NPF2.12* (Léran et al., 2014). Nous nous sommes donc également intéressés à son activité de transport de GA. Tout comme *NPF2.13*, *NPF2.12* possède une activité d'import de GA (les mêmes formes) en système hétérologue, dans les oocytes de *Xenopus laevis* (Figure 51) mais aussi dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Chiba et al., 2015). De manière générale, l'activité de transport de GA de *NPF2.13* est plus importante que celle de *NPF2.12* (Figure 51). *NPF2.12* (anciennement nommé *NRT1.6*) est également un transporteur de nitrate, ayant une faible affinité pour ce substrat (Almagro et al., 2008).

2.1.2. *Patrons d'expression de NPF2.12 et NPF2.13*

Dans le but d'analyser les patrons d'expression de ces deux transporteurs *in planta*, nous avons généré des lignées exprimant les fusions transcriptionnelles *pNPF2.12:GUS* et *pNPF2.13:GUS*. Ces études ont été réalisées en collaboration avec Jenia Binenbaum et Dr. Eilon Shani de l'Université de Tel-Aviv en Israël, qui se sont principalement focalisés sur le transporteur *NPF2.12* et ont générés la lignée *pNPF2.12:GUS*. Étant donné que le gène

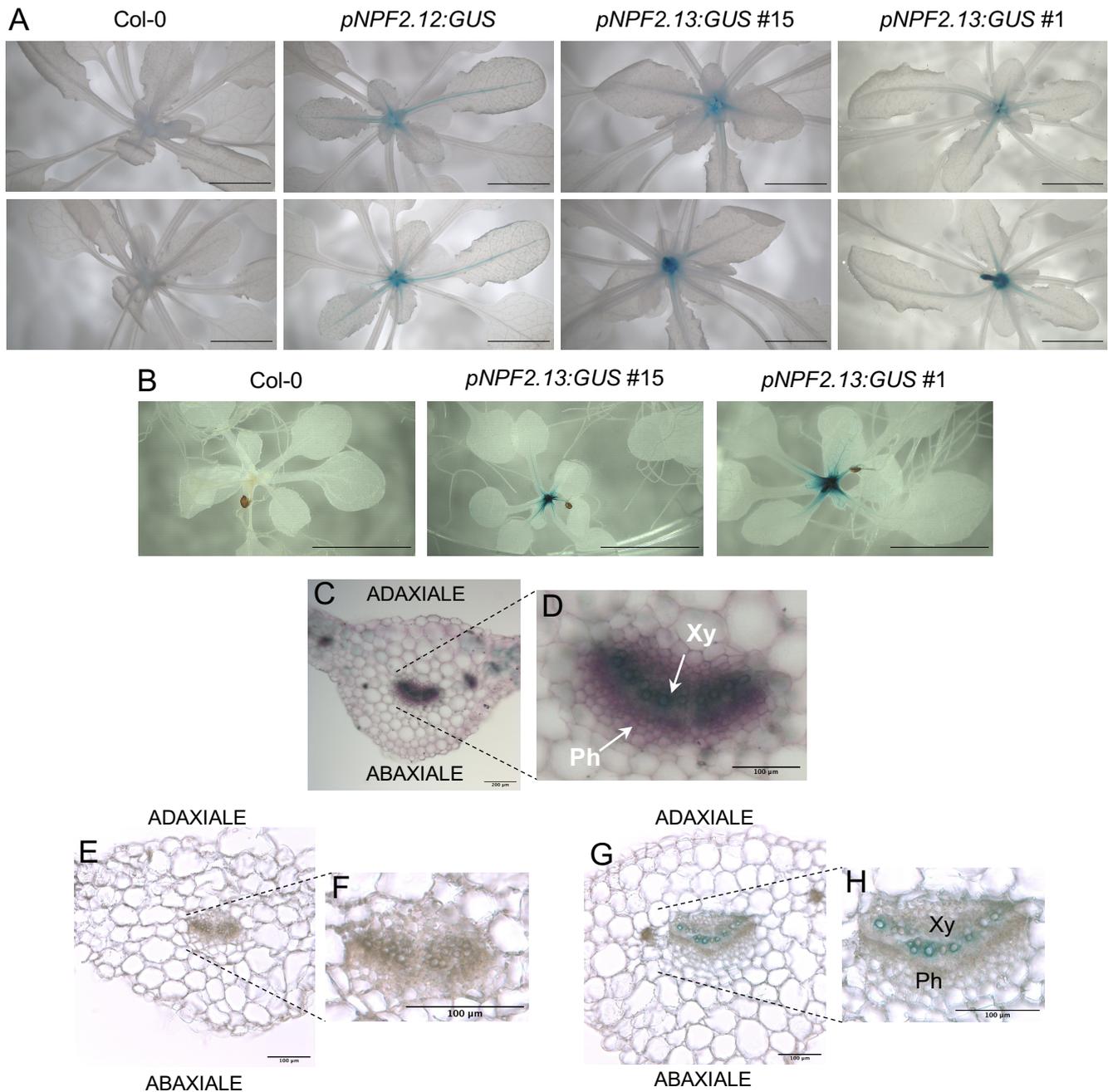


Figure 52. Patron d'expression des fusions transcriptionnelles *pNPF2.12:GUS* et *pNPF2.13:GUS*.

A-B. Analyse du patron d'expression des gènes *NPF2.12* et *NPF2.13* par coloration GUS dans les lignées *pNPF2.12:GUS*, *pNPF2.13:GUS #15* (1 insertion du transgène), *pNPF2.13:GUS #1* (≥ 1 insertion du transgène). **(A)** Images représentatives de rosettes de plantes âgées de 4 semaines cultivées en sol, vue supérieure/adaxiale (panel du haut), vue inférieure/abaxiale (panel du bas). Barre d'échelle = 0,5 cm. **(B)** Images représentatives de plantules âgées de 16 jours, cultivées *in vitro*. Barre d'échelle = 0,5 cm.

C-D. Coupe transversale d'un pétiole d'une feuille sauvage **(C)** Col-0 âgée de 4 semaines après une coloration au carmin-vert d'iode. Barre d'échelle = 200 μm . **(D)** Agrandissement des tissus conducteurs. Barre d'échelle = 100 μm .

E-F-G-H. Coupe transversale de 50 μm de pétiole de feuille sauvage (Col-0 ; **E-F**) et (*pNPF2.12:GUS* ; **G-H**) âgées de 4 semaines après coloration GUS. **F et H** représentent des agrandissements des tissus conducteurs issus de plante sauvage (Col-0) et *pNPF2.12:GUS* respectivement. Barre d'échelle = 100 μm .

Xy, xylème ; Ph, phloème.

NPF2.13 est faiblement exprimé, deux lignées *pNPF2.13:GUS* indépendantes ont été sélectionnées pour l'étude, comprenant une (lignée #15) ou deux insertions (lignée #1) du transgène, d'après les tests de ségrégation.

Les analyses de l'activité GUS chez ces lignées montrent que *NPF2.12* et *NPF2.13* ont un patron d'expression similaire dans les feuilles. Dans les rosettes de plantes âgées de 4 semaines, ces deux *NPF* sont exprimés dans les tissus conducteurs des pétioles des feuilles (Figure 52A, panel du haut), ainsi qu'au niveau de l'apex caulinaire (Figure 52A, panel du bas). La coloration GUS chez les plantes *pNPF2.12:GUS* est aussi localisée dans les veines des feuilles et semble plus forte que chez les plantes *pNPF2.13:GUS*. Comme attendu, l'activité GUS chez les plantes *pNPF2.13:GUS* #1 est plus visible dans les tissus conducteurs des pétioles des feuilles par rapport à la lignée *pNPF2.13:GUS* #15 (Figure 52A).

À un stade plus précoce, chez des plantules âgées de 16 jours, l'activité GUS dans les lignées *pNPF2.13:GUS* (lignées #1 et #15) est plus importante au niveau de l'apex caulinaire que chez les plantes âgées de 4 semaines (Figure 52B). Par ailleurs chez les plantules *pNPF2.13:GUS* #1, l'activité GUS est visible dans les veines des jeunes feuilles comparé aux plantules *pNPF2.13:GUS* #15. Enfin il n'y a pas de coloration GUS dans les racines des plantules *pNPF2.13:GUS* âgées de 16 jours, contrairement à l'expression de *pNPF2.12:GUS*, qui est détectée dans les racines (communication personnelle, Jenia Binenbaum).

NPF2.12 et *NPF2.13* sont donc exprimés dans les tissus conducteurs des feuilles. Pour avoir une localisation plus précise de leur site d'expression, des coupes transversales de pétioles ont été réalisées chez des plantes *pNPF2.12:GUS* âgées de 4 semaines, où l'activité GUS est la plus forte (Figure 52A). La coloration au carmin-vert d'iode permet de mettre en évidence les cellules du xylème et de phloème. En effet, le vert d'iode colore la lignine en vert (comme les cellules du xylème) et le carmin colore la cellulose en rose (comme les cellules du phloème et du mésophylle). Ainsi, les coupes transversales effectuées dans les pétioles des feuilles de plantes sauvages de 4 semaines montrent que le xylème est situé au-dessus du phloème (Figure 52C et D). Les coupes transversales, réalisées par Lali Achard, dans les pétioles des feuilles *pNPF2.12:GUS* semblent indiquer que la coloration GUS est plutôt localisée autour des cellules du xylème (Figure 52E, F, G et H). Cependant, le niveau de résolution n'étant pas suffisant pour valider ce résultat, il sera nécessaire de reproduire cette analyse pour confirmer ou infirmer ce résultat.

Il est important de noter que ces résultats pour les patrons d'expression de *NPF2.12* et *NPF2.13* sont en désaccord avec ceux précédemment publiés (Almagro et al., 2008; Fan et al., 2009). En effet, il a été rapporté que *NPF2.12* serait strictement exprimé dans les fleurs et

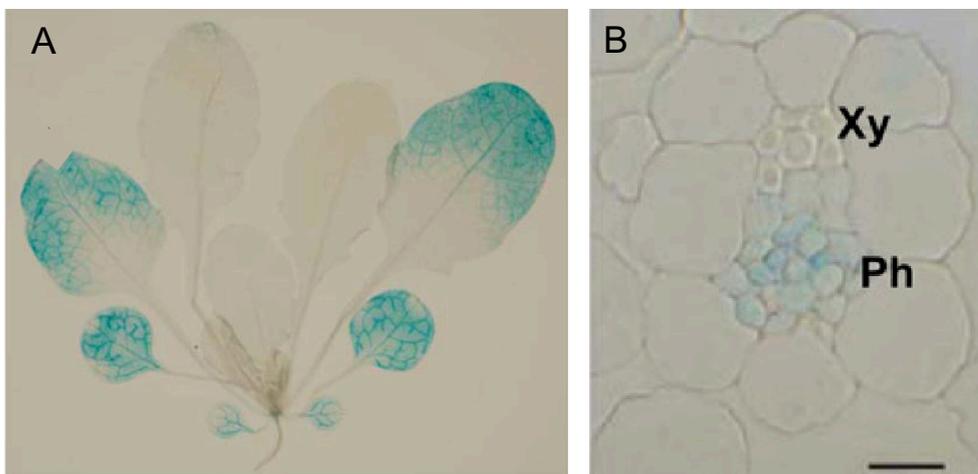


Figure 53. Patron d'expression de *NRT1.7* (*NPF2.13*) chez des plantes *pNRT1.7:GUS* (d'après Fan et al., 2009).

A. Analyse histochimique de l'activité GUS de plantes âgées de 28 jours.

B. Coupe transversale d'une 'veine' mineure de feuilles, Xy, xylème ; Ph, phloème.

Barre d'échelle = 10 μ m.

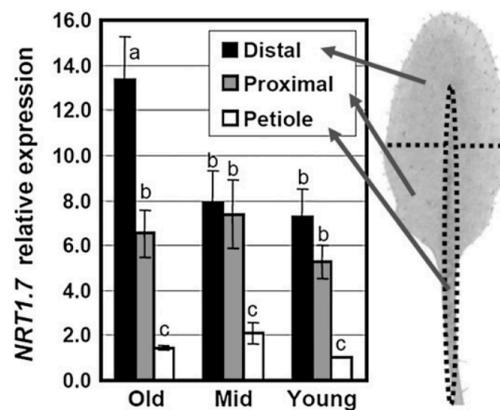


Figure 54. Analyse par RT-qPCR de l'expression de *NRT1.7* (*NPF2.13*) (Fan et al., 2009).

Des jeunes, matures et vieilles feuilles issues de plantes sauvages (Col-0) âgées de 23 jours sont segmentées en 3 parties : zone distale, zone proximale et le pétiole. Les niveaux d'expression relatifs de *NRT1.7* dans chaque feuille et zone sont déterminés par RT-qPCR puis normalisés à ceux de l'*UBQ10*. Les valeurs représentent les moyennes de 4 réplicats biologiques \pm s.d. Les lettres indiquent des différences significatives ($p < 0,01$).

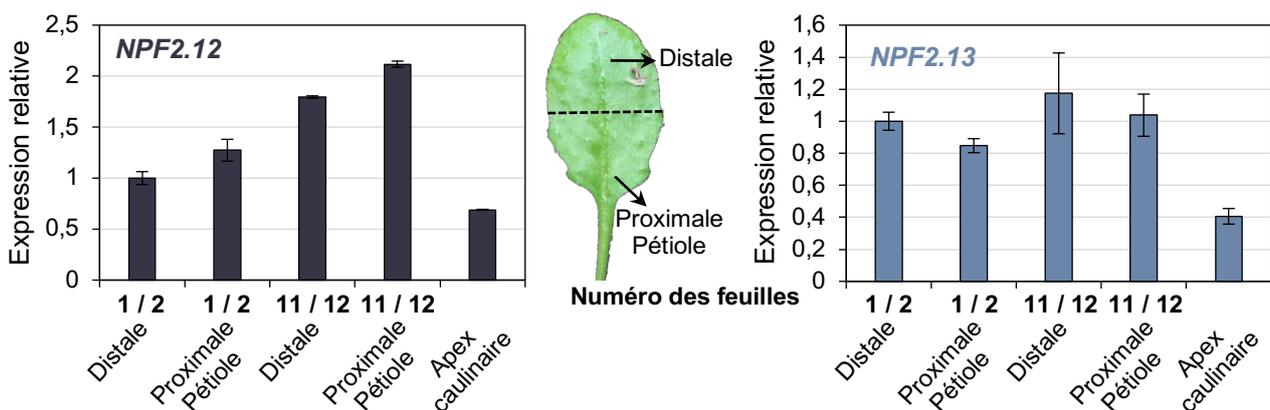


Figure 55. Analyse par RT-qPCR de l'expression de *NPF2.12* et *NPF2.13* dans les feuilles.

Analyse de l'expression des gènes *NPF2.12* et *NPF2.13* dans l'apex caulinaire et la partie distale et proximale/pétiole de vieilles feuilles (feuilles n°1 et 2) et de jeunes feuilles (feuilles n°11 et 12) de plantes sauvages (Col-0). L'expression (n=15) de *NPF2.12* et *NPF2.13* est normalisée par rapport au gène de référence *TIP4.1*, et la condition « feuilles 1 et 2 / partie distale » est fixée arbitrairement à 1. L'erreur standard (moyenne de trois réplicats techniques) est indiquée. Cette analyse a été réalisée une fois.

les siliques (Almagro et al., 2008). Concernant *NPF2.13*, l'étude de l'activité GUS réalisée à partir d'une lignée *pNRT1.7/NPF2.13:GUS* âgées de 4 semaines, rapportée par Fan et al. (2009), montre une forte coloration GUS dans les vieilles feuilles, plus particulièrement dans la partie distale de la feuille (Figure 53A). De plus, il n'y a pas d'activité GUS au niveau du pétiole des feuilles et du méristème apical. D'après les auteurs, *pNRT1.7:GUS* est exprimé au niveau des cellules compagnes du phloème (Figure 53B). Cette différence en terme de coloration GUS observée entre leur lignée et celle générée au laboratoire, pourrait être liée à la taille du promoteur cloné. En effet, la taille du promoteur de *NRT1.7/NPF2.13* cloné par Fan et al. (2009) est plus petite de 400 pb (1,3 kb au lieu de 1,7 kb pour notre construction). Il est probable que le promoteur cloné par Fan et al. (2009) ne contienne pas toutes les régions régulatrices.

Fan et al. (2009) ont également analysé le profil d'expression de *NRT1.7/NPF2.13* par RT-qPCR dans des feuilles de différents âges prélevées sur des rosettes de plantes âgées de 23 jours, en séparant la partie distale, proximale et le pétiole de la feuille prélevée (Figure 54). Leurs résultats montrent que l'expression de *NRT1.7/NPF2.13* est très forte dans la partie distale des vieilles feuilles puis diminue au niveau du pétiole. *NRT1.7/NPF2.13* est deux fois moins exprimé dans la partie distale et proximale des jeunes feuilles et son expression reste très faible dans le pétiole (Figure 54). Les profils d'expression de *NRT1.7/NPF2.13* concordent donc avec les colorations GUS réalisées à partir de la lignée *pNRT1.7:GUS* générée par les auteurs.

Pour valider ces résultats qui sont différents de ceux que j'ai obtenu avec notre lignée *pNPF2.13:GUS*, j'ai également comparé les profils d'expression par RT-qPCR, des deux transporteurs *NPF2.12* et *NPF2.13* dans les vieilles feuilles (les deux premières feuilles formées ; feuilles n°1 et 2) et jeunes feuilles (les feuilles n° 11 et 12) ainsi qu'au niveau de l'apex caulinaire de rosettes de plantes sauvages âgées de 4 semaines (Figure 55). Chaque feuille est coupée en deux, pour séparer la partie distale de la partie proximale de la feuille comprenant également le pétiole. Cette expérience préliminaire montre que l'expression de *NPF2.13* est identique entre les vieilles et les jeunes feuilles dans les parties distales ou proximales. Son expression est plus faible dans l'apex caulinaire comparée à celle dans la partie distale des vieilles feuilles (Figure 55). *NPF2.12* est plus exprimé dans la partie distale et proximale des jeunes feuilles par rapport aux vieilles feuilles. Comme pour *NPF2.13*, son expression est réduite dans l'apex caulinaire comparée à la partie distale des vieilles feuilles. Par ailleurs, l'expression de *NPF2.12* tend à être supérieure à *NPF2.13* dans les jeunes feuilles (Figure 55). Pris dans leur ensemble, ces analyses préliminaires du patron d'expression des gènes *NPF2.12* et *NPF2.13* dans les rosettes de plantes sauvages âgées de 4 semaines sont en accord avec les observations GUS faites à partir de nos lignées

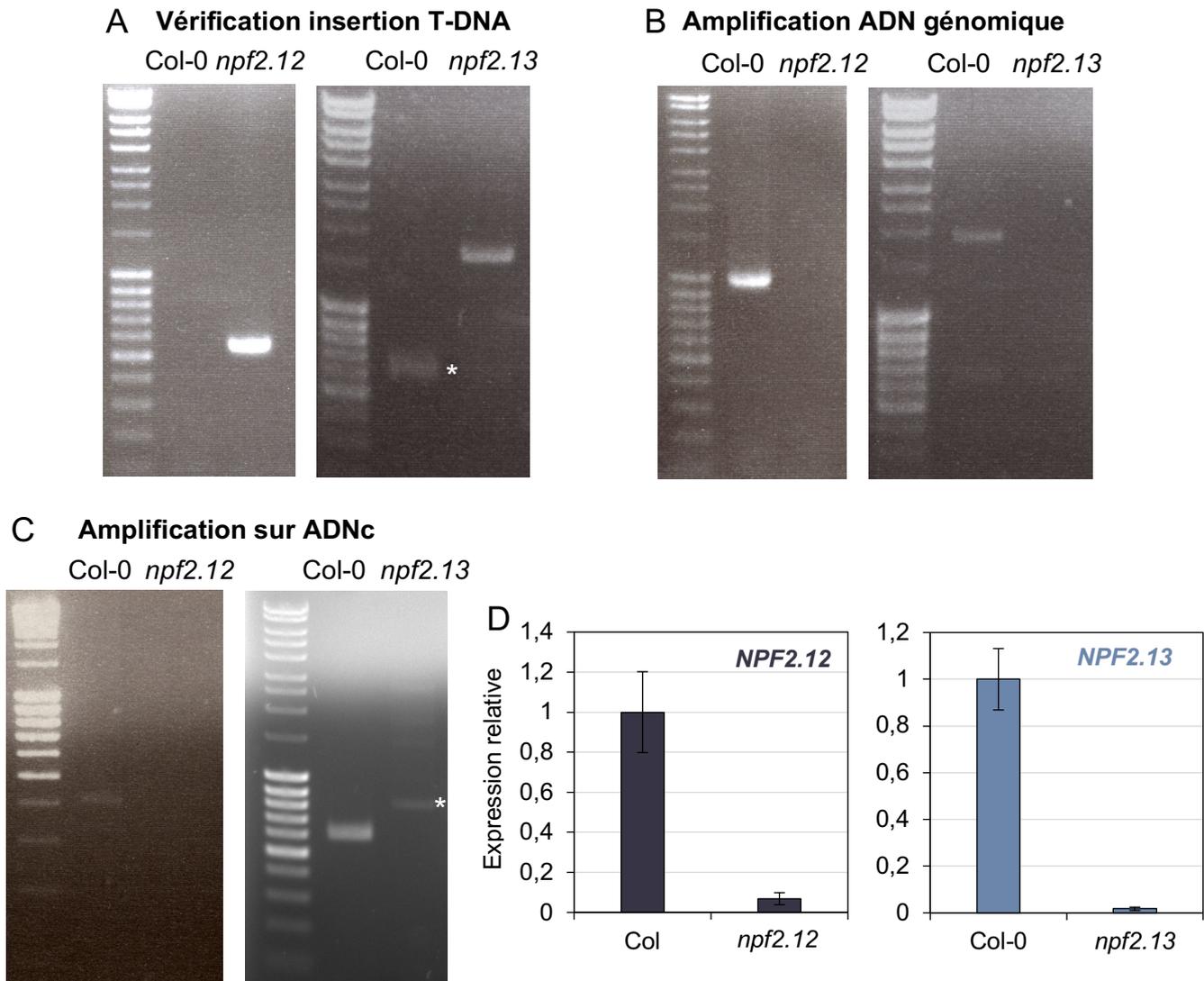


Figure 56. Validation génétique des mutants *npf2.12* (SALK_138987) et *npf2.13* (SALK_022429).
A. Vérification par PCR de la présence du T-DNA dans les gènes *NPF2.12* et *NPF2.13* à l'aide d'amorces spécifiques. *bande aspécifique.
B. Amplification par PCR des gènes *NPF2.12* et *NPF2.13* à partir d'ADN génomique issu de plantes sauvages (Col-0) et des mutants *npf2.12* et *npf2.13*.
C. Amplification par PCR des gènes *NPF2.12* et *NPF2.13* à partir d'ADNc issu d'ARN rétrotranscrits de plantes sauvages (Col-0) et des mutants *npf2.12* et *npf2.13*. *bande aspécifique.
D. Analyse du niveau d'expression relatif des gènes *NPF2.12* et *NPF2.13* dans leur mutant respectif en comparaison à la plante sauvage (Col-0) par RT-qPCR. L'erreur standard (moyenne de trois réplicats techniques) est indiquée.

pNPF2.12:GUS et *pNPF2.13:GUS*, et contrastent avec celles obtenues et rapportées par Almagro et al. (2008) et Fan et al. (2009).

En se basant sur ces résultats préliminaires, il est difficile de conclure sur la localisation tissulaire précise de NPF2.12 et NPF2.13 dans les feuilles. Néanmoins, il est clair que ces deux transporteurs sont exprimés dans les tissus conducteurs des feuilles. Pour vérifier si NPF2.13 est localisé dans les cellules compagnes du phloème, nous avons généré des lignées de fusion traductionnelle *pNPF2.13:NPF2.13:VENUS* et nos collaborateurs s'intéressent à la localisation précise de NPF2.12.

2.1.3. *NPF2.12 et NPF2.13 sont des transporteurs de GA chez Arabidopsis*

2.1.3.1. *Génération et analyse de mutants *npf2.12* et *npf2.13**

Afin de déterminer le rôle *in vivo* de NPF2.12 et NPF2.13 pour le transport de GA, les simples mutants d'insertion T-DNA correspondants ont été obtenus. Le mutant d'insertion T-DNA *npf2.12* (SALK_138987) nous a été envoyé par Dr Eilon Shani et le mutant d'insertion T-DNA *npf2.13* (SALK_022429) est originaire de la collection du NASC. Après avoir vérifié l'insertion des T-DNA et les pertes de fonction de ces deux NPF (Figure 56), les deux simples mutants ont été croisés pour obtenir le double mutant *npf2.12 npf2.13*. Des tests de ségrégation ont permis d'isoler des lignées homozygotes pour les deux mutations. Le simple mutant *npf2.13* a également été croisé avec le mutant de biosynthèse des GA *ga1-3*. Le double mutant *ga1-3 npf2.13* a été sélectionné de manière identique au double mutant *npf2.12 npf2.13*. Les croisements et sélections des mutants *ga1-3 npf2.12* et *ga1-3 npf2.12 npf2.13* sont en cours.

Il est important de noter que les paramètres morphologiques des mutants *npf2.13* (Regnault, 2014), *npf2.12* et *npf2.12 npf2.13* (non montrés) sont semblables à celui d'une plante sauvage. Ces observations suggèrent que le transport de GA n'est pas altéré par l'absence de NPF2.12 et NPF2.13, et que d'autres transporteurs redondants, compensent leur perte d'activité.

2.1.3.2. *NPF2.12 et NPF2.13 facilitent le transport basipète de GA₁₂*

Afin de démontrer *in planta* que NPF2.12 et NPF2.13 ont un rôle dans le transport de GA, le double mutant *npf2.12 npf2.13* et son contrôle Col-0 ont été cultivés pendant 12 jours sur un milieu MS standard *in vitro*. Comme *NPF2.13* est induit par une carence en nitrate (Fan et al., 2009), les plantules âgées de 12 jours ont été transférées sur des milieux pauvres en nitrate (0,5 mM NO₃⁻) et contenant 1 µM de paclobutrazol (PAC), un inhibiteur de la biosynthèse des

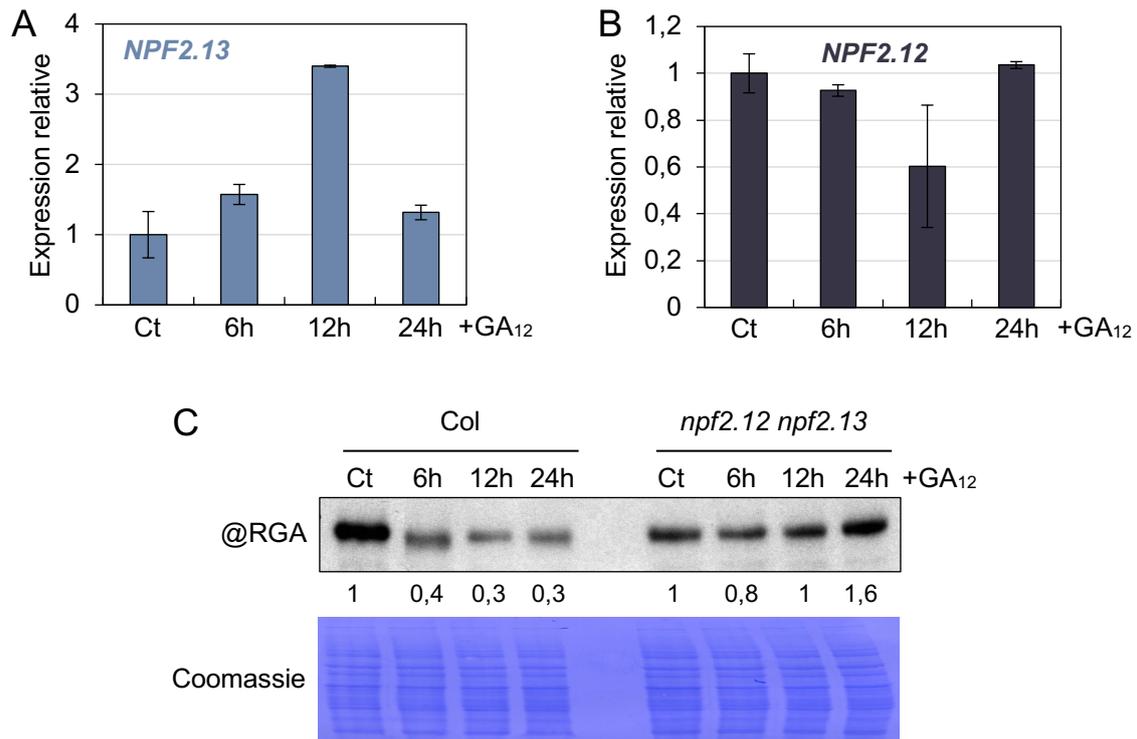


Figure 57. NPF2.12 et NPF2.13 facilitent le transport de GA₁₂ des 1ère feuilles formées vers les racines.

A-B-C. Les plantules sauvages (Col-0) et mutantes *npf2.12 npf2.13* sont cultivées sur milieu MS Agar pendant 12 jours puis transférées sur un milieu pauvre en nitrate (0,5 mM NO₃⁻) contenant 1 μM de paclobutrazol (PAC ; inhibiteur de biosynthèse de GA). A 16 jours, une goutte de 5 μL de GA₁₂ (1 μM) est déposée sur l'une des deux premières feuilles formées, et les racines sont collectées 6h, 12h et 24h après le dépôt. Une goutte de 5 μL de méthanol à 0,01% est déposée sur des feuilles contrôles (Ct). 12 plantes par points de cinétique et pour chaque génotype ont été analysées.

A-B. Analyse par RT-qPCR de l'expression de *NPF2.13* (**A**) et *NPF2.12* (**B**) dans les feuilles sauvages (Col-0) en contact avec la goutte de GA₁₂ déposée. L'expression des deux *NPF* est normalisée par rapport au gène de référence *TiP4.1* et le point contrôle (Ct) est fixé arbitrairement à 1. L'erreur standard (moyenne de trois réplicats techniques) est indiquée.

C. Immuno-détection de la protéine RGA dans les racines des plantules sauvages (Col-0) et mutantes *npf2.12 npf2.13* après l'ajout de GA₁₂. L'intensité des bandes est normalisée avec la quantité en protéines totales colorées au bleu de Coomassie. Des résultats similaires ont été obtenus dans deux expériences indépendantes.

GA. Quatre jours après le transfert, une goutte de GA₁₂ (5 µL à 1 µM) a été déposée sur l'une des deux premières feuilles formées et les racines de ces plantes ont été prélevées 6h, 12h et 24h après l'ajout de GA₁₂. Pour contrôle, l'expression de *NPF2.12* et *NPF2.13* dans les feuilles sauvages (Col-0) traitées avec la GA₁₂ a été vérifiée par RT-qPCR (Figure 57A et B). Comme attendu et précédemment démontré (Figure 50), l'expression de *NPF2.13* est induite au cours du temps avec un pic d'expression à 12h après l'ajout de GA₁₂ (Figure 57A). Il est important de noter que l'expression de *NPF2.13* est régulée par la photopériode (Fan et al., 2009), ainsi l'augmentation de l'expression de *NPF2.13* observée dans mon expérience pourrait-être la conséquence du traitement au GA₁₂ mais aussi de la photopériode. Au contraire, l'expression de *NPF2.12* reste relativement stable après l'ajout de GA₁₂ (Figure 57B). Par la suite, j'ai suivi par Western blot les niveaux d'accumulation de RGA dans les racines des plantules sauvages et du double mutant *npf2.12 npf2.13* (Figure 57C). Chez les plantules sauvages, l'accumulation de RGA diminue 6h après l'ajout de GA₁₂, tandis qu'en absence de *NPF2.12* et *NPF2.13* (chez le mutant *npf2.12 npf2.13*), les niveaux d'accumulation de RGA restent stables après l'ajout de GA₁₂ (Figure 57C). Ces résultats suggèrent que *NPF2.12* et *NPF2.13* facilitent le transport basipète de GA₁₂, des feuilles vers les racines où celles-ci sont converties en GA bioactives et stimulent la dégradation de la protéine DELLA RGA.

Pour confirmer ce résultat, la même approche a été entreprise avec le double mutant *ga1-3 npf2.13* et son contrôle, le mutant *ga1-3*, cultivés en sol pendant 4 semaines (Figure 58). Comme ces deux mutants ne produisent pas de GA, pour initier leur développement, les jeunes plantes ont été traitées deux fois par pulvérisation avec de la GA₃ (100 µM), deux semaines avant le dépôt de GA₁₂ (7 µL à 1 µM). Comme lors de l'expérience précédente, l'expression de *NPF2.13*, dans les feuilles traitées avec la GA₁₂, est induite et atteint un pic 12h après l'ajout de GA₁₂ (Figure 58A). Les niveaux d'accumulation de RGA dans les jeunes feuilles ont aussi été analysés par Western blot. En absence de *NPF2.13* (chez le mutant *ga1-3 npf2.13*), l'accumulation de RGA reste stable après l'ajout de GA₁₂. Au contraire, chez le mutant *ga1-3*, le niveau d'accumulation de RGA dans les jeunes feuilles diminue entre 6h et 12h après l'ajout de GA₁₂ (Figure 58B). Ainsi, ce résultat montre que *NPF2.13* facilite le transport de GA₁₂ des vieilles feuilles vers les jeunes feuilles.

2.1.3.3. La concentration de GA₁₂ dans le phloème diminue chez le mutant *npf2.12 npf2.13*

Dans le but d'analyser si *NPF2.12* et *NPF2.13* facilitaient la translocation de GA₁₂ endogènes (synthétisées par la plante) dans le phloème, la sève élaborée de plantes sauvages (Col-0) et

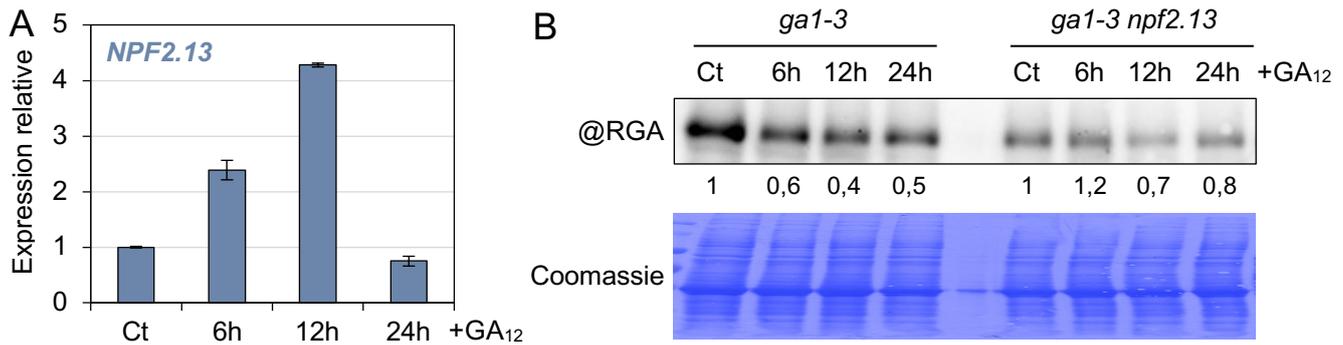


Figure 58. NPF2.13 facilite le transport de GA₁₂ des vieilles feuilles vers les jeunes feuilles.

A-B. Les plantes mutantes *ga1-3* et *ga1-3 npf2.13* sont cultivées pendant 4 semaines en sol. Une goutte de 7 μ L de GA₁₂ (1 μ M) est déposée sur l'une des deux premières feuilles formées, et les jeunes feuilles sont collectées 6h, 12h et 24h après le dépôt. Une goutte de 7 μ L de méthanol à 0,01% est déposées sur des feuilles contrôles (Ct). 10 plantes par points de cinétique et pour chaque génotype ont été analysées.

(A) Analyse par RT-qPCR de l'expression de *NPF2.13* dans les feuilles *ga1-3* en contact avec la goutte de GA₁₂. L'expression de *NPF2.13* est normalisée par rapport au gène de référence *TIP4.1* et le point contrôle (Ct) est fixé arbitrairement à 1. L'erreur standard (moyenne de trois réplicats techniques) est indiquée.

(B) Immuno-détection de la protéine RGA dans les jeunes feuilles des plantes mutantes *ga1-3* et *ga1-3 npf2.13* après l'ajout de GA₁₂. L'intensité des bandes est normalisée avec la quantité en protéines totales colorées au bleu de Coomassie. Des résultats similaires ont été obtenu dans deux expériences indépendantes.

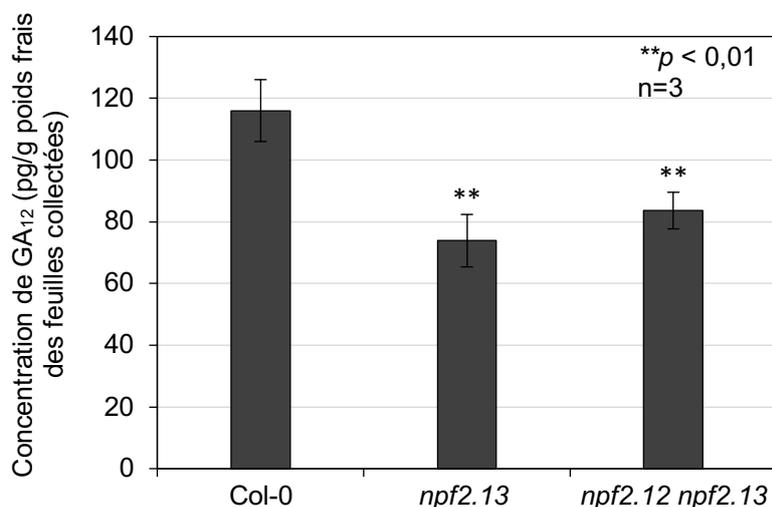


Figure 59. NPF2.12 et NPF2.13 transportent la GA₁₂ dans le phloème.

La concentration en GA₁₂ (pg/g de poids frais des feuilles collectées) est déterminée par LC-MS/MS dans le phloème de feuilles de plantes sauvages (Col-0) et mutantes *npf2.13* et *npf2.12 npf2.13* âgées de 5 semaines. Les plantes sont cultivées pendant 3 semaines sur un substrat perlite/vermiculite supplémenté une fois par semaine avec une solution nutritive contenant 10mM KNO₃. Pour induire l'expression de *NPF2.13*, les plantes ont été supplémentées avec une solution nutritive sans azote (10 mM KCl) une semaine avant le prélèvement du phloème. Les concentrations de GA₁₂ sont des moyennes de trois réplicats biologiques. Les exsudats de phloème sont prélevés à partir de 75 feuilles par génotype. Les astérisques indiquent des différences significatives pour les mutants *versus* Col-0 (***p* < 0,01, test t de Student).

des mutants *npf2.13* et *npf2.12 npf2.13* âgés de 5 semaines a été collectée au niveau des pétioles de feuilles adultes (Figure 59). Les plantes ont été cultivées sur perlite/vermiculite supplémentées une fois par semaine avec une solution nutritive contenant 10 mM NO₃⁻ pendant 3 semaines, puis la semaine précédant le prélèvement, avec une solution nutritive ne contenant aucune source d'azote. Les concentrations en GA₁₂ ont été déterminées par LC-MS/MS, en collaboration avec Julie Zumsteg et Dr Dimitri Heintz de la plate-forme métabolomique de l'institut (IBMP Strasbourg). Les résultats obtenus montrent que la concentration en GA₁₂ dans les exsudats de phloème des mutants *npf2.13* et *npf2.12 npf2.13* est significativement réduite de 37% et 28% respectivement, par rapport aux plantes sauvages (Figure 59). Ces résultats confirment les tests d'import de GA₁₂ *in vitro* et démontrent que NPF2.12 et NPF2.13 importent la GA₁₂ dans le phloème des feuilles.

2.1.3.4. L'absence de NPF2.12 et NPF2.13 restreint le transport de GA chez des plantes greffées

Afin d'étudier l'importance de NPF2.12 et NPF2.13 pour le transport endogène de GA, des expériences de micro-greffes ont été réalisées chez *Arabidopsis* par Dr Patrick Achard entre le mutant de biosynthèse des GA *ga1-3*, les simples mutants *npf2.12* et *npf2.13*, le double mutant *npf2.12 npf2.13* et les contrôles respectifs (Figure 60). Les micro-greffes sont réalisées à partir de plantules âgées de 6 jours au niveau de leur hypocotyle, de sorte que les racines forment le porte-greffe et le reste de la plantule, le greffon. Les mesures de croissance racinaire ont été effectuées 4 jours après la micro-greffe. La nomenclature des combinaisons de greffes utilisée correspond à : génotype du porte-greffe / génotype du greffon. Lorsque le porte-greffe et le greffon ne produisent pas de GA (*ga1-3/ga1-3*) la croissance racinaire par jour est fortement affectée (en comparaison de la combinaison contrôle Col/Col). À l'inverse, lorsque les tissus chlorophylliens produisent des GA mais pas les racines (*ga1-3/Col*), la croissance racinaire est restaurée et est statistiquement identique aux plantules greffées contrôles Col/Col, *npf2.12/npf2.12*, *npf2.13/npf2.13*, *npf2.12 npf2.13/npf2.12 npf2.13* (Figure 60). Ces greffes mettent en évidence un transport basipète de GA, des parties aériennes de la plantule vers les racines. Chez les plantules greffées ne produisant pas de GA dans les racines (*ga1-3*) et mutées pour NPF2.12 ou NPF2.13 dans les parties aériennes (chez les greffes *ga1-3/npf2.12*, *ga1-3/npf2.13* et *ga1-3/npf2.12 npf2.13*), la croissance racinaire diminue de façon significative par rapport aux greffes *ga1-3/Col* (Figure 60). Ces expériences confirment que NPF2.12 et NPF2.13 participent au transport basipète des GA. Cependant, le fait que la croissance racinaire des plantules greffées *ga1-3/npf2.12 npf2.13* soit plus importante que celle des plantules contrôles *ga1-3/ga1-3*, suggère l'existence d'autres transporteurs de GA présentant une activité redondante à NPF2.12 et NPF2.13.

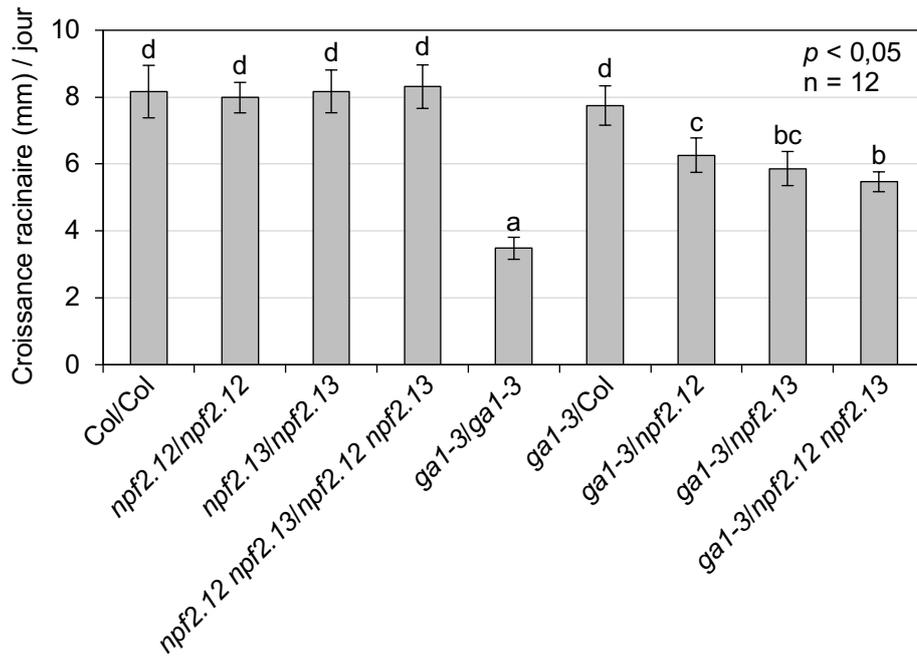


Figure 60. NPF2.12 et NPF2.13 participent au transport basipète des GA.

Croissance racinaire pendant 24h (moyennes \pm s.d., n=12 plantules), de plantules greffées Col/Col, *npf2.12/npf2.12*, *npf2.13/npf2.13*, *npf2.12 npf2.13/npf2.12 npf2.13*, *ga1-3/ga1-3*, *ga1-3/Col*, *ga1-3/npf2.12*, *ga1-3/npf2.13*, *ga1-3/npf2.12 npf2.13*, 4 jours après la greffe. La nomenclature des greffes correspond à : porte-greffe/greffon. Les différentes lettres sur les graphes indiquent des différences significatives ($p < 0,05$, ANOVA (one way) suivie du test de comparaisons multiples de Tukey). Cette expérience a été réalisée une à deux fois selon les génotypes.

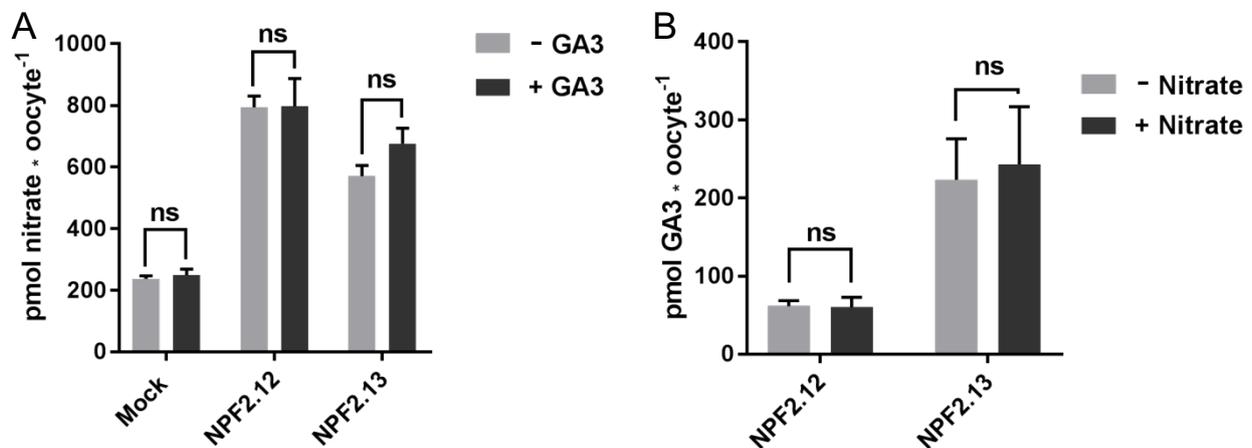


Figure 61. Évaluation d'une compétition entre le transport de GA₃ et de nitrate par NPF2.12 et NPF2.13 (réalisé par Nikolai Wulff).

A-B. Les oocytes ont été incubés avec 5 mM nitrate seul, 50 μ M GA₃ seule, ou 5 mM nitrate et 50 μ M GA₃ combinés, dans un tampon kulori, pH 4.5, pendant 60 minutes, à température ambiante. Après plusieurs étapes de lavages, les contenus en nitrate sont analysés dans 5 oocytes par HPLC. Les contenus en GA₃ sont analysés dans 7 oocytes par LC-MS/MS. L'analyse statistique (n=3 réplicats biologiques) est réalisée par une analyse ANOVA (two-way) suivie du test Holm Sidak, $p \leq 0,05$). ns, non significatif.

Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que NPF2.12 et NPF2.13, localisés au niveau des tissus conducteurs des feuilles, facilitent la translocation de GA₁₂ dans le phloème, pour être transportée dans tous les organes puits de la plante et activer leur croissance après conversion en GA bioactives. Ces deux transporteurs ont des activités redondantes puisque la restriction de croissance observée chez les plantules greffées *ga1-3/npf2.12* et *ga1-3/npf2.13* est identique. Par ailleurs ces greffes mettent en évidence que d'autres transporteurs peuvent compenser en partie (ou contribuer à) l'absence de NPF2.12 et NPF2.13.

2.1.4. Compétition entre le transport de GA₃ et le nitrate par NPF2.12 et NPF2.13

En plus de leur activité de transport du nitrate (Almagro et al., 2008; Fan et al., 2009), nous avons démontré que NPF2.12 et NPF2.13 transportaient diverses formes de GA, en système hétérologue et *in planta*. D'autres NPF sont connus pour avoir comme substrat à la fois une phytohormone et le nitrate, comme NPF6.3/NRT1.1, qui transporte de l'auxine et du nitrate, ou NPF4.6 qui transporte de l'ABA et du nitrate (Krouk et al., 2010a; Kanno et al., 2012). De manière intéressante, alors qu'une compétition entre le transport d'auxine et celui du nitrate a été mise en évidence pour NPF6.3, l'ABA et le nitrate n'entrent pas en compétition pour leur transport médié par NPF4.6 (Krouk et al., 2010a; Kanno et al., 2013). Ainsi, afin de déterminer si les GA et le nitrate entraient en compétition pour leur transport médié par NPF2.12 et NPF2.13, des tests d'import en système hétérologue avec de la GA₃ et du nitrate ont été réalisés par nos collaborateurs Dr. Nikolai Wulff et Dr. Hussam Hassan Nour-Eldin, en utilisant des oocytes de *Xenopus laevis* (Figure 61). Pour ce faire, des oocytes exprimant NPF2.12 et NPF2.13 ont été incubés avec des concentrations optimales de NO₃⁻ (5 mM) et/ou GA₃ (50 μM), puis après plusieurs lavages, les contenus en nitrate et GA₃ incorporés ont été analysés (Figure 61A et B). Cette expérience montre que l'import de nitrate par NPF2.12 et NPF2.13 n'est pas compromis par la présence de GA₃ (Figure 61A). De même, le transport de GA₃ par NPF2.12 et NPF2.13 n'est pas altéré par le nitrate (Figure 61B). Ces résultats, bien que préliminaires, suggèrent que la GA₃ et le nitrate ne sont pas en compétition pour leur transport, en système hétérologue. Ces expériences nécessiteront toutefois d'être répétées avec de la GA₁₂, et les constantes de Michaelis-Menton (Km) de NPF2.12 et NPF2.13 pour les GA devront être déterminées. Une validation *in planta* de ces résultats est en cours.

2.2. Discussion

La famille des NPF, composée de 53 membres, transporte de multiples substrats comme le nitrate, les glucosinolates, l'ABA, l'auxine et les GA (Corratgé-Faillie et Lacombe, 2017). Notamment, deux membres de cette famille (NPF3.1 et NPF2.10) transportent des GA bioactives localement, au sein d'un organe (Saito et al., 2015; Tal et al., 2016; David et al., 2016). Cependant, les transporteurs de GA₁₂, principale forme de GA mobile sur de longues distances chez *Arabidopsis* (Regnault et al., 2015), demeuraient inconnus. Suite à une analyse *in silico* basée sur la régulation transcriptionnelle de transporteurs NPF par les GA, deux nouveaux candidats ont été sélectionnés, NPF2.12 et NPF.13.

Les tests d'imports, réalisés par Dr Nikolai Wulff, chez les oocytes de *Xenopus laevis* ont montré que NPF2.12 et NPF2.13 transportaient au moins 8 formes de GA différentes dont les formes bioactives GA₁, GA₃, GA₄ et GA₇, ainsi que les précurseurs inactifs GA₁₂, GA₁₉, GA₂₄ et GA₉. Cependant, certaines formes de GA présentent une forte capacité de diffusion passive à travers la membrane plasmique des oocytes. Nos collaborateurs ont corrélé le caractère diffusible d'une GA par rapport au nombre d'atome d'oxygène de la molécule, indépendamment de leur position (Wulff et al., 2019). Ainsi, une GA possédant au moins 6 atomes d'oxygène comme les GA₁, GA₃ et GA₁₉, diffusent très peu à travers la membrane de l'oocyte, quel que soit le pH externe. Au contraire, la GA₉ et la GA₁₂, qui ne possèdent que 4 atomes d'oxygènes, montrent un caractère diffusible accrue lorsque le pH externe est faible (pH 5) (Wulff et al., 2019). En conséquence, étant donné que l'augmentation du pH externe permet de réduire la diffusion, les tests d'import pour ces deux formes de GA ont été effectués à un pH de 6 (Figure 51). Sachant que le pH de l'apoplasme varie entre 5 et 6,1 et que le pH du cytoplasme est d'environ de 7,5 (Boursiac et al., 2013), et que la capacité de diffusion à travers les membranes plasmiques de la GA₁₂ est élevée à pH faible, nous pouvons nous interroger sur la nécessité qu'a la plante de mobiliser des transporteurs pour l'import de GA₁₂ dans la cellule. Cependant, l'ABA qui est aussi un acide faible présentant une forte capacité de diffusion à travers la membrane plasmique, requière différents transporteurs appartenant à la famille des ABCG et des NPF pour son transport (Boursiac et al., 2013). La présence de transporteurs permettrait de délivrer une quantité optimale d'ABA dans les cellules cibles et induire la signalisation ABA, constituant ainsi un niveau de régulation supplémentaire (en plus de la synthèse d'ABA) pour ajuster la concentration d'ABA au sein d'un tissu, notamment en cas de stress (Boursiac et al., 2013). Enfin, il est important de noter que les conditions expérimentales utilisées en oocytes ne reflètent pas nécessairement les conditions physiologiques *in planta*. Ainsi, l'import ou l'export de GA₁₂ dans des cellules cibles ou les

tissus conducteurs seraient un avantage non négligeable pour la plante, lui permettant d'optimiser sa croissance en fonction des conditions environnementales.

Nous pouvons également nous demander comment NPF2.12 et NPF2.13 reconnaissent comme substrat des molécules aux structures différentes ? En effet, si toutes les GA partagent un squelette carboné commun de 19 à 20 atomes de carbones, l'*ent-gibbérellone*, elles possèdent aussi des groupements spécifiques qui les différencient (Figure 3 et 8). Le même constat a été effectué pour NPF2.10 et NPF2.11 qui transportent de nombreuses formes de glucosinolates (composés de défense chez les plantes), qui présentent des chaînes latérales d'acides aminés variables (Nour-Eldin et al., 2012; Jørgensen et al., 2017). Il a été récemment proposé que les NPF possédaient un site de liaison au substrat qui acceptait une large flexibilité dans la structure qu'ils reconnaissent, comme pour les GA et les glucosinolates (Wulff et al., 2019). Ainsi, la recherche d'acides aminés impliqués dans la reconnaissance du substrat (les GA) par le transporteur (le site de liaison) est essentielle. Cette étude a été conduite par le laboratoire du Dr Hussam Hassan Nour-Eldin (Wulff et al., 2019). La structure des NPF, commune à tous les membres des MFS (MAJOR FACILITATOR SUPERFAMILY), consiste en 2 faisceaux à 6 hélices, reliés par une longue boucle cytosolique. L'interface entre les deux faisceaux contient les acides aminés qui interagissent avec le substrat et donc définissent leur spécificité. Jusqu'à ce jour, seule la structure du transporteur NPF6.3/NRT1.1 a été déterminée et montre que le repliement global de cette protéine est similaire à celui des POT (PROTON-COUPLED OLIGOPEPTIDE TRANSPORTER), chez les bactéries (Parker et Newstead, 2014; Sun et al., 2014). Wulff et al., (2019) ont donc fondé leur étude sur la structure de plusieurs membres de la famille des transporteurs POT, proches homologues des NPF, pour sélectionner les acides aminés potentiellement exposés au substrat. Les auteurs ont ainsi comparé cette signature en acides aminés présents chez les NPF transportant les GA (dont NPF2.12 et NPF2.13) à celle des NPF ne transportant pas les GA. Par ailleurs, les propriétés physicochimiques de ces acides aminés spécifiques pour la liaison entre le transporteur et le substrat ont été déterminées (Wulff et al., 2019). L'ensemble de ces analyses ont révélé que 4 acides aminés conservés chez une partie des NPF transportant des GA, étaient importants pour la reconnaissance des GA. Cependant, tous les NPF ayant pour substrat les GA ne partagent pas ces 4 acides aminés, ainsi il a été proposé que les GA pouvaient être reconnues de manière différente selon le type de NPF (Wulff et al., 2019). Une autre hypothèse avancée, repose sur un transport de GA sans présence de sites spécifiques de fixation au NPF. En effet, la majorité des substrats des NPF identifiés, possèdent un ou plusieurs groupement(s) donnant une charge négative à la molécule transportée, suffisante pour ancrer le substrat à une charge positive au niveau du site de liaison du NPF et activer son transport (Wulff et al., 2019).

Nous avons par la suite étudié le patron d'expression de *NPF2.12* et *NPF2.13* chez *Arabidopsis*, en collaboration avec Jenia Binenbaum et Dr. Eilon Shani. Les lignées de fusion transcriptionnelle *pNPF2.12:GUS* et *pNPF2.13:GUS* montrent que ces deux transporteurs sont exprimés au niveau des vaisseaux conducteurs présents dans le pétiole des feuilles et au niveau de l'apex caulinaire de plantes âgées de 16 jours et 4 semaines (Figure 52A et B). *NPF2.12* serait également exprimé dans les racines contrairement à *NPF2.13*. Les colorations GUS ont été confirmées par RT-qPCR dans les feuilles de plantes âgées de 4 semaines, et montrent que *NPF2.12* est davantage exprimé dans les jeunes feuilles comparé aux vieilles feuilles, alors que *NPF2.13* (bien que plus faiblement exprimé que *NPF2.12*) présente une expression semblable indépendante de l'âge des feuilles (Figure 55). La coloration GUS intense de *NPF2.12* et *NPF2.13*, visible chez les plantules au niveau de l'apex caulinaire, pourrait refléter une proximité accrue des vaisseaux conducteurs au niveau de l'initiation des organes. Les colorations GUS ont été effectuées uniquement à des stades végétatifs, il sera donc intéressant de réaliser de nouvelles observations, après l'induction de la floraison, dans les tiges des lignées *pNPF2.12:GUS* et *pNPF2.13:GUS*. Des coupes transversales réalisées dans le pétiole d'une feuille de la lignée *pNPF2.12:GUS* semblent indiquer une localisation de *NPF2.12* autour des cellules du xylème. Cependant, ce résultat très préliminaire reste à être confirmé.

Il est important de noter que nos résultats divergent avec ceux obtenus par Almagro et al. (2008) et Fan et al. (2009). En effet, selon leurs analyses, *NPF2.12* serait uniquement exprimé dans les fleurs et siliques et *NPF2.13/NRT1.7* dans les cellules compagnes du phloème, dans la partie distale des vieilles feuilles de plantes âgées de 4 semaines. Malgré ces différences, il est certain que *NPF2.12* et *NPF2.13* sont exprimés au niveau des tissus conducteurs des feuilles. Cependant, nous devons vérifier la localisation précise de *NPF2.12* et *NPF2.13*, c'est-à-dire si ces transporteurs se localisent principalement à proximité du xylème ou du phloème. Étant donné que nos collaborateurs Jenia Binenbaum et Dr. Eilon Shani se concentrent sur *NPF2.12*, nous avons fait le choix d'étudier la localisation de *NPF2.13*. Afin de confirmer sa localisation, nous avons généré des lignées de fusion traductionnelle *pNPF2.13:NPF2.13-VENUS* dans le fond génétique du mutant *npf2.13*. L'aniline bleu pourra être utilisée pour marquer les plages criblées des cellules du phloème et par microscopie confocale, nous pourrions déterminer la localisation précise de *NPF2.13* (Hsu et Tsay, 2013). Il faut noter, que la même séquence du promoteur de *NPF2.13* a été utilisée pour générer les lignées *pNPF2.13:GUS* et *npf2.13 pNPF2.13:NPF2.13-VENUS*. Ainsi, la fonctionnalité de la construction (et donc du promoteur *pNPF2.13*) pourra être vérifiée par des expériences de micro-greffes réalisées entre un porte-greffe *ga1-3* (ne produisant pas de GA) et un greffon de génotype *npf2.13 pNPF2.13:NPF2.13-VENUS*. Si le promoteur *pNPF2.13* est fonctionnel, la croissance racinaire sera restaurée, similaire à la combinaison *ga1-3/Col* (Figure 60).

Même si les localisations précises de NPF2.12 et NPF2.13 doivent être confirmées, nos analyses *in planta* ont été initialement basées sur l'étude publiée par Fan et al. (2009), montrant que NPF2.13 était localisée dans les cellules compagnes du phloème, dans la partie distale des vieilles feuilles. Afin de déterminer le rôle des NPF dans le transport de GA *in planta*, nous avons quantifié la GA₁₂ dans le phloème de feuilles adultes de plantes sauvages et mutantes *npf2.13* et *npf2.12 npf2.13* (Figure 59). Ces analyses indiquent que la concentration en GA₁₂ est moins importante dans le phloème des feuilles des plantes mutantes *npf2.13* et *npf2.12 npf2.13*, comparée à celle mesurée chez les plantes sauvages. Par ailleurs la concentration en GA₁₂ dans le phloème est identique entre les deux mutants *npf2.13* et *npf2.12 npf2.13*. Ce dernier résultat suggère que l'absence combinée de NPF2.12 et NPF2.13 n'altère pas plus significativement le transport de GA₁₂ dans le phloème que le simple mutant *npf2.13*. Néanmoins, les tests d'import en oocytes montrent une activité de transport de GA₁₂ similaire pour NPF2.12 et NPF2.13 (Figure 51). Ainsi, il serait intéressant de déterminer la concentration de GA₁₂ dans le phloème de feuilles de plantes mutantes *npf2.12*, et la comparer à celle retrouvée chez le simple mutant *npf2.13*.

Pour confirmer que NPF2.12 et NPF2.13 participaient bien au transport basipète de GA, des expériences de micro-greffes ont également été réalisées, entre des racines (porte-greffe) ne produisant pas de GA (*ga1-3*) et des greffons sauvages (Col-0) ou mutées pour *NPF2.12* et/ou *NPF2.13* (*npf2.12*, *npf2.13*, *npf2.12 npf2.13*). La croissance racinaire de ces plantules a été mesurée 4 jours après la greffe (Figure 60). Chez les plantules greffées *ga1-3/Col*, la croissance racinaire est identique aux plantules greffées contrôles Col/Col, montrant de manière attendue, que les GA synthétisées dans les greffons sont transportées vers les racines déficientes en GA et restaurent leur croissance. Chez les plantules greffées *ga1-3/npf2.12* et *ga1-3/npf2.13*, la croissance racinaire est significativement réduite par rapport aux plantules greffées *ga1-3/Col* (Figure 60). Ces résultats indiquent que NPF2.12 et NPF2.13 participent au transport basipète de GA et démontrent que ces deux transporteurs ont des activités redondantes. Par ailleurs, la restriction de croissance racinaire observée chez les plantules (double mutant) greffées *ga1-3/npf2.12 npf2.13* ne se distingue pas de celle des plantules (simple mutant) greffées *ga1-3/npf2.12* et *ga1-3/npf2.13*, de manière consistante aux concentrations de GA₁₂ retrouvées dans le phloème des plantes *npf2.13* et *npf2.12 npf2.13* (Figure 59), même si les plantes n'ont pas le même âge. Cependant la croissance racinaire des plantules greffées *ga1-3/npf2.12 npf2.13* reste supérieure à celle des plantules greffées *ga1-3/ga1-3* (Figure 60), suggérant l'existence d'autres transporteurs possédant une activité redondante à NPF2.12 et NPF2.13.

Plusieurs études sur les NPF montrent que les simples mutants ne présentent pas de phénotypes particuliers (Binenbaum et al., 2018), lié probablement à une compensation

partielle ou totale médiée par d'autres transporteurs. Aussi, en raison de leur grand nombre et de leurs fortes similitudes de séquences, il est raisonnable de supposer qu'il existe une redondance génétique très importante au sein de la famille des NPF mais également avec d'autres familles de transporteurs (Binenbaum et al., 2018). Pour citer un exemple, des mutants simples *npf2.10* et *npf2.11*, affectés dans le transport de glucosinolates, ne présentent pas de phénotypes marqués, alors que l'accumulation de ces composés est réduite fortement dans les graines, chez le double mutant *npf2.10 npf2.11* (Nour-Eldin et al., 2012). Dans notre étude, il semblerait que ce ne soit pas aussi marqué. En effet, les analyses morphologiques effectuées chez le mutant *npf2.13* ne montrent pas de phénotype particulier (Regnault, 2014), mais les expériences de micro-greffes réalisées avec les simples mutants *npf2.12*, *npf2.13* et le double mutant *npf2.12 npf2.13* montrent d'une part une redondance fonctionnelle entre ces deux NPF et d'autre part que d'autres transporteurs, membres ou pas de la famille des NPF, pourraient être impliqués dans le transport basipète des GA. La principale limitation à l'identification de nouveaux transporteurs de GA, ou autres phytohormones, par la génétique classique est la redondance fonctionnelle des transporteurs. Aujourd'hui, il est possible d'inhiber l'expression de familles de gènes (par exemple, ceux codant pour des transporteurs) par la stratégie des microARNm (amiR) ou de créer des mutations par CRISPR/Cas9, afin d'obtenir des mutants hypomorphes ou nuls, respectivement (Binenbaum et al., 2018). Ainsi, suite à la création d'une collection de mutants amiR ciblant différentes familles de transporteurs (« transportome ») (Zhang et al., 2018a), deux nouveaux transporteurs d'auxine (ABCB6 et ABCB20) ont été identifiés. L'utilisation de cette nouvelle collection d'amiR pourrait être utilisée afin d'identifier de nouveaux transporteurs de GA. Enfin, il est important de noter que la famille des NPF n'est pas la seule à avoir été identifiée comme transporteurs de GA. En effet, il a été démontré que les protéines SWEET13 et SWEET14 transportaient également les GA au niveau des inflorescences (Kanno et al., 2016). La famille des transporteurs SWEET est surtout connue pour son rôle dans le transport de diverses formes de sucres comme les hexoses, fructoses ou sucrozes (Eom et al., 2015). Certains membres, comme SWEET11 et SWEET12, sont essentiels au chargement des sucres dans le phloème par les sucrose transporters SUTs (Chen et al., 2012). Ainsi, il est possible que d'autres membres de la famille SWEET facilitent le transport basipète de GA. Il serait alors intéressant de tester l'activité d'import de GA en système hétérologue pour tous les membres de cette famille de transporteurs, ou de sélectionner de multiples mutants d'insertion regroupant divers membres et analyser leur phénotype par micro-greffe, comme nous l'avons précédemment effectué avec NPF2.12 et NPF2.13.

Comme indiqué précédemment, les NPF transportent une large variété de substrats, comme le nitrate et les phytohormones (Corratgé-Faillie et Lacombe, 2017). Ainsi, un même

transporteur peut avoir plusieurs substrats différents, comme NPF6.3/NRT1.1 qui transporte le nitrate et l'auxine ou NPF2.10 qui transporte des GA, des glucosinolates et le nitrate (Krouk et al., 2010a; Nour-Eldin et al., 2012; Saito et al., 2015). NPF2.12 et NPF2.13, caractérisés initialement *in planta*, pour le transport de nitrate (Almagro et al., 2008; Fan et al., 2009), ont la capacité de transporter différentes formes de GA, notamment en système hétérologue. Cette aptitude à transporter diverses molécules telles que les GA et le nitrate soulève la question d'une possible compétition dans leur transport. Pour vérifier cette hypothèse, des tests d'import de GA₃ et de nitrate ont été effectués en système hétérologue chez les oocytes de *Xenopus laevis*. Les résultats préliminaires montrent que l'import de GA₃ n'est pas altéré par la présence de nitrate, et inversement (Figure 61). Ainsi, le nitrate et la GA₃ ne seraient pas en compétition pour leur transport, au moins dans ce système hétérologue. Il convient d'étendre l'analyse avec d'autres formes de GA notamment la GA₁₂, qui est transportée sur de longues distances. Afin de réfuter ou conforter la mise en évidence d'une compétition *in vivo* entre le nitrate et les GA pour leur transport, des tests d'import de GA et de nitrate seront effectués dans des protoplastes d'*Arabidopsis*. Par ailleurs, des plantules sauvages et mutantes *npf2.12 npf2.13* seront cultivées sur des milieux supplémentés avec des concentrations croissantes en nitrate et GA₁₂ afin de mesurer la croissance racinaire et de l'hypocotyle, à 7 et 10 jours après germination. Enfin, NPF2.12 et NPF2.13 ont une affinité faible pour le nitrate, avec un Km d'environ 6 mM pour NPF2.12 et d'environ 2,8 mM pour NPF2.13, mais leur affinité pour les GA est inconnue et devra être déterminée. Cela permettra d'une part de mesurer la spécificité de NPF2.12 et NPF2.13 pour les GA et d'autre part, de comparer les affinités respectives de ces transporteurs, aux GA et nitrate.

La dernière interrogation concerne le rôle biologique de ce transport. Fan et al. (2009) proposent que lors d'une carence en azote, le rôle de NPF2.13 consiste à remobiliser le nitrate stocké dans les vieilles feuilles *via* le phloème vers les jeunes feuilles, afin de soutenir la croissance des nouveaux organes. Ainsi, en se basant sur ce résultat, lors d'une carence en azote, NPF2.13 faciliterait le transport de GA₁₂ des vieilles feuilles vers les jeunes organes puits (jeunes feuilles, racines), pour stimuler leur croissance. Cette fonction peut sembler surprenante puisque la biosynthèse des GA a lieu principalement dans les tissus et organes en croissance. Cependant, comme montré au chapitre 1, la biosynthèse des GA est réprimée lors d'une déficience en nitrate. Il serait donc possible que la plante optimise le développement de ses jeunes tissus (en particulier le système racinaire) en remobilisant le pool de GA₁₂ stocké ou accumulé dans les feuilles matures, lorsque la disponibilité en nitrate diminue. Néanmoins, à ce stade de l'étude, et aux vues des discordances sur la localisation précise de NPF2.13 (et NPF2.12) obtenue par notre laboratoire et celui du Dr Tsay, il est difficile d'avancer une fonction précise du transport de GA₁₂ médiée par ces deux NPF. Il sera nécessaire de

compléter notre étude et de réévaluer celle réalisée par Fan et al. (2009), pour définir sans ambiguïté la localisation de ces transporteurs, leur niveau d'expression (organe/tissu-spécifique), et définir les fonctions biologiques associées au transport de GA₁₂ médié par NPF2.12 et NPF2.13 lors de conditions fluctuantes en azote.

En conclusion, dans cette partie 1 du chapitre 2, nous avons caractérisé deux nouveaux transporteurs de GA en système hétérologue et *in planta*, NPF2.12 et NPF2.13. Ces deux protéines, identifiées initialement comme des transporteurs de nitrate, sont localisées à proximité des tissus conducteurs et participent au transport basipète de GA, et notamment la GA₁₂. Les niveaux d'expressions de *NPF2.12* et *NPF2.13* en réponse à diverses conditions azotées (carence ou condition optimale), la localisation tissulaire précise de ces transporteurs, ainsi que leur fonction biologique restent cependant à être définis.

3. Partie 2 : Rôle du transport acropète de GA₁₂ en réponse à une élévation de la température ambiante

Manuscrit soumis à *Nature Plants* :

Root-derived GA₁₂ contributes to temperature-induced shoot growth in *Arabidopsis*

Lucie Camut^{1,2}, Thomas Regnault^{1,2,3}, Lali Sakvarelidze-Achard¹, Esther Carrera⁴, Julie Zumsteg¹, Dimitri Heintz¹, Nathalie Leonhardt⁵, Maria João Pimenta Lange⁶, Theo Lange⁶, Jean-Michel Davière¹ and Patrick Achard^{1*}

¹Institut de biologie moléculaire des plantes, CNRS, Université de Strasbourg, 67084 Strasbourg, France.

²LC and TR contributed equally to this work.

³Current address: Plant Advanced Technologies, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

⁴Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, CSIC-UPV, 46022 Valencia, Spain.

⁵Aix Marseille Univ, CEA, CNRS, BIAM, Laboratoire de Biologie du Développement des Plantes, Saint Paul-Lez-Durance, France F-13108.

⁶TU Braunschweig, Institut für Pflanzenbiologie, 38106 Braunschweig, Germany.

Dans ce manuscrit, j'ai participé aux expériences de biologie moléculaire.

Root-derived GA₁₂ contributes to temperature-induced shoot growth in *Arabidopsis*

Lucie Camut^{1,2}, Thomas Regnault^{1,2,3}, Lali Sakvarelidze-Achard¹, Esther Carrera⁴, Julie Zumsteg¹, Dimitri Heintz¹, Nathalie Leonhardt⁵, Maria João Pimenta Lange⁶, Theo Lange⁶, Jean-Michel Davière¹ and Patrick Achard^{1*}

¹Institut de biologie moléculaire des plantes, CNRS, Université de Strasbourg, 67084 Strasbourg, France.

²LC and TR contributed equally to this work.

³Current address: Plant Advanced Technologies, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

⁴Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, CSIC-UPV, 46022 Valencia, Spain.

⁵Aix Marseille Univ, CEA, CNRS, BIAM, Laboratoire de Biologie du Développement des Plantes, Saint Paul-Lez-Durance, France F-13108.

⁶TU Braunschweig, Institut für Pflanzenbiologie, 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

Plants are able to perceive small differences in temperature, and adjust their metabolic and developmental processes accordingly. This coordination requires the transmission of signaling molecules that move throughout the plant body. Here we report that root-derived GA₁₂, a precursor of the bioactive gibberellins (GA), mediates thermo-responsive shoot growth in *Arabidopsis*. Our findings provide a new understanding of how plants adapt their growth in response to ambient temperature changes.

In plants, roots and shoots perpetually communicate to optimize their growth in response to changing environment. For example, a small increase in ambient temperature has a profound impact on plant morphology, including increased elongation of roots and hypocotyls, hyponastic growth and accelerated flowering¹⁻³. Although root-derived signals have long been known to influence shoot development, the contribution of these signals to temperature-induced shoot growth is more elusive.

Gibberellins (GA) are phytohormones that regulate various growth processes, such as seed germination, elongation growth and flowering, in response to endogenous and environmental signals^{4,5}. GA promote growth by stimulating the degradation of nuclear growth-repressing DELLA proteins⁶, providing a mechanism for environmentally responsive growth regulation. Notably, diverse studies have pointed out a role for GA signaling in temperature-sensing pathways. Whereas warmer temperatures enhance GA biosynthesis gene expression^{7,8}, lack of DELLA activity accelerates flowering at lower temperatures³. Thus, changes in GA distribution have important effect on plant adaptation to fluctuating temperatures. Although GA are essentially produced near their site of action, they can also be transported over long-distances through the vascular bundles, enabling distant organs to communicate and adapt their growth throughout plant development^{9,10}. This latest observation prompted us to test whether root-to-shoot transport of GA is required for the increased shoot growth at high temperature.

To investigate this possibility, we examined the behavior of reciprocal grafts between *Arabidopsis* wild-type (Col-0) and GA-deficient mutant (*gal-3*) at 20° and 28°C (Fig. S1a-c). Strikingly, whereas the rosettes of Col-0 self-grafts grown at 28°C were larger to those grown at 20°C, the rosette radius of wild-type scions grafted onto *gal-3* rootstocks (*gal-3*/Col-0 grafts) was smaller at 28°C (Fig. 1a and Fig. S1b). Moreover, the diameter of three-week-old *gal-3* rosettes grafted onto wild-type rootstocks (Col-0/*gal-3* grafts) was significantly larger at 28°C than at 20°C (Fig. 1b and Fig. S1c). Thus, root-derived GA contribute substantially to the shoot growth promotion triggered by high temperature. Remarkably, we found that *ga20ox1-2-3* triple mutant rootstocks, which can produce GA₁₂, but cannot convert it into GA₁₅ and following products¹¹ (Fig. S1a), were also able to increase the growth of *gal-3* grafted scions at high temperature (Fig. 1a,b and Fig. S1b,c); consistent with the premise that GA₁₂ acts as a long distance growth signal in *Arabidopsis*⁹.

To further examine the root-mediated GA signal leading to accelerated shoot growth at elevated temperature, we next determined the endogenous GA contents in scions of Col-0/*gal-3* and *gal-3*/Col-0 grafts, and wild-type and *gal-3* self-graft controls. Consistent with the above growth parameters, bioactive GA₄ accumulated to higher levels in *gal-3* mutant scions of Col-0/*gal-3* grafts growing at 28°C compared with those at 20°C (Fig. 1c). Interestingly, GA₁₂ was also detected in higher amount in *gal-3* mutant scions of Col-0/*gal-3* grafts grown at 28°C. Taken together, these results strongly suggest that the amount of root-borne GA₁₂ delivered to the shoots is increased at elevated temperatures, whose action is dependent on the conversion to GA₄ by the activities of GA 20-oxidases (GA20ox) and GA 3-oxidases (GA3ox)¹¹ (Fig. S1a). Consistent with this hypothesis, we found that GA₄ accumulated to higher level in wild-type scions of Col-0/Col-0 grafts compared with *gal-3*/Col-0 grafts at 28°C (Fig. 1c). This result could explain the difference in rosette size observed at 28°C between Col-0/Col-0 and *gal-3*/Col-0 grafts (Fig. 1a). Unlike GA₄, GA₁₂ was detected at a lower

level in wild-type scions of Col-0/Col-0 and *gal-3*/Col-0 grafts grown at 28°C compared with those grown at 20°C (Fig. 1c). In wild-type shoots, the concentration of GA₁₂ is determined by both the amount of root-derived and shoot-synthesized GA₁₂, and the rate of its metabolic conversion to GA₁₅ by the activity of GA20ox, which catalyze a rate-limiting step in the synthesis of GA₄¹¹. As previously reported⁷, we found that elevated ambient temperature enhanced *GA20ox1* expression, and thereby, the conversion of GA₁₂ into GA₁₅ (Figure S1d and Fig. 1c). Thus, warm temperatures enhance both GA₁₂ supply and metabolic conversion in wild-type shoots.

High ambient temperature could enhance the delivery of root-borne GA₁₂ in the shoots via increased synthesis of GA₁₂ in roots and/or increased transport of GA₁₂ from the roots. To examine these possibilities, we first determined the concentration of endogenous GA in wild-type roots grown at 20° and at 28°C. The content in GA₁₂ was not statistically different between the two conditions (Fig. 1d), as well as the expression of genes encoding enzymes involved in the first steps of the GA biosynthetic pathway (Fig. S1e). We also determined the concentration of GA₁₂ in xylem sap collected from scions of five-week-old Col-0/*gal-3* grafts grown at 20° and 28°C. Remarkably, both the concentration of GA₁₂ and the GA₁₂/K⁺ ratio (K⁺ is used as a reference of the xylem sap flux¹², which fluctuates with the transpiration rate of the leaves) were increased at 28°C (Fig. 1e). Taken together, these results provide compelling evidence that warm temperature increases the root-to-shoot translocation of GA₁₂, which in turn, after metabolic conversion into bioactive GA₄, promotes shoot elongation.

In *Arabidopsis*, thermo-responsive elongation growth is dependent on the transcription factor PIF4, which promotes growth through direct activation of auxin biosynthesis and signaling genes^{1,3}. It has been shown that high temperature enhances both *PIF4* expression and transcriptional activity, while GA-regulated DELLA proteins repress PIF4 activity by preventing its DNA binding capacity (Fig. 2a)^{1,3,13}. To strengthen the genetic evidence supporting a role of root-borne GA₁₂ in temperature-mediated shoot growth, we generated a transgenic line that produces GA₁₂ solely in the root. To this end, we complemented the *kao1 kao2* double mutant (deprived of GA₁₂ synthesis¹⁴) with a construct that expresses *KAOI* only in root, with the use of the *ROOT-SPECIFIC KINASE 1 (ARSK1)* promoter (in *kao1 kao2 pARSK1:KAOI-RFP*). Indeed, as previously observed with *pARSK1:GUS* reporter line¹⁵, the promoter of *ARSK1* is active in the entire root (except the root apex), mainly in epidermal and endodermal cells, but not in the hypocotyl and cotyledons (Fig. S2a-e). Moreover, to further validate the root-specific activity of *ARSK1* promoter, we also expressed *GA20ox1* under the regulation of the *ARSK1* promoter in the *ga20ox1-2-3* triple mutant (in *ga20ox1-2-3 pARSK1:GA20ox1-RFP*). Consistent with the fact that GA₁₂ is the predominant form of GA transported from root to shoot, *pARSK1:KAOI-RFP* entirely rescued the dwarf phenotype of *kao1 kao2* mutant seedlings (in *kao1 kao2 pARSK1:KAOI-RFP*) grown at 22°C in long day conditions, while *pARSK1:GA20ox1-RFP* only restored the growth of *ga20ox1-2-3* roots (in *ga20ox1-2-3*

pARSK1:GA20ox1-RFP); the hypocotyls being similar from that of *ga20ox1-2-3* triple mutant (Fig. S3a,b). Thus, the activity of the *ARSK1* promoter is restricted to the root at seedling stage. At adult stage, *ARSK1* promoter is also active in rosette leaves (but not in inflorescence; Fig. S3e-i), and therefore, all further experiments were performed on 7-d-old seedlings. Noteworthy, complementary analysis revealed that ambient temperature does not modulate *ARSK1* promoter activity (Fig. S2f,g).

To further substantiate the previous results obtained with the grafts (Fig. 1), we finally examined the behavior of *kaol kao2 pARSK1:KAO1-RFP* and *ga20ox1-2-3 pARSK1:GA20ox1-RFP* seedlings at 20° and 28°C, compared to that of wild-type and *pif4-101* mutant. For this experiment, the seedlings were grown in short day conditions under low light intensity (30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) to enhance hypocotyl elongation and therefore to monitor subtle changes in hypocotyl length. Whereas the seedlings exhibited similar growth patterns at 20°C (moderate temperature inhibits PIF action¹), the hypocotyls of wild-type and *kaol kao2 pARSK1:KAO1-RFP* were more elongated than those of *ga20ox1-2-3 pARSK1:GA20ox1-RFP* and *pif4-101* mutant at 28°C (Fig. 2b,c). Consistent with this result, we found that hypocotyl growth of rootless wild-type seedlings (hence producing GA only in shoot) was significantly reduced at 28°C compared to that of intact wild-type seedlings (producing GA in both root and shoot), but less affected than *pif4* mutant, which is substantially resistant to temperature-induced shoot growth³ (Fig. S4a). Furthermore, we found that elevated temperature decreased the abundance of the DELLA protein REPRESSOR OF GA1-3 (RGA) in hypocotyls of wild-type, *kaol kao2 pARSK1:KAO1-RFP* and *pif4-101* mutant (compared to that at 20°C) but not in *ga20ox1-2-3 pARSK1:GA20ox1-RFP* hypocotyls (Fig. 2d and Fig. S4b); hence confirming that GA signaling acts upstream of PIF4 in the thermo-responsive growth regulation. Thus, increased root-to-shoot translocation of GA₁₂ at 28°C promotes DELLA protein degradation in shoots, and as a consequence growth, in agreement with the phenotypic data of the grafts shown in Figure 1.

In a subsequent experiment, we determined the effects of root-to-shoot transport of GA₁₂ on the expression of PIF4 target genes in hypocotyls after a short-term temperature increase (20° to 28°C for 4h). Consistent with the above results, we found that *INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 19 (IAA19)*, *IAA29*, *YUCCA 8 (YUC8)* and *PACLOBUTRAZOL RESISTANT 1 (PRE1)* transcripts were increased by about twofold in wild-type and *kaol kao2 pARSK1:KAO1-RFP* hypocotyls treated at 28°C, compared with those maintained at 20°C (Fig. 2e). In contrast, treatment with warm temperature did not significantly induce the expression of the PIF4 target genes in *ga20ox1-2-3 pARSK1:GA20ox1-RFP* hypocotyls. Given that DELLA-PIF4 interaction blocks the DNA binding capacity of PIF4 to its target genes¹³, these results suggest that root-derived GA₁₂ induces PIF4-mediated temperature-responsive gene expression, by enhancing the degradation of DELLA proteins.

Plant growth regulators play a critical role in long-distance communication between roots and shoots, ensuring coordinated developmental processes in response to fluctuating environmental conditions. For example, nitrate availability fine-tunes the amount of root-borne cytokinins delivered to the shoots

to optimize their development¹⁶. Although previous studies have revealed the existence of long-range movement of GA in plants^{9,10}, the physiological relevance of this transport remained unclear. In this work, we demonstrated that root-derived GA₁₂ contributes substantially to temperature-induced shoot growth, consistent with previous data showing that GA₁₂ is the main mobile GA signal over long distances in *Arabidopsis*⁹. The amount of root-borne GA₁₂ delivered to the shoots depends on its concentration in xylem sap and the transpiration rate of the leaves, which increases at elevated temperature. By analyzing the GA₁₂/K⁺ ratio, our findings have revealed a specific effect of the temperature on the concentration of GA₁₂ in xylem fluid (Fig. 1e). Although further studies are clearly required to understand the molecular mechanism, it is tempting to speculate that ambient temperature regulates the activity or the level of GA efflux transporters facilitating the translocation of GA₁₂ into the xylem. Unfortunately, despite the recent identification of several GA influx transporters involved in the local movement of GA in *Arabidopsis*^{10,17,18}, GA efflux transporters remain to be discovered. Climate change has already caused significant effects in plant morphology and behavior. Pioneering studies suggested that environmental signals such as flooding or soil temperature influence shoot growth, at least in part, via the modulation in the supply of GA-like substances in the xylem sap in tomato and in pine^{19,20}. Although it remains unclear how the temperature signal is sensed in the root, our results show that root-derived GA₁₂ permits a flexible growth response to ambient temperature changes (Fig. S5). Root-to-shoot translocation of GA₁₂ might play an important role in response to day and night air temperature oscillations for which, in contrast to soil temperature, the amplitude of the variations can rapidly rise in spring.

Methods

Plant material and growth conditions

Mutant lines are derived from Columbia-0 (Col-0) (*gal-3*; *kaol-1 kao2-1*; *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3-1*; *pif4-101*) backgrounds. Plants were grown on soil or on plates containing 1x Murashige-Skoog (MS) medium (Duchefa Biochemical), 1% sucrose and 0.8% agar, at 20°C or at 28°C, as indicated. GA-deficient mutant seeds were pretreated at 4°C with 5 μM GA₃ (Sigma-Aldrich) for 3 days to synchronize germination, washed thoroughly 3 times, then surface sterilized before sowing.

Plasmid construction and plant transformation

To generate *pARSK1:GUS*, *pARSK1* promoter (2.7-kb fragment) was PCR amplified from Col-0 genomic DNA with appropriate primers (listed in Table S2) and inserted into pDONR207 (Invitrogen) by Gateway cloning and recombined with pGWB633²¹. To generate *pARSK1:KAO1-RFP* and *pARSK1:GA20ox1-RFP* constructs, *pARSK1* (2.7-kb fragment) was cloned into HindIII/SpeI sites of pB7RWG2²², replacing the *p35S* promoter. *KAO1* and *GA20ox1* cDNA amplified by RT-PCR were then inserted into pDONR207 and recombined with the new *pARSK1*-pB7RWG2 vectors. The plant

binary vectors were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 strain by electroporation, and *Arabidopsis* Col-0, *kaol1 kaol2* and *ga20ox1-2-3* plants were transformed by floral dip to respectively obtained *pARSK1:GUS*, *kaol1 kaol2 pARSK1:KAOI-RFP* and *ga20ox1-2-3 pARSK1:GA20ox1-RFP* transgenic lines.

Grafting

Micrografting between hypocotyls of rootstocks and scions was carried out without collars on 6-day-old seedlings, as previously described²³. Successful grafts were transferred into soil and grown under continuous light at 20°C or at 28°C.

Xylem sap exudations

Stems of 5-week-old grafts (5 days after bolting) were decapitated 2 cm above the rosette with a razor blade and placed in closed box to maintain high humidity. Exudate was collected every 30 min for 3 h (the first drop was discarded), pooled and concentrated under vacuum centrifugation (Savant ThermoFisher).

GA determinations

GA contents in scions of grafted plants (Fig. 1c) were determined by ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UHPLC-MS) using a Q-Exactive spectrometer (Orbitrap detector; ThermoFisher Scientific). Dry grounded material was suspended in 80% methanol-1% acetic acid including 17-²H₂-labeled GA internal standards (Olchemim) and mixed by shaking during one hour at 4°C. The extract was kept at -20°C overnight, centrifuged and the supernatant dried in a vacuum evaporator. The dry residue was dissolved in 1% acetic acid and passed consecutively through a reverse phase column Oasis HLB column and a cationic exchange Oasis MCX eluted with MeOH. The dried eluate was dissolved in 5% acetonitrile-1% acetic acid, and the GAs were separated by UHPLC (Accucore C18 column 2.6 μm, 100 mm x 2.1 mm; ThermoFisher Scientific) with a 2 to 55% acetonitrile gradient containing 0.05% acetic acid, at 400 μL/min over 21 min. The concentrations of GAs in the extracts were analyzed by selected ion monitoring (SIM) using embedded calibration curves and the Xcalibur 4.0 and TraceFinder 4.1 SP1 programs. The total dry masses of the samples are given in table S1.

Quantitative analysis of endogenous GA levels in roots (Fig. 1d) was performed as described previously²⁴, with the following modifications. After solvent partitioning the samples were directly loaded onto C18 cartridges (Waters), and GA₅₁ and GA₃₄ were eluted with 50%, GA₉, GA₂₄, GA₄ and GA₁₅ with 60%, and GA₁₂ with 70% methanol-water, pH 3 (acetic acid). The derivatized samples were analysed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) as described elsewhere²⁴.

GA₁₂ content in xylem sap collected from *gal-3* scions of Col-0/*gal-3* grafted plants (Fig. 1e) was determined by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 UHPLC coupled MS Bruker EVOQ Elite) as described previously⁹.

K⁺ determination

Xylem sap exudation samples were mineralized in concentrated HNO₃ 90 min at 160 °C. The potassium concentration in the solution was determined using inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP AES Vista MPX).

Gene expression analyses

Total RNA from hypocotyls, roots and grafted shoots were extracted with NucleoSpin RNA Plant kit (Macherey Nagel). RNA samples were treated with DNase I (Promega) and reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) with Superscript IV reverse transcriptase (Invitrogen). The cDNA was further quantified with a SYBR Green Master mix (Roche) and gene-specific primers (listed in Table S2) on a Lightcycler LC480 apparatus (Roche) as previously described¹⁴. AT4G34270 (*TIP41-LIKE*) and AT4G26410 genes were used as internal reference genes. Data are means ± s.d. of three biological samples.

Protein gel blot analyses

Protein extraction and immunoblot analyses were as previously described¹⁴. Total proteins from hypocotyls of 7-d-old seedlings were extracted in 2x SDS-PAGE buffer and fractionated on a 10% SDS-PAGE gel. Immunoblots were performed using a 2000-fold dilution of anti-RGA antibody (Agrisera). The blot was subsequently probed with anti-cdc2 (PSTAIRE) antibody (Santa Cruz Biotechnology) for loading control. Quantification of the signals was performed using ImageJ package version 1.48v (www.imagej.nih.gov). Similar results were obtained in two independent experiments.

GUS analyses

pARSK1:GUS seedlings were 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.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using RStudio package version 1.2.1335 (www.rstudio.com). Phenotypic characterization and qRT-PCR experiments were analyzed using Student's *t*-test ($P <$

0.05) or by analysis of variance (ANOVA). Tukey's Honest Significant Difference (HSD) was used to compare between genotypes using a significance threshold of 5%

Acknowledgements

We thank Tp. Sun for providing seeds of *gal-3* (Col-0 background), P. Hedden for providing *ga20ox1-2-3* and M. Sirlin for statistics. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and the French ministry of research and higher education.

References

1. Quint, M. *et al.* Molecular and genetic control of plant thermomorphogenesis. *Nat. Plants* **2**, 15190 (2016).
2. Martins, S. *et al.* Brassinosteroid signaling-dependent root responses to prolonged elevated ambient temperature. *Nat. Commun.* **8**, 309 (2017).
3. Kumar, S.V. *et al.* Transcription factor PIF4 controls the thermosensory activation of flowering. *Nature* **484**, 242-245 (2012).
4. Achard, P. *et al.* Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* **311**, 91-94 (2006).
5. Colebrook, E.H., Thomas, S.G., Phillips, A.L. & Hedden, P. The role of gibberellin signaling in plant responses to abiotic stress. *J. Exp. Bot.* **217**, 67-75 (2014).
6. Davière, J.M. & Achard, P. Gibberellin signaling in plants. *Development* **140**, 1147-1151 (2013).
7. Stavang, J.A. *et al.* Hormonal regulation of temperature-induced growth in *Arabidopsis*. *Plant J.* **60**, 589-601 (2009).
8. Bai, L., Deng, H., Zhang, X., Yu X. & Li, Y. Gibberellin is involved in inhibition of cucumber growth and nitrogen uptake at suboptimal root-zone temperature. *PLOS One* **11**, e0156188 (2016).
9. Regnault, T. *et al.* The gibberellin precursor GA₁₂ acts as a long-distance growth signal in *Arabidopsis*. *Nat. Plants* **1**, 15073 (2015).
10. Binenbaum, J., Weinstain, R. & Shani, E. Gibberellin localization and transport in plants. *Trends Plant Sci.* **23**, 410-421 (2018).
11. Hedden, P. & Thomas, S.G. Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem. J.* **444**, 11-25 (2012).
12. Gaymard, F. *et al.* Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap. *Cell* **94**, 647-655 (1998).
13. de Lucas, M. *et al.* A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* **451**, 480-484 (2008).

14. Regnault, T., Davière, J.-M., Heintz, D., Lange, T. & Achard, P. The gibberellin biosynthetic genes *AtKAO1* and *AtKAO2* have overlapping roles throughout *Arabidopsis* development. *Plant J.* **80**, 462-474 (2014).
15. Hwang, I. & Goodman, H.M. An *Arabidopsis thaliana* root-specific kinase homolog is induced by dehydration, ABA, and NaCl. *Plant J.* **8**, 37-43 (1995).
16. Osugi, A. *et al.* Systemic transport of *trans*-zeatin and its precursor have differing roles in *Arabidopsis* shoots. *Nat Plants* **3**, 17112 (2017).
17. Saito, H. *et al.* The jasmonate-responsive GTR1 transporter is required for gibberellin-mediated stamen development in *Arabidopsis*. *Nat. Commun.* **6**, 6095 (2015).
18. Tal, I. *et al.* The *Arabidopsis* NPF3 protein is a GA transporter. *Nat. Commun.* **7**, 11486 (2016).
19. Reid, D.M., Crozier, A. & Harvey, B.M. The effects of flooding on the export of gibberellins from the root to the shoot. *Planta* **89**, 346-379 (1969).
20. Lavender, D.P., Sweet, G.B., Zaerr, J.B. & Hermann, R.K. Spring shoot growth in Douglas-fir may be initiated by gibberellins exported from the roots. *Science* **182**, 838-839 (1973).

Supplementary References (methods)

21. Nakamura, S. *et al.* Gateway binary vectors with the bialaphos resistance gene, *bar*, as a selection marker for plant transformation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 1315-1319 (2010).
22. Karimi, M., Inzé, D. & Depicker, A. GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* **7**, 193-195 (2002).
23. Turnbull, C.G.N., Booker, J.P. & Leyser O. Micrografting techniques for testing long-distance signalling in *Arabidopsis*. *Plant J.* **32**, 255-262 (2002).
24. Lange, T., Kappler, J., Fischer, A., Frisse, A., Padeffke, T., Schmidtke, S. & Pimenta Lange, M. J. Gibberellin biosynthesis in developing pumpkin seedlings. *Plant Physiol.* **139**, 213-223 (2005).

Author contributions

L.C., T.R., L.S.A., E.C., J.Z., D.H., N.L., M.J.P.L., T.L., J.M.D. and P.A. performed experimental work; L.C., T.R., D.H., N.L., M.J.P.L., T.L., J.M.D. and P.A. designed the experiments; M.J.P.L., T.L., J.M.D. and P.A. wrote the paper.

Additional information

Figure S1. Warm temperature modulates growth and GA metabolism.

Figure S2. *ARSKI* promoter drives a root specific expression.

Figure S3. *pARSKI:KAO1-RFP* expression entirely rescues the growth of *kaol1 kaol2* mutant.

Figure S4. Elevated temperature enhances hypocotyl growth and GA signaling.

Figure S5. Root-borne GA₁₂ enhances RGA protein degradation in shoots at 28°C.

Table S1. Sample masses for GA quantification.

Table S2. List of primers used in the study.

Competing interests

The authors declare no competing financial interests.

Figures

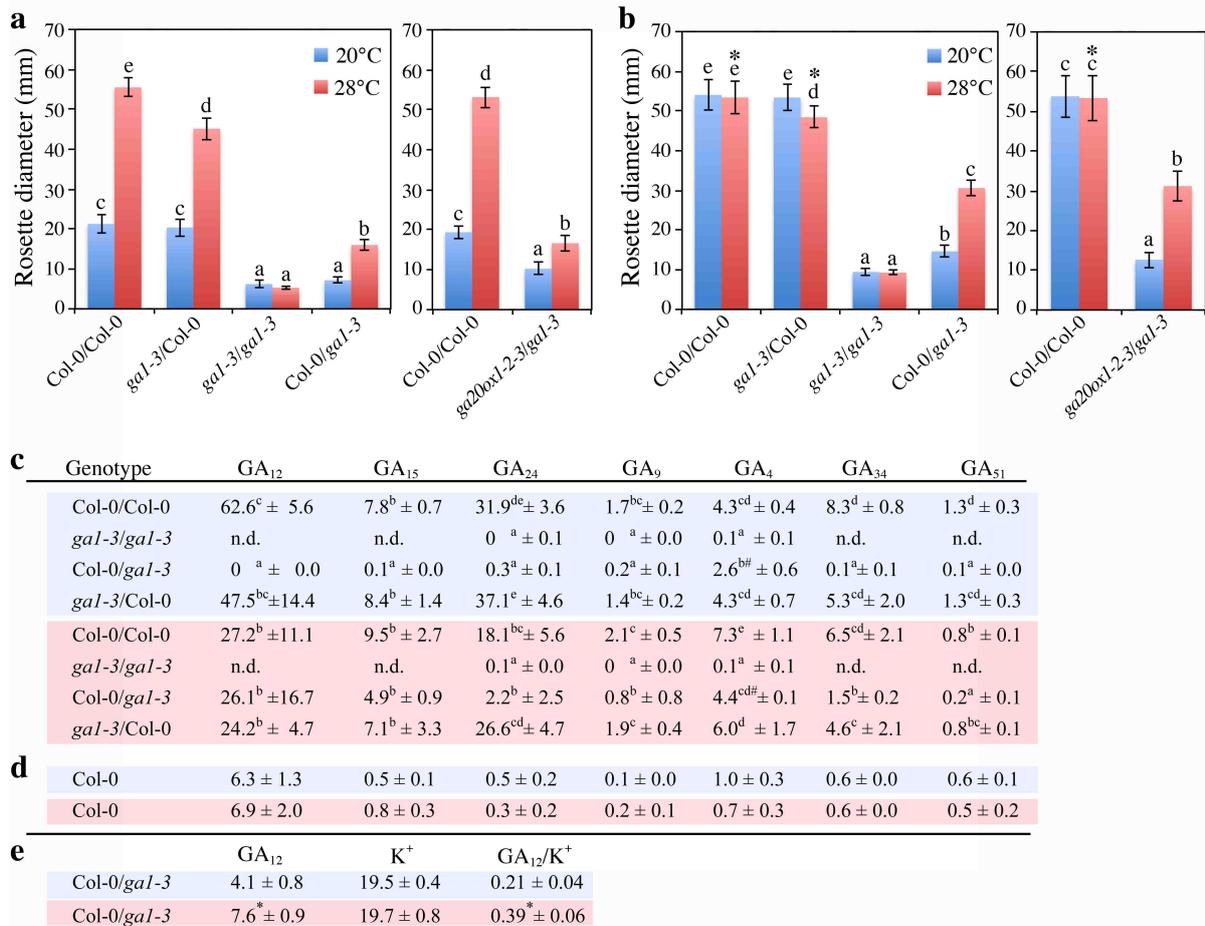


Figure 1. Root-derived GA are essential for the thermal induction of shoot growth. **a-b**, Feret's rosette diameter (mean ± s.d.; n ≥ 15) of Col-0/Col-0, *gal-3/Col-0*, *gal-3/gal-3*, Col-0/*gal-3* and *ga20ox1-2-3/gal-3* grafts grown at 20°C (in blue) or 28°C (in red), two- (**a**) and three-weeks (**b**) post-grafting. Different letters denote significant differences ($p < 0.05$) using one-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons. Asterisks indicate that plants had already initiated flowering before measuring their rosette diameter. **c**, Concentrations of GAs (ng.g⁻¹ dry weight ± s.d.) in the shoots of 12 days post-grafted plants of indicated genotypes, grown at 20°C (highlighted in blue) or 28°C (highlighted in red). Notation of genotype is rootstock/scion. In samples marked n.d. endogenous GA was not detected, but internal standard was recovered. The values are means of three biological replicates except where indicated. #, Two biological replicates only. Different letters denote significant differences ($p < 0.05$) using one-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons. **d**, Concentration of GAs (ng.g⁻¹ dry weight ± s.d.) in the roots of Col-0 seedlings grown for 8 days at 20°C (highlighted in blue) or for 6 days at 20°C and 2 days at 28°C (highlighted in red). Values are means of three biological replicates. There is no significant differences ($p < 0.05$) for 28°C versus 20°C by Student's t-test. **e**, GA₁₂ content (nM ± s.d.), K⁺ content (mM ± s.d.) and GA₁₂/K⁺ ratio (10⁻⁶ ± s.d.) in xylem exudates of Col-0/*gal-3* grafted plants grown at 20°C for 5 weeks (highlighted in blue) or for 4 weeks at 20°C and 1 week at 28°C (highlighted in red). Notation of genotype is rootstock/scion. Values are means of three biological replicates. Asterisks indicate significant differences ($p < 0.05$) for 28°C versus 20°C by Student's t-test.

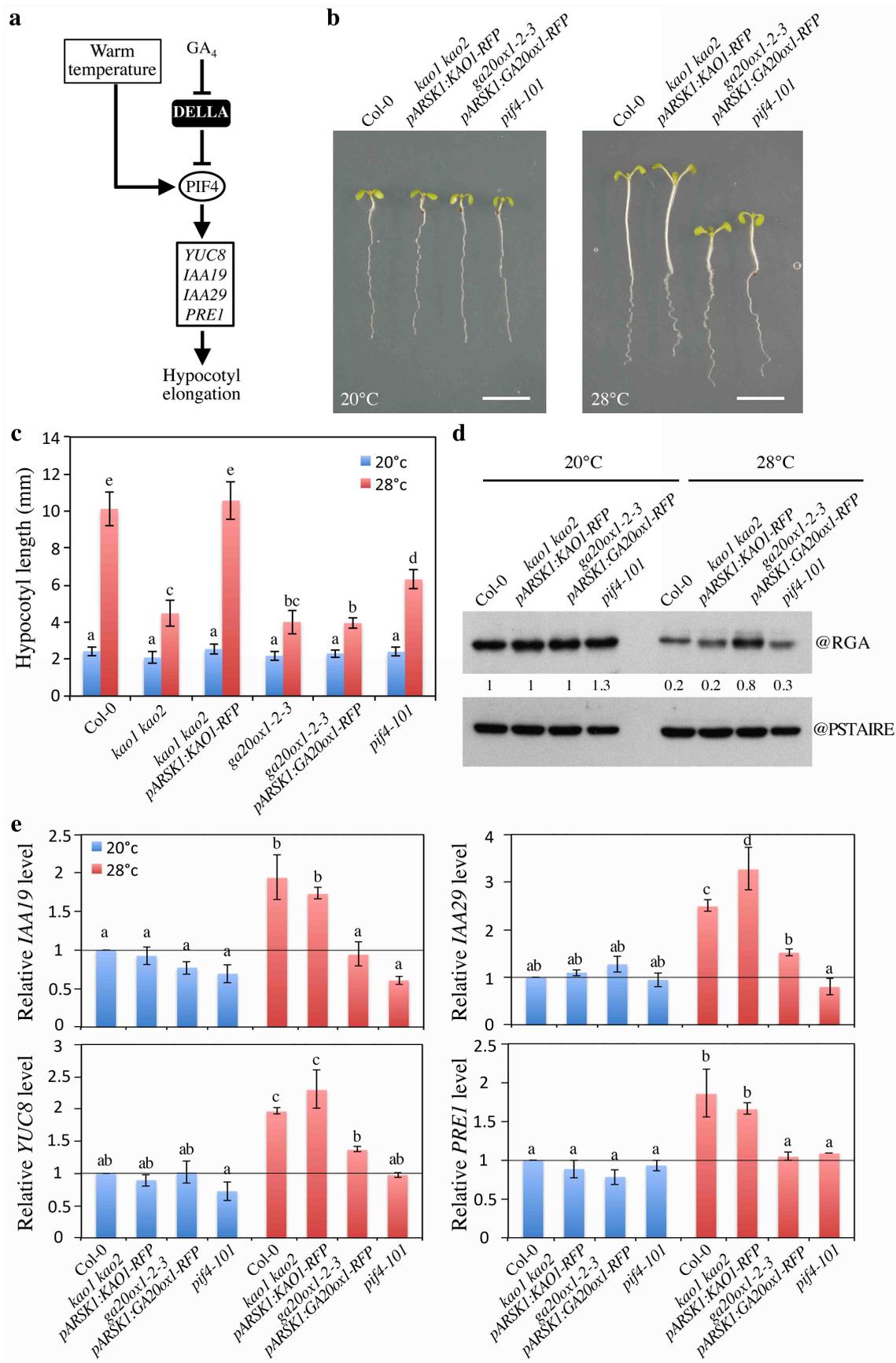


Figure 2. Root-borne GA₁₂ enhances hypocotyl elongation at 28°C via a DELLA-dependent mechanism. **a**, Schematic of the GA and thermo-responsive growth regulation. **b**, Representative 7-

day-old wild-type (Col-0), *kaol kao2 pARSK1:KAO1-RFP*, *ga20ox1-2-3 pARSK1:GA20ox1-RFP* and *pif4-101* seedlings grown in short day (SD) conditions (30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) at 20°C or 28°C. Scale bars represent 5 mm. **c**, Hypocotyl length (mean \pm s.d.; $n \geq 20$) of 7-day-old Col-0, *kaol kao2*, *kaol kao2 pARSK1:KAO1-RFP*, *ga20ox1-2-3*, *ga20ox1-2-3 pARSK1:GA20ox1-RFP* and *pif4-101* seedlings grown at 20°C (in blue) or 28°C (in red), in SD conditions. Different letters denote significant differences ($p < 0.05$) using one-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons. **d**, Immunodetection of RGA protein in hypocotyls of 7-d-old Col-0, *kaol kao2 pARSK1:KAO1-RFP*, *ga20ox1-2-3 pARSK1:GA20ox1-RFP* and *pif4-101* seedlings grown at 20°C or 28°C, in SD conditions. PSTAIRE serves as sample loading control. Values indicate RGA signal intensity relative to PSTAIRE signal intensity. Similar results were obtained in two independent experiments (shown in Figure S4). **e**, Expression levels of *IAA19*, *IAA29*, *YUC8* and *PRE1* in hypocotyls of wild-type (Col-0), *kaol kao2 pARSK1:KAO1-RFP*, *ga20ox1-2-3 pARSK1:GA20ox1-RFP* and *pif4-101* seedlings grown in short-day conditions (30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) at 20°C (in blue) or at 20°C and then transferred at 28°C for 4 h under light (in red). Error bars indicate s.d. ($n = 3$). Different letters denote significant differences ($p < 0.01$) using one-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons.

Supplementary information

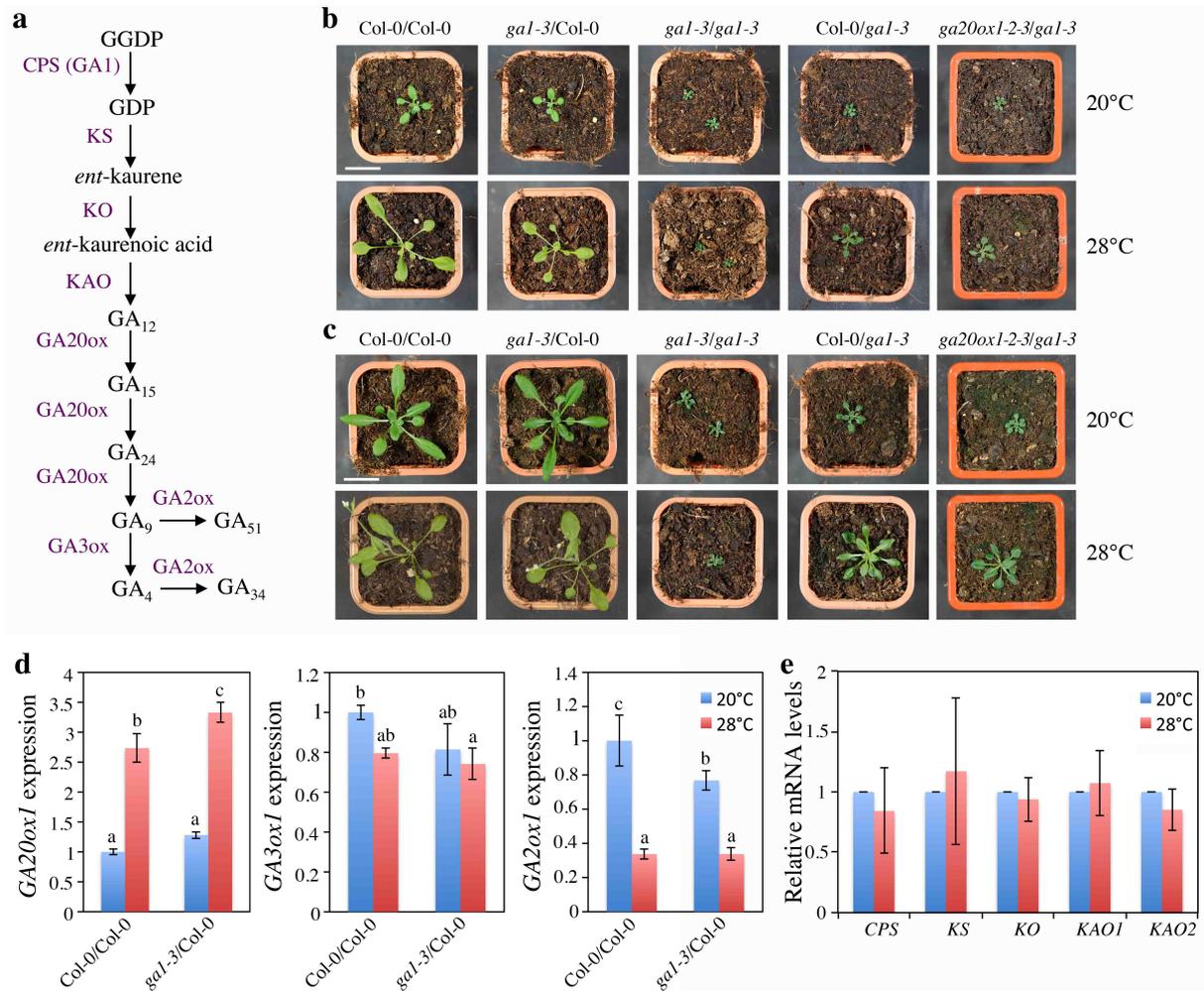


Figure S1. Warm temperature modulates growth and GA metabolism. **a**, Schematic of the GA biosynthetic pathway. Biosynthetic enzymes are indicated in purple. GGDP, geranylgeranyl diphosphate; CDP, *ent*-copalyl diphosphate; CPS, *ent*-copalyl diphosphate synthase; KS, *ent*-kaurene synthase; KO, *ent*-kaurene oxidase; KAO, *ent*-kaurenoic acid oxidase; GA20ox, GA 20-oxidase; GA3ox, GA 3-oxidase; GA2ox, GA 2-oxidase. **b-c**, Representative rosette phenotype of Col-0/Col-0, *gal-3*/Col-0, *gal-3/gal-3*, Col-0/*gal-3* and *ga20ox1-2-3/gal-3* grafts grown in continuous light (75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) at 20°C or 28°C, two- (**b**) and three-weeks (**c**) post-grafting. Statistical data are shown in Figure 1a,b. Genotype notation is rootstock/grafted scion. Scale bar represents 2 cm. **d**, Expression levels of *GA20ox1*, *GA3ox1* and *GA2ox1* in wild-type scions of Col-0/Col-0 and *gal-3*/Col-0 grafts grown in continuous light at 20°C (in blue) or 28°C (in red), 12 days post-grafting. Error bars indicate s.d. ($n = 3$). Different letters denote significant differences ($p < 0.05$) using one-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons. **e**, Expression levels of *CPS*, *KS*, *KO*, *KAO1* and *KAO2* in roots of 8-d-old Col-0 seedlings grown in continuous light at 20°C (in blue) or at 20°C for 6 days and then transferred at 28°C for 2 days (in red). Error bars indicate s.d. ($n = 3$). There is no significant differences ($p < 0.05$) for 28°C versus 20°C by Student's t-test.

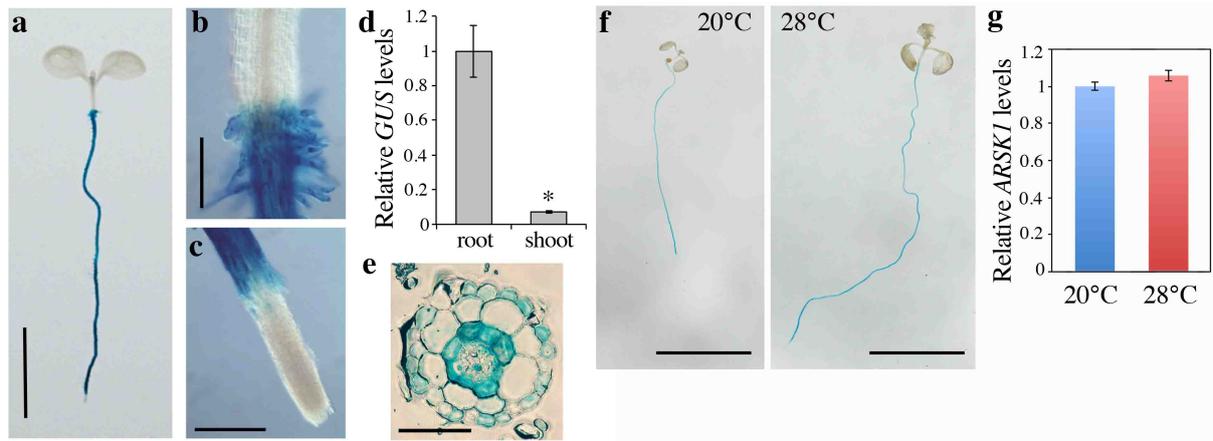


Figure S2. *ARSK1* promoter drives a root specific expression. **a-c**, *pARSK1:GUS* expression in 7-d-old seedling (a), root-hypocotyl junction (b), root tip (c). **d**, Relative *GUS* levels in root and shoot of 7-d-old *pARSK1:GUS* seedlings. Error bars indicate s.d. (n= 3). Asterisk indicates significant difference ($p < 0.05$) for shoot versus root expression by Student's t-test. **e**, *pARSK1:GUS* expression in 7-d-old seedling root; transversal cut in differentiation zone of the root. **f**, *pARSK1:GUS* expression in 7-d-old seedling grown at 20°C or at 28°C. **g**, Expression level of *ARSK1* in 7-d-old Col-0 seedling roots grown at 20°C (blue) or at 28°C (red). Error bars indicate s.d. (n= 3). There is no significant differences ($p < 0.05$) for 28°C versus 20°C by Student's t-test. Scale bars represent 5 mm (a), 0.3 mm (b), 0.5 mm (c), 0.1 mm (e) and 1 cm (f).

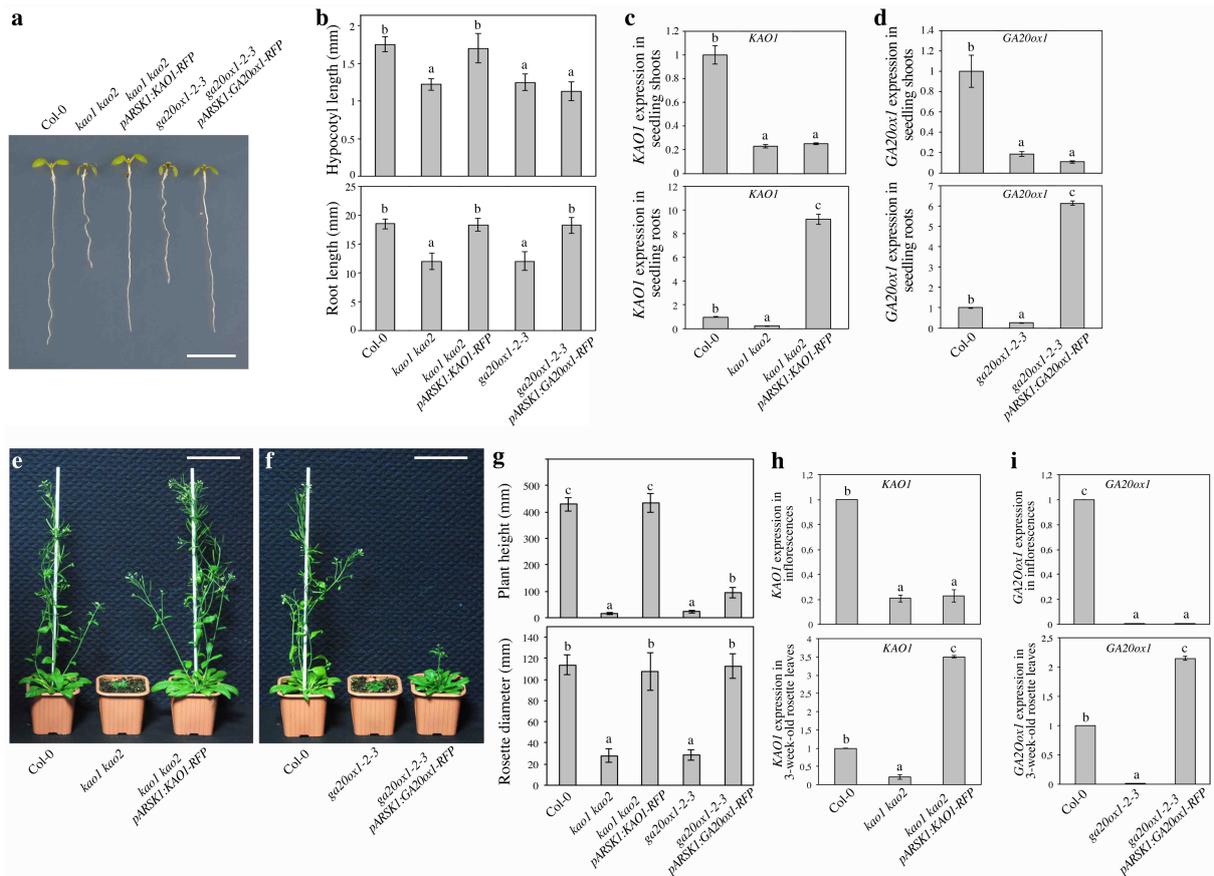


Figure S3. *pARSK1:KAO1-RFP* expression rescues the growth of *kao1 kao2* mutant. **a**, Representative growth phenotype of 7-d-old wild-type (Col-0), *kao1 kao2*, *kao1 kao2 pARSK1:KAO1-RFP*, *ga20ox1-2-3* and *ga20ox1-2-3 pARSK1:GA20ox1-RFP* seedlings grown at 22°C in long day (LD) conditions (100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). **b**, Hypocotyl and root lengths (mean \pm s.d.; $n \geq 15$) of Col-0, *kao1 kao2*, *kao1 kao2 pARSK1:KAO1-RFP*, *ga20ox1-2-3* and *ga20ox1-2-3 pARSK1:GA20ox1-RFP* seedlings grown in LD conditions. **c**, Relative *KAO1* expression in root and shoot of Col-0, *kao1 kao2* and *kao1 kao2 pARSK1:KAO1-RFP* seedlings grown in LD conditions. Error bars indicate s.d. ($n = 3$). **d**, Relative *GA20ox1* expression in root and shoot of Col-0, *ga20ox1-2-3* and *ga20ox1-2-3 pARSK1:GA20ox1-RFP* seedlings grown in LD conditions. Error bars indicate s.d. ($n = 3$). **e**, Representative growth phenotype of 6-week old Col-0, *kao1 kao2* and *kao1 kao2 pARSK1:KAO1-RFP* plants grown in LD conditions. **f**, Representative growth phenotype of 6-week old Col-0, *ga20ox1-2-3* and *ga20ox1-2-3 pARSK1:GA20ox1-RFP* plants grown in LD conditions. **g**, Feret's rosette diameter and plant height (mean \pm s.d.; $n \geq 15$) of Col-0, *kao1 kao2*, *kao1 kao2 pARSK1:KAO1-RFP*, *ga20ox1-2-3* and *ga20ox1-2-3 pARSK1:GA20ox1-RFP* plants grown in LD conditions. **h**, Relative *KAO1* expression in rosette and inflorescence of Col-0, *kao1 kao2* and *kao1 kao2 pARSK1:KAO1-RFP* plants grown in LD conditions. Error bars indicate s.d. ($n = 3$). **i**, Relative *GA20ox1* expression in rosette and inflorescence of Col-0, *ga20ox1-2-3* and *ga20ox1-2-3 pARSK1:GA20ox1-RFP* plants grown in LD conditions. Error bars indicate s.d. ($n = 3$). Different letters denote significant differences ($p < 0.05$) using one-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons (**b,c,d,g,h** and **i**). Scale bar represents 5 mm (**a**) and 7 cm (**e** and **f**).

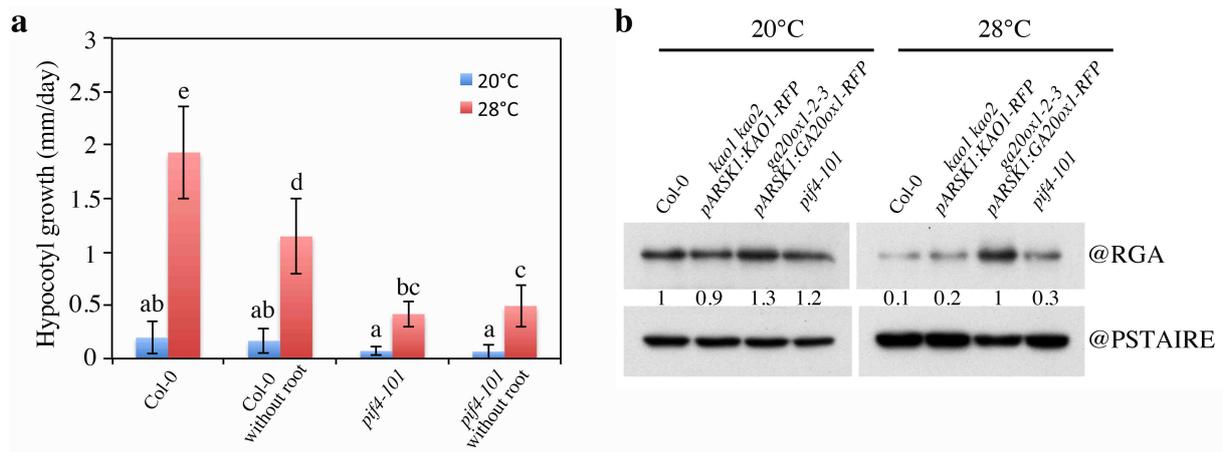


Figure S4. Elevated temperature enhances hypocotyl growth and GA signaling. **a**, Hypocotyl growth per day (mean \pm s.d.; $n \geq 16$) of Col-0 and *pif4-101* seedlings with and without roots. The seedlings were grown in short day conditions at 20°C for 5 days and then transferred at 20°C (in blue) or 28°C (in red) for 3 days. Roots were cut off for one set of the seedlings before the transfer. Hypocotyl length was measured between day 5 and day 8. Different letters denote significant differences ($p < 0.05$) using one-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons. **b**, Root-borne GA₁₂ enhances RGA protein degradation in shoots at 28°C. Immunodetection of RGA protein in hypocotyls of 7-d-old Col-0, *kao1 kao2* *pARSK1:KAO1-RFP*, *ga20ox1-2-3 pARSK1:GA20ox1-RFP* and *pif4-101* seedlings grown at 20°C or 28°C, in short day conditions. PSTAIRE serves as sample loading control. Values indicate RGA signal intensity relative to PSTAIRE signal intensity. Biological replicate is shown in Figure 2d.

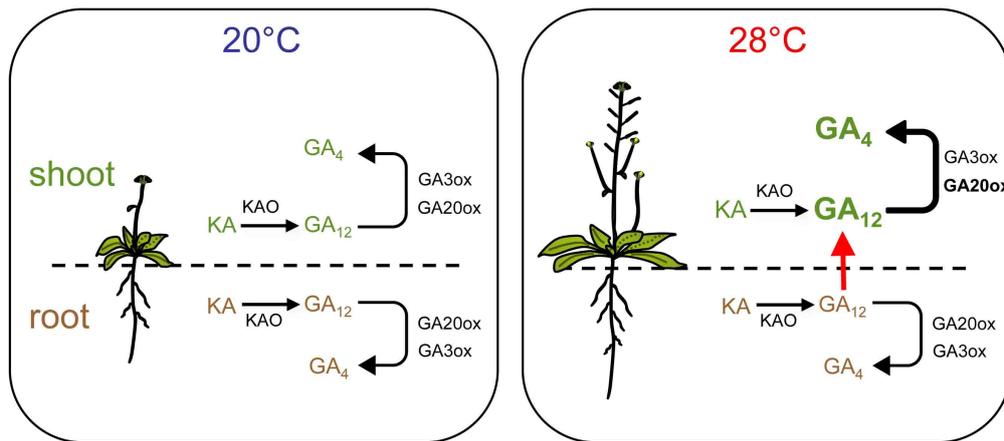


Figure S5. Root-derived GA₁₂ is required for temperature-induced shoot growth. At 20°C, the growth of root and shoot is regulated by GA₄ in a root- and shoot-autonomous manner. At 28°C, warm temperature activates root-to-shoot transport of GA₁₂, whose action combined with shoot-synthesized GA₁₂, promotes shoot growth, after metabolic conversion into GA₄. KA, *ent*-kaurenoic acid; KAO, *ent*-kaurenoic acid oxidase; GA20ox, GA 20-oxidase; GA3ox, GA 3-oxidase.

Table S1. Sample masses for GA quantification**Table S1a: dry masses of the samples used for GA quantification in Figure 1c**

Samples	dry weight (mg)
Scions of Col-0/Col-0 grafts grown at 20°C - replicate 1	63,9
Scions of Col-0/Col-0 grafts grown at 20°C - replicate 2	62,7
Scions of Col-0/Col-0 grafts grown at 20°C - replicate 3	63,9
Scions of <i>gal-3/gal-3</i> grafts grown at 20°C - replicate 1	51
Scions of <i>gal-3/gal-3</i> grafts grown at 20°C - replicate 2	51,1
Scions of <i>gal-3/gal-3</i> grafts grown at 20°C - replicate 3	48,4
Scions of Col-0/ <i>gal-3</i> grafts grown at 20°C - replicate 1	45,6
Scions of Col-0/ <i>gal-3</i> grafts grown at 20°C - replicate 2	45,5
Scions of Col-0/ <i>gal-3</i> grafts grown at 20°C - replicate 3	45,5
Scions of <i>gal-3</i> /Col-0 grafts grown at 20°C - replicate 1	60,3
Scions of <i>gal-3</i> /Col-0 grafts grown at 20°C - replicate 2	61,8
Scions of <i>gal-3</i> /Col-0 grafts grown at 20°C - replicate 3	60
Scions of Col-0/Col-0 grafts grown at 28°C - replicate 1	69
Scions of Col-0/Col-0 grafts grown at 28°C - replicate 2	69,7
Scions of Col-0/Col-0 grafts grown at 28°C - replicate 3	62
Scions of <i>gal-3/gal-3</i> grafts grown at 28°C - replicate 1	49,9
Scions of <i>gal-3/gal-3</i> grafts grown at 28°C - replicate 2	49,7
Scions of <i>gal-3/gal-3</i> grafts grown at 28°C - replicate 3	50,5
Scions of Col-0/ <i>gal-3</i> grafts grown at 28°C - replicate 1	60,4
Scions of Col-0/ <i>gal-3</i> grafts grown at 28°C - replicate 2	56,6
Scions of Col-0/ <i>gal-3</i> grafts grown at 28°C - replicate 3	58,4
Scions of <i>gal-3</i> /Col-0 grafts grown at 28°C - replicate 1	69,4
Scions of <i>gal-3</i> /Col-0 grafts grown at 28°C - replicate 2	70,6
Scions of <i>gal-3</i> /Col-0 grafts grown at 28°C - replicate 3	67,7

Table S1b: dry masses of the samples used for GA quantification in Figure 1d

Samples	dry weight (mg)
Col-0 grown at 20°C-replicate 1	40
Col-0 grown at 20°C-replicate 2	43
Col-0 grown at 20°C-replicate 3	43
Col-0 grown at 28°C-replicate 1	27
Col-0 grown at 28°C-replicate 2	45
Col-0 grown at 28°C-replicate 3	43

Table S2. List of primers used in the study.

Primers used for cloning:

<i>pARSK1-F</i>	CATTATTGGAAGAGAATTACTAAG
<i>pARSK1-R</i>	TTTCAACTTCTTCTTTTGTGTTAT
<i>KAO1-F</i>	GCAAGTTTAACTAAGTGAAAAGTCT
<i>KAO1-R</i>	CTGATAACTAATTCTTGCCAAGCAA
<i>GA20ox1-F</i>	CACTTTACTATAATCTCTCAAA
<i>GA20ox1-R</i>	GATGGGTTTGGTGAGCCAATC

Primers used for RT-qPCR:

<i>CPS-F</i>	GAGAAACGATGAGAAGGAGAAGAC
<i>CPS-R</i>	TCCGACAATGCTAACTCAACC
<i>KS-F</i>	GAAAAAGAGATCTGGATCTTAAATGTG
<i>KS-R</i>	TTGTCCCCTCTAAAACATAGGC
<i>KO-F</i>	AAATCGGAGGCTATCATGTCC
<i>KO-R</i>	GCTTCTTATCCATGTTGCATCC
<i>KAO1-F</i>	CTTATCGCAGGTTGTGCGATG
<i>KAO1-R</i>	TTCCAACCTTTTGGGATCAA
<i>KAO2-F</i>	CTAGAGGATACAAGAGGTGGTC
<i>KAO2-R</i>	CCGTCATAGCTTCAGTCG
<i>GA20ox1-F</i>	GAGACTGAATTACTACCCTC
<i>GA20ox1-R</i>	TGGGTTTGGTGAGCCAATC
<i>GA3ox1-F</i>	GTCTAGCAGCTCATAACCGAC
<i>GA3ox1-R</i>	CTTCTCTGTGATTTCTAATC
<i>GA2ox1-F</i>	ACGTTGGTGACTCTCTCC
<i>GA2ox1-R</i>	CGATTCTCTGAGTCAATGAAGG
<i>GUS-F</i>	GAAACTCAGCAAGCGCACTTA
<i>GUS-R</i>	TATCCGGTTCGTTGGCAAT
<i>IAA19-F</i>	AATTGTATCAAATTGTGAGAGGAAAA
<i>IAA19-R</i>	CGTTATCTCAAGCCCGAGTC
<i>IAA29-F</i>	CCGAGTCTTCAATAGTTTACGATG
<i>IAA29-R</i>	CGAATATGACGATGATGATAACTACC
<i>YUC8-F</i>	TTGACCTAGCAAACCATTTTCG
<i>YUC8-R</i>	CGGCATCACGTGAAGAGAG
<i>PRE1-F</i>	CAGAAGATCAAGGCAATCTTCA
<i>PRE1-R</i>	TGCAATACTTTCGAGGCTGA
<i>TIP41-LIKE-F</i>	GTGAAAACCTGTTGGAGAGAAGCAA

TIP41-LIKE-R TCAACTGGATACCCTTTCGCA
AT4G2610-F GAGCTGAAGTGGCTTCAATGAC
AT4G2610-R GGTCCGACATACCCATGATCC

Conclusions générales et perspectives

L'azote (N) constitue l'un des éléments nutritifs le plus limitant pour la productivité agricole. Ainsi, depuis les années 1960, l'utilisation d'engrais azotés a été largement répandue et a contribué à une augmentation conséquente des rendements. Cependant, les variétés céréalières à fort rendement cultivées, plus hautes sur tiges, présentaient une prédisposition accrue aux phénomènes de verse. Afin de limiter ce risque, des variétés semi-naines, altérées dans leurs réponses aux gibbérélines (GA), ont été sélectionnées par les semenciers. Grâce à ces nouvelles variétés, moins sensibles à l'action de l'azote sur leur croissance, les rendements en graines ont grandement augmenté pour atteindre un plateau au début du 21^e siècle. À présent, l'utilisation des engrais azotés est strictement réglementée pour limiter les risques de pollution des eaux et la dégradation de l'environnement (suite à un apport récurrent d'azote). Ainsi, une meilleure compréhension des effets du nitrate (principale source d'azote chez les plantes cultivées) sur la croissance des plantes, et leurs interconnexions avec les GA, est devenue un enjeu sociétal majeur. En effet, le but est de sélectionner de nouvelles variétés de céréales encore plus performantes et flexibles aux variations de l'environnement, et de répondre ainsi à une demande sans cesse croissante d'approvisionnement en nourriture pour la population, tout en respectant l'environnement avec une agriculture durable. Étant donné que les GA sont une classe d'hormones adaptant la croissance et le développement des plantes en réponse aux fluctuations de l'environnement, la régulation de la biosynthèse des GA, leur transport et la voie de signalisation GA, représentent différents niveaux d'intégration potentiels. C'est dans ce contexte que les objectifs principaux de ma thèse ont été définis, et deux grandes problématiques ont été soulevées :

1. Quel est le rôle des GA dans les mécanismes de croissance activés par le nitrate chez *Arabidopsis* et le blé ?
2. Quel est le rôle du nitrate et des transporteurs NPF dans le transport longue-distance de GA₁₂ et quelle est la fonction biologique de ce transport ?

Par une combinaison d'approches génétiques, biochimiques et moléculaires, nous avons montré que le nitrate augmentait la production de GA₁₂ chez *Arabidopsis*, et GA₅₃ chez le blé, qui suite à une conversion métabolique en GA bioactives, stimulent la dégradation des répresseurs de croissance DELLA par le protéasome. Malgré le fait que ce mécanisme soit directement lié au nitrate, la réponse est lente puisque la dégradation des DELLA intervient seulement quelques jours en réponse à une application de nitrate. Néanmoins, cette augmentation de GA active la division cellulaire, conduisant ainsi à une croissance accrue de la plante. De manière intéressante, nous avons aussi observé que le nitrate stimulait le transport de GA₁₂ des racines vers les parties aériennes de la plante, soulignant la possibilité que le nitrate agisse à un second niveau de régulation, en plus de son effet sur la biosynthèse

kao1 kao2
pARSK1:KAO1-RFP

Crible 1
Sélection de
plantes naines

Crible 2
Sélection de mutants dont
la croissance est rétablie

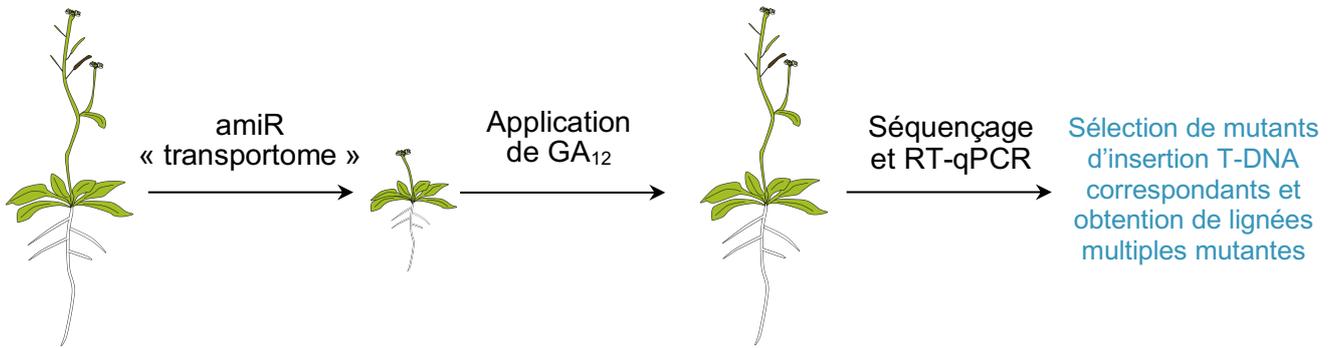


Figure 62. Stratégie de criblages pour rechercher des plantes mutantes affectées dans le transport longue-distance de GA₁₂.

de GA. Deux aspects essentiels restent cependant à être éclaircis, i) le mécanisme par lequel le nitrate active les premières étapes de la biosynthèse des GA et ii) la contribution des GA dans la plasticité de la plante face à une disponibilité hétérogène en nitrate.

Nous avons ensuite caractérisé deux nouveaux transporteurs de GA appartenant à la famille des NPF, NPF2.12 et NPF2.13, précédemment identifiés comme transporteurs de nitrate. Les approches biochimiques et de micro-greffes entreprises chez *Arabidopsis* ont démontré que ces deux protéines membranaires facilitaient le transport basipète de GA₁₂. Même si la fonction biologique précise de ce co-transport de GA₁₂ et de nitrate n'a pas été élucidée, il a été proposé que les NPF participaient à l'intégration des signaux de l'environnement et plus particulièrement de la disponibilité en nitrate (Corratgé-Faillie et Lacombe, 2017). Ainsi, nous proposons que le transport de GA modulerait la croissance de la plante en fonction de la disponibilité en nitrate et constituerait ainsi un élément clé de sa plasticité en réponse aux variations continues de l'environnement. Par ailleurs, de futures expériences en système « split-root » seront essentielles pour disséquer le rôle précis des GA pour le développement de la plante lors de conditions hétérogènes en nitrate et notamment pour déterminer si le transport acropète et/ou basipète de GA₁₂ joue(nt) un rôle pivot dans les modifications morphologiques et physiologiques remarquables de la plante, en réponse à ces conditions environnementales fluctuantes.

Enfin, nous avons mis en évidence le rôle biologique essentiel du transport acropète de GA₁₂, produites dans les racines, lors d'une élévation de quelques degrés de la température ambiante. Le transport de GA₁₂ permet à la plante d'adapter et coordonner la croissance d'organes distants en réponse aux fluctuations de la température, et souligne plus largement son importance dans la plasticité architecturale de la plante, organisme sessile, face aux variations des facteurs de l'environnement.

Pris dans leur ensemble, ces résultats montrent que le transport de GA₁₂ en réponse au nitrate ou à une élévation de la température constitue un signal endogène mobile à la plante optimisant son développement. Le mécanisme assurant le transport de GA₁₂ reste cependant méconnu du fait de la redondance fonctionnelle des transporteurs. Ainsi, afin de caractériser de nouveaux transporteurs de GA₁₂, un crible génétique *in planta* est envisagé et repose sur la lignée *kao1 kao2 pARSK1:KAO1-RFP* précédemment décrite (Figure 62). Cette lignée complète le double mutant *kao1 kao2* (déficient en GA₁₂) uniquement dans les racines, grâce au promoteur *pARSK1* qui est actif seulement dans les racines. Ainsi, au contraire du mutant nain *kao1 kao2*, la lignée *kao1 kao2 pARSK1:KAO1-RFP* présente un phénotype semblable à une plante sauvage grâce au transport de GA₁₂ qui auront été produites dans les racines vers les parties aériennes de la plante, où elles seront converties en GA bioactives

(Figure S3 manuscrit de la 2^e partie du chapitre 2). Après transformation de cette lignée avec la collection d'amiRNA ciblant l'ensemble des transporteurs ('amiR transportome library') chez *Arabidopsis* (Zhang et al., 2018a), les plantes présentant un phénotype nain, donc potentiellement affectées dans le transport de GA₁₂, seront sélectionnées en T1 (1^{ère} génération de transformants). Pour valider notre choix, un second crible sera directement réalisé sur les T1, par un traitement des mutants nains avec de la GA₁₂. Ainsi, seuls les mutants affectés dans le transport de GA₁₂ pourront recouvrir un phénotype semblable à celui d'une plante sauvage (Figure 62). Des analyses complémentaires par séquençage et RT-qPCR permettront d'identifier le(s) gène(s) ciblé(s) par les amiR, et les mutants d'insertion T-DNA correspondants seront recherchés afin de générer des combinaisons de multiples mutants perte de fonction, et de réaliser ainsi des études plus approfondies sur le transport de GA₁₂.

Si nous avons mis en évidence que le nitrate activait la croissance de la plante en induisant la biosynthèse et le transport de GA, il a été récemment rapporté que les GA stimulaient en retour l'assimilation du nitrate pour subvenir aux besoins nutritionnels de la plante (Li et al., 2018). Cela supporte l'idée que la croissance et la nutrition sont étroitement liées et régulées par les signalisations hormonales (Krouk et al., 2011). Par ailleurs, comme précédemment décrit dans la partie introductive de la thèse (introduction, paragraphe 3.6.3), l'assimilation et l'utilisation de l'azote (NUE) chez les cultivars issus de la Révolution Verte sont fortement diminuées du fait de l'accumulation des protéines DELLA. Ce constat soulève la question de savoir si ces cultivars assimilent efficacement d'autres éléments nutritifs, comme par exemple, le fer. En effet, il a été démontré que les DELLA interagissaient et inhibaient l'activité du facteur de transcription FIT, régulant l'expression du transporteur de fer *IRT1* chez *Arabidopsis* (Wild et al., 2016). Lors d'une carence en fer, les DELLA sont déstabilisées spécifiquement dans l'épiderme, qui en conséquence active l'expression de *IRT1* et promeut le prélèvement du fer. Ainsi, chez les blés *Rht-1* semi-nains, la régulation du prélèvement du fer peut s'avérer potentiellement peu performante lorsque les plantes font face à une carence ferrique, et des études de réévaluation de la capacité d'assimilation du fer ou du nitrate de ces variétés semi-naines deviennent essentielles.

La croissance et le développement des plantes sont dépendants des connexions entre les métabolismes azoté et carboné (Nunes-Nesi et al., 2010). L'azote est un composant majeur des protéines impliquées dans les mécanismes photosynthétiques. Par conséquent, une quantité suffisante d'azote est requise pour assurer une assimilation optimale du CO₂ lors de la photosynthèse, et donc la production de biomasse (Nunes-Nesi et al., 2010). D'autre part, une quantité suffisante de carbone fixé est nécessaire pour fournir les squelettes carbonés essentiels pour l'assimilation de l'azote. L'assimilation de l'azote, notamment le nitrate,

constitue un processus très coûteux en énergie et requiert donc de grandes quantités d'ATP et de pouvoir réducteur NAD(P)H. Cette énergie est en partie fournie par la photorespiration, seconde fonction de l'enzyme RubisCO (Bloom, 2015). De manière intéressante, l'activité photosynthétique des blés et riz semi-nains de la Révolution Verte est supérieure aux plantes sauvages, alors que le métabolisme carboné (composants des photosystèmes, enzymes du métabolisme des sucres, ou encore le transport de sucres) est régulé négativement par la protéine DELLA SLR1 chez le riz (Li et al., 2018). De plus, il est connu depuis longtemps que les cultivars semi-nains présentent une meilleure répartition des produits assimilés par la photosynthèse entre la tige et les graines, cependant, le mécanisme impliqué reste méconnu (Hedden, 2003). Aujourd'hui, seule la découverte de la relation antagoniste entre GFR4 et SLR1 chez le riz a permis de mieux comprendre le rôle des GA pour le métabolisme carboné et azoté (Li et al., 2018). Des études complémentaires devront être réalisées pour approfondir des connaissances encore morcelées.

Dans le sol, la disponibilité de plusieurs éléments nutritifs peut être limitante pour le développement de la plante. Les études sur les effets combinés de carences pour plusieurs éléments nutritifs sur l'architecture du système racinaire par rapport à la carence pour un seul nutriment ont révélé des effets synergiques, antagonistes ou nuls (Kellermeier et al., 2014). Comment la plante intègre et s'adapte à ces multiples stress nutritionnels et quels sont les mécanismes moléculaires impliqués, sont des questions émergentes qui commencent seulement à être étudiées (Bouain et al., 2019). Comme la signalisation GA est impliquée dans les mécanismes d'adaptation des plantes à certaines carences en éléments minéraux, comme le fer, le phosphate ou le nitrate, elle pourrait constituer un niveau d'intégration et de régulation pour la plante pour adapter sa croissance à ces stress combinés.

Pris dans son ensemble, mon travail de thèse a, en partie, permis de fournir les bases, et d'apporter des éléments de connaissance importants sur la compréhension de la perception et de l'adaptation des plantes en réponse à la disponibilité en nitrate essentiel à leur développement, et aux fluctuations de températures de plus en plus fréquentes avec le changement climatique.

Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

1.1.1. Mutants

Les mutants *global-DELLA*, *gai-t6 rga-24*, *ga20ox1* et *shy2-31* sont dans le fond génétique Landsberg *erecta*. Les autres mutants sont dans le fond génétique Columbia.

Mutants <i>Arabidopsis</i>	Origine / Référence
<i>global-DELLA (gai-t6 rga-t2 rgl1-1 rgl2-1 rgl3-4)</i>	Koini et al., 2009
<i>gai-t6 rga-24</i>	King et al., 2001
<i>ga20ox1</i>	Rieu et al., 2008
<i>shy2-31</i>	Sabrina Sabatini / Moubayidin et al., 2010
<i>ga1-3</i>	Tyler et al., 2004
<i>nia1 nia2</i>	José Leon / Lozano-Juste and Leon, 2010
<i>nrt2.1-2</i>	SALK_035429 (NASC)
<i>npf2.12</i>	SALK_138987 (NASC, Eilon Shani)
<i>npf2.13</i>	SALK_022429 (NASC)
<i>npf2.12 npf2.13</i>	Laboratoire
<i>ga1-3 npf2.13</i>	Laboratoire

Les graines de blés sauvage (*Rht-1*) semi-nains *Rht-D1b* et *Rht-B1c* (cultivar Cadenza), nous ont été envoyés par le Dr SG. Thomas (Rothamsted research).

1.1.2. Lignées transgéniques

L'ensemble des lignées transgéniques utilisées sont dans le fond génétique Columbia à l'exception de la lignée *pRGA:GFP-RGA* qui est dans Landsberg *erecta*.

Lignée transgénique	Origine / Référence
<i>pRGA:GFP-RGA</i>	Tai-ping Sun / Silverstone et al., 2001
<i>pCYCB1,2:Dbox-GUS</i>	NASC
<i>gai-t6 rga-24 pCYCB1,2:Dbox-GUS^a</i>	Laboratoire
<i>pSHY2:GUS</i>	Sabrina Sabatini / Moubayidin et al., 2010

<i>pNPF2.12:GUS</i>	Eilon Shani
<i>pNPF2.13:GUS</i>	Laboratoire
<i>pNPF2.13:NPF2.13-VENUS npf2.13</i>	Laboratoire
<i>pKAO1:KAO1-GFP</i>	Laboratoire (Thomas Regnault)
<i>pKAO2:KAO2-GFP</i>	Laboratoire (Thomas Regnault)

^aLa lignée *pCYCB1,2:Dbox-GUS* (Col-0) a été croisée avec le double mutant *gai-t6 rga-24* (Ler). La génération F3 a été rétrocroisée une fois avec la lignée *pCYCB1,2:Dbox-GUS* (Col-0). Deux lignées homozygotes indépendantes (#7 et #18) ont été sélectionnées.

1.2. Souches bactériennes

1.2.1. *Escherichia coli*

Souche Top10 (Invitrogen) : Cette souche est utilisée pour amplifier les plasmides de type Gateway.

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.

2. Méthodes

2.1. Techniques relatives aux plantes

2.1.1. Conditions de culture pour *Arabidopsis*

2.1.1.1. Culture *in vitro*

Les graines sont stérilisées en surface par une solution d'éthanol 70% pendant 10 min puis par 3 lavages successifs à l'éthanol 100% pendant 1 min chacun et séchées en condition stérile. Les mutants de biosynthèse de GA (*ga1-3* et *kao1 kao2*) sont traités pendant au moins 3 jours à 4°C avec 10 µM de GA₃ (Sigma-Aldrich) et rincées 3 fois avec de l'eau stérile. Les graines sont semées en boîtes de Pétri contenant du milieu 1x Murashige-Skoog (MS) modifié sans source d'azote (Ref 30630200; bioWORLD plantmedia) supplémenté avec différentes concentrations en KNO₃ ou 0,5 mM glutamine (comme indiqué dans les figures), 0,5 mM NH₄-

succinate (Santa Cruz Biothenology), 1% sucrose et 1% ultrapure agar (Merck) or 1% type A agar (Sigma-Aldrich) ou sans agar pour les cultures en milieu MS liquide (dosages de GA chez les plantules d'*Arabidopsis*). Pour certaines expériences les graines sont semées sur un milieu MS standard (Duchefa Biochemical), 1% sucrose et 1% agar (Sigma-Aldrich). Tous les milieux sont tamponnés à un pH 5,8 avec du KOH 1 N. Après une stratification des graines d'au moins 2 jours à 4°C à l'obscurité, les boîtes sont transférées en chambre de culture (Sanyo) sous une photopériode de 16h de lumière ($85 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) et 8h à l'obscurité, à une température de 22°C. Seules les plantes sauvages Col-0 et mutantes *npf2.12 npf2.13* (Partie 1 du chapitre 2, résultats paragraphe 2.1.3.2) ont été cultivées en logette de culture *in vitro* avec une photopériode de 16h lumière et 8h obscurité (21°C/17°C).

Pour les cinétiques de transfert de milieu pauvre à optimal en nitrate (et inversement) (chapitre 1), les graines sont semées sur des membranes en nylon avec des mailles espacées de 38 μm (SEFAR NITEX 03-38/22) déposées sur le milieu de culture. Pour le point de cinétique 72h, les plantules sont transférées 4 jours après le semis, pour le point 48h les plantules sont transférées 5 jours après le semis et ainsi de suite. Ainsi les plantules sont toutes récoltées en même temps après 7 jours de croissance. L'AZD-8055 (inhibiteur de l'activité TOR) nous a été fourni par le Dr. Mikhail Schepetilnikov.

Pour l'analyse de l'expression des gènes du métabolisme des GA (chapitre 1), les plantules sauvages ont été transférées de 0,5 mM KNO_3 à 0,5 mM KNO_3 (condition contrôle) ou à 10 mM KNO_3 pendant les différents temps indiqués. Les ions K^+ ont été ajustés avec du KCl dans les milieux de culture et les plantes ont été cultivées en lumière continue.

2.1.1.2. Culture en système « split-root » *in vitro*

Ce protocole est adapté de (Ruffel et al., 2011). Les graines sont semées en boîte de Pétri sur un milieu MS modifié sans N (3 mM sucrose) supplémenté avec 0,1 mM KNO_3 et 0,5 mM NH_4 -succinate. La racine principale des plantules est coupée en dessous des 2 premières racines latérales. Ces deux racines latérales formeront les deux nouvelles « racines principales ». À 14 jours, les plantules sont transférées sur un milieu MS sans N en présence uniquement de 0,5 mM NH_4 -succinate comme source d'azote, pendant 4 jours supplémentaires. À 18 jours les plantules sont transférées sur les milieux « split-roots » où le système racinaire est séparé en 2 parties égales. Les boîtes finales sont préparées avec 50 mL de milieux MS sans N réparti dans des boîtes de Pétri carrées de 12 cm. Une bande d'agar de 1 cm est retirée en haut et en bas de la boîte, ainsi qu'une bande de 5 mm au centre pour isoler deux compartiments. La veille du transfert des plantules, 5 mM KNO_3 et 5 mM KCl sont étalées sur les milieux pour exposer les plantules à différentes disponibilités en nitrate. Le volume de KNO_3 et KCl à déposer est déterminé en mesurant la quantité d'agar enlevée. Les trois conditions de

traitement sont : (i) la condition C.KNO₃ contenant 5 mM KNO₃ dans chaque compartiment ; (ii) la condition C.KCl contenant 5 mM KCl dans chaque compartiment ; (iii) la condition hétérogène (Sp.KNO₃ / Sp. KCl) où un compartiment contient 5 mM KNO₃ et l'autre 5 mM KCl. Après transfert des plantules, les boîtes de Pétri sont placées en position verticales en chambre de culture (Sanyo) sous une photopériode de 16h de lumière (85 μmol photons m⁻² sec⁻¹) et 8h à l'obscurité, à une température de 22°C. Les mesures de croissance sont réalisées 4 jours après le transfert.

2.1.1.3. Culture en système « split-root » en hydroponie non stérile

Ces expériences ont été réalisées par Dr. Sandrine Ruffel de Montpellier. Les graines sont semées au centre de bouchons Eppendorf noir contenant une solution d'eau et d'agarose 0,9% et cultivées 7 jours sur des bassines remplies d'eau. L'eau est ensuite remplacée par une solution nutritive minérale basale contenant 1 mM KH₂PO₄, 1 mM MgSO₄, 7H₂O, 0,25 mM K₂SO₄, 2,5mM CaCl₂, 2H₂O, 0,1mM Na-Fe-EDTA, 50 μM KCl, 30 μM H₃BO₃, 5 μM MnSO₄, H₂O, , 1 μM ZnSO₄, 7H₂O, , 1 μM CuSO₄, 5H₂O, 1 nM (NH₄)₆ Mo₇ O₂₄, 4H₂O, supplémenté avec 1 mM NH₄Cl, 0,1 mM KNO₃ comme source de N et ajusté au pH 5.8 avec du KOH 2N. La solution nutritive est renouvelée tous les 4 jours. 19 jours après le semis, la racine principale est coupée en dessous de la 2^{ème} racine latérale pour stimuler la formation de deux systèmes racinaires. Après 15 jours de croissance supplémentaire, les plantes âgées de 34 jours sont transférées dans les systèmes « split-root ». 10 jours plus tard la solution nutritive est renouvelée mais sans KNO₃. Après 4 jours de culture sans source de KNO₃, la solution nutritive est remplacée par une solution sans source d'azote pendant 24h. Le traitement est finalement réalisé sur des plantes âgées de 49 jours pendant deux jours par l'ajout de 1 mM KNO₃ ou 1 mM KCl des deux côtés du système « split-root » (C.KNO₃ et C.KCl) ou 1 mM KNO₃ d'un côté et 1 mM KCl de l'autre côté du système « split-root » (Sp.KNO₃/Sp.KCl). Les plantes sont cultivées sous une photopériode de 8h lumière (260 μmol photon m⁻² s⁻¹) et 16h d'obscurité (23°C/21°C).

2.1.1.4. Culture en sol

Pour les expériences en sol du chapitre 1 et le dosage de GA₁₂ dans le phloème (Partie 1 du chapitre 2, résultats paragraphe 2.1.3.3), les plantes sont cultivées en pots de 7 cm de diamètre remplis d'un mélange de perlite/vermiculite (1/2, v/v) complété avec 5% de terreau (LAT-Terra Standard P - Hawita-Gruppe) tamisé à 10 mm. Les plantes sont cultivées en logette en conditions contrôlées sous une photopériode de 16h lumière / 8h obscurité (21°C / 18°C). Les pots sont arrosés quotidiennement et la teneur en eau est ajustée deux fois par semaine par pesée. Dix jours après le semis, les plantes sont supplémentées une fois par

semaine avec 5 mL de solution nutritive (1x MS modifié sans azote, pH 5,8) supplémenté avec du KNO₃ comme indiqué ; les K⁺ sont ajustés avec du KCl.

Pour les expériences de la partie 1 du chapitre 2 (résultats paragraphe 2.1.3.2 et les lignées *pNPF:GUS* âgées de 4 semaines), les plantes sont cultivés dans des pots de 7 cm de diamètre complétés de terreau (LAT-Terra Standard P - Hawita-Gruppe) sans ajout de fertilisants, en logettes en conditions contrôlées sous une photopériode de 16h lumière / 8h obscurité (21°C / 18°C). Les mutants *ga1-3* ont été traitées deux fois par pulvérisations avec de la GA₃ (100 µM) deux semaines avant le dépôt de GA₁₂ à 1 µM (OChemim).

2.1.2. Conditions de culture pour le blé

Au laboratoire, les plantes sont cultivées en pots de 13 cm de diamètre remplis d'un mélange de perlite/vermiculite (1/2, v/v) complété avec 5% de terreau (LAT-Terra Standard P - Hawita-Gruppe) tamisé à 10 mm, en logette de culture avec une photopériode de 16h lumière à 20°C et 8h obscurité à 15°C. Les pots sont arrosés quotidiennement et la teneur en eau est ajustée deux fois par semaine par pesée. Les plantes sont supplémentées trois fois par semaine avec 13 mL de solution de 1x Letcombe modifiée sans (-N) ou avec azote (+N), pH 5,8 (voir tableau ci-dessous).

Letcombe micronutrients 1000x	Solution 1x Letcombe modifiée +N	Solution 1x Letcombe modifiée -N
160 µM CuSO ₄ . 5 H ₂ O	1,5 mM Ca(NO ₃) ₂ . 4 H ₂ O	1,5 mM CaCl ₂
160 µM CuCl ₂ . 2 H ₂ O	5 mM KNO ₃	5 mM KCl
9,2 mM H ₃ BO ₃	2 mM NaNO ₃	2 mM NaCl
3,6 mM MnCl ₂ . 4 H ₂ O	1 mM MgSO ₄ . 7 H ₂ O	1 mM MgSO ₄ . 7 H ₂ O
16 µM Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	1 mM KH ₂ PO ₄	1 mM KH ₂ PO ₄
5 mM KCl	25 µM FeNaEDTA	25 µM FeNaEDTA
770 µM ZnCl ₂	1 mL/L of Letcombe micronutrients 1000x	1 mL/L of Letcombe micronutrients 1000x

2.1.3. Micro-greffes d'*Arabidopsis*

Des plantules âgées de 6 à 7 jours sont cultivées sur milieu MS standard (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 Pétri, 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 4 jours (16h/8h lumière/obscurité, 22°C). Les plantules greffées sont ensuite transférées sur milieu MS standard (1% sucrose, 1% agar) et la longueur de la racine est mesurée quotidiennement.

2.1.4. Analyse de la croissance d'Arabidopsis et du blé

Chez *Arabidopsis*, la hauteur des plantes est mesurée à partir de la base de la rosette chez des plantes âgées de 7 semaines. Le nombre de tiges principales (tiges de plus de 5 mm de longueur, émergeant de la base de la rosette) est déterminé chez des plantes âgées de 8 semaines.

La longueur des racines principales et racines latérales est mesurée à l'aide du logiciel ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

La longueur ainsi que le nombre de cellule corticale du méristème racinaire sont déterminées à partir du centre quiescent (QC) jusqu'à la première cellule en élongation marquée par la formation de la vacuole (Achard et al., 2009), par microscopie (objectifs X20 ou X40, Axiomager Z1, Zeiss). La longueur des cellules corticales dans la zone différenciée de la racine est mesurée par ImageJ.

Chez le blé, la longueur de la gaine (« leaf sheath ») de la première feuille formée est mesurée à partir de la base du collet.

2.1.5. Transformation stable d'Arabidopsis

Les plantes sont transformées par immersion florale dans une solution d'Agrobactéries (Clough et Bent, 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.

2.2. Techniques relatives à l'ADN

2.2.1. Extraction de l'ADN

100 mg de matériel végétal sont placés dans un tube Sarstedt à bouchon vissé et broyés à l'aide de billes en verre (\varnothing 0,5mm) dans le broyeur Precellys®. La poudre est homogénéisée dans 500 μ L de tampon d'extraction Edwards (200mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS). Après 5min de centrifugation à 21 000 g, 300 μ L de la phase supérieure sont prélevés et mélangés à 300 μ L d'isopropanol afin de précipiter l'ADN. Après 15min de centrifugation à 21 000 g, le culot obtenu est rincé avec de l'éthanol 70% (v/v) et resuspendu dans 100 μ L d'eau stérile. La concentration en ADN est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm (Nanodrop 2000, Thermo Scientific).

2.2.2. Extraction de plasmides

Les bactéries sont cultivées dans 3 mL de milieu LB (lysogeny broth) 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.

2.2.3. La PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) 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 décrites en annexes 1, 3 et 4. Lorsque nécessaire, les séquences de recombinaisons indispensables aux clonages sont ajoutées aux 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 High-Fidelity (Thermo Scientist). Les mélanges réactionnels sont les suivants :

Phire Hot Start II (20 μ L de volume réactionnel)		Phusion High-Fidelity (50 μ L de volume réactionnel)	
Matrice d'ADN	100 ng	Matrice d'ADN	100 ng
Amorce sens (10 μ M)	0,5 μ L	Master Mix	25 μ L
Amorce antisens (10 μ M)	0,5 μ L	Amorce sens (10 μ M)	1 μ L
dNTP (10 mM)	0,4 μ L	Amorce antisens (10 μ M)	1 μ L
Tampon de l'enzyme 5X	4 μ L	H ₂ O qsp	50 μ L
ADN polymérase	0,2 μ L		
H ₂ O qsp	20 μ L		

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 5 min à 72°C terminant l'élongation des brins. En fonction de l'enzyme utilisée, le programme de PCR est le suivant :

Étape	Phire Hot Start II	Phusion High-Fidelity
Étape initiale	98°C, 3 min	98°C, 3 min
Dénaturation	98°C, 30 sec	98°C, 30 sec
Hybridation	T_m , 30 sec	T_m , 30 sec
Élongation	72°C, 30 sec par kb	72°C, 30 sec par kb
Étape finale	72°C, 5 min	72°C, 5 min

La révélation de l'amplification se fait sous UV après électrophorèse sur gel d'agarose (le pourcentage varie suivant la taille des amplicons) contenant du bromure d'ethyidium (BET) dans du tampon TAE (40 mM Tris-acétate, 0,1 mM EDTA).

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. Pour le gène *NPF2.13*, l'ADN complémentaire (ADNc) a été amplifié à partir du plasmide R21823 obtenu au RIKEN Bioresource Center, Japon. Les fragments ont été séparés par migration sur gel d'agarose 1%. Le fragment d'intérêt a été découpé du gel à la taille attendue et purifié à l'aide du kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) selon les indications fournies par le fabricant.

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 pDONR (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. Le vecteur est amplifié dans *E. coli* puis introduit dans *Agrobacterium tumefaciens* (souche GV301) par électroporation à 2,5 kV et 400 Ω (GenePulser, Biorad).

La construction *pNPF2.13:GUS* est obtenue par une double recombinaison. Le promoteur *pNPF2.13* (1,7 kb) est inséré dans le vecteur d'entrée pDONR221 et le plasmide de destination utilisé est le pGWB633 (Nakamura et al., 2010).

La construction *pNPF2.13:NPF2.13-VENUS* est obtenue par une triple recombinaison. Le promoteur *pNPF2.13* (1,7 kb) est inséré dans le vecteur d'entrée pDONR P4-P1R, l'ADNc de *NPF2.13* est inséré dans le vecteur d'entrée pDONR221 et la VENUS est insérée dans le vecteur d'entrée pDONR P2R-P3. Le vecteur de destination utilisé est le pB7m34GW (Karimi et al., 2005).

Deux autres constructions ont également été réalisées mais ne sont présentées dans ma thèse :

- la construction *p35S:NPF2.13* issue de la double recombinaison entre le vecteur d'entrée (pDONR221 + ADNc *NPF2.13*) et le vecteur de destination pB2GW7 (Karimi et al., 2005),
- la construction *pSUC2:NPF2.13-VENUS* issue de la triple recombinaison entre le vecteur d'entrée (pDONR P4P1R + *pSUC2*) fourni par Dr Marion Clavel, le vecteur d'entrée (pDONR221 + ADNc *NPF2.13*) et le vecteur de destination pB7m34GW (Karimi et al., 2005).

2.3. Analyse de l'expression des gènes

2.3.1. Extraction des ARN

100mg de matériel végétal est introduit dans un tube Eppendorf de type « safe lock » contenant des billes de verre (Ø 0,5mm) stériles, puis 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).

Suivant les expériences, les ARN totaux sont extraits avec un second protocole. Après le broyage du matériel végétal, la poudre est homogénéisée dans 1 mL de TRI Reagent® (Molecular Research Center). Après un 2nd broyage, 200 µL de chloroforme (Carlo ERBA) sont ajoutés, puis les échantillons sont incubés 5 min dans la glace. Après une centrifugation à 4°C

à 21 000 *g* pendant 7 min, la phase aqueuse (400 μ L) est prélevée puis mélangée à 400 μ L d'isopropanol (v/v). Après agitation, les ARN sont précipités pendant 30 min à température ambiante. Après centrifugation à 4°C à 21 000 *g* pendant 15 min, le surnageant est enlevé et le culot contenant les ARN est lavé avec un 1 mL d'éthanol 70%. Après évaporation de l'éthanol, les ARN sont resuspendus dans 100 μ L d'H₂O RNA-free. La concentration en ARN est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm (Nanodrop 2000, Thermo Scientific).

2.3.2. *Transcription inverse des ARN*

Après extraction de l'ARN, l'ADN résiduel est éliminé par traitement des échantillons avec la DNase I (Promega), pendant 50 min à 37°C. La transcription inverse (RT) est réalisée avec 1 à 2 μ g d'ARN totaux, dans un volume total de 40 μ L avec le tampon de l'enzyme, 2 μ M d'oligo(dT)₂₀, 0,5 mM de déoxynucléotide triphosphate (dNTP), 5 mM de dithiothréitol (DTT), et 200 unités/ μ L de Superscript IV reverse transcriptase (Invitrogen). Le mélange réactionnel est incubé à 50°C pendant 30 min, puis la réaction est inactivée à 80°C pendant 10 min.

2.3.3. *PCR quantitative*

La PCR quantitative (qPCR) utilise des amorces de gènes spécifiques (Annexe 2), dans un volume réactionnel total de 10 μ L de SYBR Green Master Mix (Roche) et est réalisée avec l'appareil LightCycler[®] 480 II (Roche). Le programme utilisé est le suivant : dénaturation (95°C, 5 min), PCR (45 cycles : dénaturation des amplicons à 95°C 10 sec, hybridation des amorces à 60°C 15 sec, polymérisation à 72°C 15 sec). Puis un gradient de température (55 à 95°C en 1 min) en lecture continue de la fluorescence permet d'établir une courbe de fusion et de vérifier la présence d'un seul amplicon par couple d'amorces. La valeur moyenne de trois répliquats techniques est normalisée par rapport aux gènes de référence *SAND* (AT2G28390), *EXP* (AT4G26410) ou *TIP41-Like* (AT4G34270) pour *Arabidopsis* et *Actine* pour le blé (Pearce et al., 2015), et est calculée à l'aide du logiciel Lightcycler 480 1.5.0 SP3.

2.4. Analyse des protéines

2.4.1. *Extraction des protéines totales*

100 mg de matériel végétal préalablement congelés dans de l'azote liquide sont réduits en poudre à l'aide de billes en verre et de l'utilisation du broyeur Precellys[®]. Les protéines sont extraites en présence d'un tampon dénaturant (Tris-base 62,5 mM, Urée 4 M, SDS 3% (p/v), dithiothréitol (DTT) 100 mM, Glycérol 10% (v/v), Bleu de bromophénol 0,1% (p/v), pH 6.8) en suivant une étape de dénaturation à 95°C pendant 5 min et une centrifugation à 21 000 *g*

pendant 15 min. Le surnageant contenant les protéines totales est collecté puis conservé à -20°C.

2.4.2. Quantification des protéines

La concentration des protéines totales extraites est déterminée selon la méthode colorimétrique Amido Black. Cette méthode repose sur la précipitation des protéines dans le méthanol en milieu acide, et leur coloration par l'Amido Black. Pour cela, 10 µL d'extraits protéiques sont dilués dans 190 µL d'eau et 1 mL de solution Amido Black (acide acétique 10% (v/v), méthanol 90% (v/v), et Amido Black 0,05% (p/v)). Après homogénéisation, les protéines sont précipitées par centrifugation à 15 000 rpm pendant 15 mi, puis rincées dans une solution d'acide acétique 10% (v/v), éthanol 90% (v/v). Le culot de protéines est ensuite resuspendu dans 1 mL de NaOH 0,2 N, et l'absorbance de l'extrait est mesurée à 630 nm. La concentration protéique de l'extrait est calculée en se référant à une gamme étalon préalablement réalisée avec de la BSA (Albumine de Sérum Bovin).

2.4.3. Séparation et détection des protéines par SDS-PAGE

Entre 5 et 15 µg de protéines totales par extrait sont séparées par migration électrophorétique dans un gel acrylamide de 8% à 10% dénaturant SDS-PAGE (préparé selon Sambrook et Russel, 2001). Les protéines séparées selon leur taille apparente par migration pendant 2 h à 110V 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), pendant 2 h à 100 V, dans un tampon de transfert (25 mM Tris-base, 192 mM Glycine, 15% éthanol technique (v/v)). Après transfert, la membrane est bloquée pendant 1 h dans du TBS-T (Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, Tween 20 0,1% (v/v)) contenant 5% de lait en poudre ou 2% de BSA (si l'anticorps primaire est dilué dans le BSA). 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 2 h. Après 3 nouveaux lavages de 10 min dans du TBS-T, la révélation est effectuée par chimiluminescence avec du Luminata Forte Western HRP (Millipore) ou Clarty Max™ Western ECL (Biorad). Les anticorps primaires utilisés sont l'anti-RGA (dilué au 1000^{ème}, Agrisera), l'anti-GFP (dilué au 5000^{ème}, JL8, Clontech), l'anti-S6K1-T449P (Santa-Cruz Biotechnology, fourni par Dr Mikhail Schepetilnikov), l'anti-cdc2 (dilué au 5000^{ème}, PSTAIR, Santa Cruz Biotechnology). Les anticorps secondaires utilisés sont le goat anti-rabbit IgG et le goat anti-mouse IgG (dilué au 10000^{ème}, Molecular Probe), couplés à la HRP (Horseradish peroxidase). Le contrôle de charge est réalisé avec l'anti-cdc2 (PSTAIR) ou par coloration de la membrane au bleu de Coomassie (450 mL méthanol, 450

mL H₂O, 100 mL acide acétique, 2,5 g Brillant blue R250 (Sigma-Aldrich)), pendant 20 min, suivie de plusieurs lavages à l'eau distillée puis séchage de la membrane. La quantification des signaux est réalisée avec ImageJ.

2.4.4. Observations de la fluorescence GFP par microscopie confocale

La fluorescence GFP (excitation à 488 nm / émission à 504 nm) dans l'apex des racines de plantules *pRGA:GFP-RGA* âgées de 7 jours, cultivées *in vitro*, est observée à l'aide d'un microscope confocal Zeiss LSM780 avec un objectif 20X. Les racines sont préalablement traitées avec de l'iodure de propidium (10 µg/mL, Sigma) pour colorer les parois cellulaires. Toutes les images ont été obtenues avec les mêmes modifications et selon les mêmes paramètres d'intensité.

2.5. Analyses histochimiques

2.5.1. Coloration GUS

Le matériel végétal est fixé dans de l'acétone 90% sur glace pendant 10 min puis est infiltré sous vide (0,8 bar) pendant 15 min dans une solution GUS (5-bromo- 4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (X-Gluc) 250 µg/mL, 50 mM sodium phosphate pH 7,2 mM potassium ferricyanide, 2 mM potassium ferrocyanide, 10 mM EDTA, 0,01% Triton X-100 (v/v)). Le potassium ferricyanide et ferrocyanide sont retirés du tampon pour les analyses réalisées avec les lignées *pNPF2.12:GUS* et *pNPF2.13:GUS*. Après une nuit d'incubation à 37°C, la réaction est arrêtée par immersion des plantules dans de l'éthanol 70% (v/v).

Pour l'observation des racines, l'éthanol 70% est remplacé par une solution contenant 0,24 N HCl dans 20% méthanol et les plantules sont placées à 57°C pendant 15 minutes. Cette solution est ensuite remplacée par 7% NaOH dans 60% éthanol pendant 15 min à température ambiante. Les plantules sont enfin réhydratées dans des bains successifs de 40%, 20% et 10% d'éthanol pendant 5 min, chacun, et infiltrées (à 0,8 bar) pendant 10 min dans 5% éthanol 25% glycérol. Les racines sont montées sur lames dans 50% glycérol et observées à l'aide d'un microscope Axiomager Z1 (Zeiss).

2.5.2. Coupe transversale de pétiole des feuilles *pNPF2.12:GUS*

Après la coloration GUS, les pétioles des feuilles de la lignée *pNPF2.12:GUS* âgées de 4 semaines sont incubés dans un tampon de fixation FAA (3,2% Formaldéhyde, 5% acide acétique et 50% éthanol) pendant 30 min à température ambiante. Les échantillons sont lavés successivement 2x30 min dans 50% éthanol, puis 2x30 min dans 70% éthanol, puis 2x30 min

dans 96% éthanol. Ensuite les pétioles sont placés dans une solution contenant 96% éthanol et 0,1% éosine sur la nuit à 4°C et lavés 3x40 min dans 96% éthanol. Les échantillons sont ensuite placés des bains successifs de 75% éthanol et 25% HistoClear (HISTOCHOICE® Clearing Agent, Electron Microscopy Sciences) ; 50% éthanol et 50% HistoClear ; 25% éthanol et 75% HistoClear pendant 15 min chaque puis plongés 3x30 min dans 100% HistoClear. Les échantillons sont incubés dans un mélange de 50% HistoClear et 50% paraplast (Paraplast Plus, McCormick Scientific) à 60°C pendant 2 h, puis placés dans 100% paraplast à 60°C pendant 3 jours. Après l'inclusion dans le paraplast, les coupes transversales sont réalisées à l'aide du Leica RM2155 à une épaisseur de 50 µm. Les coupes sont déposées sur des lames de microscopes puis successivement rincées avec 100% HistoClear, puis 96%, 70%, 50% éthanol. L'observation est réalisée dans l'eau à l'aide du microscope optique Leica DRMB à l'objectif X20.

2.5.3. Coloration au Carmin vert d'iode (réactif de Mirande)

Des coupes transversales de pétioles de feuilles sont réalisées sur des plantes sauvages Col-0 âgées de 4 semaines. Les pétioles sont placés entre deux morceaux de polystyrènes puis coupés transversalement à l'aide d'une lame de rasoir. Les coupes sont incubées dans de l'hypochlorite de sodium pendant 20 min afin de détruire le contenu cellulaire, puis rincées à l'eau pendant 10 min avec agitation. L'eau est remplacée par de l'acide acétique 5% pendant 5 min pour favoriser le mordantage du colorant. La coloration au Carmin vert d'iode s'effectue pendant 1 à 3 min et est finalement suivie de plusieurs étapes de lavage à l'eau. Les coupes transversales sont montées sur lame dans de l'eau glycinée et observées au microscope optique Leica DMRB.

2.6. Purification de polysomes

La purification des polysomes a été effectuée avec l'aide de Dr. Mikhail Schepetilnikov. 100 à 500 mg de matériel végétal frais sont broyés au mortier/pilon à 4°C dans un tampon d'extraction des polysomes PEB (200 mM HEPES pH 8, 150 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 25 mM EGTA pH 8, 250 mM sucrose, 5 mM DDT, 100 µg/mL cycloheximide, 5 µL RNase out, cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche), 0,5% NP-40) à 4°C pendant 15 min. Les débris cellulaires sont enlevés par deux étapes de centrifugation à 10 000 g de 15 min à 4°C. Une fraction du surnageant (fraction totale) est gardée pour être utilisée comme contrôle interne du niveau total des ARNm par RT-qPCR. Le surnageant est déposé sur une solution de 50% sucrose (w/w) contenant 100 mM HEPES pH 8, 100 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 25 mM EGTA pH 8, 250 mM sucrose, 1 mM DDT, 50 µg/mL Cycloheximide, 1 µL RNase out, cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche) et centrifugé à 53 000 rpm (Berckmann Optima MAX-XP, rotor TLA-110)

pendant 2 h à 4°C. Après avoir enlevé le surnageant et la solution de sucrose, le culot est resuspendu dans 200 µL de tampon de resuspension des polysomes PRB (20 mM HEPES pH 7,6, 30 mM KCl, 5 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DDT, 10 µg/mL cycloheximide, 1 µL RNase out, cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche)) puis centrifugé à 10 000 g à 4°C pendant 15 min. Le surnageant (fraction contenant les polysomes) est placé dans un nouveau tube et la concentration en ARN des différentes fractions est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm (Nanodrop 2000, Thermo Scientific).

2.7. Expression hétérologue en ovocyte de *Xenopus laevis*

Les tests d'import de GA en oocytes de *Xenopus laevis* ont été réalisés par Dr Nikolai Wulff, suivant la méthode décrite par Wulff et al. (2019).

Des oocytes *Xenopus laevis* (stade V-VI) ont été obtenus chez Ecocyte Biosciences et ont été injectés avec 25 ng ARNc dans 50,6 nL (500 ng/µl) en utilisant un Drummond Nanoject II. Avant utilisation, les oocytes sont incubés pendant 2-4 jours à 16 °C dans un tampon kulori HEPES-based (90 mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 5 mM HEPES pH 7,4). Les oocytes transformés sont pré-incubés dans un tampon kulori MES-based (90 mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 5 mM MES pH 5) pendant 4 min puis transférés dans un tampon kulori MES-based contenant les GA pendant 60 min. Par la suite, les oocytes sont lavés 3 fois dans un tampon kulori HEPES-based, suivi par un lavage dans 25 mL d'eau déminéralisée et homogénéisés dans 50% de méthanol et stockés à -20°C pendant au moins 30 min. Après une centrifugation (25 000 g pendant 10 min à 4°C), le surnageant est mélangé avec de l'eau déminéralisée pour obtenir une concentration en méthanol de 20% et filtré (0,22 µm, MSGVN2250, Merck Millipore) avant les analyses par LC-MS/MS (ci-après, paragraphe 2.8.4.1).

2.8. Dosages de GA et de nitrate

2.8.1. Dosages de GA dans les plantules d'*Arabidopsis* et chez le blé

Les contenus en GA chez les plantules d'*Arabidopsis* cultivées 7 jours en MS liquide et dans le premier entre-nœuds chez le blé âgé de 3 semaines ont été déterminés par Dr Esther Carerra Bergua (IBMCP, Valence, Espagne) par chromatographie liquide à ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse (UHPLC-MS) utilisant un Q-Exactive spectromètre (détecteur Orbitrap; ThermoFisher Scientific). Le matériel broyé à sec est homogénéisé dans 80% méthanol-1% acide acétique incluant les standards internes 17-²H₂-labeled GA (Olchemim) par agitation pendant 1 h à 4°C. L'extrait est stocké à -20°C sur la nuit, puis centrifugé et le surnageant est mis à sec (SpeedVac). Le résidu sec est dissout dans 1%

acide acétique et consécutivement passé aux travers d'une colonne Oasis HLB (phase inverse), d'une colonne Oasis MCX (échange de cations), et d'une colonne WAX (échange anionique). Les GA sont éluées de la dernière colonne est avec 80% méthanol-1% acide acétique et l'éluât est mis à sec (SpeedVac). L'éluât sec est resuspendu dans 5% acétonitrile-1% acide acétique et les GA sont séparées par UHPLC (Accucore RP-MS column 2.6 μ m, 50 x 2.1 mm; ThermoFisher Scientific) avec un gradient d'acétonitrile de 5 à 50% contenant 0,05% d'acide acétique, à raison de 400 μ L/min pendant 14 min. La concentration des GA dans les extraits a été analysée par SIM (selected ion monitoring) en utilisant des courbes standards et les programmes Xcalibur 2.2 SP1 build 48 et TraceFinder.

2.8.2. Analyse de la sève brute d'Arabidopsis

Les plantes âgées de 6 semaines, soit quelques jours après l'induction florale, sont utilisées pour ces expériences. 24 h avant le prélèvement, les plantes sont placées en mini-serre et les pots imbibés d'eau. La tige des plantes est coupée 2 cm au-dessus de la rosette, et la première goutte formée quelques minutes après la coupure est éliminée. Les gouttes suivantes sont collectées toutes les 10-20 min dans un tube Eppendorf de 1,5 mL pendant 3 h. Les échantillons sont concentrés et réduit à sec (SpeedVac). Le matériel sec est resuspendu dans 80% méthanol-1% acide acétique incluant les standards internes de $17\text{-}^2\text{H}_2$ -labeled GA (Olchemim) et agité pendant 1 h à 4°C. L'extrait est stocké une nuit à -20°C, puis centrifugé, et le surnageant est mis à sec (SpeedVac). Le résidu sec est dissout dans 1% acide acétique et déposé sur une colonne Oasis HLB (phase inverse). Les GA sont éluées avec 95% méthanol-1% acide acétique et l'éluât est mis à sec (SpeedVac). L'éluât sec est resuspendu dans 5% acétonitrile-1% acide acétique.

L'analyse des gibbérellines a été réalisée par Julie Zumsteg et Dr Dimitri Heintz à l'IBMP, avec un spectromètre de masse du type triple quadripôle EvoQ Elite LC-TQ (Bruker, Palaiseau, France), couplé à un appareil de chromatographie liquide à haute pression (UPLC, Thermo scientific Ultimate 3000), La méthode de chromatographie utilise une colonne UPLC de phase inverse C18 (Waters 1.7 μ m, 2mm, 10cm) avec une pré-colonne C18 (Waters 1.7 μ m, 2mm, 2 cm). Les solvants utilisés sont : A (99.9 % eau, 0.1% acide formique), B (99.9% méthanol, 0.1% acide formique). La méthode de chromatographie dure 16 min avec un gradient linéaire débutant avec 5% de méthanol 94.9% d'eau et 0.1% d'acide formique pendant 2 min puis jusqu'à 7 min pour atteindre 98% de méthanol, 1.9 % d'eau et 0.1% d'acide formique. Ensuite, de la minute 7 à la minute 10 on atteint 100% de B. B est encore maintenue pendant 2 min jusqu'à la minute 12. Ensuite, on revient à la condition initiale en 1,5 min (minute 13.5) à 5% de méthanol 94.9% d'eau et 0.1% d'acide formique maintenue pendant 2 min. La quantification des gibbérellines a été réalisée en comparaison des signaux obtenus avec une courbe dose-

réponse à l'aide standard de gibbérellines pures (0.001 μ /ml -100 μ g/ml). La détection des composés a été effectuée en utilisant le mode MRM (multiple reaction monitoring). Brièvement pour chaque gibbérelline l'ionisation optimale a été déterminée sur l'ion parent par la méthode du MRM builder en infusant du standard dans un mélange méthanol. Une fois la meilleure condition d'ionisation déterminée en mode ESI + /- l'ion parent est fragmenté afin d'obtenir des fragments sous différentes énergies de collisions. On détermine ainsi deux fragments, l'un qui sera le « qualifieur » et l'autre le « quantifieur ». Ces deux ions fils seront les signatures pour chacune des gibbérellines et seront utilisées pour l'identification fine et la quantification *in planta* des GA.

2.8.3. Analyse de la sève élaborée d'*Arabidopsis*

75 feuilles matures de plantes âgées de 5 semaines par génotype sont prélevées puis coupées en biseau à l'aide d'une lame de rasoir. Les feuilles sont ensuite placées dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL, le pétiole reposant dans 80 μ L de tampon d'exsudation (50 mM Potassium phosphate, EDTA 10 mM, pH 7,6). L'exsudation dans le tampon se déroule pendant 3 h à l'obscurité, dans une boîte contenant du papier Whatmann imbibé d'eau afin d'assurer un taux d'humidité élevé. Les exsudats des 75 tubes sont ensuite regroupés, concentrés et réduits à sec (SpeedVac). Les contenus en GA sont déterminés comme décrit au paragraphe 2.8.2.

2.8.4. Dosages de GA et du nitrate dans les ovocytes de *Xenopus laevis*

2.8.4.1. Dosages de GA

Les dosages de GA dans les ovocytes de *Xenopus laevis* ont été réalisés par Dr. Christoph Crocoll de l'Université de Copenhague, suivant la méthode décrite par Tal et al. (2016) et Wulff et al. (2019). Les composés dans les extraits d'ovocytes dilués sont analysés directement par LC-MS/MS. La chromatographie est réalisée sur un système Advance UHPLC (Bruker, Brême, Allemagne). La chromatographie en phase liquide est couplée à un spectromètre de masse triplequad EVOQ Elite (Bruker, Brême, Allemagne). Le logiciel MS Workstation de Bruker (version 8.2.1, Bruker, Brême, Allemagne) est utilisé pour l'acquisition et le traitement des données. La concentration des GA dans les extraits est déterminée en se référant à des courbes standard préalablement réalisées. Pour des raisons, la concentration en GA₁₂ n'a pas été normalisée par une courbe étalon et les valeurs indiquées dans la figure 51H représentent l'aire du pic de la GA₁₂.

2.8.4.2. Dosages du nitrate

Les dosages de nitrate dans les oocytes de *Xenopus laevis* ont été effectués par Dr. Vlastimil Novák de l'Université de Copenhague. La concentration en nitrate dans les extraits d'oocytes a été déterminée par chromatographie par échange d'anions Dionex ICS-2100 (Thermo Scientific). La séparation a été effectuée sur une colonne d'analyse Dionex IonPac AG11-HC couplée à une pré-colonne AS11-HC (Thermo Scientific). Les colonnes ont été raccordées à un suppresseur d'anions Dionex AERS 500 (Thermo Scientific). Les analyses ont été effectuées dans les conditions suivantes : volume d'injection de l'échantillon, 4,8 μ L ; température de la colonne, 30°C ; débit, 0,38 mL/min ; gradient d'élution isocratique, 30 mM KOH ; courant, 29 mA ; temps, 15 min. La détection du nitrate a été effectuée à 220 nm par Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific). Des dilutions de Dionex Combined Seven Anion Standard (Thermo Scientific) dans QH₂O ont été utilisées pour réaliser une courbe étalon. L'exactitude et la précision de la quantification ont été vérifiées en incluant des échantillons de nitrate de potassium tout au long de l'analyse.

2.9. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel InfoStat 2014d (Universidad Nacional de Córdoba, Argentine, www.infostat.com.ar). Les études phénotypiques ont été analysées par le test t de Student ($p < 0,05$ et $p < 0,01$) ou une analyse de variance (ANOVA) suivie du test de comparaison multiple et de classement de Tukey (Honest Significant Difference) au risque inférieur à 1 ou 5%.

Bibliographie

Bibliographie

- Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van Der Straeten, D., Peng, J., et Harberd, N.P.** (2006). Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* **311**: 91-4.
- Achard, P., Gong, F., Cheminant, S., Alioua, M., Hedden, P., et 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., Gusti, A., Cheminant, S., Alioua, M., Dhondt, S., Coppens, F., Beeemster, G.T.S., et Genschik, P.** (2009). Gibberellin Signaling Controls Cell Proliferation Rate in Arabidopsis. *Curr. Biol.* **19**: 1188-1193.
- Achard, P., Liao, L., Jiang, C., Desnos, T., Bartlett, J., Fu, X., et Harberd, N.P.** (2007). DELLA Contribute to Plant Photomorphogenesis. *Plant Physiol.* **143**: 1163-1172.
- Achard, P., Renou, J.-P., Berthomé, R., Harberd, N.P., et Genschik, P.** (2008b). Plant DELLA Restrain Growth and Promote Survival of Adversity by Reducing the Levels of Reactive Oxygen Species. *Curr. Biol.* **18**: 656-660.
- Adamec, L.** (1997). Mineral nutrition of carnivorous plants: A review. *Bot. Rev.* **63**: 273-299.
- Aguilar-Martínez, J.A., Poza-Carrión, C., et Cubas, P.** (2007). Arabidopsis BRANCHED1 acts as an integrator of branching signals within axillary buds. *Plant Cell* **19**: 458-72.
- Alabadí, D., Gil, J., Blázquez, M.A., et García-Martínez, J.L.** (2004). Gibberellins repress photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiol.* **134**: 1050-7.
- Albertos, P., Romero-Puertas, M.C., Tatematsu, K., Mateos, I., Sánchez-Vicente, I., Nambara, E., et Lorenzo, O.** (2015). S-nitrosylation triggers ABI5 degradation to promote seed germination and seedling growth. *Nat. Commun.* **6**: 8669.
- Almagro, A., Lin, S.H., et Tsay, Y.F.** (2008). Characterization of the Arabidopsis Nitrate Transporter NRT1.6 Reveals a Role of Nitrate in Early Embryo Development. *Plant Cell* **20**: 3289-3299.
- Alvarez, J.M., Riveras, E., Vidal, E.A., Gras, D.E., Contreras-López, O., Tamayo, K.P., Aceituno, F., Gómez, I., Ruffel, S., Lejay, L., Jordana, X., et Gutiérrez, R.A.** (2014). Systems approach identifies TGA1 and TGA4 transcription factors as important regulatory components of the nitrate response of Arabidopsis thaliana roots. *Plant J.* **80**: 1-13.
- An, F., Zhang, X., Zhu, Z., Ji, Y., He, W., Jiang, Z., Li, M., et Guo, H.** (2012). Coordinated regulation of apical hook development by gibberellins and ethylene in etiolated Arabidopsis seedlings. *Cell Res.* **22**: 915-927.
- De Angeli, A., Monachello, D., Ephritikhine, G., Frachisse, J.M., Thomine, S., Gambale, F., et Barbier-Brygoo, H.** (2006). The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature* **442**: 939-942.
- Arana, M.V., Marín-de la Rosa, N., Maloof, J.N., Blázquez, M.A., et Alabadí, D.** (2011). Circadian oscillation of gibberellin signaling in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 9292-7.
- Araya, T., Kubo, T., von Wirén, N., et Takahashi, H.** (2016). Statistical modeling of nitrogen-dependent modulation of root system architecture in Arabidopsis thaliana. *J. Integr. Plant Biol.* **58**: 254-265.
- Arnaud, N., Girin, T., Sorefan, K., Fuentes, S., Wood, T.A., Lawrenson, T., Sablowski, R., et Østergaard, L.** (2010). Gibberellins control fruit patterning in Arabidopsis

thaliana. Genes Dev. **24**: 2127-32.

- Astier, J., Gross, I., et Durner, J.** (2018). Nitric oxide production in plants: an update. J. Exp. Bot. **69**: 3401-3411.
- Astier, J., Rasul, S., Koen, E., Manzoor, H., Besson-Bard, A., Lamotte, O., Jeandroz, S., Durner, J., Lindermayr, C., et Wendehenne, D.** (2011). S-nitrosylation: An emerging post-translational protein modification in plants. Plant Sci. **181**: 527-533.
- Bai, M.-Y., Shang, J.-X., Oh, E., Fan, M., Bai, Y., Zentella, R., Sun, T., et Wang, Z.-Y.** (2012). Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in *Arabidopsis*. Nat. Cell Biol. **14**: 810-817.
- Besson-Bard, A., Pugin, A., et Wendehenne, D.** (2008). New Insights into Nitric Oxide Signaling in Plants. Annu. Rev. Plant Biol. **59**: 21-39.
- Binenbaum, J., Weinstain, R., et Shani, E.** (2018). Gibberellin Localization and Transport in Plants. Trends Plant Sci. **23**: 410-421.
- Bishop, G., Sakakibara, H., Seo, M., et Yamaguchi, S.** (2015). Biosynthesis of hormones. In Biochemistry and Molecular Biology of Plants, 2nd edition, B.B. Buchanan, W. Gruissem, et R.L. Jones, éd (American Society of Plant Biologists), p. 1280.
- Bloom, A.J.** (2015). Photorespiration and nitrate assimilation: a major intersection between plant carbon and nitrogen. Photosynth. Res. **123**: 117-128.
- Bouain, N., Krouk, G., Lacombe, B., et Rouached, H.** (2019). Getting to the Root of Plant Mineral Nutrition: Combinatorial Nutrient Stresses Reveal Emergent Properties. Trends Plant Sci. **24**: 542-552.
- Boursiac, Y., Léran, S., Corratgé-Faillie, C., Gojon, A., Krouk, G., et Lacombe, B.** (2013). ABA transport and transporters. Trends Plant Sci. **18**: 325-333.
- Brian, P. et Hemming, H.** (1955). The effect of gibberellic acid on shoot growth and pea seedlings. Plant Physiol. **8**: 669-681.
- Caldana, C., Li, Y., Leisse, A., Zhang, Y., Bartholomaeus, L., Fernie, A.R., Willmitzer, L., et Gialvalisco, P.** (2013). Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal a general metabolic switch controlling growth in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. **73**: 897-909.
- Calvo, S.E., Pagliarini, D.J., et Mootha, V.K.** (2009). Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. Proc. Natl. Acad. Sci. **106**: 7507-7512.
- Camut, L., Davière, J.-M., et Achard, P.** (2017). Dynamic Regulation of DELLA Protein Activity: SPINDLY and SECRET AGENT Unmasked! Mol. Plant **10**: 785-787.
- Carr, D.J., Reid, D.M., et Skene, K.G.M.** (1964). The supply of gibberellins from the root to the shoot. Planta **63**: 382-392.
- Casal, J.J. et Balasubramanian, S.** (2019). Thermomorphogenesis. Annu. Rev. Plant Biol. **70**: 321-346.
- Castaigns, L., Camargo, A., Pocholle, D., Gaudon, V., Texier, Y., Boutet-Mercey, S., Taconnat, L., Renou, J.P., Daniel-Vedele, F., Fernandez, E., Meyer, C., et Krapp, A.** (2009). The nodule inception-like protein 7 modulates nitrate sensing and metabolism in *Arabidopsis*. Plant J. **57**: 426-435.
- Cerezo, M., Tillard, P., Filleur, S., Muñoz, S., Daniel-Vedele, F., et Gojon, A.** (2001). Major Alterations of the Regulation of Root NO₃ - Uptake Are Associated with the Mutation of Nrt2.1 and Nrt2.2 Genes in *Arabidopsis*. Plant Physiol. **127**: 262-271.
- Chaillou, S., Morot-Gaudry, J.-F., Lesaint, C., Salsac, L., et Jolivet, E.** (1986). Nitrate or

ammonium nutrition in french bean. *Plant Soil* **91**: 363-365.

- Chen, L.-Q., Qu, X.-Q., Hou, B.-H., Sosso, D., Osorio, S., Fernie, A.R., et Frommer, W.B.** (2012). Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* **335**: 207-11.
- Chen, Y.J., Ching, W.C., Lin, Y.P., et Chen, Y.J.** (2013). Methods for detection and characterization of protein S-nitrosylation. *Methods* **62**: 138-150.
- Cheng, H., Qin, L., Lee, S., Fu, X., Richards, D.E., Cao, D., Luo, D., Harberd, N.P., et Peng, J.** (2004). Gibberellin regulates Arabidopsis floral development via suppression of DELLA protein function. *Development* **131**: 1055-64.
- Chiba, Y., Shimizu, T., Miyakawa, S., Kanno, Y., Koshiha, T., Kamiya, Y., et Seo, M.** (2015). Identification of Arabidopsis thaliana NRT1/PTR FAMILY (NPF) proteins capable of transporting plant hormones. *J. Plant Res.* **128**: 679-686.
- Choi, J., Summers, W., et Paszkowski, U.** (2018). Mechanisms Underlying Establishment of Arbuscular Mycorrhizal Symbioses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **56**: 135-160.
- Choubane, D., Rabot, A., Mortreau, E., Legourrierec, J., Péron, T., Foucher, F., Ahcène, Y., Pelleschi-Travier, S., Leduc, N., Hamama, L., et Sakr, S.** (2012). Photocontrol of bud burst involves gibberellin biosynthesis in *Rosa* sp. *J. Plant Physiol.* **169**: 1271-1280.
- Chresta, C.M. et al.** (2010). AZD8055 Is a Potent, Selective, and Orally Bioavailable ATP-Competitive Mammalian Target of Rapamycin Kinase Inhibitor with In vitro and In vivo Antitumor Activity. *Cancer Res.* **70**: 288-298.
- Clack, T., Mathews, S., et Sharrock, R.A.** (1994). The phytochrome apoprotein family in Arabidopsis is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant Mol. Biol.* **25**: 413-427.
- Clough, S.J. et Bent, A.F.** (1998). Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **16**: 735-743.
- Colebrook, E.H., Thomas, S.G., Phillips, A.L., et Hedden, P.** (2014). The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. *J. Exp. Biol.* **217**: 67-75.
- Coles, J.P., Phillips, A.L., Croker, S.J., García-Lepe, R., Lewis, M.J., et Hedden, P.** (1999). Modification of gibberellin production and plant development in Arabidopsis by sense and antisense expression of gibberellin 20-oxidase genes. *Plant J.* **17**: 547-556.
- Conti, L., Nelis, S., Zhang, C., Woodcock, A., Swarup, R., Galbiati, M., Tonelli, C., Napier, R., Hedden, P., Bennett, M., et Sadanandom, A.** (2014). Small Ubiquitin-like Modifier Protein SUMO Enables Plants to Control Growth Independently of the Phytohormone Gibberellin. *Dev. Cell* **28**: 102-110.
- Corpas, F.J. et Barroso, J.B.** (2015). Nitric oxide from a « green » perspective. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* **45**: 15-19.
- Corratgé-Faillie, C. et Lacombe, B.** (2017). Substrate (un)specificity of Arabidopsis NRT1/PTR FAMILY (NPF) proteins. *J. Exp. Bot.* **68**: 3107-3113.
- Crawford, N.M.** (1995). Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* **7**: 859-868.
- Crawford, N.M. et Forde, B.G.** (2002). Molecular and Developmental Biology of Inorganic Nitrogen Nutrition. *Arab. B.* **1**: e0011.
- Crawford, N.M. et Glass, A.D.M.** (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends Plant Sci.* **3**: 389-395.
- Crocchi, C.D., Locascio, A., Escudero, C.M., Alabadí, D., Blázquez, M.A., et Botto, J.F.** (2015). The transcriptional regulator BBX24 impairs DELLA activity to promote shade avoidance in Arabidopsis thaliana. *Nat. Commun.* **6**: 6202.

- Curtis, P.J. et Cross, P.E.** (1954). Gibberellic acid: A new metabolite from the culture filtrates of *Gibberella fujikuroi*. *Chem. Ind.*
- David, L.C., Berquin, P., Kanno, Y., Seo, M., Daniel-Vedele, F., et Ferrario-Méry, S.** (2016). N availability modulates the role of NPF3.1, a gibberellin transporter, in GA-mediated phenotypes in *Arabidopsis*. *Planta* **244**: 1315-1328.
- Davière, J.-M. et Achard, P.** (2013). Gibberellin signaling in plants. *Development* **140**: 1147-51.
- Davière, J.-M., Wild, M., Regnault, T., Baumberger, N., Eisler, H., Genschik, P., et Achard, P.** (2014). Class I TCP-DELLA Interactions in Inflorescence Shoot Apex Determine Plant Height. *Curr. Biol.* **24**: 1923-1928.
- Davière, J.-M.M. et Achard, P.** (2016). A Pivotal Role of DELLA in Regulating Multiple Hormone Signals. *Mol. Plant* **9**: 10-20.
- Dechorgnat, J., Nguyen, C.T., Armengaud, P., Jossier, M., Diatloff, E., Filleur, S., et Daniel-Vedele, F.** (2011). From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. *J. Exp. Bot.* **62**: 1349-1359.
- Deprost, D.D., Yao, L., Sormani, R.R., Moreau, M., Leterreux, G., Nicolai, M., Bedu, M.M., Robaglia, C., et Meyer, C.** (2007). The *Arabidopsis* TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Rep.* **8**: 864-870.
- Dobrenel, T., Caldana, C., Hanson, J., Robaglia, C., Vincentz, M., Veit, B., et Meyer, C.** (2016). TOR Signaling and Nutrient Sensing. *Annu. Rev. Plant Biol.* **67**: 261-285.
- Eom, J.S., Chen, L.Q., Sosso, D., Julius, B.T., Lin, I.W., Qu, X.Q., Braun, D.M., et Frommer, W.B.** (2015). SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **25**: 53-62.
- Fagard, M., Launay, A., Clement, G., Courtial, J., Dellagi, A., Farjad, M., Krapp, A., Soulie, M.-C., et Masclaux-Daubresse, C.** (2014). Nitrogen metabolism meets phytopathology. *J. Exp. Bot.* **65**: 5643-5656.
- Fan, S.-C., Lin, C.-S., Hsu, P.-K., Lin, S.-H., et Tsay, Y.-F.** (2009). The *Arabidopsis* Nitrate Transporter NRT1.7, Expressed in Phloem, Is Responsible for Source-to-Sink Remobilization of Nitrate. *Plant Cell* **21**: 2750-2761.
- Feng, J., Chen, L., et Zuo, J.** (2019). Protein S-Nitrosylation in plants: Current progresses and challenges. *J. Integr. Plant Biol.*: jipb.12780.
- Feng, J., Wang, C., Chen, Q., Chen, H., Ren, B., Li, X., et Zuo, J.** (2013). S-nitrosylation of phosphotransfer proteins represses cytokinin signaling. *Nat. Commun.* **4**: 1529.
- Feng, S. et al.** (2008). Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* **451**: 475-479.
- Ferguson, B.J., Foo, E., Ross, J.J., et Reid, J.B.** (2011). Relationship between gibberellin, ethylene and nodulation in *Pisum sativum*. *New Phytol.* **189**: 829-842.
- Ferguson, B.J., Ross, J.J., et Reid, J.B.** (2005). Nodulation phenotypes of gibberellin and brassinosteroid mutants of pea. *Plant Physiol.* **138**: 2396-405.
- Feurtado, J.A., Huang, D., Wicki-Stordeur, L., Hemstock, L.E., Potentier, M.S., Tsang, E.W.T., et Cutler, A.J.** (2011). 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.
- Filleur, S., Dorbe, M.-F., Cerezo, M., Orsel, M., Granier, F., Gojon, A., et Daniel-Vedele, F.** (2001). An *Arabidopsis* T-DNA mutant affected in *Nrt2* genes is impaired in nitrate uptake. *FEBS Lett.* **489**: 220-224.

- Fleet, C.M., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kawaide, H., David, C.J., Kamiya, Y., et Sun, T.-P.** (2003). Overexpression of AtCPS and AtKS in *Arabidopsis* confers increased entkaurene production but no increase in bioactive gibberellins. *Plant Physiol.* **132**: 830-9.
- Floss, D.S., Levy, J.G., Levesque-Tremblay, V., Pumplun, N., et Harrison, M.J.** (2013). DELLA proteins regulate arbuscule formation in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**: E5025-E5034.
- Fonouni-Farde, C., Diet, A., et Frugier, F.** (2016a). Root Development and Endosymbioses: DELLA Lead the Orchestra. *Trends Plant Sci.* **21**: 898-900.
- Fonouni-Farde, C., Tan, S., Baudin, M., Brault, M., Wen, J., Mysore, K.S., Niebel, A., Frugier, F., et Diet, A.** (2016b). DELLA-mediated gibberellin signalling regulates Nod factor signalling and rhizobial infection. *Nat. Commun.* **7**: 12636.
- Foo, E., Ross, J.J., Jones, W.T., et Reid, J.B.** (2013). Plant hormones in arbuscular mycorrhizal symbioses: An emerging role for gibberellins. *Ann. Bot.* **111**: 769-779.
- Forde, B.G.** (2014). Nitrogen signalling pathways shaping root system architecture: an update. *Curr. Opin. Plant Biol.* **21**: 30-36.
- Fredes, I., Moreno, S., Díaz, F.P., et Gutiérrez, R.A.** (2019). Nitrate signaling and the control of *Arabidopsis* growth and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **47**: 112-118.
- Fu, X. et Harberd, N.P.** (2003). Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature* **421**: 740-743.
- Fukazawa, J., Teramura, H., Murakoshi, S., Nasuno, K., Nishida, N., Ito, T., Yoshida, M., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., et Takahashi, Y.** (2014). DELLA Function as Coactivators of GAI-ASSOCIATED FACTOR1 in Regulation of Gibberellin Homeostasis and Signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**: 2920-2938.
- Gallego-Bartolomé, J., Arana, M. V., Vandenbussche, F., Žádníková, P., Minguet, E.G., Guardiola, V., Van Der Straeten, D., Benkova, E., Alabadí, D., et Blázquez, M.A.** (2011). Hierarchy of hormone action controlling apical hook development in *Arabidopsis*. *Plant J.* **67**: 622-634.
- Gallego-Bartolome, J., Minguet, E.G., Marin, J.A., Prat, S., Blazquez, M.A., et Alabadi, D.** (2010). Transcriptional Diversification and Functional Conservation between DELLA Proteins in *Arabidopsis*. *Mol. Biol. Evol.* **27**: 1247-1256.
- Gan, Y., Bernreiter, A., Filleur, S., Abram, B., et Forde, B.G.** (2012). Overexpressing the ANR1 MADS-Box Gene in Transgenic Plants Provides New Insights into its Role in the Nitrate Regulation of Root Development. *Plant Cell Physiol.* **53**: 1003-1016.
- Gent, L. et Forde, B.G.** (2017). How do plants sense their nitrogen status? *J. Exp. Bot.* **68**: 2531-2539.
- Giehl, R.F.H. et von Wiren, N.** (2014). Root Nutrient Foraging. *Plant Physiol.* **166**: 509-517.
- Good, A.G. et Beatty, P.H.** (2011). Fertilizing Nature: A Tragedy of Excess in the Commons. *PLoS Biol.* **9**: e1001124.
- Good, A.G., Shrawat, A.K., et Muench, D.G.** (2004). Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? *Trends Plant Sci.* **9**: 597-605.
- Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z.-L., Powers, S.J., Gong, F., Phillips, A.L., Hedden, P., Sun, T., et Thomas, S.G.** (2006). Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 3399-414.
- Gruber, B.D., Giehl, R.F.H., Friedel, S., et von Wirén, N.** (2013). Plasticity of the

- Arabidopsis Root System under Nutrient Deficiencies. *Plant Physiol.* **163**: 161-179.
- Gruber, N. et Galloway, J.N.** (2008). An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature* **451**: 293-296.
- Guan, P.** (2017). Dancing with Hormones: A Current Perspective of Nitrate Signaling and Regulation in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* **8**: 1697.
- Guan, P., Ripoll, J.-J., Wang, R., Vuong, L., Bailey-Steinitz, L.J., Ye, D., et Crawford, N.M.** (2017). Interacting TCP and NLP transcription factors control plant responses to nitrate availability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**: 2419-2424.
- Guan, P., Wang, R., Nacry, P., Breton, G., Kay, S.A., Pruneda-Paz, J.L., Davani, A., et Crawford, N.M.** (2014). Nitrate foraging by Arabidopsis roots is mediated by the transcription factor TCP20 through the systemic signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**: 15267-15272.
- Gutiérrez, R.A., Lejay, L. V, Dean, A., Chiaromonte, F., Shasha, D.E., et Coruzzi, G.M.** (2007). Qualitative network models and genome-wide expression data define carbon/nitrogen-responsive molecular machines in Arabidopsis. *Genome Biol.* **8**: R7.
- Gutjahr, C.** (2014). Phytohormone signaling in arbuscular mycorrhiza development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **20**: 26-34.
- Harberd, N.P.** (2003). BOTANY: Relieving DELLA Restraint. *Science.* **299**: 1853-1854.
- Hedden, P.** (2019). A novel gibberellin promotes seedling establishment. *Nat. Plants* **5**: 459-460.
- Hedden, P. et al.** (2016). Annual Plant Reviews, The Gibberellins Wiley Blac. P. Hedden et S.G. Thomas, éd (John Wiley & Sons Ltd Registered).
- Hedden, P.** (2003). The genes of the Green Revolution. *Trends Genet.* **19**: 5-9.
- Hedden, P. et Phillips, A.L.** (2000). Gibberellin metabolism: New insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci.* **5**: 523-530.
- Hedden, P. et Sponsel, V.** (2015). A Century of Gibberellin Research. *J. Plant Growth Regul.* **34**: 740-760.
- Hedden, P. et Thomas, S.G.** (2012). Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem. J.* **444**: 11-25.
- Helliwell, C.A., Chandler, P.M., Poole, A., Dennis, E.S., et Peacock, W.J.** (2001). The CYP88A cytochrome P450, ent-kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellin biosynthesis pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 2065-2070.
- Helliwell, C.A., Poole, A., Peacock, W.J., et Dennis, E.S.** (1999). Arabidopsis ent-kaurene oxidase catalyzes three steps of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiol.* **119**: 507-10.
- Helliwell, C.A., Sheldon, C.C., Olive, M.R., Walker, A.R., Zeevaert, J.A., Peacock, W.J., et Dennis, E.S.** (1998). Cloning of the Arabidopsis ent-kaurene oxidase gene GA3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 9019-24.
- Herder, G. Den, Van Isterdael, G., Beeckman, T., et De Smet, I.** (2010). The roots of a new green revolution. *Trends Plant Sci.* **15**: 600-607.
- Hernández-García, J., Briones-Moreno, A., Dumas, R., et Blázquez, M.A.** (2019). Origin of Gibberellin-Dependent Transcriptional Regulation by Molecular Exploitation of a Transactivation Domain in DELLA Proteins. *Mol. Biol. Evol.* **36**: 908-918.
- Hirano, K. et al.** (2007). The GID1-Mediated Gibberellin Perception Mechanism Is Conserved in the Lycophyte *Selaginella moellendorffii* but Not in the Bryophyte *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* **19**: 3058-3079.

- Hirano, K., Kouketu, E., Katoh, H., Aya, K., Ueguchi-Tanaka, M., et Matsuoka, M.** (2012). The suppressive function of the rice DELLA protein SLR1 is dependent on its transcriptional activation activity. *Plant J.* **71**: no-no.
- Hirano, Y., Nakagawa, M., Suyama, T., Murase, K., Shirakawa, M., Takayama, S., Sun, T., et Hakoshima, T.** (2017). Structure of the SHR–SCR heterodimer bound to the BIRD/IDD transcriptional factor JKD. *Nat. Plants* **3**: 17010.
- Ho, C.-H., Lin, S.-H., Hu, H.-C., et Tsay, Y.-F.** (2009). CHL1 Functions as a Nitrate Sensor in Plants. *Cell* **138**: 1184-1194.
- Hoad, G. V. et Bowen, M.R.** (1968). Evidence for gibberellin-like substances in phloem exudate of higher plants. *Planta* **82**: 22-32.
- Höfer, R., Dong, L., André, F., Ginglinger, J.F., Lugan, R., Gavira, C., Grec, S., Lang, G., Memelink, J., Van Der Krol, S., Bouwmeester, H., et Werck-Reichhart, D.** (2013). Geraniol hydroxylase and hydroxygeraniol oxidase activities of the CYP76 family of cytochrome P450 enzymes and potential for engineering the early steps of the (seco)iridoid pathway. *Metab. Eng.* **20**: 221-232.
- Hong, G.-J., Xue, X.-Y., Mao, Y.-B., Wang, L.-J., et Chen, X.-Y.** (2012). Arabidopsis MYC2 Interacts with DELLA Proteins in Regulating Sesquiterpene Synthase Gene Expression. *Plant Cell* **24**: 2635-2648.
- Hori, S.** (1898). Some observations on 'Bakanae' disease of the rice plant. *Agric. Res. Stn.* **12**: 110-119.
- Horlings, L.G. et Marsden, T.K.** (2011). Towards the real green revolution? Exploring the conceptual dimensions of a new ecological modernisation of agriculture that could 'feed the world'. *Glob. Environ. Chang.* **21**: 441-452.
- Hou, X., Lee, L.Y.C., Xia, K., Yan, Y., et Yu, H.** (2010). DELLA Modulate Jasmonate Signaling via Competitive Binding to JAZs. *Dev. Cell* **19**: 884-894.
- Hou, X., Zhou, J., Liu, C., Liu, L., Shen, L., et Yu, H.** (2014). Nuclear factor Y-mediated H3K27me3 demethylation of the SOC1 locus orchestrates flowering responses of Arabidopsis. *Nat. Commun.* **5**: 4601.
- Hsu, P.-K. et Tsay, Y.-F.** (2013). Two Phloem Nitrate Transporters, NRT1.11 and NRT1.12, Are Important for Redistributing Xylem-Borne Nitrate to Enhance Plant Growth. *Plant Physiol.* **163**: 844-856.
- Hu, H.-C., Wang, Y.-Y., et Tsay, Y.-F.** (2009). AtCIPK8, a CBL-interacting protein kinase, regulates the low-affinity phase of the primary nitrate response. *Plant J.* **57**: 264-278.
- Hu, J. et al.** (2008). Potential sites of bioactive gibberellin production during reproductive growth in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**: 320-36.
- Hu, J., Huang, X., Chen, L., Sun, X., Lu, C., Zhang, L., Wang, Y., et Zuo, J.** (2015). Site-specific nitrosoproteomic identification of endogenously S-nitrosylated proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **167**: 1731-46.
- Hussain, A., Cao, D., Cheng, H., Wen, Z., et Peng, J.** (2005). Identification of the conserved serine/threonine residues important for gibberellin-sensitivity of Arabidopsis RGL2 protein. *Plant J.* **44**: 88-99.
- Hyun, Y., Richter, R., Vincent, C., Martinez-Gallegos, R., Porri, A., et Coupland, G.** (2016). Multi-layered Regulation of SPL15 and Cooperation with SOC1 Integrate Endogenous Flowering Pathways at the Arabidopsis Shoot Meristem. *Dev. Cell* **37**: 254-266.
- Iglesias, M.J. et al.** (2018). Regulation of SCFTIR1/AFBs E3 ligase assembly by S-nitrosylation of Arabidopsis SKP1-like1 impacts on auxin signaling. *Redox Biol.* **18**:

200-210.

- Ikeda, A., Ueguchi-Tanaka, M., Sonoda, Y., Kitano, H., Koshioka, M., Futsuhara, Y., Matsuoka, M., et Yamaguchi, J.** (2001). slender rice, a constitutive gibberellin 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.
- Dello Iorio, R., Linhares, F.S., Scacchi, E., Casamitjana-Martinez, E., Heidstra, R., Costantino, P., et Sabatini, S.** (2007). Cytokinins Determine Arabidopsis Root-Meristem Size by Controlling Cell Differentiation. *Curr. Biol.* **17**: 678-682.
- Jaffrey, S.R. et Snyder, S.H.** (2001). The Biotin Switch Method for the Detection of S-Nitrosylated Proteins. *Sci. Signal.* **2001**.
- Jiang, C., Gao, X., Liao, L., Harberd, N.P., et Fu, X.** (2007). Phosphate Starvation Root Architecture and Anthocyanin Accumulation Responses Are Modulated by the Gibberellin-DELLA Signaling Pathway in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **145**: 1460-1470.
- Jiang, H. et Morgan, J.A.** (2004). Optimization of an in Vivo Plant P450 Monooxygenase System in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **85**: 130-137.
- de Jong, M., George, G., Ongaro, V., Williamson, L., Willetts, B., Ljung, K., McCulloch, H., et Leyser, O.** (2014). Auxin and Strigolactone Signaling Are Required for Modulation of Arabidopsis Shoot Branching by Nitrogen Supply. *Plant Physiol.* **166**: 384-395.
- Jørgensen, M.E., Xu, D., Crocoll, C., Ramírez, D., Motawia, M.S., Olsen, C.E., Nour-Eldin, H.H., et Halkier, B.A.** (2017). Origin and evolution of transporter substrate specificity within the NPF family. *Elife* **6**: 1-31.
- Jung, J.-H. et al.** (2016). Phytochromes function as thermosensors in Arabidopsis. *Science.* **354**: 886-889.
- Kanno, Y., Hanada, A., Chiba, Y., Ichikawa, T., Nakazawa, M., Matsui, M., Koshiba, T., Kamiya, Y., et Seo, M.** (2012). Identification of an abscisic acid transporter by functional screening using the receptor complex as a sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: 9653-8.
- Kanno, Y., Kamiya, Y., et Seo, M.** (2013). Nitrate does not compete with abscisic acid as a substrate of AtNPF4.6/NRT1.2/AIT1 in Arabidopsis. *Plant Signal. Behav.* **8**: 8-11.
- Kanno, Y., Oikawa, T., Chiba, Y., Ishimaru, Y., Shimizu, T., Sano, N., Koshiba, T., Kamiya, Y., Ueda, M., et Seo, M.** (2016). AtSWEET13 and AtSWEET14 regulate gibberellin-mediated physiological processes. *Nat. Commun.* **7**: 1-11.
- Kant, S., Bi, Y.-M., et Rothstein, S.J.** (2011). Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. *J. Exp. Bot.* **62**: 1499-1509.
- Karimi, M., De Meyer, B., et Hilson, P.** (2005). Modular cloning in plant cells. *Trends Plant Sci.* **10**: 103-105.
- Kasahara, H., Hanada, A., Kuzuyama, T., Takagi, M., Kamiya, Y., et Yamaguchi, S.** (2002). Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of gibberellins in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* **277**: 45188-94.
- Katsumi, M., Foard, D.E., et Phinney, B.O.** (1983). Evidence for the Translocation of Gibberellin A3 and Gibberellin-Like Substances in Grafts between Normal, Dwarf1 and Dwarf5 Seedlings of *Zea mays* L.1. *Plant Cell Physiol.* **24**: 379-388.
- Kellermeier, F., Armengaud, P., Seditas, T.J., Danku, J., Salt, D.E., et Amtmann, A.** (2014). Analysis of the Root System Architecture of Arabidopsis Provides a Quantitative Readout of Crosstalk between Nutritional Signals. *Plant Cell* **26**: 1480-1496.

- Kiba, T., Feria-Bourrellier, A.-B., Lafouge, F., Lezhneva, L., Boutet-Mercey, S., Orsel, M., Brehaut, V., Miller, A., Daniel-Vedele, F., Sakakibara, H., et Krapp, A.** (2012). The Arabidopsis Nitrate Transporter NRT2.4 Plays a Double Role in Roots and Shoots of Nitrogen-Starved Plants. *Plant Cell* **24**: 245-258.
- Kieber, J.J. et Schaller, G.E.** (2014). Cytokinins. *Arab. B.* **12**: e0168.
- King, K.E., Moritz, T., et Harberd, N.P.** (2001). Gibberellins are not required for normal stem growth in Arabidopsis thaliana in the absence of GAI and RGA. *Genetics* **159**: 767-76.
- Ko, D. et al.** (2014). Arabidopsis ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**: 7150-7155.
- Koini, M.A., Alvey, L., Allen, T., Tilley, C.A., Harberd, N.P., Whitelam, G.C., et Franklin, K.A.** (2009). High Temperature-Mediated Adaptations in Plant Architecture Require the bHLH Transcription Factor PIF4. *Curr. Biol.* **19**: 408-413.
- Kolbert, Z., Feigl, G., Bordé, Á., Molnár, Á., et Erdei, L.** (2017). Protein tyrosine nitration in plants: Present knowledge, computational prediction and future perspectives. *Plant Physiol. Biochem.* **113**: 56-63.
- Koornneef, M. et van der Veen, J.H.** (1980). Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in Arabidopsis thaliana (L.) heynh. *Theor. Appl. Genet.* **58**: 257-263.
- Kotur, Z., Mackenzie, N., Ramesh, S., Tyerman, S.D., Kaiser, B.N., et Glass, A.D.M.** (2012). Nitrate transport capacity of the Arabidopsis thaliana NRT2 family members and their interactions with AtNAR2.1. *New Phytol.* **194**: 724-731.
- Kozak, M.** (2001). Constraints on reinitiation of translation in mammals. *Nucleic Acids Res.* **29**: 5226-5232.
- Krapp, A.** (2015). Plant nitrogen assimilation and its regulation: A complex puzzle with missing pieces. *Curr. Opin. Plant Biol.* **25**: 115-122.
- Krapp, A., David, L.C., Chardin, C., Girin, T., Marmagne, A., Leprince, A.-S., Chaillou, S., Ferrario-Méry, S., Meyer, C., et Daniel-Vedele, F.** (2014). Nitrate transport and signalling in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* **65**: 789-798.
- Krouk, G.** (2016). Hormones and nitrate: a two-way connection. *Plant Mol. Biol.* **91**: 599-606.
- Krouk, G. et al.** (2010a). Nitrate-Regulated Auxin Transport by NRT1.1 Defines a Mechanism for Nutrient Sensing in Plants. *Dev. Cell* **18**: 927-937.
- Krouk, G.** (2017). Nitrate signalling: Calcium bridges the nitrate gap. *Nat. Plants* **3**: 17095.
- Krouk, G., Carré, C., Fizames, C., Gojon, A., Ruffel, S., et Lacombe, B.** (2015). GeneCloud reveals semantic enrichment in lists of gene descriptions. *Mol. Plant* **8**: 971-973.
- Krouk, G., Mirowski, P., LeCun, Y., Shasha, D.E., et Coruzzi, G.M.** (2010b). Predictive network modeling of the high-resolution dynamic plant transcriptome in response to nitrate. *Genome Biol.* **11**: R123.
- Krouk, G., Ruffel, S., Gutiérrez, R.A., Gojon, A., Crawford, N.M., Coruzzi, G.M., et Lacombe, B.** (2011). A framework integrating plant growth with hormones and nutrients. *Trends Plant Sci.* **16**: 178-182.
- Kurosawa, E.** (1926). Experimental studies on the nature of the substance excreted by the 'bakanae' fungus. *Trans. Nat. Hist. Soc. Formosa* **16**: 213-227.
- Lacombe, B. et Achard, P.** (2016). Long-distance transport of phytohormones through the plant vascular system. *Curr. Opin. Plant Biol.* **34**: 1-8.
- Landrein, B., Formosa-Jordan, P., Malivert, A., Schuster, C., Melnyk, C.W., Yang, W.,**

- Turnbull, C., Meyerowitz, E.M., Locke, J.C.W., et Jönsson, H.** (2018). Nitrate modulates stem cell dynamics in Arabidopsis shoot meristems through cytokinins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**: 1382-1387.
- Lee, S., Cheng, H., King, K.E., Wang, W., He, Y., Hussain, A., Lo, J., Harberd, N.P., et 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.
- Legris, M., Klose, C., Burgie, E.S., Rojas, C.C.R., Neme, M., Hiltbrunner, A., Wigge, P.A., Schäfer, E., Vierstra, R.D., et Casal, J.J.** (2016). Phytochrome B integrates light and temperature signals in Arabidopsis. *Science.* **354**: 897-900.
- León, J. et Costa-Broseta, Á.** (2019). Present knowledge and controversies, deficiencies and misconceptions on nitric oxide synthesis, sensing and signaling in plants. *Plant. Cell Environ.:* pce.13617.
- Léran, S. et al.** (2014). A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. *Trends Plant Sci.* **19**: 5-9.
- Lezhneva, L., Kiba, T., Feria-Bourrellier, A.-B., Lafouge, F., Boutet-Mercey, S., Zoufan, P., Sakakibara, H., Daniel-Vedele, F., et Krapp, A.** (2014). The Arabidopsis nitrate transporter NRT2.5 plays a role in nitrate acquisition and remobilization in nitrogen-starved plants. *Plant J.* **80**: 230-241.
- Li, M., An, F., Li, W., Ma, M., Feng, Y., Zhang, X., et Guo, H.** (2016). DELLA proteins interact with FLC to repress flowering transition. *J. Integr. Plant Biol.* **58**: 642-655.
- Li, S., Tian, Y., Wu, K., Ye, Y., Yu, J., Zhang, J., Liu, Q., Hu, M., Li, H., Tong, Y., Harberd, N.P., et Fu, X.** (2018). Modulating plant growth–metabolism coordination for sustainable agriculture. *Nature* **560**: 595-600.
- Liao, Z., Yu, H., Duan, J., Yuan, K., Yu, C., Meng, X., Kou, L., Chen, M., Jing, Y., Liu, G., Smith, S.M., et Li, J.** (2019). SLR1 inhibits MOC1 degradation to coordinate tiller number and plant height in rice. *Nat. Commun.* **10**: 2738.
- Lim, S., Park, J., Lee, N., Jeong, J., Toh, S., Watanabe, A., Kim, J., Kang, H., Kim, D.H., Kawakami, N., et Choi, G.** (2013). ABA-insensitive3, ABA-insensitive5, and DELLA Interact to activate the expression of SOMNUS and other high-temperature-inducible genes in imbibed seeds in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 4863-4878.
- Lindermayr, C., Saalbach, G., et Durner, J.** (2005). Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **137**: 921-30.
- Liu, H. et al.** (2019a). Biosynthesis of DHGA12 and its roles in Arabidopsis seedling establishment. *Nat. Commun.* **10**: 1768.
- Liu, H., Zhang, C., Yang, J., Yu, N., et Wang, E.** (2018). Hormone modulation of legume-rhizobial symbiosis. *J. Integr. Plant Biol.* **60**: 632-648.
- Liu, K.-H.H. et Tsay, Y.F.** (2003). Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *EMBO J.* **22**: 1005-1013.
- Liu, K. et al.** (2017). Discovery of nitrate–CPK–NLP signalling in central nutrient–growth networks. *Nature* **545**: 311-316.
- Liu, M., Shi, Z., Zhang, X., Wang, M., Zhang, L., Zheng, K., Liu, J., Hu, X., Di, C., Qian, Q., He, Z., et Yang, D.-L.** (2019b). Inducible overexpression of Ideal Plant Architecture1 improves both yield and disease resistance in rice. *Nat. Plants* **5**: 389-400.
- Liu, Q., Chen, X., Wu, K., et Fu, X.** (2015). Nitrogen signaling and use efficiency in plants: What's new? *Curr. Opin. Plant Biol.* **27**: 192-198.
- Liu, Z., Cao, J., Ma, Q., Gao, X., Ren, J., et Xue, Y.** (2011). GPS-YNO2: Computational

- prediction of tyrosine nitration sites in proteins. *Mol. Biosyst.* **7**: 1197-1204.
- Locascio, A., Blázquez, M.A., et Alabadí, D.** (2013a). Dynamic regulation of cortical microtubule organization through prefoldin-DELLA interaction. *Curr. Biol.* **23**: 804-809.
- Locascio, A., Blázquez, M.A., et Alabadí, D.** (2013b). Genomic analysis of della protein activity. *Plant Cell Physiol.* **54**: 1229-1237.
- Lozano-Juste, J., Colom-Moreno, R., et León, J.** (2011). In vivo protein tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **62**: 3501-3517.
- Lozano-Juste, J. et Leon, J.** (2010). Enhanced Abscisic Acid-Mediated Responses in *nia1nia2noa1-2* Triple Mutant Impaired in NIA/NR- and AtNOA1-Dependent Nitric Oxide Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **152**: 891-903.
- Lozano-Juste, J. et Leon, J.** (2011). Nitric Oxide Regulates DELLA Content and PIF Expression to Promote Photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **156**: 1410-1423.
- Lu, C. et Tian, H.** (2017). Global nitrogen and phosphorus fertilizer use for agriculture production in the past half century: Shifted hot spots and nutrient imbalance. *Earth Syst. Sci. Data* **9**: 181-192.
- Lu, Z. et al.** (2013). Genome-wide binding analysis of the transcription activator *ideal plant architecture1* reveals a complex network regulating rice plant architecture. *Plant Cell* **25**: 3743-59.
- de Lucas, M., Davière, J.M., Rodríguez-Falcón, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J.M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blázquez, M.A., Titarenko, E., et Prat, S.** (2008). A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* **451**: 480-484.
- de Lucas, M., Prat, S., Miguel, D.L., Salomé, P., de Lucas, M., et Prat, S.** (2014). PIFs get BRright: PHYTOCHROME INTERACTING FACTORs as integrators of light and hormonal signals. *New Phytol.* **202**: 1126-1141.
- Ma, W., Li, J., Qu, B., He, X., Zhao, X., Li, B., Fu, X., et Tong, Y.** (2014a). Auxin biosynthetic gene *TAR2* is involved in low nitrogen-mediated reprogramming of root architecture in *Arabidopsis*. *Plant J.* **78**: 70-79.
- Ma, Z., Hu, X., Cai, W., Huang, W., Zhou, X., Luo, Q., Yang, H., Wang, J., et Huang, J.** (2014b). *Arabidopsis* miR171-Targeted Scarecrow-Like Proteins Bind to GT cis-Elements and Mediate Gibberellin-Regulated Chlorophyll Biosynthesis under Light Conditions. *PLoS Genet.* **10**: e1004519.
- MacMillan, J. et Suter, P.J.** (1958). The occurrence of gibberellin A1 in higherplants – isolation from the seed of runner bean (*Phaseolus multiflorus*). *Naturwissenschaften*.
- Magome, H., Nomura, T., Hanada, A., Takeda-Kamiya, N., Ohnishi, T., Shinma, Y., Katsumata, T., Kawaide, H., Kamiya, Y., et Yamaguchi, S.** (2013). CYP714B1 and CYP714B2 encode gibberellin 13-oxidases that reduce gibberellin activity in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: 1947-52.
- Mahfouz, M.M., Kim, S., Delauney, A.J., et Verma, D.P.S.** (2006). *Arabidopsis* TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *Plant Cell* **18**: 477-90.
- Marchive, C., Roudier, F., Castaings, L., Bréhaut, V., Blondet, E., Colot, V., Meyer, C., et Krapp, A.** (2013). Nuclear retention of the transcription factor NLP7 orchestrates the early response to nitrate in plants. *Nat. Commun.* **4**: 1713.
- Marín-de la Rosa, N. et al.** (2015). Genome Wide Binding Site Analysis Reveals Transcriptional Coactivation of Cytokinin-Responsive Genes by DELLA Proteins. *PLOS*

Genet. **11**: e1005337.

- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L., et Suzuki, A.** (2010). Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann. Bot.* **105**: 1141-1157.
- Matsuoka, K., Furukawa, J., Bidadi, H., Asahina, M., Yamaguchi, S., et Satoh, S.** (2014). Gibberellin-Induced Expression of Fe Uptake-Related Genes in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **55**: 87-98.
- Mazoyer, M. et Roudart, L.** (2002). Histoire des agricultures du monde Points His. Points, éd.
- Mcallister, C.H., Beatty, P.H., et Good, A.G.** (2012). Engineering nitrogen use efficient crop plants: The current status. *Plant Biotechnol. J.* **10**: 1011-1025.
- Medici, A. et Krouk, G.** (2014). The Primary Nitrate Response: A multifaceted signalling pathway. *J. Exp. Bot.* **65**: 5567-5576.
- Mitchum, M.G., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kuwahara, A., Yoshioka, Y., Kato, T., Tabata, S., Kamiya, Y., et Sun, T.P.** (2006). Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in Arabidopsis development. *Plant J.* **45**: 804-818.
- Miyawaki, K., Matsumoto-Kitano, M., et Kakimoto, T.** (2004). Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in Arabidopsis: Tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J.* **37**: 128-138.
- Monna, L., Kitazawa, N., Yoshino, R., Suzuki, J., Masuda, H., Maehara, Y., Tanji, M., Sato, M., Nasu, S., et Minobe, Y.** (2002). Positional cloning of rice semidwarfing gene, *sd-1*: Rice « green revolution gene » encodes a mutant enzyme involved in gibberellin synthesis. *DNA Res.* **9**: 11-17.
- Montané, M.-H. et Menand, B.** (2013). ATP-competitive mTOR kinase inhibitors delay plant growth by triggering early differentiation of meristematic cells but no developmental patterning change. *J. Exp. Bot.* **64**: 4361-74.
- Moreau, M., Lindermayr, C., Durner, J., et Klessig, D.F.** (2010). NO synthesis and signaling in plants - where do we stand? *Physiol. Plant.* **138**: 372-383.
- Morris, D.R. et Geballe, A.P.** (2000). Upstream Open Reading Frames as Regulators of mRNA Translation. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 8635-8642.
- Moubayidin, L., Perilli, S., Dello Iorio, R., Di Mambro, R., Costantino, P., et Sabatini, S.** (2010). The Rate of Cell Differentiation Controls the Arabidopsis Root Meristem Growth Phase. *Curr. Biol.* **20**: 1138-1143.
- Mounier, E., Pervent, M., Ljung, K., Gojon, A., et Nacry, P.** (2014). Auxin-mediated nitrate signalling by NRT1.1 participates in the adaptive response of Arabidopsis root architecture to the spatial heterogeneity of nitrate availability. *Plant. Cell Environ.* **37**: 162-174.
- Müller, D., Waldie, T., Miyawaki, K., To, J.P.C., Melnyk, C.W., Kieber, J.J., Kakimoto, T., et Leyser, O.** (2015). Cytokinin is required for escape but not release from auxin mediated apical dominance. *Plant J.* **82**: 874-886.
- Murase, K., Hirano, Y., Sun, T.P., et Hakoshima, T.** (2008). Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* **456**: 459-463.
- Nakajima, M. et al.** (2006). Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors. *Plant J.* **46**: 880-889.
- Nakamura, H. et al.** (2013). Molecular mechanism of strigolactone perception by DWARF14. *Nat. Commun.* **4**: 2613.

- Nakamura, S., Mano, S., Tanaka, Y., Ohnishi, M., Nakamori, C., Araki, M., Niwa, T., Nishimura, M., Kaminaka, H., Nakagawa, T., Sato, Y., et 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.
- Näsholm, T., Kielland, K., et Ganeteg, U.** (2009). Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytol.* **182**: 31-48.
- Nomura, T., Magome, H., Hanada, A., Takeda-Kamiya, N., Mander, L.N., Kamiya, Y., et Yamaguchi, S.** (2013). Functional analysis of arabidopsis CYP714A1 and CYP714A2 reveals that they are distinct gibberellin modification enzymes. *Plant Cell Physiol.* **54**: 1837-1851.
- Nour-Eldin, H.H., Andersen, T.G., Burow, M., Madsen, S.R., Jørgensen, M.E., Olsen, C.E., Dreyer, I., Hedrich, R., Geiger, D., et Halkier, B.A.** (2012). NRT/PTR transporters are essential for translocation of glucosinolate defence compounds to seeds. *Nature* **488**: 531-534.
- Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R., et Stitt, M.** (2010). Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. *Mol. Plant* **3**: 973-996.
- O'Brien, J.A., Vega, A., Bouguyon, E., Krouk, G., Gojon, A., Coruzzi, G., et Gutiérrez, R.A.** (2016). Nitrate Transport, Sensing, and Responses in Plants. *Mol. Plant* **9**: 837-856.
- Oh, E., Zhu, J.Y., Bai, M.Y., Arenhart, R.A., Sun, Y., et Wang, Z.Y.** (2014). Cell elongation is regulated through a central circuit of interacting transcription factors in the *Arabidopsis* hypocotyl. *Elife* **2014**: 1-19.
- Ohkubo, Y., Tanaka, M., Tabata, R., Ogawa-Ohnishi, M., et Matsubayashi, Y.** (2017). Shoot-to-root mobile polypeptides involved in systemic regulation of nitrogen acquisition. *Nat. Plants* **3**: 17029.
- Osugi, A., Kojima, M., Takebayashi, Y., Ueda, N., Kiba, T., et Sakakibara, H.** (2017). Systemic transport of trans-zeatin and its precursor have differing roles in *Arabidopsis* shoots. *Nat. Plants* **3**: 17112.
- Park, J., Nguyen, K.T., Park, E., Jeon, J.S., et Choi, G.** (2013). 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.
- Park, J., Oh, D.-H., Dassanayake, M., Nguyen, K.T., OGA, J., Choi, G., et Sun, T.-P.** (2017). Gibberellin Signaling Requires Chromatin Remodeler PICKLE to Promote Vegetative Growth and Phase Transitions. *Plant Physiol.* **173**: 1463-1474.
- Parker, J.L. et Newstead, S.** (2014). Molecular basis of nitrate uptake by the plant nitrate transporter NRT1.1. *Nature* **507**: 68-72.
- Pearce, S., Huttly, A.K., Prosser, I.M., Li, Y., Vaughan, S.P., Gallova, B., Patil, A., Coghill, J.A., Dubcovsky, J., Hedden, P., et Phillips, A.L.** (2015). Heterologous expression and transcript analysis of gibberellin biosynthetic genes of grasses reveals novel functionality in the GA3ox family. *BMC Plant Biol.* **15**: 130.
- Peng, J. et al.** (1999). 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* **400**: 256-261.
- Phillips, A.L., Ward, D.A., Uknes, S., Appleford, N.E., Lange, T., Huttly, A.K., Gakin, P., Graebe, J.E., et Hedden, P.** (1995). Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **108**: 1049-57.
- Phinney, B.O.** (1957). Growth response of single-gene dwarf mutants in maize to gibberellic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **42**: 185-189.

- Piotrowska, A. et Bajguz, A.** (2011). Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates. *Phytochemistry* **72**: 2097-2112.
- Plackett, A.R.G. et al.** (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.
- Plackett, A.R.G., Ferguson, A.C., Powers, S.J., Wanchoo-Kohli, A., Phillips, A.L., Wilson, Z.A., Hedden, P., et Thomas, S.G.** (2014). DELLA activity is required for successful pollen development in the Columbia ecotype of Arabidopsis. *New Phytol.* **201**: 825-836.
- Poitout, A., Crabos, A., Petřík, I., Novák, O., Krouk, G., Lacombe, B., et Ruffel, S.** (2018). Responses to Systemic Nitrogen Signaling in Arabidopsis Roots Involve trans-Zeatin in Shoots. *Plant Cell* **30**: 1243-1257.
- Proebsting, W.M., Hedden, P., Lewis, M.J., Croker, S.J., et Proebsting, L.N.** (1992). Gibberellin concentration and transport in genetic lines of pea: Effects of grafting. *Plant Physiol.* **100**: 1354-1360.
- Pysh, L.D., Wysocka-Diller, J.W., Camilleri, C., Bouchez, D., et Benfey, P.N.** (1999). The GRAS gene family in Arabidopsis: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant J.* **18**: 111-119.
- Qi, T., Huang, H., Wu, D., Yan, J., Qi, Y., Song, S., et Xie, D.** (2014). Arabidopsis DELLA and JAZ Proteins Bind the WD-Repeat/bHLH/MYB Complex to Modulate Gibberellin and Jasmonate Signaling Synergy. *Plant Cell* **26**: 1118-1133.
- Quint, M., Delker, C., Franklin, K.A., Wigge, P.A., Halliday, K.J., et van Zanten, M.** (2016). Molecular and genetic control of plant thermomorphogenesis. *Nat. Plants* **2**: 15190.
- Radley, M.** (1956). Occurrence of Substances Similar to Gibberellic Acid in Higher Plants. *Nature* **178**: 1070-1071.
- Ragni, L., Nieminen, K., Pacheco-Villalobos, D., Sibout, R., Schwechheimer, C., et Hardtke, C.S.** (2011). Mobile Gibberellin Directly Stimulates Arabidopsis Hypocotyl Xylem Expansion. *Plant Cell* **23**: 1322-1336.
- Rahayu, Y.S., Walch-Liu, P., Neumann, G., Römheld, V., von Wirén, N., et Bangerth, F.** (2005). Root-derived cytokinins as long-distance signals for NO₃--induced stimulation of leaf growth. *J. Exp. Bot.* **56**: 1143-1152.
- Rameau, C., Bertheloot, J., Leduc, N., Andrieu, B., Foucher, F., et Sakr, S.** (2015). Multiple pathways regulate shoot branching. *Front. Plant Sci.* **5**: 1-15.
- Raven, P.H., Eichhorn, S.E., et Evert, R.F.** (2014). La nutrition des plantes et les sols. In *Biologie végétale*, 3e édition, p. 862.
- Regnault, T.** (2014). Biosynthèse et transport des gibbérellines chez *Arabidopsis thaliana*. <https://www.theses.fr/190836210>.
- Regnault, T., Davière, J.-M., Wild, M., Sakvarelidze-Achard, L., Heintz, D., Carrera Bergua, E., Lopez Diaz, I., Gong, F., Hedden, P., et Achard, P.** (2015). The gibberellin precursor GA12 acts as a long-distance growth signal in Arabidopsis. *Nat. Plants* **1**: 15073.
- Regnault, T., Daviere, J.M., Heintz, D., Lange, T., et Achard, P.** (2014). The gibberellin biosynthetic genes AtKAO1 and AtKAO2 have overlapping roles throughout Arabidopsis development. *Plant J.* **80**: 462-474.
- Remans, T., Nacry, P., Pervent, M., Filleur, S., Diatloff, E., Mounier, E., Tillard, P., Forde, B.G., et Gojon, A.** (2006). The Arabidopsis NRT1.1 transporter participates in

- the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**: 19206-19211.
- Rieu, I., Eriksson, S., Powers, S.J., Gong, F., Griffiths, J., Woolley, L., Benlloch, R., Nilsson, O., Thomas, S.G., Hedden, P., et Phillips, A.L.** (2008a). Genetic Analysis Reveals That C19-GA 2-Oxidation Is a Major Gibberellin Inactivation Pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**: 2420-2436.
- 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., et Hedden, P.** (2008b). The gibberellin biosynthetic genes AtGA20ox1 and AtGA20ox2 act, partially redundantly, to promote growth and development throughout the Arabidopsis life cycle. *Plant J.* **53**: 488-504.
- Rombolá-Caldentey, B., Rueda-Romero, P., Iglesias-Fernández, R., Carbonero, P., et Oñate-Sánchez, L.** (2014). Arabidopsis DELLA and Two HD-ZIP Transcription Factors Regulate GA Signaling in the Epidermis through the L1 Box cis-Element. *Plant Cell* **26**: 2905-2919.
- Rosa, N.M. la, Sotillo, B., Miskolczi, P., Gibbs, D.J., Vicente, J., Carbonero, P., Oñate-Sánchez, L., Holdsworth, M.J., Bhalerao, R., Alabadí, D., et Blázquez, M.A.** (2014). Large-Scale Identification of Gibberellin-Related Transcription Factors Defines Group VII ETHYLENE RESPONSE FACTORS as Functional DELLA Partners. *Plant Physiol.* **166**: 1022-1032.
- Rossato, L., Lainé, P., et Ourry, A.** (2001). Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: nitrogen fluxes within the plant and changes in soluble protein patterns. *J. Exp. Bot.* **52**: 1655-1663.
- Roycewicz, P. et Malamy, J.E.** (2012). Dissecting the effects of nitrate, sucrose and osmotic potential on Arabidopsis root and shoot system growth in laboratory assays. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **367**: 1489-1500.
- Rubin, G., Tohge, T., Matsuda, F., Saito, K., et Scheible, W.R.** (2009). Members of the LBD family of transcription factors repress anthocyanin synthesis and affect additional nitrogen responses in arabidopsis. *Plant Cell* **21**: 3567-3584.
- Ruffel, S. et Gojon, A.** (2017). Systemic nutrient signalling: On the road for nitrate. *Nat. Plants* **3**: 17040.
- Ruffel, S., Krouk, G., Ristova, D., Shasha, D., Birnbaum, K.D., et Coruzzi, G.M.** (2011). Nitrogen economics of root foraging: Transitive closure of the nitrate-cytokinin relay and distinct systemic signaling for N supply vs. demand. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**: 18524-18529.
- Ruffel, S., Poitout, A., Krouk, G., Coruzzi, G.M., et Lacombe, B.** (2016). Long-distance nitrate signaling displays cytokinin dependent and independent branches. *J. Integr. Plant Biol.* **58**: 226-229.
- Saito, H. et al.** (2015). The jasmonate-responsive GTR1 transporter is required for gibberellin-mediated stamen development in Arabidopsis. *Nat. Commun.* **6**: 6095.
- Sakakibara, H., Takei, K., et Hirose, N.** (2006). Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development. *Trends Plant Sci.* **11**: 440-448.
- Sambrook, J. et Russel, D.W.** (2001). Molecular cloning, a laboratory manual 3rd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York).
- Sarnowska, E.A. et al.** (2013). DELLA-interacting SWI3C core subunit of switch/sucrose nonfermenting chromatin remodeling complex modulates gibberellin responses and hormonal cross talk in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **163**: 305-317.
- Sasaki, A.** (2003). Accumulation of Phosphorylated Repressor for Gibberellin Signaling in an

F-box Mutant. *Science*. **299**: 1896-1898.

- Sasaki, A., Ashikari, M., Ueguchi-Tanaka, M., Itoh, H., Nishimura, A., Swapan, D., Ishiyama, K., Saito, T., Kobayashi, M., Khush, G.S., Kitano, H., et Matsuoka, M.** (2002). A mutant gibberellin-synthesis gene in rice: New insight into the rice variant that helped to avert famine over thirty years ago. *Nature* **416**: 701-702.
- Sawada, K.** (1912). Diseases of agricultural products in Japan. *Form Agric Rev* **63**: 10-16.
- Schepetilnikov, M., Dimitrova, M., Mancera-Martínez, E., Geldreich, A., Keller, M., et Ryabova, L.A.** (2013). TOR and S6K1 promote translation reinitiation of uORF-containing mRNAs via phosphorylation of eIF3h. *EMBO J.* **32**: 1087-1102.
- Schepetilnikov, M., Kobayashi, K., Geldreich, A., Caranta, C., Robaglia, C., Keller, M., et Ryabova, L.A.** (2011). Viral factor TAV recruits TOR/S6K1 signalling to activate reinitiation after long ORF translation. *EMBO J.* **30**: 1343-1356.
- Schepetilnikov, M. et Ryabova, L.A.** (2018). Recent Discoveries on the Role of TOR (Target of Rapamycin) Signaling in Translation in Plants. *Plant Physiol.* **176**: 1095-1105.
- Schomburg, F.M., Bizzell, C.M., Lee, D.J., Zeevaart, J.A.D., et 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.
- Schopfer, F.J., Baker, P.R.S., et Freeman, B.A.** (2003). NO-dependent protein nitration: A cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *Trends Biochem. Sci.* **28**: 646-654.
- Seale, M., Bennett, T., et Leyser, O.** (2017). BRC1 expression regulates bud activation potential but is not necessary or sufficient for bud growth inhibition in Arabidopsis. *Development* **144**: 1661-1673.
- Shi, L., Wu, Y., et Sheen, J.** (2018). TOR signaling in plants: conservation and innovation. *Development* **145**: dev160887.
- Shimizu-Sato, S., Tanaka, M., et Mori, H.** (2009). Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching. *Plant Mol. Biol.* **69**: 429-435.
- Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M., Ruth, T.J., et Fernando, M.** (1989). Studies of the Regulation of Nitrate Influx by Barley Seedlings Using $^{13}\text{NO}_3^-$. *Plant Physiol.* **90**: 806-813.
- Silverstone, A.L., Chang, C., Krol, E., et Sun, T.P.** (1997). Developmental regulation of the gibberellin biosynthetic gene GA1 in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **12**: 9-19.
- Silverstone, A.L., Ciampaglio, C.N., et Sun, T.** (1998). The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* **10**: 155-69.
- Silverstone, A.L., Jung, H.S., Dill, A., Kawaide, H., Kamiya, Y., et Sun, T.P.** (2001). Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**: 1555-66.
- Silverstone, A.L. et Sun, T.** (2000). Gibberellins and the Green Revolution. *Trends Plant Sci.* **5**: 1-2.
- Smith, B.E.** (2002). Nitrogenase Reveals Its Inner Secrets. *Science*. **297**: 1654-1655.
- Spielmeier, W., Ellis, M.H., et Chandler, P.M.** (2002). Semidwarf (sd-1), « green revolution » rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**: 9043-9048.
- Stavang, J.A., Gallego-Bartolomé, J., Gómez, M.D., Yoshida, S., Asami, T., Olsen, J.E., García-Martínez, J.L., Alabadí, D., et Blázquez, M.A.** (2009). Hormonal regulation of temperature-induced growth in Arabidopsis. *Plant J.* **60**: 589-601.

- Stavang, J.A., Lindgård, B., Erntsen, A., Lid, S.E., Moe, R., et Olsen, J.E.** (2005). Thermoperiodic stem elongation involves transcriptional regulation of gibberellin deactivation in pea. *Plant Physiol.* **138**: 2344-53.
- Sun, J., Bankston, J.R., Payandeh, J., Hinds, T.R., Zagotta, W.N., et Zheng, N.** (2014). Crystal structure of the plant dual-affinity nitrate transporter NRT1.1. *Nature* **507**: 73-77.
- Sun, T.P. et Kamiya, Y.** (1994). The Arabidopsis GA1 locus encodes the cyclase entkaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* **6**: 1509-1518.
- Suzaki, T. et Kawaguchi, M.** (2014). Root nodulation: A developmental program involving cell fate conversion triggered by symbiotic bacterial infection. *Curr. Opin. Plant Biol.* **21**: 16-22.
- Tabata, R., Sumida, K., Yoshii, T., Ohyama, K., Shinohara, H., et Matsubayashi, Y.** (2014). Perception of root-derived peptides by shoot LRR-RKs mediates systemic N-demand signaling. *Science*. **346**: 343-346.
- Takahashi, N., Kitamura, H., Kawarada, A., Seta, Y., Takai, M., Tamura, S., et Sumiki, Y.** (1955). Biochemical studies on "Bakanae" fungus. Part XXXIV. Isolation of gibberellins and their properties. *Bull Agric Chem Soc Jp* **19**: 267-277.
- Takeda, N., Handa, Y., Tsuzuki, S., Kojima, M., Sakakibara, H., et Kawaguchi, M.** (2015). Gibberellins interfere with symbiosis signaling and gene expression and alter colonization by Arbuscular Mycorrhizal fungi in Lotus Japonicus. *Plant Physiol.* **167**: 545-557.
- Takei, K., Ueda, N., Aoki, K., Kuromori, T., Hirayama, T., Shinozaki, K., Yamaya, T., et Sakakibara, H.** (2004). AtIPT3 is a Key Determinant of Nitrate-Dependent Cytokinin Biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **45**: 1053-1062.
- Tal, I. et al.** (2016). The Arabidopsis NPF3 protein is a GA transporter. *Nat. Commun.* **7**: 11486.
- Thomas, S.G., Phillips, A.L., et Hedden, P.** (1999). Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 4698-4703.
- Tsay, Y.-F., Chiu, C.-C., Tsai, C.-B., Ho, C.-H., et Hsu, P.-K.** (2007). Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Lett.* **581**: 2290-2300.
- Tsay, Y., Schroeder, J.I., Feldmann, K.A., et Crawford, N.M.** (1993). The herbicide sensitivity gene CHL1 of arabidopsis encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* **72**: 705-713.
- Ubeda-Tomás, S., Federici, F., Casimiro, I., Beemster, G.T.S., Bhalerao, R., Swarup, R., Doerner, P., Haseloff, J., et Bennett, M.J.** (2009). Gibberellin Signaling in the Endodermis Controls Arabidopsis Root Meristem Size. *Curr. Biol.* **19**: 1194-1199.
- Ubeda-Tomás, S., Swarup, R., Coates, J., Swarup, K., Laplaze, L., Beemster, G.T.S., Hedden, P., Bhalerao, R., et Bennett, M.J.** (2008). Root growth in Arabidopsis requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. *Nat. Cell Biol.* **10**: 625-628.
- Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T.Y., Hsing, Y.I.C., Kitano, H., Yamaguchi, I., et Matsuoka, M.** (2005). GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* **437**: 693-698.
- Ueguchi-Tanaka, M., Nakajima, M., Katoh, E., Ohmiya, H., Asano, K., Saji, S., Hongyu, X., Ashikari, M., Kitano, H., Yamaguchi, I., et Matsuoka, M.** (2007). Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, GID1, with a rice DELLA protein, SLR1, and gibberellin. *Plant Cell* **19**: 2140-2155.

- Varbanova, M. et al.** (2007). Methylation of Gibberellins by Arabidopsis GAMT1 and GAMT2. *Plant Cell* **19**: 32-45.
- Van De Velde, K., Ruelens, P., Geuten, K., Rohde, A., et Van Der Straeten, D.** (2017). Exploiting DELLA Signaling in Cereals. *Trends Plant Sci.* **22**: 880-893.
- Vidal, E.A., Álvarez, J.M., Moyano, T.C., et Gutiérrez, R.A.** (2015). Transcriptional networks in the nitrate response of Arabidopsis thaliana. *Curr. Opin. Plant Biol.* **27**: 125-132.
- Vidal, E.A. et Gutiérrez, R.A.** (2008). A systems view of nitrogen nutrient and metabolite responses in Arabidopsis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**: 521-529.
- Waldie, T. et Leyser, O.** (2018). Cytokinin Targets Auxin Transport to Promote Shoot Branching. *Plant Physiol.* **177**: 803-818.
- Wang, R., Tischner, R., Gutiérrez, R.A., Hoffman, M., Xing, X., Chen, M., Coruzzi, G., et Crawford, N.M.** (2004). Genomic Analysis of the Nitrate Response Using a Nitrate Reductase-Null Mutant of Arabidopsis. *Plant Physiol.* **136**: 2512-2522.
- Wang, W., Shi, J., Xie, Q., Jiang, Y., Yu, N., et Wang, E.** (2017). Nutrient Exchange and Regulation in Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Mol. Plant* **10**: 1147-1158.
- Wang, Y.-Y., Cheng, Y.-H., Chen, K.-E., et Tsay, Y.-F.** (2018). Nitrate Transport, Signaling, and Use Efficiency. *Annu. Rev. Plant Biol.* **69**: 85-122.
- Wang, Y.Y., Hsu, P.K., et Tsay, Y.F.** (2012). Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends Plant Sci.* **17**: 458-467.
- Webb, S.E., Appleford, N.E.J., Gakin, P., et Lenton, J.R.** (1998). Gibberellins in internodes and ears of wheat containing different dwarfing alleles. *Phytochemistry* **47**: 671-677.
- Weiss, D. et Ori, N.** (2007). Mechanisms of cross talk between gibberellin and other hormones. *Plant Physiol.* **144**: 1240-1246.
- Wendler, R., Carvalho, P.O., Pereira, J.S., et Millard, P.** (1995). Role of nitrogen remobilization from old leaves for new leaf growth of Eucalyptus globulus seedlings. *Tree Physiol.* **15**: 679-683.
- Weston, D.E., Elliott, R.C., Lester, D.R., Rameau, C., Reid, J.B., Murfet, I.C., et Ross, J.J.** (2008). The Pea DELLA Proteins LA and CRY Are Important Regulators of Gibberellin Synthesis and Root Growth. *Plant Physiol.* **147**: 199-205.
- Wild, M. et Achard, P.** (2013). The DELLA protein RGL3 positively contributes to jasmonate/ethylene defense responses. *Plant Signal. Behav.* **8**: e23891.
- Wild, M., Davière, J.-M., Cheminant, S., Regnault, T., Baumberger, N., Heintz, D., Baltz, R., Genschik, P., et Achard, P.** (2012). The Arabidopsis DELLA RGA - LIKE3 Is a Direct Target of MYC2 and Modulates Jasmonate Signaling Responses. *Plant Cell* **24**: 3307-3319.
- Wild, M., Davière, J.-M., Regnault, T., Sakvarelidze-Achard, L., Carrera, E., Lopez Diaz, I., Cayrel, A., Dubeaux, G., Vert, G., et Achard, P.** (2016). Tissue-Specific Regulation of Gibberellin Signaling Fine-Tunes Arabidopsis Iron-Deficiency Responses. *Dev. Cell* **37**: 190-200.
- Wilkinson, J.Q. et Crawford, N.M.** (1993). Identification and characterization of a chlorate-resistant mutant of Arabidopsis thaliana with mutations in both nitrate reductase structural genes NIA1 and NIA2. *Mol. Gen. Genet.* **239**: 289-297.
- von Wiren, N., Lauter, F.-R., Ninnemann, O., Gillissen, B., Walch-Liu, P., Engels, C., Jost, W., et Frommer, W.B.** (2000). Differential regulation of three functional

ammonium transporter genes by nitrogen in root hairs and by light in leaves of tomato. *Plant J.* **21**: 167-175.

- Wolters, H. et Jürgens, G.** (2009). Survival of the flexible: Hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nat. Rev. Genet.* **10**: 305-317.
- Wu, Y., Shi, L., Li, L., Fu, L., Liu, Y., Xiong, Y., et Sheen, J.** (2019). Integration of nutrient, energy, light, and hormone signalling via TOR in plants. *J. Exp. Bot.* **70**: 2227-2238.
- Wulff, N., Ernst, H.A., Jørgensen, M.E., Lambertz, S., Maierhofer, T., Belew, Z.M., Crocoll, C., Motawia, M.S., Geiger, D., Jørgensen, F.S., Mirza, O., et Nour-Eldin, H.H.** (2019). An Optimized Screen Reduces the Number of GA Transporters and provides Insights into NPF Substrate Determinants. *bioRxiv*: 670174.
- Xiong, Y. et Sheen, J.** (2015). Novel links in the plant TOR kinase signaling network. *Curr. Opin. Plant Biol.* **28**: 83-91.
- Xiong, Y. et Sheen, J.** (2014). The Role of Target of Rapamycin Signaling Networks in Plant Growth and Metabolism. *Plant Physiol.* **164**: 499-512.
- Xu, F., Li, T., Xu, P.-B., Li, L., Du, S.-S., Lian, H.-L., et Yang, H.-Q.** (2016). DELLA proteins physically interact with CONSTANS to regulate flowering under long days in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* **590**: 541-549.
- Xue, Y., Liu, Z., Gao, X., Jin, C., Wen, L., Yao, X., et Ren, J.** (2010). GPS-SNO: Computational prediction of protein s-nitrosylation sites with a modified GPS algorithm. *PLoS One* **5**: 1-7.
- Yabuta, T. et Sumiki, T.** (1937). Studies on the Chemical Constituents of "Inekoji" Part IV. *J. Agric. Chem. Soc. Japan* **13**: 103-105.
- Yamaguchi, S.** (2008). Gibberellin Metabolism and its Regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 225-251.
- Yamaguchi, S., Kamiya, Y., et Sun, T.** (2001). Distinct cell-specific expression patterns of early and late gibberellin biosynthetic genes during *Arabidopsis* seed germination. *Plant J.* **28**: 443-453.
- Yamaguchi, S., Sun, T., Kawaide, H., et Kamiya, Y.** (1998). The GA2 Locus of *Arabidopsis thaliana* Encodes ent-Kaurene Synthase of Gibberellin Biosynthesis. *Plant Physiol.* **116**: 1271-1278.
- Yasumura, Y., Crumpton-Taylor, M., Fuentes, S., et Harberd, N.P.** (2007). Step-by-Step Acquisition of the Gibberellin-DELLA Growth-Regulatory Mechanism during Land-Plant Evolution. *Curr. Biol.* **17**: 1225-1230.
- Yoshida, H. et al.** (2018). Evolution and diversification of the plant gibberellin receptor GID1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**: E7844-E7853.
- Yu, N. et al.** (2014). A DELLA protein complex controls the arbuscular mycorrhizal symbiosis in plants. *Cell Res.* **24**: 130-133.
- Yu, S., Galvão, V.C., Zhang, Y.C., Horrer, D., Zhang, T.Q., Hao, Y.H., Feng, Y.Q., Wang, S., Schmid, M., et Wang, J.W.** (2012). Gibberellin regulates the *Arabidopsis* floral transition through miR156-targeted SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE transcription factors. *Plant Cell* **24**: 3320-3332.
- Zentella, R. et al.** (2016). O-GlcNAcylation of master growth repressor DELLA by SECRET AGENT modulates multiple signaling pathways in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **30**: 164-176.
- Zentella, R., Sui, N., Barnhill, B., Hsieh, W.P., Hu, J., Shabanowitz, J., Boyce, M., Olszewski, N.E., Zhou, P., Hunt, D.F., et Sun, T.P.** (2017). The *Arabidopsis* O-

- fucosyltransferase SPINDLY activates nuclear growth repressor della. *Nat. Chem. Biol.* **13**: 479-485.
- Zentella, R., Zhang, Z.-L., Park, M., Thomas, S.G., Endo, A., Murase, K., Fleet, C.M., Jikumaru, Y., Nambara, E., Kamiya, Y., et Sun, T.** (2007). Global Analysis of DELLA Direct Targets in Early Gibberellin Signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 3037-3057.
- Zhang, D., Jing, Y., Jiang, Z., et Lin, R.** (2014a). The Chromatin-Remodeling Factor PICKLE Integrates Brassinosteroid and Gibberellin Signaling during Skotomorphogenic Growth in Arabidopsis. *Plant Cell* **26**: 2472-2485.
- Zhang, H. et Forde, B.G.** (1998). An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science*. **279**: 407-409.
- Zhang, H., Jennings, A., Barlow, P.W., et Forde, B.G.** (1999). Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 6529-6534.
- Zhang, J., Huang, D., Wang, C., Wang, B., Fang, H., Huo, J., et Liao, W.** (2019a). Recent Progress in Protein S -Nitrosylation in Phytohormone Signaling. *Plant Cell Physiol.* **60**: 494-502.
- Zhang, K., Novak, O., Wei, Z., Gou, M., Zhang, X., Yu, Y., Yang, H., Cai, Y., Strnad, M., et Liu, C.J.** (2014b). Arabidopsis ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins. *Nat. Commun.* **5**: 3274.
- Zhang, Q., Wang, J., Wang, L., Wang, J., Wang, Q., Yu, P., Bai, M., et Fan, M.** (2019b). Gibberellin repression of axillary bud formation in Arabidopsis by modulation of DELLA-SPL9 complex activity. *J. Integr. Plant Biol.* **XXXX**: jipb.12818.
- Zhang, Y. et al.** (2018a). A transportome-scale amiRNA-based screen identifies redundant roles of Arabidopsis ABCB6 and ABCB20 in auxin transport. *Nat. Commun.* **9**: 4204.
- Zhang, Y., Zhang, B., Yan, D., Dong, W., Yang, W., Li, Q., Zeng, L., et Wang, J.** (2011a). Two Arabidopsis cytochrome P450 monooxygenases , CYP714A1 and CYP714A2 , function redundantly in plant development through gibberellin deactivation. **53**: 342-353.
- Zhang, Y., Zhou, Y., Chen, S., Liu, J., Fan, K., Li, Z., Liu, Z., et Lin, W.** (2019c). Gibberellins play dual roles in response to phosphate starvation of tomato seedlings, negatively in shoots but positively in roots. *J. Plant Physiol.* **234-235**: 145-153.
- Zhang, Y.Y., Zhang, Y.Y., McFarlane, H.E., Obata, T., Richter, A.S., Lohse, M., Grimm, B., Persson, S., Fernie, A.R., et Giavalisco, P.** (2018b). Inhibition of TOR Represses Nutrient Consumption, Which Improves Greening after Extended Periods of Etiolation. *Plant Physiol.* **178**: 101-117.
- Zhang, Z.L., Ogawa, M., Fleet, C.M., Zentella, R., Hu, J., Heo, J.O., Lim, J., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., et Sun, T.P.** (2011b). SCARECROW-LIKE 3 promotes gibberellin signaling by antagonizing master growth repressor DELLA in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**: 2160-2165.
- Zhao, Y.** (2012). Auxin biosynthesis: A simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-Acetic acid in plants. *Mol. Plant* **5**: 334-338.
- Zhu, Y. et al.** (2006). ELONGATED UPPERMOST INTERNODE Encodes a Cytochrome P450 Monooxygenase That Epoxidizes Gibberellins in a Novel Deactivation Reaction in Rice. *Plant Cell* **18**: 442-456.

Annexes

Annexes

Annexe 1. Amorces utilisées pour les clonages

Gène	Couple d'amorces 5' 3'
<u>attB1-</u> <i>pNPF2.13</i>	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGCCTAAAAGGCGATAAAAAGCC</u>
<u>attB2-</u> <i>pNPF2.13</i>	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTCTAAGATATTACTACACTCG</u>
<u>attB4-</u> <i>pNPF2.13</i>	<u>GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGTTGCCTAAAAGGCGATAAAAAGCC</u>
<u>attB1r-</u> <i>pNPF2.13</i>	<u>GGGGACTGCTTTTTTGTACAACTTGTCTCTAAGATATTACTACACTCG</u>
<u>attB1-</u> <i>NPF2.13</i>	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGGTTTTGGAGGATAGAAAGG</u>
<u>attB2-</u> <i>NPF2.13</i>	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTTCATCGATTTCTTCGAAGTC</u>

Annexe 2. Amorces utilisées pour les RT-qPCR

Gène (<i>Arabidosis</i>)	Couple d'amorces 5' 3' F=sens ; R=antisens
<i>NIA1-F</i>	AAGCCGTACACATTA AAAAGGCTA
<i>NIA1-R</i>	TCACCTCAACCCTCGTTACC
<i>CPS-F</i>	TCCATTCCAAGTACAACCTTTCT
<i>CPS-R</i>	TCTCTAGCGACATTGAGAGGAGA
<i>KS-F</i>	GAAAAAGAGATCTGGATCTTAAATGTG
<i>KS-R</i>	TTGTCCCCTCTAAAACATAGGC
<i>KO-F</i>	AAATCGGAGGCTATCATGTCC
<i>KO-R</i>	GCTTCTTATCCATGTTGCATCC
<i>KAO1-F</i>	CTTATCGCAGGTTGTTCGATG
<i>KAO1-R</i>	TTCCAACCTTTTGGGATCAA
<i>KAO2-F</i>	CTAGAGGATACAAGAGGTGGTC
<i>KAO2-R</i>	CCGTCATAGCTTCAGTCG
<i>GA20ox1-F</i>	CATGGGTTTCAGCCATTG
<i>GA20ox1-R</i>	CTCTAAAGTAGTCCCGTTTTACGC
<i>GA20ox2-F</i>	CGATCTCTCAAGCCAAGACTCG
<i>GA20ox2-R</i>	TCGCTGACGCCATGATTG
<i>GA20ox3-F</i>	ATGGCTCTAACGAATGGAAG
<i>GA20ox3-R</i>	CTTTCTCTCTCGCTGTTAC

<i>GA20ox4-F</i>	ACGGATACAAAGATTTTCGGG
<i>GA20ox4-R</i>	TCTTTAGAGAGAGATTGCTCATGG
<i>GA20ox5-F</i>	TCAAGAGATCGGTCAAGTGT
<i>GA20ox5-R</i>	AGCTCCATCAAATCCATAACCA
<i>GA3ox1-F</i>	GTCTAGCAGCTCATACCGAC
<i>GA3ox1-R</i>	CTTCTCTGTGATTTCTAATC
<i>GA3ox2-F</i>	GCCACCACCTCAAATACTGTG
<i>GA3ox2-R</i>	GGCCATTGTATGTCCTTTTC
<i>GA3ox3-F</i>	TCTGCAGTTGAACTCCTACCC
<i>GA3ox3-R</i>	TGTGAGGGGCTAAACCCATA
<i>GA3ox4-F</i>	TCACACCAAGTACTGCGG
<i>GA3ox4-R</i>	AGCCTAATATGCAATACAGAAGTC
<i>GA2ox1-F</i>	ACGTTGGTGACTCTCTCC
<i>GA2ox1-R</i>	CGATTCTCTGAGTCAATGAAGG
<i>GA2ox2-F</i>	AGGTCGTAAACCACGGAGTC
<i>GA2ox2-R</i>	CAAGCCGAAGAAGCCAATAG
<i>GA2ox3-F</i>	CCAAAAGAGTAGACCATGGTAATTG
<i>GA2ox3-R</i>	CATTTTGGATTAACATAGAGGTTGC
<i>GA2ox4-F</i>	TAGGAGACTTGTTACAGGTGATG
<i>GA2ox4-R</i>	GTAGGTCAATGCTCTATGCCTT
<i>GA2ox6-F</i>	TCATGATGATCCTTTCAAGTTCAG
<i>GA2ox6-R</i>	CAAATCTCTAACCGTGCGTA
<i>GA2ox7-F</i>	ATCGCAACAACCTCAGAAC
<i>GA2ox7-R</i>	TTTGTGCCACTCGAGCTATC
<i>GA2ox8-F</i>	AACACCGTGTGATGACGAAC
<i>GA2ox8-R</i>	GCGTCGTATGATGGACACA
<i>GAI-F</i>	CACCTCGGCTTGGAACTCTCTC
<i>GAI-R</i>	TGACAAAGGGAAAAACAGTAGGATTT
<i>RGA-F</i>	AATAGTGGCCAAGGTTATCGTG
<i>RGA-R</i>	AGTGTGCCAACCCAACATG
<i>RGL1-F</i>	CAAGCATGTTGTTGGCACTT
<i>RGL1-R</i>	GCAACAAACAACCTTCATTCTCT
<i>RGL2-F</i>	CTGCGTTTCCAAGGAAGAG
<i>RGL2-R</i>	GTCGGATCCTCTTGCTGCTA

<i>RGL3-F</i>	CGTCGAATTTACCGGATTCA
<i>RGL3-R</i>	AATCTCTTCGAAGGAAGGATCA
<i>GID1A-F</i>	GCTGCGAGCGATGAAGTTA
<i>GID1A-R</i>	AGTGTCGGTTAAAGGTTCCATC
<i>GID1B-F</i>	TTTGCTGGGTTTTGGAGACT
<i>GID1B-R</i>	AGGACCCATGTGTTGAGTGG
<i>GID1C-F</i>	GAACGGCGTTTAACTACTACCG
<i>GID1C-R</i>	TTTGGACGGTTCACAAACG
<i>SLEEPY-F</i>	CAAAACGGCACAAGACGAG
<i>SLEEPY-R</i>	GCAGCCGATGTTAGTCCAGT
<i>SNEEZY -F</i>	CCTGGCACGACTCCCTAAG
<i>SNEEZY -R</i>	CACAGTAAAGTGACAGAGAGAGCTG
<i>NPF2.12-F</i>	GCATCCCTCTTCTCAATTCTAGG
<i>NPF2.12-R</i>	GTCTGGATGAGGGTTGTTGC
<i>NPF2.13-F</i>	CATCGCTTTCGCCTCATT
<i>NPF2.13-R</i>	AGGAAACGATGCTGTGAGTGT
<i>SAND-F</i>	AACTCTTATGCAGCATTGATCCACT
<i>SAND-R</i>	TGATTGCATATCTTTATCGCCATC
<i>AT4G26410-F</i>	GAGCTGAAGTGGCTTCAATGAC
<i>AT4G26410-R</i>	GGTCCGACATACCCATGATCC
<i>TIP41-Like-F</i>	GTGAAAACACTGTTGGAGAGAAGCAA
<i>TIP41-Like-R</i>	TCAACTGGATACCCTTTTCGCA

Gène (Blé)	Couple d'amorces 5' 3' F=sens ; R=antisens
<i>GA13ox1A-F</i>	TCATCTATATATAACCAAACCAAACCA
<i>GA13ox1A-R</i>	GTTTGCGCAGAATCTACCATC
<i>GA13ox1B-F</i>	GAGTCTTCTCATTAAATTTGGACCAC
<i>GA13ox1B-R</i>	ATGCAGTGCAGGAGTACTTATTGT
<i>GA13ox1D-F</i>	ACACCATCGTACGCAGAGC
<i>GA13ox1D-R</i>	TCGTATAGGGGGTTGGGTTT
<i>GA13ox2A-F</i>	TCGATCTCTCCATTGATCTCG
<i>GA13ox2A-R</i>	AACGAACAACCGAGCTAATCA
<i>GA13ox2B-F</i>	ATGGCATCCTCAAGTCCAAC
<i>GA13ox2B-R</i>	GAAGAACTCAGGGGCGATG

<i>GA13ox2D-F</i>	CTGATCGACTTCCGTTTCCTA
<i>GA13ox2D-R</i>	GCTTCCCATGAACACACCA
<i>Actin-F</i>	ACCTTCAGTTGCCAGCAAT
<i>Actin-R</i>	CAGAGTCGAGCACAATACCAGTTG

Annexe 3. Amorces utilisées pour les RT-PCR

Gène	Couple d'amorces 5' 3' F=sens ; R=antisens
<i>NPF2.12-F_{RT}</i>	GGGAGTTGTTGAGAATCGGA
<i>NPF2.12-R_{gen}</i>	GAGACCGAGGAATAGAATCC
<i>NPF2.13-F_{RT}</i>	GGAGCGTATATCTCAGACAC
<i>NPF2.13-R_{RT}</i>	CTAGACTTGATGGCTGGGTC

Annexe 4. Amorces utilisées pour les génotypages

Gène	Couple d'amorces 5' 3' F=sens ; R=antisens
insertion SALK LB1.3	ATTTGCCGATTTTCGGAAC
<i>NPF2.12-F_{gen}</i>	TTTCGACCGTTTCAAGTTTTTG
<i>NPF2.12-R_{gen}</i>	GAGACCGAGGAATAGAATCC
<i>NPF2.13-F_g</i>	ACGCTGGAGAGACTGGGATCG
<i>NPF2.13 R_g</i>	CGTAGACATAACGCTTCATTC
<i>pNPF2.13-F_{prom}</i>	CCATCAACCCCTTACGATGC
<i>NPF2.13-R_g</i>	CGTAGACATAACGCTTCATTC
<i>NPF2.13-F_{seq}</i>	GACCCAGCCATCAAGTCTAG
<i>VENUS-R</i>	GATCTCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGA
<i>NIA1-F1</i>	TTCTCCTCGCTCATTCGAC
<i>NIA1-R1</i>	AAGATCCTCCGCTCCTTC
<i>NIA2-F</i>	ACGGCGTGGTTCGTTCTTACA
<i>NIA2-R</i>	ACCTTCTTCGTCCGCGAGTTC
<i>GAI-N6</i>	TAGAAGTGGTAGTGG
<i>GAI-R1</i>	GTGAACAGTCTCAGTAGC
<i>RGA-F1</i>	TGGTGGAGTCATAGGAACGAC
<i>RGA-R1</i>	TCAACCACCGTGAAAATCACC
<i>NRT2.1-F1</i>	CTTCTCTAGGCTCGTGATGG
<i>NRT2.1-R1</i>	CATAGCCACAACGGCAGTTA

<i>pSHY2-F2</i>	CATATGGCATAACCACATGTGG
<i>GUS-R1</i> (pBI101.1)	AACATACGGCGTGACATCGG
<i>SHY2-F2</i>	CATATGGCATAACCACATGTGG
<i>SHY2-R_{gen}</i>	AGATCTAACTGGTGGCCATC
<i>SHY2-F_{seq}</i>	CTCGAAGCCTCTCATCTTCATCA
<i>GUS-F4</i> (pBI101.1)	TTATGCGGGCAACGTCTG
<i>GUS-R2</i> (pBI101.1)	GGTTAAAGCCGACAGCAGCA
<i>NPF2.13-F_{seq2}</i>	CCTTAGTAGTTTCCTTGTGAC
<i>NPF2.13-F_{seq3}</i>	TCCGTCATCTCTCTCCTCAC
<i>NPF2.13-R_{seq}</i>	GTGGAGTTGAGGAAACGATG
<i>NPF2.13-R_{seq2}</i>	CCGACCTTGTACCGGTATC
<i>NPF2.13-R_{seq3}</i>	GTGAGGAGAGAGATGACGGA

Annexe 5. Revue-communication publiée dans *Molecular Plant*

Dynamic regulation of DELLA protein activity: SPINDLY and SECRET AGENT unmasked!

Lucie Camut, Jean-Michel Davière and Patrick Achard*

Institut de biologie moléculaire des plantes, CNRS, Université de Strasbourg, 12 rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg Cedex, France.

*Correspondence: Patrick Achard (patrick.achard@ibmp-cnrs.unistra.fr).

Dynamic Regulation of DELLA Protein Activity: SPINDLY and SECRET AGENT Unmasked!

Plants are sessile organisms that integrate growth responses to multiple endogenous and environmental signals. The DELLA family of transcription regulators, first identified as key repressors of gibberellin (GA) signaling, have emerged as a central node of integration, thus providing a mechanism for environmentally responsive growth regulation (Oh et al., 2014). DELLA proteins are distinguished by a conserved N-terminal DELLA domain essential for the interaction with the GA receptor GIBBERELLIN-INSENSITIVE DWARF1 (GID1), followed by an enriched sequence in serine (Ser) and threonine (Thr) residues (PolyS/T) and a C-terminal GRAS domain involved in protein-protein interaction and transcriptional regulation (Figure 1A; Davière and Achard, 2016). DELLAs repress plant growth by interacting with and modulating the activity of diverse classes of transcription factors and regulatory proteins, such as PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR (PIF), BRASSINAZOLE-RESISTANT1 (BZR1), and JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ) (Marín-de la Rosa et al., 2014). The binding of GA to GID1 leads to specific destruction of DELLAs through the ubiquitin-dependent proteasome pathway (Figure 1B, upper part), causing transcriptional reprogramming of DELLA-regulated genes involved in distinct pathways (Davière and Achard, 2016). Through this mechanism, DELLAs modulate plant growth in response to environmental variability.

Although GA-induced ubiquitylation and subsequent degradation of DELLAs is a relatively fast process (within a few minutes), it has long been hypothesized that other types of post-translational modifications on DELLAs would ensure a more dynamic regulation of DELLA activity throughout plant development. Hence, there is some evidence showing that phosphorylation of DELLAs on several residues is important for both protein stability and activity (Figure 1A; Hussain et al., 2005). However, despite the characterization of a casein kinase I, EARLIER FLOWERING1 (EL1) in rice, the mechanisms governing the dynamic regulation of DELLA activity remains largely unknown (Dai and Xue, 2010). A recent study revealed that DELLAs could be conjugated to the small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein at the KLE motif (Figure 1A) under salt stress conditions (Conti et al., 2014). According to the model, stress-induced SUMOylation of DELLAs sequesters GID1 independently of GA, allowing non-SUMOylated DELLAs to accumulate and restrain plant growth (Conti et al., 2014). Remarkably, Zentella et al. (2016, 2017) have recently reported another layer of regulation, the O-linked glycosylation of DELLAs. Although suspected for a long time, biochemical and genetic studies in *Arabidopsis* now provide compelling evidence that SPINDLY (SPY) and SECRET AGENT (SEC) glycosylate the DELLAs and thereby fine-tune their growth-repressing activity (Figure 1B, bottom part; Zentella et al., 2016, 2017).

SPY was originally identified in a genetic screen for negative regulators of GA signaling (Jacobsen and Olszewski, 1993).

Loss-of-function *spy* alleles are able to germinate in the presence of paclobutrazol, an inhibitor of GA biosynthesis, and to partially rescue the dwarf phenotype of GA-deficient mutants (Jacobsen and Olszewski, 1993). The predicted amino acid sequence of SPY, and its close homolog SEC, contains an N-terminal tetratricopeptide repeat domain involved in protein-protein interaction and a C-terminal putative O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) transferase (OGT) catalytic domain. OGTs catalyze the transfer of an O-GlcNAc from UDP-GlcNAc to selected Ser and Thr residues of cytosolic and nuclear proteins. O-GlcNAcylation is a dynamic and reversible reaction that usually modulates the activity of proteins according to nutritional demand. Because DELLAs contain several putative OGT-target sites mainly distributed throughout the PolyS/T region, it was initially suggested that SPY O-GlcNAcylates the DELLAs. However, only SEC has been confirmed to have OGT activity when expressed in *Escherichia coli* (Hartweck et al., 2002). To clarify this point and investigate whether DELLAs are O-GlcNAcylated *in planta* by SPY and/or SEC, Zentella et al. (2016) affinity-purified a tagged-version of the DELLA protein REPRESSOR OF *ga1-3* (RGA) from *Arabidopsis* seedlings, and then subjected the immunoprecipitated protein to mass spectrometry analysis after trypsin digestion. They identified several O-GlcNAcylated residues both in the N terminus and in the PolyS/T region of RGA. More importantly, the O-GlcNAcylation sites were lost in the *sec-3* mutant while they were unaffected in the *spy-8* mutant (Zentella et al., 2016). Therefore, although SPY was predicted to be an OGT, DELLAs are O-GlcNAcylated by SEC and not by SPY. The putative OGT catalytic domain of SPY lacks several conserved amino acids important for OGT activity that could lead to different glycosyl transferase activity. Indeed, further biochemical studies finally revealed that SPY is a nuclear protein O-fucosyltransferase (POFUT) (Zentella et al., 2017). POFUTs, which are usually localized in the endoplasmic reticulum, function as a chaperone in the folding of regulatory proteins. POFUTs catalyze the transfer of fucose from GDP-fucose to the hydroxyl group of Ser and Thr residues of target proteins. Several O-fucosylation sites were identified in RGA protein, which cluster in the same region as O-GlcNAcylation sites. As expected, the level of O-fucosylations in RGA was reduced in *spy-8* but unaltered in the *sec-3* mutant, confirming that SPY and SEC have different glycosyl transferase activity (Zentella et al., 2017).

Transient expression assay in tobacco further revealed that SPY and SEC compete with each other in modifying RGA, thus suggesting that SPY and SEC have opposite roles (Zentella et al., 2017). To precisely examine the function of SPY and SEC in regulating the activity of DELLAs, Zentella et al. (2016, 2017) investigated the binding affinity between the DELLAs and their

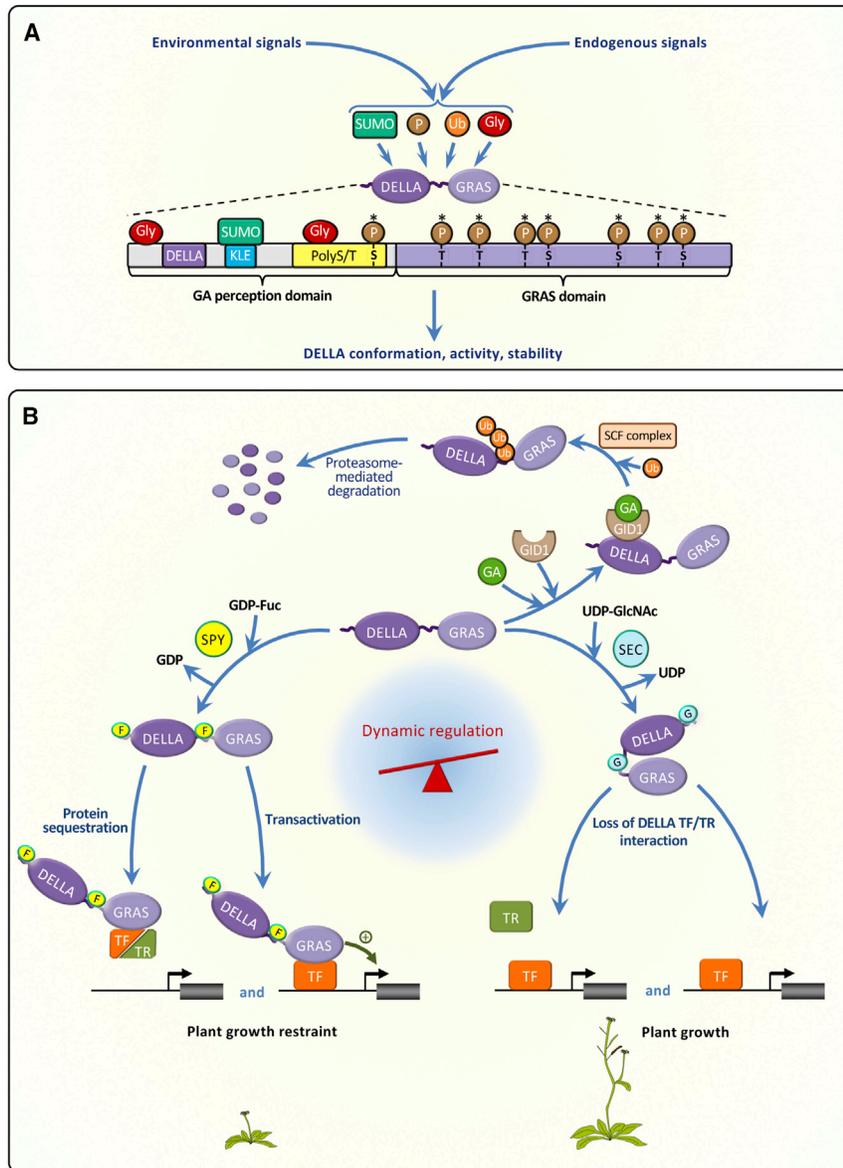


Figure 1. Post-Translational Modifications of DELLAs Allow Dynamic Regulation of Plant Growth.

(A) Post-translational modifications of DELLAs are modulated by the convergence of multiple environmental and endogenous signals, which in turn have an impact on their conformation, activity, or stability. The positions of known and potential (highlighted by an asterisk) post-translational modifications are indicated on a schematic representation of a DELLA. Specific sites of ubiquitylation are unknown. The DELLA, KLE, and PolyS/T motifs are indicated. SUMO, SUMOylation; P, phosphorylation; Ub, ubiquitylation; Gly, glycosylation.

(B) Overview of the effects of GA, SEC, and SPY on DELLA protein stability and activity. The binding of GA to GID1 stimulates the poly-ubiquitylation and subsequent degradation of DELLA by the 26S proteasome pathway. The O-fucosyltransferase SPY and O-GlcNAc transferase SEC respectively activate and repress the growth-repressing activity of DELLA through modulation of the DELLA-TF/TR interaction, leading to transcriptional reprogramming, hence ensuring flexible regulation of plant growth. It is suggested that SPY and SEC induce opposite conformational transition of DELLA, which respectively enhances and prevents the binding of DELLA with interacting partners. By doing so, DELLAs regulate the expression of target genes via two mechanisms: protein sequestration and transactivation. +, DELLA acts as transcriptional activator. GID1, GIBBERELLIN-INSENSITIVE DWARF1; SCF, SLEEPY/CULLIN/Fbox E3 ligase complex; TF, transcription factor; TR, transcription regulator; GA, gibberellin.

interacting partners. Strikingly, whereas O-GlcNAcylation by SEC reduced RGA interaction with BZR1 and PIFs, O-fucosylation by SPY increased RGA-BZR1 and RGA-PIF binding. The phenotype of *sec-3* and *spy-8* mutants further corroborated this opposite function. The *sec* mutation reduces both plant growth and the GA responsiveness of the GA-deficient *ga1-3* mutant (in *sec-3 ga1-3*), while *spy* mutation partially rescues the growth defect of *ga1-3* (in *spy-8 ga1-3*). Altogether these results support a model in which SEC-dependent O-GlcNAcylation and SPY-dependent O-fucosylation of DELLAs induce reciprocal conformational transition of the DELLAs that respectively prevents and promotes their binding activity with interacting partners (Figure 1B). Because DELLAs interact with a plethora of signaling pathways (Marín-de la Rosa et al., 2014), it is tempting to speculate that O-GlcNAcylation and O-fucosylation of the DELLAs provide a dynamic mechanism ensuring flexible growth in response to environmental variability. OGTs and

POFUTs have been extensively studied in the animal field, and OGTs were shown to act as nutrient sensors, coupling cell metabolic status to gene expression. Further studies are needed to reveal whether plant OGTs and POFUTs convey environmental signals to DELLAs to permit appropriate modulation of plant growth.

FUNDING

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and the French Ministry of Research and Higher Education.

ACKNOWLEDGMENTS

We apologize for inadvertent omission of any pertinent original references owing to space limitations. No conflict of interest declared.

Received: April 12, 2017
 Revised: April 12, 2017
 Accepted: May 7, 2017
 Published: May 12, 2017

*Lucie Camut, Jean-Michel Davière
and Patrick Achard**

Institut de biologie moléculaire des plantes, CNRS, Université de Strasbourg,
12 rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg Cedex, France

*Correspondence: Patrick Achard (patrick.achard@ibmp-cnrs.unistra.fr)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2017.05.003>

REFERENCES

- Conti, L., Nelis, S., Zhang, C., Woodcock, A., Swarup, R., Galbiati, M., Tonelli, C., Napier, R., Hedden, P., Bennett, M., et al. (2014). Small ubiquitin-like modifier protein SUMO enables plants to control growth independently of the phytohormone gibberellin. *Dev. Cell* **28**:102–110.
- Dai, C., and Xue, H.-W. (2010). RICE EARLY FLOWERING1, a CKI, phosphorylates DELLA protein SLR1 to negatively regulate gibberellin signalling. *EMBO J.* **29**:1916–1927.
- Davière, J.-M., and Achard, P. (2016). A pivotal role of DELLAs in regulating multiple hormone signals. *Mol. Plant* **9**:10–20.
- Hartweck, L.M., Scott, C.L., and Olszewski, N.E. (2002). Two *O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase genes of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. have overlapping functions necessary for gamete and seed development. *Genetics* **161**:1279–1291.
- Hussain, A., Cao, D., Cheng, H., Wen, Z., and Peng, J. (2005). Identification of the conserved serine/threonine residues important for gibberellin-sensitivity of *Arabidopsis* RGL2 protein. *Plant J.* **44**:88–99.
- Jacobsen, E., and Olszewski, N.E. (1993). Mutations at the *SPINDLY* locus of *Arabidopsis* alter gibberellin signal transduction. *Plant Cell* **5**:887–896.
- Marín-de la Rosa, N., Sotillo, B., Miskolczi, P., Gibbs, D.J., Vicente, J., Carbonero, P., Oñate-Sánchez, L., Holdsworth, M.J., Bhalerao, R., Alabadí, D., et al. (2014). Large-scale identification of gibberellin-related transcription factors defines group VII ETHYLENE RESPONSE FACTORS as functional DELLA partners. *Plant Physiol.* **166**:1022–1032.
- Oh, E., Zhu, J.-Y., Bai, M.-Y., Arenhart, R.A., Sun, Y., and Wang, Z.-Y. (2014). Cell elongation is regulated through a central circuit of interacting transcription factors in the *Arabidopsis* hypocotyl. *Elife* **3**:1–19.
- Zentella, R., Hu, J., Hsieh, W.-P., Matsumoto, P.A., Dawdy, A., Barnhill, B., Oldenhof, H., Hartweck, L.M., Maitra, S., Thomas, S.G., et al. (2016). *O*-GlcNAcylation of master growth repressor DELLA by SECRET AGENT modulates multiple signaling pathways in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **30**:164–176.
- Zentella, R., Sui, N., Barnhill, B., Hsieh, W.-P., Hu, J., Shabanowitz, J., Boyce, M., Olszewski, N.E., Zhou, P., Hunt, D.F., et al. (2017). The *Arabidopsis* *O*-fucosyltransferase SPINDLY activates nuclear growth repressor DELLA. *Nat. Chem. Biol.* <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.2320>.

Résumé :

Les gibbérellines (GAs) sont des phytohormones régulant divers aspects de la croissance et du développement de la plante en réponse aux signaux endogènes et exogènes. Au niveau moléculaire, les GAs stimulent la dégradation des protéines DELLA, répresseurs nucléaires de croissance. L'azote (N), macronutriment essentiel au développement de la plante, représente un des facteurs les plus limitant pour la productivité agricole. Le nitrate (NO_3^-), principale source de N pour les plantes cultivées, est une molécule soluble dont la disponibilité varie dans l'espace et le temps. Depuis la Révolution Verte des années 1960, l'application d'engrais azotés et l'utilisation de variétés de céréales semi-naines (altérées dans leurs réponses aux GAs) à forts rendements ont permis d'augmenter significativement la productivité agricole. Récemment, il a été rapporté que des transporteurs NO_3^- appartenant à la famille des NPF (NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER FAMILY) étaient capables de transporter des GAs. Malgré les liens historiques et scientifiques établis entre les GAs et le NO_3^- , peu d'études se sont intéressées à l'effet du nitrate sur la biosynthèse, le transport et la signalisation GA chez les plantes. A l'aide d'approches génétiques, moléculaires et biochimiques réalisées chez *Arabidopsis* et le blé, ce travail de thèse démontre que le nitrate augmente la production et le transport acropète de GA_{12} (un intermédiaire de biosynthèse de GAs) et en conséquence, stimule la dégradation des répresseurs DELLAs. La diminution de l'abondance des DELLAs active la division cellulaire et donc la croissance de la plante. Par ailleurs, à l'aide de micro-greffes et de tests d'import de GAs réalisés dans des oocytes de *Xenopus laevis*, nous montrons que NPF2.12 et NPF2.13 facilitent le transport basipète de GA_{12} et du nitrate. Enfin, nous montrons que le transport acropète de GA_{12} est accru en réponse à une élévation de la température ambiante. Pris dans leur ensemble, ces résultats révèlent que la biosynthèse et le transport de GAs sont finement régulés en réponse à la disponibilité en nitrate et aux fluctuations de la température, permettant une croissance adaptée et optimale de la plante.

Mots clefs : gibbérellines, nitrate, croissance, transport, température, adaptation, *Arabidopsis*, blé

Abstract:

The phytohormones gibberellins (GAs) regulate major aspects of plant growth and development in response to endogenous and exogenous signals. GAs promote growth by stimulating the degradation of nuclear growth repressing DELLA proteins. Nitrogen (N), a macronutrient essential for plant development, is one of the most limiting factors for agricultural productivity. Nitrate (NO_3^-) represents the main N source for cultivated plants but its availability fluctuates in both time and space due to its high solubility. Since the Green Revolution in the 1960's, the use of N-fertilizers associated with high-yielding semi-dwarf cereal varieties, altered in GA responses, led to impressive yield increases. Recently, it has been reported that some NO_3^- transporters belonging to the NPF family (NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER FAMILY), were able to transport GAs. Despite these observations, the effect of nitrate on GA biosynthesis, transport and signaling pathway is still unknown. Using genetics, molecular and biochemical approaches performed in *Arabidopsis* and wheat, this thesis work demonstrates that nitrate activates GA biosynthesis and GA_{12} transport (an inactive GA precursor), and as a consequence, DELLA protein degradation. The reduction in DELLA abundance increases cell division rate and thus plant growth. Moreover, through micrograftings and GA import assays in *Xenopus laevis* oocytes, we show that NPF2.12 and NPF2.13 facilitate the basipetal transport of GA_{12} and nitrate. Finally, we show that GA_{12} transport is enhanced by a small elevation of the ambient temperature. Altogether, these results reveal that GA biosynthesis and transport are tightly regulated in response to nitrate availability and temperature changes, enabling adaptive and optimal growth of the plant.

Keywords: gibberellins, nitrate, growth, transport, temperature, plant adaptation, *Arabidopsis*, wheat