



HAL
open science

Etude du mécanisme du transport de Gibbérellines chez les plantes

Mathilde Sirlin-Josserand

► **To cite this version:**

Mathilde Sirlin-Josserand. Etude du mécanisme du transport de Gibbérellines chez les plantes. Génétique des plantes. Université de Strasbourg, 2023. Français. NNT : 2023STRAJ058 . tel-04892846

HAL Id: tel-04892846

<https://theses.hal.science/tel-04892846v1>

Submitted on 17 Jan 2025

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 :

Mathilde SIRLIN-JOSSERAND

soutenue le : **09 octobre 2023**

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

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

**Étude du mécanisme du transport des
Gibbérellines chez les plantes**

THÈSE dirigée par :

Dr. ACHARD Patrick

DR CNRS, Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Strasbourg

THÈSE co-dirigée par :

Dr. DAVIERE Jean-Michel

Maitre de conférences, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr. MARION-POLL Annie

DR INRAE, Institut Jean-Pierre Bourgin, Versailles

Dr. LACOMBE Benoît

DR CNRS, Institut des Sciences des Plantes de Montpellier, Montpellier

EXAMINATEURS :

Dr. FERRARIO-MERY Sylvie

CR INRAE, Institut Jean-Pierre Bourgin, Versailles

Dr. LECHNER Esther

IR CNRS, Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Strasbourg

Un grain de bravoure pour trois grains de folie

Eragon

Christopher Paolini

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier avec beaucoup de sincérité mes directeurs de thèse, Patrick et Jean Michel, pour tout le chemin que j'ai pu parcourir avec eux : du premier mail que j'ai envoyé à Patrick pour lui demander un stage, en passant par le VégéLab durant mon master, puis mon stage, le concours de l'école doctorale, ma thèse et, pour finir ces derniers mois de corrections. Je me sens chanceuse d'avoir eu l'opportunité d'être formée par vous et d'avoir travaillé avec vous dans la bienveillance, le soutien et la compréhension. Patrick, je te remercie de m'avoir donné l'occasion de pouvoir travailler sur ce sujet si passionnant durant ma thèse, du temps que tu m'as accordé, de toutes les discussions sur mes projets et d'avoir cru en moi quand d'autres n'y croyait pas. Jean-Michel, je te remercie pour l'oreille attentive que tu m'as prêtée et pour m'avoir fait profiter de ton expertise scientifique et pédagogique.

Je remercie aussi la totalité de l'équipe et des membres que j'ai côtoyés durant ma thèse. Lali, un grand merci à toi pour la vie et la bonne humeur que tu apportes au laboratoire, pour ton aide durant mes expériences, pour m'avoir fait découvrir ta culture et pour tous les moments de convivialité. Lucas, merci pour l'aide que m'as apportée dans mon travail ainsi que tes nombreuses (pas toujours bonnes) blagues. Erwan, merci pour les discussions et les bons moments que nous avons partagés. Lucie, merci pour ton aide, tes conseils, ton soutien et tes encouragements durant tout le temps où nous avons travaillé ensemble. Mais surtout un grand merci, pour toutes les discussions, les rires, les verres, les sorties et l'amitié que nous partageons depuis notre rencontre. Tu es et tu resteras mon « mentor » pour lequel j'aurai toujours beaucoup d'affection.

Je souhaite remercier le Dr Eilon Shani pour nous avoir transmis la collection d'ARN guide nous ayant permis de réaliser notre crible ainsi que le Dr Roy Weinstain pour les GA-Fl.

Je tiens tout particulièrement à remercier les membres de mon jury, Annie Marion-Poll, Benoît Lacombe, Sylvie Ferrario-Mery et Ester Lechner pour avoir accepté d'évaluer le travail que j'ai réalisé au cours de ma thèse et plus spécifiquement Esther et Sylvie pour avoir suivi mon travail de thèse lors de mes comités de suivis annuels.

Merci aux plateformes techniques et scientifiques de l'IBMP pour l'aide qu'ils m'ont apportée. Notamment à Sandrine Koehler et Malek Alioua de la plateforme Analyse de l'expression génique et à Michel Kerneis, Agathe Humbert et Anais Zehnter de la plateforme

production végétale. Et aussi à tous les membres de l'institut que j'ai pu côtoyer et avec qui j'ai pu passer de très bons moments. Avec tout particulièrement une pensée pour l'équipe de Pascal Genshick (mes voisins préférés) avec qui j'ai eu de nombreux échanges scientifiques et des moments de convivialité autour d'un grand nombre de cafés et de pâtisseries.

Durant ces quatre années de thèse, j'ai eu l'occasion de lier de très belles amitiés avec des personnes qui m'ont soutenue durant les montagnes russes que peuvent être une thèse. Un grand merci à Anne, Valentin, Déborah, Léa, Emilie et Nicolas pour les nombreux moments que nous avons partagés et que, je l'espère, nous partagerons encore. Anaïs et Elody, merci pour toutes les pauses repas que nous avons passées ensemble à discuter de famille/couture/bêtises (et un peu de travail tout de même) et surtout pour tous les fous rires que nous avons eus. Et pour finir, j'ai une pensée toute particulière pour Herrade et Sébastien avec qui, en plus d'avoir partagé beaucoup de moments durant ma thèse, j'ai passé mes mois de rédaction. Ils m'ont beaucoup soutenue et encouragée durant tous ce processus. J'espère avoir pu moi aussi vous apporter autant de soutien, de réconfort et de bonne humeur.

Il n'y a bien sûr pas que les amis rencontrés au cours de ma thèse que je veux remercier mais aussi ceux qui sont dans ma vie depuis, pour certains, bien plus longtemps. Louise, tu as été ma première amie rencontrée à l'université et notre amitié a vu passer nos années de licence, de master et nos thèses respectives. Je suis très heureuse d'avoir pu partager toutes ces années avec toi. Virginie, merci pour toutes ces aventures, ces années d'amitié, pour être toujours là pour m'écouter et pour être toujours présente dans ma vie (un grand merci aussi à toi Romane). Émilie, ou devrais-je dire « mon binôme de vie », je me sens vraiment chanceuse de t'avoir rencontrée et que tu aies pris une aussi grande place dans ma vie. Nous avons grandi et évolué ensemble ces dernières années et j'espère que nous pourrons continuer à le faire. Et enfin Alice, merci d'avoir illuminé mes derniers mois de thèse.

Et pour finir je souhaite remercier ma famille et plus particulièrement ma grande sœur et ma maman qui ont été là pour moi et m'ont soutenue toutes mes années universitaires et de thèse. Merci maman d'avoir cru en moi quand, à 17 ans, je t'ai annoncé que je souhaitais faire des études de biologie dans le domaine du végétal et pourquoi pas faire une thèse. Même si mes envies ont un peu changé durant mon parcours et que je ne suis pas finalement dans le domaine de l'écologie, tu m'as toujours dit que j'avais assez de volonté (et un caractère un peu dur) pour atteindre les objectifs que je me fixe.

Sommaire

Listes des figures et tableaux	19
Listes des annexes :	29
Abréviations :	31
Introduction Générale	39
1 <i>Préambule</i>	41
2 <i>Les gibbérellines</i>	45
2.1 Structure chimique et généralités	49
2.2 Rôles des GA dans le développement des plantes	51
2.2.1 Phase végétative	51
2.2.2 Phase reproductive	55
2.3 Voie de signalisation des GA	55
2.3.1 Perception des GA	57
2.3.2 Les protéines DELLA	59
2.3.3 Dégradation des DELLA	61
2.3.4 Mécanismes d'action des DELLA	63
3 <i>La distribution des Gibbérellines</i>	65
3.1 Le métabolisme GA	67
3.1.1 Biosynthèse des GA	69
3.1.1.1 1 ^{er} phase, synthèse de l' <i>ent</i> -kaurène	69
3.1.1.2 2 ^{ème} phase, synthèse de GA ₁₂	71
3.1.1.3 3 ^{ème} phase, synthèse des formes bioactives	73
3.1.2 Catabolisme des GA	75
3.1.3 Régulation du métabolisme GA	77
3.2 Le stockage des GA	83
3.3 Le transport de GA	83
3.4 Les transporteurs	91
3.4.1 Les transporteurs d'hormones	91
3.4.2 Les transporteurs de GA	93
3.4.2.1 Les transporteurs de GA caractérisés	93
3.4.2.2 Les transporteurs de GA identifiés en systèmes hétérologues	97

3.5	Objectifs de la thèse.....	99
3.5.1	Transport local de GA.....	101
3.5.1.1	Le transport de GA lors de la germination.....	101
3.5.1.2	Le transport de GA au cours de la croissance racinaire.....	103
3.5.2	Transport longue distance de GA.....	103
Résultats		105
Chapitre 1 : Implication des GA pendant la germination de la graine, et rôle de leur transport		107
1	<i>Introduction</i>	109
1.1	Structure de la graine mature.....	111
1.1.1	Embryon.....	111
1.1.2	Téguments.....	111
1.1.2.1	Testa.....	113
1.1.2.2	Endosperme.....	113
1.2	Le processus de germination.....	115
1.2.1	Régulation hormonale de la germination.....	119
1.2.1.1	L'ABA et la dormance des graines.....	119
1.2.1.2	Les GA et la germination.....	123
1.2.2	Les contraintes mécaniques.....	127
1.3	Communication entre l'embryon et l'endosperme.....	129
1.4	Objectifs.....	131
2	<i>Résultats</i>	133
2.1	Les GA sont nécessaires pour la germination.....	133
2.1.1	Lieux de production des GA dans les graines.....	137
2.1.2	Étude du transport de GA de l'embryon vers l'endosperme.....	143
2.2	Sélection de transporteurs de GA candidats.....	147
2.3	Étude de la localisation subcellulaire de NPF4.1.....	153
2.4	Étude <i>in planta</i> de l'activité de transport de GA de NPF4.1.....	155
2.5	Influence des transporteurs de GA sélectionnés sur la capacité germinative des graines.....	155
3	<i>Discussion</i>	163
Chapitre 2 : Caractérisation de transporteurs de GA impliqués dans le développement racinaire		175

1	Introduction.....	177
1.1	Le système racinaire.....	177
1.1.1	Développement racinaire.....	177
1.1.2	Régulation par l'environnement	179
1.1.3	Régulation par les hormones	183
1.2	Les GA et le développement racinaire	185
1.2.1	Rôle des GA dans la croissance racinaire	185
1.2.2	Distribution des GA dans la racine	187
1.2.3	Le transport de GA dans les racines	187
1.3	Objectifs	191
2	Résultats.....	193
2.1	Sélection de nouveaux transporteurs de GA dans la racine	193
2.1.1	Recherche <i>in silico</i> de transporteurs candidats	193
2.1.2	Recherche Bibliographique de transporteurs candidats.....	195
2.2	Caractérisation des transporteurs NPF2.3, NPF2.4, NPF2.5 et NPF2.7	197
2.2.1	Localisation des transporteurs NPF2.3, NPF2.4, NPF2.5 et NPF2.7	197
2.2.2	Analyse de l'expression des transporteurs sélectionnés	199
2.3	Étude phénotypique des mutants <i>npf2.3</i> , <i>npf2.4</i> , <i>npf2.5</i> et <i>npf2.7</i>	201
2.4	Étude phénotypique des multiples mutants <i>npf2.3 npf2.4 npf2.5 npf2.7</i>	209
2.4.1	Obtention du quadruple mutant <i>npf2.3 npf2.4 npf2.5 npf2.7</i>	209
2.4.2	Rôle de NPF2.3, NPF2.4, NPF2.5 et NPF2.7 sur le transport local de GA.....	211
2.4.3	Rôle de NPF2.3, NPF2.4, NPF2.5 et NPF2.7 sur le transport longue-distance de GA	215
2.4.3.1	Transport acropète de GA.....	215
2.4.3.2	Transport basipète de GA	219
3	Discussion.....	223

Chapitre 3 : Recherche de transporteurs impliqués dans la translocation acropète de GA₁₂..... 235

1	Introduction.....	237
1.1	Le système vasculaire.....	237
1.2	Le transport longue-distance de gibbérellines	239
1.3	Les transporteurs impliqués dans l'acheminement de GA sur de longues distances	241
1.4	Objectifs	241

2	Résultats.....	245
2.1	Stratégie du crible génétique.....	245
2.1.1	Collection « Transporter CRISPR Library »	245
2.1.2	Lignée <i>kao1-2 kao2-3 pARSK1:KAO1-RFP</i>	247
2.2	Mise en œuvre du crible génétique et les résultats	251
3	Discussion.....	259
	Conclusion générale	269
	Matériels et Méthodes.....	279
1	Matériels.....	280
1.1	Matériel végétal.....	280
1.1.1	Mutants.....	280
1.1.2	Lignées transgéniques.....	281
1.2	Souches bactériennes	282
1.2.1	<i>Escherichia coli</i>	282
1.2.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	282
1.3	Librairie CRISPR/Cas 9	283
2	Méthodes.....	283
2.1	Techniques relatives aux plantes	283
2.1.1	Condition de culture.....	283
2.1.1.1	Culture <i>in vitro</i>	283
2.1.1.2	Culture en sol	284
2.1.1.3	Imbibition des graines sur Papier Whatman.....	284
2.1.1.4	Imbibition des graines sur milieu MS.....	285
2.1.2	Micro-greffes d' <i>Arabidopsis</i>	286
2.1.3	Analyse phénotypique.....	287
2.1.4	Transformation stable	288
2.2	Techniques relatives à l'ADN.....	289
2.2.1	Extraction d'ADN	289
2.2.2	Purification de plasmides	289
2.2.3	PCR.....	290
2.2.4	Purification de fragments PCR.....	291
2.2.5	Clonage par système Gateway	292
2.2.6	Génotypage de mutants d'insertion T-DNA.....	293

2.3	Analyse de l'expression des gènes	293
2.3.1	Extraction d'ARN	293
2.3.2	Amplification de l'ARN	294
2.3.3	Transcription inverse des ARN	294
2.3.4	PCR quantitative	295
2.4	Étude des patrons d'expression d'un gène	295
2.4.1	Analyses histochimiques GUS	295
2.4.2	Technique du « Bedding assay »	296
2.5	Microscopie confocale	296
2.6	Analyse des protéines	296
2.6.1	Extraction des protéines totales	296
2.6.2	Quantification des protéines totales.....	297
2.6.3	Séparation et détection des protéines par SDS-PAGE	297
2.7	Génération des multiples mutants	299
2.7.1	Stratégie des micro-ARN artificiels.....	299
2.7.2	Stratégie CRISPR/Cas9	300
2.8	Analyses statistiques	300
	Bibliographie.....	303
	Annexes	327

Listes des figures et tableaux

Figure 1 : Facteurs environnementaux impactant le développement des plantes	p40
Figure 2 : Phénotype représentatif de plants de riz infectés par <i>Gibberella fujikuroi</i>	p46
Figure 3 : Application d'acide gibbérellique exogène sur des plantes de maïs mutantes <i>dwarf-1</i>	p46
Figure 4 : Structure chimique d'une sélection de Gibbérellines	p48
Figure 5 : Phénotype du mutant de biosynthèse de GA, <i>ga1-3</i> , chez <i>Arabidopsis</i>	p48
Figure 6 : Phénotype du mutant semi-nain du riz, <i>semi-dwarf1</i>	p52
Figure 7 : Complexe GA-GID1-DELLA	p58
Figure 8 : Structure d'une protéine DELLA	p58
Figure 9 : Fonction des protéines DELLA	p60
Figure 10 : Patron d'expression de gènes DELLA	p60
Figure 11 : Voie de dégradation des protéines DELLA	p62
Figure 12 : Mécanismes d'action des protéines DELLA	p62
Figure 13 : Fret Bio-senseur de GA, nlsGPS1	p64
Figure 14 : Bio-senseur ratio-métrique de la signalisation GA, <i>pUBQ10::RGA^{mPFYR}</i>	p64
Figure 15 : Augmentation de l'activité de signalisation des GA en réponse au nitrate	p66
Figure 16 : Synthèse du précurseur des GA	p66
Figure 17 : Formation de l'ent-kaurène	p68
Figure 18 : Phénotype du mutant de biosynthèse de GA, <i>ga2</i> , chez <i>Arabidopsis</i>	p68
Figure 19 : Formation de la GA ₁₂ , précurseur commun à toutes les GA bioactives	p70
Figure 20 : Phénotype du mutant de biosynthèse de GA, <i>ga3</i> , chez <i>Arabidopsis</i>	p70
Figure 21 : Phénotypes des mutants <i>ga3-1</i> , <i>kao1</i> et <i>kao2</i> , chez <i>Arabidopsis</i>	p72
Figure 22 : Formation des GA bioactives	p72
Figure 23 : Phénotypes des mutants et sur-expressesurs <i>GA20ox</i> , chez <i>Arabidopsis</i>	p74
Figure 24 : Phénotype des mutants <i>ga3ox</i> , chez <i>Arabidopsis</i>	p74
Figure 25 : Voie du catabolisme des GA	p76

Figure 26 : Phénotypes des sur-expressseurs <i>GA2ox</i> , chez <i>Arabidopsis</i>	p76
Figure 27 : Patrons d'expression des gènes <i>CPS</i> , <i>KAO1</i> et <i>KAO2</i> chez <i>Arabidopsis</i>	p78
Figure 28 : Analyse du patron d'expression des <i>GA20ox</i> , chez <i>Arabidopsis</i>	p80
Figure 29 : Analyse du patron d'expression des <i>GA3ox1</i> et <i>GA3ox2</i> , chez <i>Arabidopsis</i>	p80
Figure 30 : Transport de GA non polarisé dans la tige de pois	p82
Figure 31 : Analyse phénotypique de greffons et quantification de GA dans le xylème	p84
Figure 32 : Accumulation de GA-FI dans l'endoderme des racines	p86
Figure 33 : Principe du « Ionic trap Model »	p88
Figure 34 : Gradients de concentration de GA dans la racine	p88
Figure 35 : Structure et phylogénie de la famille des 'NITRATE TRANSPORTER1/PEPTIDE TRANSPORTER FAMILY' (NPF)	p90
Figure 36 : Structure et phylogénie de la famille des ATP-Binding Cassettes (ABC)	p92
Figure 37 : Transport local d'Auxine	p94
Figure 38 : Effet des mutations <i>sweet13</i> et <i>sweet14</i> sur le développement des étamines	p94
Figure 39 : La mutation <i>npf3.1</i> altère l'accumulation de GA-FI dans l'endoderme des racines	p96
Figure 40 : La mutation <i>npf2.14</i> induit un défaut de subérisation dans les racines	p96
Figure 41 : Schéma d'une graine mature d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	p110
Figure 42 : Représentation des évènements concomitants permettant la germination des graines	p114
Figure 43 : Image représentative de la rupture des téguments d'une graine	p116
Figure 44 : Exemple de régulation de la dormance par un facteur environnemental	p120
Figure 45 : Modèle d'un des mécanismes moléculaires régulant la dormance	p120
Figure 46 : Modèle d'interaction entre l'embryon et l'endosperme	p126
Figure 47 : Processus représentatif de la germination d'une graine sauvage d' <i>Arabidopsis</i>	p132
Figure 48 : Test de germination de mutants de biosynthèse de GA	p134
Figure 49 : Patrons d'expression des gènes de biosynthèse de GA dans la graine par coloration histochimique GUS	p136

Figure 50 : Patrons d'expression des gènes de biosynthèse de GA, dans les différents tissus de la graine, par RT-qPCR	p138
Figure 51 : Cinétiques d'expression des gènes de biosynthèse de GA pendant la germination	p140
Figure 52 : Analyse histochimique GUS de l'expression <i>EXPA2</i> , induite par les GA	p142
Figure 53 : Analyse histochimique <i>EXPA2</i> -GUS dans des endospermes exposés à un « Embryo bedding assay »	p144
Figure 54 : Effet de GA ₄ et GA ₉ sur l'induction d' <i>EXPA2</i> par analyse histochimique GUS	p144
Figure 55 : Cinétique d'induction de <i>EXPA2</i> - GUS	p146
Figure 56 : Patrons d'expression de transporteurs de GA par analyse histochimique GUS	p146
Figure 57 : Patrons d'expression de transporteurs de GA dans différents tissus de la graine, par RT-qPCR	p148
Figure 58 : Cinétiques d'expression des transporteurs de GA pendant la germination	p150
Figure 59 : Analyse du surexprimeur <i>NPF4.1</i>	p152
Figure 60 : Analyse de la localisation subcellulaire de <i>NPF4.1</i>	p152
Figure 61 : Localisation tissulaire de GA ₃ -Fl dans les racines de plantules <i>35S:NPF4.1-HA</i>	p154
Figure 62 : Patron d'expression de <i>NPF4.1</i> au sein des racines	p154
Figure 63 : Capacité germinative des mutants des transporteurs NPF	p156
Figure 64 : Capacité germinative du surexprimeur <i>NPF4.1</i>	p158
Figure 65 : Capacité germinative du double mutant <i>sweet13sweet14</i>	p160
Figure 66 : Morphologie d'une racine d' <i>Arabidopsis</i>	p176
Figure 67 : Anatomie du méristème apical racinaire d' <i>Arabidopsis</i>	p176
Figure 68 : Anatomie de la racine principale d' <i>Arabidopsis</i>	p178
Figure 69 : Développement des racines latérales d' <i>Arabidopsis</i>	p180
Figure 70 : Effets des mutations <i>gai</i> et <i>rga</i> sur la croissance racinaire	p184
Figure 71 : Localisation et rôle des transporteurs de GA, <i>NPF2.12</i> et <i>NPF2.14</i> , dans la racine	p188
Figure 72 : Capacités d'import de GA des membres de la sous-famille NPF2 en systèmes hétérologues	p192
Figure 73 : Patron d'expression des NPF2 sélectionnés au sein des racines	p194

Figure 74 : Patrons d'expression (issus de la bibliographie) des NPF2 sélectionnés au sein des racines	p196
Figure 75 : Localisation subcellulaire de NPF2.3, NPF2.4, NPF2.5 et NPF2.7	p198
Figure 76 : Patrons d'expression des gènes <i>NPF2.3</i> , <i>NPF2.4</i> , <i>NPF2.5</i> et <i>NPF2.7</i> dans la racine	p198
Figure 77 : Analyse de l'expression des gènes <i>NPF2.3</i> , <i>NPF2.4</i> , <i>NPF2.5</i> et <i>NPF2.7</i> dans la racine	p200
Figure 78 : Vérification du niveau d'expression des mutants <i>npf2.4</i> , <i>npf2.5</i> et <i>npf2.7</i> dans la racine	p202
Figure 79 : Effet des mutations <i>npf2.3</i> , <i>npf2.4</i> , <i>npf2.5</i> et <i>npf2.7</i> sur le développement racinaire	p204
Figure 80 : Effet des mutations <i>npf2.3</i> , <i>npf2.4</i> , <i>npf2.5</i> et <i>npf2.7</i> sur la localisation tissulaire de GA ₃ -FI dans la racine	p206
Figure 81 : Cartographie des gènes <i>NPF2.3</i> , <i>NPF2.4</i> , <i>NPF2.5</i> et <i>NPF2.7</i> sur le chromosome 3	p208
Figure 82 : Génération et analyse de multiples mutants <i>npf2</i> par stratégie amiR	p210
Figure 83 : Effets de l'expression des amiR74 et 76 sur le développement racinaire	p212
Figure 84 : Effet de l'expression des amiR74 et 76 sur la localisation tissulaire de GA ₃ -FI dans la racine	p212
Figure 85 : Analyse morphologique des lignées amiR74 et 76	p214
Figure 86 : Effet des mutations <i>npf2.3 npf2.4 npf2.5 npf2.7</i> sur le transport acropète de GA	p216
Figure 87 : Morphologie des racines de plantules <i>ga1-3 amiR74</i> et <i>ga1-3 amiR76</i>	p218
Figure 88 : Effet des mutations <i>npf2.3 npf2.4 npf2.5 npf2.7</i> sur le transport basipète de GA	p218
Figure 89 : Anatomie du système vasculaire d'une tige d' <i>Arabidopsis</i>	p238
Figure 90 : Carte du plasmide pAGM5561	p244
Figure 91 : Présentation schématique de la lignée <i>kao1-2 kao2-1 pARSK1:KOA1-RFP</i>	p244
Figure 92 : Caractéristiques de la lignée transgénique <i>kao1-2 kao2-1 pARSK1:KOA1-RFP</i>	p246
Figure 93 : Génotypage des mutants <i>kao2-3</i> et <i>kao1-2 kao2-3</i>	p248
Figure 94 : Analyse de l'expression de <i>KAO1</i> chez 3 lignées <i>kao1-2 kao2-3 pARSK1:KOA1-RFP</i> issues du crible, sélectionnées en première génération	p250

Figure 95 : Sélection et repiquage de la première génération de transformants issus du crible	p252
Figure 96 : Phénotype de deux transformants primaires, pris pour exemple, sélectionnés lors du crible	p252
Figure 97 : Étude phénotypique des lignées c510 et c1280 sélectionnées durant le crible	p254
Figure 98 : Phylogénie de la sous-famille ATP-Binding Cassette (ABC) superfamily G (ABCG)	p256
Figure 99 : Alignement de séquences des gènes codant les transporteurs ciblés chez les lignées c510 et c1280	p258
Figure 100 : Stratégie des micro-ARN artificiels (amiRNA)	P296
Tableau 1 : Récapitulatif des transporteurs NPFs présentant des capacités d'import de GA, en systèmes hétérologues	p98
Tableau 2 : Phénotypes des transformants primaires <i>kao1-2 kao2-3 pARSK1:KOA1-RFP</i>	p250
Tableau 3 : Récapitulatif des ARN guides contenus dans les 7 lignées indépendantes retenues	p256

Listes des annexes :

Annexe 1 : Amorces utilisées pour le clonage des fusions transcriptionnelles	p326
Annexe 2 : Amorces utilisées pour le clonage des régions codantes de gènes	p327
Annexe 3 : Amorces utilisées pour les RT-qPCR	p328
Annexe 4 : Amorces utilisées pour le génotypage	p331
Annexe 5 : Amorces utilisées pour le séquençage	p333
Annexe 6 : Amorces utilisées pour obtenir les micro-ARN artificiels	p335
Annexe 7 : Cinétiques d'expression des gènes de transporteurs de GA, essais supplémentaires de la Figure 58	p336
Annexe 8 : Génotypage des mutants <i>npf2.4</i> , <i>npf2.5</i> , <i>npf2.7</i> et <i>npf4.1</i>	p337
Annexe 9 : Patron d'expression global de <i>NPF2.3</i> , <i>NPF2.4</i> , <i>NPF2.5</i> et <i>NPF2.7</i>	p338
Annexe 10 : Effet d'un traitement PAC et GA sur la croissance racinaire des mutants <i>npf2.3</i> , <i>npf2.4</i> , <i>npf2.5</i> et <i>npf2.7</i> , essais supplémentaires de la Figure 79	p339
Annexe 11 : Effet du nitrate et GA sur la croissance racinaire des mutants <i>npf2.3</i> , <i>npf2.4</i> , <i>npf2.5</i> et <i>npf2.7</i> , essais supplémentaires de la Figure 79	p340

Abréviations :

ABA : Acide abscissique

ABCG : ATP-binding cassette (ABC)-superfamily G

ABI : ABSCISIC ACID INSENSITIVE

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNc : Acide Désoxyribonucléique Complémentaire

AHG1 : ABA Hypersensitive Germination 1

Ala : Alanine

amiR : artificial micro-RNA

ARN : Acide Ribonucléique

ARSK1 : Arabidopsis Root-Specific Kinase 1

Asp : Aspartate

BET : Bromure d'éthidium

BP : BP clonase II

BR : Brassinostéroïdes

BSA : Albumine de Sérum Bovin

Cas9 : Associated protein 9

CHL1 : Chlorina 1

CK : Cytokinine

cm : centimètre

Col 0 : Columbia 0

CPP : *ent*-copalyl diphosphate

CPS : *ent*-copalyl diphosphate synthase

CQ : Centre quiescent

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

Ct : Cycle Threshold

CWRE : CELL-WALL REMODELING ENZYME

CYP707A : CYTOCHROME P450 707A

DELLA : Protéine DELLA

DIP : DELLA-interacting protein

DMAPP : Diméthylallyl-pyrophosphate

dNTP : mélange des 4 désoxyribonucléotide triphosphate

DOG 1 : DELAY-OF-GERMINATION-1

DTT : Dithiothréitol

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique

ET : Ethylène

EUI1 : ELONGATED UPPERMOSTINTERNODE 1

EXPA2 : EXPANSINE 2

FRET : Förster Resonance Energy Transfer

FT : Facteur de transcription

g : gramme

GA : Gibbérelline

GA2ox : GA2-oxydase

GA3ox : GA3-oxydase

GA20ox : GA20-oxydase

GAI : GA-INSENSITIVE

GA-FL : GA-fluorescéine

GAMT1 : Gibbérelline Méthyltransferas 1

GAMyb : GA-regulated Myb

GFP : Green Fluorescent Protein

GGDP : Géranyl-géranyl diphosphate

GID1 : GA INSENSITIVE DWARF 1

GID2 : GA INSENSITIVE DWARF 2

Glu : Glutamine

GRAS : GA INSENSITIVE REPRESSOR OG
GAI1-3, SCARECROW

GUS : beta-Glucoronidase

h : heure

hai : heure après imbibition

HB5 : HOMEBOX PROTEIN 5

IAA : Acide indole-3-actique

IPP: Isopentényl diphosphate

JA : Acide jasmonique

KAO : *ent*-kaurénoïque oxydase

KO : *ent*-kaurène oxydase

KS : *ent*-kaurène synthase

l : Litre

LB : Lysogeny Broth

Ler : Landsberg *erecta*

Leu : Leucine

LHR1 : Leucine heptad repeat 1

M : Mole/Litre

MEP : Méthylérythritol phosphate

mg : milligramme

min : Minute

miR : micro-RNA

ml : Millilitre

ML1 : MERISTEM LAYER 1

mm : millimètre

mM : Millimole/Litre

MS : Murashige-Skoog

N : Azote

NASC : Nottingham Arabidopsis Stock center

NCDE : 9-*cis* epoxy-caroténoïde dioxygénase

NH₃ : Ammoniaque

NH₄ : Ammonium

ng : nanogramme

NLS : Localisation nucléaire

nm : nanomètre

NPF : Nitrate transporter1/peptide transporter family

OE : Overexpression

oligoDT : acide oligodesoxythymidylique

p : p-valeur

PAC : Paclubutrazol

PAGE : Polyacrylamide Gel Electrophoresis

PAT : Polar auxine transport

pb : Paire de Bases

PCR : Réaction de polymérase en chaîne

pH : Potentiel Hydrogène

PIF : PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS

PIN : Pin-formed

pK_a : Constante d'acidité K_a

p/v : Poids pour volume

PVP : Polyvinylpyrrolidone

P450 : Cytochrome p450 mono-oxygénase

qPCR : PCR quantitative

qsp : Quantité suffisante pour

RFP : Red fluorescent Protein

RGA : REPRESSOR OF ga1-3

RGL1 : RGA-LIKE 1

RGL2 : RGA-LIKE 2

Rpm : rotation par minute

RT : Reverse Transcriptase

RT-PCR : Reverse Transcriptase PCR

s : seconde

SA : Acide salicylique

SCF : SPK1-Cullin-F-box

s.d. : Erreur standard

sd1 : semi-dwarf 1

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

Ser : Sérine

sgRNA : ARN guide

SL : Strigolactone

SLY1 : SLEEPY

SNE : SNEEZY

SOM : SOMNUS

SWEET : Sweet family

Taq : Thermus aquaticus

TBS : Tris-Buffered Saline

T-DNA : ADN de transfert

Thr : Thréonine

Tm : Température de fusion

TM : transmembranaire

TPS : Terpène synthase

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

UHPLC-SIM : Ultra High Performance
Liquide Chromatography – Single Ion
monitoring

UV : Rayonnement Ultra Violet

V : Volts

Val : Valine

v/v : volume pour volume

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

2-ODD : Dioxygénase 2-oxoglutarate-
dépendante

10 X : Grossissement 10 fois

20 X : Grossissement 20 fois

% : Pourcent

μFahrad : micro-Fahrad

μL : Micro-Litre

μm : micro-mètre

μM : Micro-Mole

°C : Degré Celsius

Introduction Générale

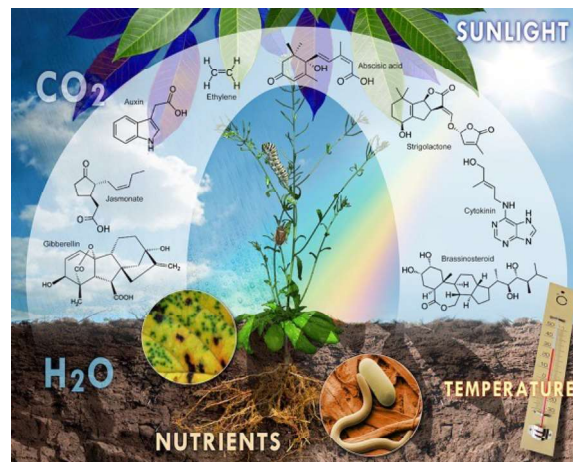


Figure 1 : Facteurs environnementaux impactant le développement des plantes

Liste non-exhaustive de facteurs biotiques et abiotiques ayant une influence sur la croissance et le développement des plantes. Plusieurs phytohormones aidant à l'intégration des différents signaux environnementaux sont représentées, incluant les Gibbérellines (molécule à gauche de l'image).

(Vert et Chory, 2011)

1 Préambule

Les plantes, du fait de leur vie sessile, s'adaptent continuellement aux différentes exigences de leur environnement. Cette adaptation à la fois physiologique et architecturale, s'opère grâce à une fine perception des différents facteurs abiotiques, tels que la qualité de la lumière, la disponibilité en eau ou encore les variations de températures ; mais aussi, par la perception de facteurs biotiques comme les attaques de différents pathogènes. Ces facteurs extérieurs sont intégrés au programme génétique intrinsèque des plantes pour leur permettre d'ajuster et d'optimiser leur croissance et aussi leur développement, conduisant ainsi, à une survie de l'individu et de l'espèce (Figure 1). L'intégration de ces différents signaux environnementaux se réalise par l'intermédiaire des molécules de signalisation telles que des peptides, des sucres ou encore des phytohormones.

Les phytohormones n'ont pas comme seul rôle l'intégration des signaux extérieurs, elles modulent aussi les réponses associées des plantes, ainsi que l'ajustement de leur développement. Ce sont de petites molécules, qui s'accumulent à de faibles concentrations, pouvant agir soit à proximité de leur site de production, soit pouvant être transportées, afin d'agir sur des tissus ou des organes plus ou moins éloignés. Leurs actions nécessitent l'interaction avec un récepteur, pour activer ensuite une cascade de signalisation nécessaire à la mise en place d'une réponse physiologique.

A ce jour, de nombreuses phytohormones ont été découvertes, caractérisées et leur implication dans l'adaptation des plantes a été étudiée. Vous retrouverez ci-dessous une liste succincte et non exhaustive, des différentes phytohormones existantes, illustrant leur grande diversité de fonction chez les plantes :

Les Auxines dont l'Acide Indole-3-acétique (IAA) sont des phytohormones considérées comme essentielles pour énormément de processus développementaux tels que l'élongation, la division et la différenciation des cellules, ainsi que pour la régulation de la croissance (Abel et Theologis, 1996). Indispensable au développement des parties aériennes, pouvant installer

une dominance apicale, l'auxine facilite aussi l'initiation de racines latérales et adventives. En outre, l'action de l'auxine permet de comprendre le tropisme (élongation différentielle des cellules dans un organe, sous l'effet d'un gradient d'auxine). Elle fait partie des hormones les plus étudiées et pour lesquelles nous possédons beaucoup d'informations (Li et al., 2023; Morffy et Strader, 2022).

L'acide jasmonique (JA) joue un rôle à la fois au niveau du développement des plantes en agissant sur l'élongation racinaire, la fertilité et le développement des fruits, la formation de trichomes ou encore dans l'adaptation des plantes (Wasternack et Hause, 2013) à la fois dans leur résistance à des attaques de pathogènes nécrotrophes ou d'herbivores (Reymond et Farmer, 1998);

Les cytokinines (CK) initialement découvertes grâce aux galles causées par *Agrobacterium tumefaciens*, sont impliquées dans de nombreux procédés tels que le maintien du méristème apical caulinaire, la levée de la dominance apicale (facilitent le développement des ramifications axillaires), le retard de la sénescence des feuilles ou encore la nodulation au niveau des racines (Werner et Schmölling, 2009) ;

L'éthylène (ET) est une petite molécule volatile (se retrouve à l'état gazeux), qui diffuse facilement, à la fois impliqué dans le développement des plantes comme par exemple en régulant la croissance de la plantule, la sénescence des organes et la maturation des fruits, mais aussi, dans la réponse aux stress environnementaux (Schaller et Kieber, 2002);

L'acide abscissique (ABA) est impliqué entre autre, dans l'initiation et le maintien de la dormance des graines et les réponses aux stress environnementaux qui incluent la tolérance à la dessiccation (contribution à la fermeture des stomates), tolérance à la salinité du sol, au froid et au gel (Sreenivasulu et al., 2012) ;

Les brassinostéroïdes (BR) sont une classe de stérol qui ont été découverts en premier lieu dans le pollen de *Brassica napus L.* (Mitchell et al., 1970). Ils sont importants pour l'élongation et la division cellulaire, la différenciation vasculaire et la tolérance aux pathogènes (Symons et Reid, 2004) ;

Les strigolactones (SL) sont une classe dérivée des caroténoïdes découverts dans des exsudats racinaires de plantes hôtes qui avaient la capacité de stimuler la germination de la plante parasite *Striga lutea* (Cook et al., 1966). Les SL adaptent l'architecture des plantes en

fonction de la disponibilité en nutriments (Kohlen et al., 2011), également par inhibition des ramifications axillaires et facilitation des symbioses mycorhiziennes (Parniske, 2008; Brewer et al., 2013).

L'acide salicylique (SA) est un composé phénolique qui joue un rôle important dans la défense des plantes face aux attaques de pathogènes essentiellement biotrophes ou ravageurs piqueurs (Dempsey et al., 1999).

Il a été démontré que certaines hormones peuvent avoir des rôles redondants et agir par synergie, ou au contraire, jouer des rôles antagonistes. Les interactions entre les différentes voies hormonales forment un réseau complexe qui peut moduler de multiples aspects, tels que leur synthèse, leur catabolisme, leur transport, et ainsi, modifier leur accumulation et leur distribution respective.

Pendant ma thèse, je me suis focalisée sur les gibbérellines (GA), une phytohormone de croissance impliquée dans la régulation de nombreux processus développementaux allant de la germination à la maturation du fruit.

2 Les gibbérellines

Les phytohormones GA sont des métabolites primaires présents dans divers règnes du monde vivant, notamment chez les plantes, quelques bactéries et champignons. Une évolution graduelle de leur diversité, biosynthèse et de leur voie de signalisation est observable des bactéries jusqu'aux plantes supérieures. Actuellement, 137 formes ont été identifiées, et nommées gibbérellines A_x ou GA_x , le x correspondant au nombre attribué selon l'ordre de leur découverte respective.

Les bactéries présentent une évolution distincte des autres règnes, même si elles partagent des intermédiaires semblables à ceux présents chez les plantes ; elles utilisent des enzymes qui ne montrent pas ou peu d'homologie avec leurs homologues fonctionnels chez les plantes et les champignons (Nett et al., 2017). Contrairement aux plantes, les GA n'agissent pas sur la croissance et le développement des bactéries, cependant, elles semblent jouer un



Figure 2 : Phénotype représentatif de plants de riz infectés par *Gibberella fujikuroi*

Les plantes infectées par le champignon *Gibberella* ont un phénotype caractéristique comprenant un allongement excessif des entre-nœuds et un jaunissement des feuilles. Ce phénotype est très prononcé sur la plante infectée (à gauche), quand on la compare avec une plante saine (à droite).

(International Rice Research Institute, IRRI)



Figure 3 : Application d'acide gibbérellique exogène sur des plantes de maïs mutantes *dwarf-1*.

L'acide gibbérellique appliqué de façon exogène permet de stimuler la croissance des plantes sauvages de maïs, au centre gauche. L'application de ce même acide gibbérellique sur des plantes mutantes *dwarf-1* provoque une restauration de la croissance de ce mutant, à droite.

(Phinney, 1957)

rôle dans la formation de nodule et la symbiose, en agissant comme facteur de virulence (Navarro et al., 2008).

Les GA ont été initialement découvertes chez un champignon phytopathogène *Gibberella fujikuroi*, au cours du 19^{ème} siècle, au Japon, à la suite de l'étude de la maladie du riz « bakanae ». Cette maladie provoque chez le riz infecté, des elongations excessives des entre-nœuds et une perte de rendement en grain (Hori, 1898)(Figure 2). Suite à sa découverte, des études approfondies ont permis de caractériser la voie de biosynthèse conduisant à la formation des GA, dont la forme bioactive chez le champignon correspond à la GA₃ (Tudzynski, 2005).

Des recherches ont été effectuées sur plusieurs embranchements du règne végétal. Les algues présentent entre 18 et 20 formes de GA différentes qui sont détectables dans plusieurs familles distinctes. Deux formes prédominantes ont été caractérisées, l'intermédiaire GA₁₅ et la forme active GA₆, cette prédominance n'est pas conservée dans les autres embranchements du règne (Stirk et al., 2013).

C'est à partir des mousses que l'on commence à observer des gènes orthologues à ceux des plantes supérieures, codant pour les enzymes de biosynthèse des GA, mais aussi, pour des composants de la voie de signalisation (Hayashi et al., 2010). Les études ont montré que les GA pouvaient induire des réponses physiologiques chez les mousses, comme chez *Physcomitrella patens*, dont la GA₃ affecte le gravitoprisme (Vandenbussche et al., 2007), ainsi qu'au niveau de précurseurs de GA impliqués dans la germination des spores (Anterola et al., 2009).

C'est chez les plantes supérieures que la majorité des études sur les GA a été réalisée, du fait de l'importance du rôle des GA sur le développement et la croissance des plantes, tout au long de leur cycle de vie. De plus, leurs études ont rapidement montré un intérêt agronomique, du fait de l'utilisation de variétés impactées dans la biosynthèse ou dans la signalisation des GA, qui ont permis l'obtention de plantes semi-naines et résistantes à la verse. Ces plantes présentent une croissance restreinte malgré l'apport d'engrais et un rendement accru en grain, lié à une redistribution des réserves de composés carbonés issus de la photosynthèse, encore non expliquée à ce jour (Figure 3). Ces découvertes

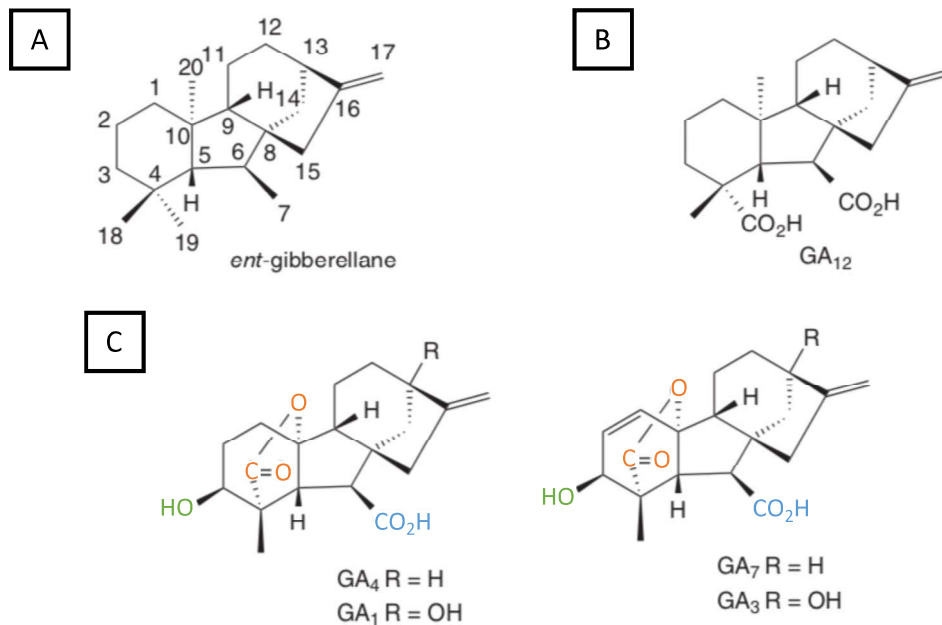


Figure 4 : Structure chimique d'une sélection de Gibbérellines

- A. L'*ent-gibbérellane* est formé du squelette de base de toutes les GA. Au squelette a été ajouté la numérotation des carbones.
- B. Structure chimique du précurseur commun de toutes les GA bioactives, la GA_{12} .
- C. Structures chimiques des formes bioactives de GA. Les formes actives possèdent 3 éléments chimiques permettant leur forte affinité avec leur récepteur.
- Un groupe hydroxyle en position C3 (en vert)
 - Un groupe carboxyle en position C6 (en bleu)
 - Un groupe lactone sur les carbones 4 et 10 (en orange)

(Adapté de Sponsel, 2016. Edité par Hedden P.)

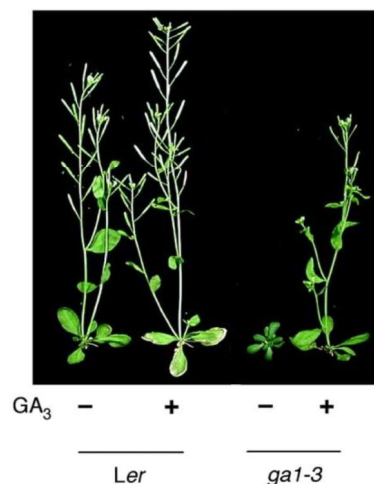


Figure 5 : Phénotype du mutant de biosynthèse de GA, *ga1-3*, chez *Arabidopsis*

Analyse phénotypique de plantes d'*Arabidopsis* âgées de 36 jours. Chaque génotype, sauvage (écotype Landsberg *erecta*, *Ler*) ou mutant *ga1-3* incapable de synthétiser des GA bioactives, a été traité (+) ou non (-) avec des GA_3 exogènes.

(Adapté de Dill et Sun, 2001)

agronomiques ont joué un rôle déterminant dans la 'révolution verte' ayant eu lieu pendant les années 1960.

2.1 Structure chimique et généralités

Les GA forment une large famille d'acides carboxyliques diterpénoïdes tétracycliques. Dans l'ensemble les GA sont formées d'un squelette commun basé sur l'*ent*-gibbéréllane, molécule composée de 19 ou 20 atomes de carbone (Figure 4). Seules quelques formes de GA présentent une activité biologique (aussi dites bioactives), telles que la GA₁, GA₃, GA₄ ou la GA₇ (Figure 4). Les autres formes découvertes sont soit des précurseurs des formes actives, soit des catabolites inactifs de la voie de biosynthèse. Les formes bioactives présentent une structure chimique commune, nécessaire pour se lier au récepteur GID1 (GA INSENSITIVE DWARF 1) et initier la cascade de signalisation permettant la mise en place d'une réponse biologique. Ces formes actives possèdent une grande affinité avec leur(s) récepteur(s) grâce à trois modifications : un groupe hydroxyle en position C3-β, un groupe carboxyle positionné sur le carbone 6 et une lactone sur les carbones 4 et 10 (Yamaguchi, 2008). Cependant, de légères différences structurales entre ces différentes formes bioactives modifient leur stabilité. La GA₃, forme prédominante chez les champignons, est insensible au mécanisme principal d'inactivation des GA, mis en place chez les plantes. Ainsi, les plantes traitées avec de la GA₃ exogène, ne sont pas capables de l'inactiver, cela entraînera une croissance excessive des entre-nœuds (Hedden, 2020). Dans le cas des plantes supérieures, les formes actives majoritaires correspondent à la GA₁ et la GA₄.

Une plante n'ayant pas la capacité de produire des GA, ou GA déficiente, présente un phénotype caractéristique avec : un nanisme sévère, une rosette compacte, des feuilles vert-foncées, des pétales et des étamines peu développées, ce qui provoque une baisse de fertilité et la production de graines avec une faible capacité de germination (Koornneef et van der Veen, 1980) (Figure 5). Il est possible de restaurer la capacité des mutants de biosynthèse de GA, à se développer et à germer, avec un traitement de GA exogènes.

2.2 Rôles des GA dans le développement des plantes

Des études ont déjà permis d'établir au niveau cellulaire, que les GA agissent selon deux mécanismes : la division et l'élongation cellulaire (Achard et al., 2009). De plus, l'action des GA s'étend également au niveau des tissus et des organes, pour moduler plusieurs étapes de transition du développement des plantes, tant dans la phase de croissance végétative que pendant la phase reproductive.

2.2.1 Phase végétative

La germination, première transition de la vie d'une plante (dormance/phase latente versus phase active), est contrôlée majoritairement par deux phytohormones aux effets antagonistes; l'ABA qui promeut et maintient la dormance de la graine et les GA qui vont stimuler l'initiation de la germination (Debeaujon et Koornneef, 2000). Une activation combinée du catabolisme de l'ABA et de la biosynthèse de GA est requise pour l'initiation du processus de germination. Un mutant de biosynthèse de GA, tel que le mutant *ga1-3*, se trouve dans l'incapacité de germer sans un apport exogène de GA bioactives (Debeaujon et Koornneef, 2000). L'implication des GA dans le processus de germination sera traitée plus en détail dans le chapitre 1 : Implication des GA pendant la germination, et rôle de leur transport.

Une fois le processus de germination achevé, l'hypocotyle de la plantule va s'allonger. Cette élongation est régie par un facteur principal extérieur, la qualité et quantité de lumière, comme par des facteurs internes qui incluent une action synergique de trois phytohormones les BR, l'IAA et les GA (Liu et al., 2018). A l'obscurité, une plantule qui se développe, présente un phénotype dit de skotomorphogénèse. Ce phénotype se compose d'un hypocotyle très allongé, surmonté d'un crochet apical, et à contrario, montre un développement inhibé des cotylédons, des méristèmes apicaux caulinaires et des racines. Sous l'action de lumière, une plantule se développe et subit le phénomène de dé-étiolation et révèle un phénotype dit de photomorphogénèse. Ce phénotype se caractérise par un déploiement des cotylédons, une



Figure 6 : Phénotype du mutant semi-nain du riz, *semi-dwarf1*

A gauche, le mutant *sd1*, muté pour l'enzyme GA20ox1.

A droite, une plante sauvage d'écotype équivalent.

(Adapté de Hedden, 2003)

genèse des chloroplastes et l'activation des gènes de la photosynthèse, ainsi qu'un développement racinaire conséquent (von Arnim et Deng, 1996). Afin d'activer l'élongation cellulaire, les GA vont s'opposer à l'action de protéines régulatrices réprimant l'expansion cellulaire (Chaiwanon et al., 2016). Ainsi, une plante déficiente en GA a un hypocotyle court, alors qu'inversement, une plante mutée pour la signalisation des GA (mutant perte de fonction des répresseurs de GA), contient des cellules plus allongées au niveau de l'hypocotyle, par rapport à une plante contrôle (Ben-Targem et al., 2021).

La croissance primaire de la racine s'effectue au niveau des méristèmes (apicaux) racinaires, amas de cellules indifférenciées, où des cellules prolifèrent et se différencient après plusieurs divisions. Les GA stimulent l'induction des divisions et de l'élongation cellulaire. Aussi, un mutant de biosynthèse de GA montre une forte réduction du nombre de cellules en division dans le méristème, phénotype restauré suite à un traitement par GA exogènes (Achard et al., 2009). Le développement racinaire sera davantage détaillé dans le chapitre 2 : Caractérisation de nouveaux transporteurs de GA impliqués dans le développement racinaire.

La croissance en hauteur des jeunes plantes modulée par les GA, résulte de l'activité de divisions au niveau des apices caulinaires et de la croissance des entre-nœuds. Pour ce faire, elles stimulent l'élongation cellulaire dans les entre-nœuds, de même que la prolifération cellulaire au niveau des méristèmes apicaux caulinaires, chez les dicotylédones, et monocotylédones, ainsi que des méristèmes intercalaires, chez ces dernières (Davière et al., 2014). L'adaptation de la hauteur des plantes en fonction de l'environnement où elles évoluent demeure essentielle pour leur survie et leur bon développement ; caractéristique importante au niveau agronomique. Les mutants déficients en GA montrent des défauts de croissance en hauteur plus ou moins sévères. Ainsi, le mutant *ga1-3* se caractérise par un fort nanisme alors que le mutant *semi-dwarf1 (sd1)* chez le riz montre un phénotype semi-nain (Monna, 2002)(Figure 6).

Le développement des plantes ne s'arrête pas à leur hauteur finale, mais comprend aussi la modulation de l'architecture de leur partie aérienne, passant par la formation de branches secondaires. Durant leur croissance, les plantes forment des bourgeons axillaires au niveau des nœuds, à la base des feuilles caulines. Ces bourgeons vont rester dormants, ou pouvoir générer des ramifications/branches secondaires (Wang et Jiao, 2018). Plusieurs phytohormones sont impliquées dans l'initiation de la formation des bourgeons, ainsi que de

leur débourrement, c'est le cas de l'Auxine, des CK, des SL, des BR et des GA (Chatfield et al., 2000). Certains mutants de signalisation des GA montrent une forte réduction du nombre de bourgeons axillaires formés à la base de leur feuille. De plus, on peut noter qu'un traitement par GA exogène inhibe la formation de ces bourgeons axillaires (Zhang et al., 2020).

2.2.2 Phase reproductive

Quand les plantes entrent dans la phase reproductive de leur cycle de vie, l'ensemble des méristèmes présents au niveau aérien (méristème apical caulinaire et méristèmes axillaires) se convertissent en méristèmes inflorescentiels et mettent en place des fleurs. Cette étape, plus communément appelée transition florale est orchestrée par de multiples facteurs à la fois environnementaux et internes. Les GA jouent un rôle prépondérant dans cette transition florale. Plusieurs mutants de biosynthèse et de signalisation des GA montrent une altération du processus de floraison. Certains mutants de biosynthèse tels que le mutant *ga1-3* sont incapables de fleurir, un traitement avec des GA bioactives exogènes est nécessaire, afin de restaurer leur floraison (Wilson et al., 1992).

Le développement du fruit comprend son initiation, sa croissance et sa maturation. Ces trois étapes sont contrôlées par différentes phytohormones, dont les GA. Une action combinée de l'auxine et des GA est requise à la formation du fruit. L'auxine est produite dans les ovules fertilisées et transportée dans le péricarpe, où elle stimule la synthèse de GA ; les GA nouvellement synthétisées vont stimuler la croissance du fruit en formation (McAtee et al., 2013). L'auxine et les GA vont continuellement agir en synergie durant la croissance du fruit, afin d'activer la division cellulaire et l'élongation des cellules (Csukasi et al., 2011).

2.3 Voie de signalisation des GA

Grâce à de nombreuses études réalisées ces dernières années, nous possédons une connaissance assez approfondie de la voie de signalisation des GA, ainsi que des éléments qui

la composent. Ces différentes études ont démontré que les GA stimulent le développement et la croissance des plantes en déstabilisant des répresseurs de croissance, nommés protéines DELLA (Davière et Achard, 2013; Harberd, 2003). La voie de signalisation des GA diffère d'un règne à l'autre, mais aussi d'une espèce à une autre. Chez le riz par exemple, plusieurs composants de la voie de signalisation sont codés par des gènes uniques, alors qu'à contrario, chez *Arabidopsis*, plusieurs gènes peuvent coder pour un même élément créant de possibles redondances fonctionnelles (Dill et al., 2004).

2.3.1 Perception des GA

Les formes bioactives de GA peuvent être reconnues par le récepteur GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 (GID1), protéine soluble, découverte tout d'abord chez le riz (Ueguchi-Tanaka et al., 2005), puis par la suite, chez *Arabidopsis* (Nakajima et al., 2006). Les mutants *gid1* montrent un phénotype semblable à celui d'un mutant de biosynthèse de GA, mais à l'inverse de celui-ci, un traitement par GA exogènes ne permet pas de restaurer un phénotype de type sauvage (mutants insensibles aux GA bioactives) (Ueguchi-Tanaka et al., 2005). Chez *Arabidopsis*, trois gènes orthologues codent pour le récepteur GID1, nommés *GID1a*, *GID1b* et *GID1c* (Nakajima et al., 2006). Ces trois récepteurs présentent des patrons d'expressions proches, suggérant une possible redondance fonctionnelle ; cependant des différences de niveau d'expression laissent à penser qu'une certaine spécificité des récepteurs existe. Une étude a mis en évidence que *GID1a* est le récepteur le plus fortement exprimé dans tous les tissus confondus, à l'exception des racines et que *GID1c*, à l'inverse, est celui le moins exprimés dans les tissus (Griffiths et al., 2007). La redondance fonctionnelle existant entre ces récepteurs s'illustre par une stratégie de génétique classique. Les simples mutants *gid1* ne présentent aucune altération visible de leur phénotype, alors que le triple mutant *gid1a gid1b gid1c* montre un nanisme fortement marqué (Griffiths et al., 2007)

Des études de cristallographie ont montré que le récepteur GID1 se compose de deux structures essentielles, la première est une poche où se loge les GA bioactives et la seconde une extension N-terminale (Murase et al., 2008). Une fois molécule de GA bioactive fixée au

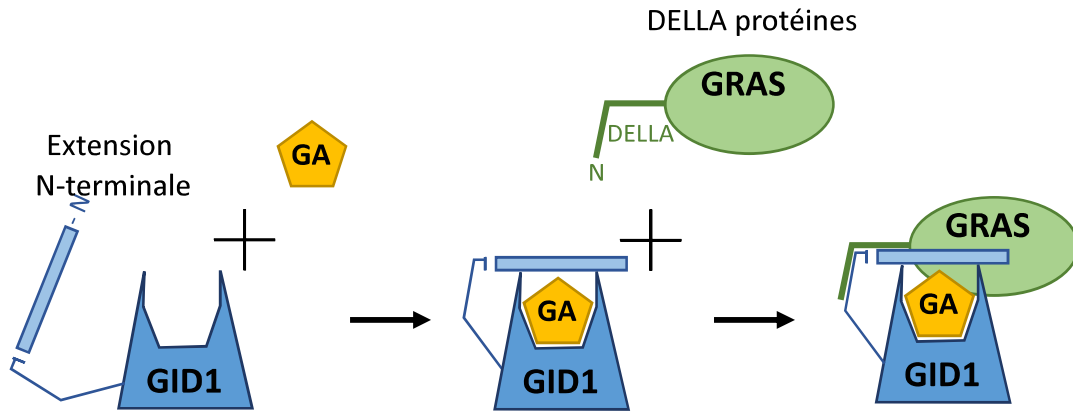


Figure 7 : Complexe GA-GID1-DELLA

La reconnaissance entre une molécule de GA bioactive et son récepteur GID1 provoque un changement conformationnel du récepteur au niveau l'extrémité N-terminale. Ainsi, l'extrémité N-terminale pourra interagir avec une protéine DELLA.

(inspiré de Murase et al., 2008)

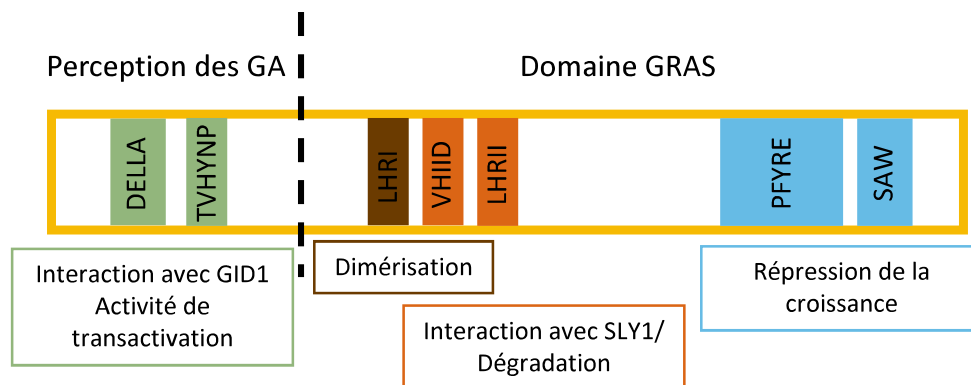


Figure 8 : Structure d'une protéine DELLA

Les protéines DELLA sont composées de deux structures principales :

- La structure de perception des GA en N-terminale comprenant deux motifs: DELLA et TVHYNP.
- La structure du domaine GRAS en C-terminale comprenant plusieurs motifs: LHRI, VHIID, LHRII, PFYRE, SAW

(Inspiré de Davière et Achard, 2016)

niveau de la poche du récepteur, un changement de conformation s'opère au niveau de l'extrémité N-terminale du récepteur, qui referme la poche de fixation. Ce changement conformationnel permet l'interaction entre GID1 et une protéine DELLA, afin de former un nouveau complexe nommé GA-GID1-DELLA (Figure 7)(Ueguchi-Tanaka et al., 2007; Davière et Achard, 2013).

2.3.2 Les protéines DELLA

Les DELLA sont des protéines nucléaires faisant partie de la famille des protéines GRAS (GA INSENSITIVE REPRESSOR OF GAI1-3, SCARECROW), décrite pour être des régulateurs transcriptionnels (Pysh et al., 1999). Chez *Arabidopsis* 5 protéines DELLA ont été identifiées: GA-INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR OF *ga1-3* (RGA), RGA-LIKE 1 (RGL1), RGL2 et RGL3 (Davière et Achard, 2016; Silverstone et al., 1997b; Peng et al., 1997). Les protéines DELLA sont composées de deux domaines, un domaine de perception des GA, positionné à l'extrémité N-terminale et d'un domaine GRAS à l'extrémité C-terminale, impliqué dans les interactions protéine-protéine (Figure 8)(Davière et Achard, 2013)

Ces protéines, en comparaison des autres protéines de la famille GRAS, ont la particularité de posséder une extension N-terminale comprenant trois motifs : le motif DELLA (avec une séquence d'acides aminés conservés Asp-Glu-Leu-Leu-Ala) et le motif VHYNP, impliqués dans l'interaction entre GID1 et la protéine DELLA ; et un motif polymérique (Ser-Thr-Val) capable d'être phosphorylé ou glycosylé, afin de moduler l'activité des DELLA (Figure 8) (Murase et al., 2008; Shimada et al., 2008).

Le domaine GRAS en C-terminal des protéines, quant à lui, comprend deux motifs leucine heptad repeat (LHR1 et LHR2), nécessaires à l'interaction protéine-protéine ; un signal de localisation nucléaire (NLS) et des motifs VHIID, PFYRE et SAW, qui contrôlent l'interaction entre les protéines DELLA et à la fois avec GID1 et des protéines F-box (Figure 8)(Bolte, 2004).

Des mutations dans ces domaines ont permis de mettre en évidence leur importance. Une délétion dans le domaine DELLA rend les protéines non-dégradables (aussi dites,

insensibles aux GA, mutation gain de fonction), ce qui conduit à un nanisme de la plante. Une mutation dans le domaine GRAS des protéines DELLA supprime l'activité des protéines (mutation perte de fonction) ; il a été montré que dans le fond génétique du mutant de biosynthèse *ga1-3*, cette dernière mutation permet de restaurer un phénotype sauvage à la plante (Silverstone et al., 1997b). De même, une approche de génétique a révélé que les protéines DELLA agissent comme répresseurs de la voie de signalisation des GA. Le mutant de biosynthèse *ga1-3*, harborant un fort nanisme, peut voir sa croissance restaurée progressivement, quand les 5 gènes codant pour les DELLA sont séquentiellement mutés (Figure 9) (Silverstone et al., 1997b).

Bien que proche en terme de séquence et de redondance fonctionnelle, les protéines DELLA montrent des spécificités dues aux patrons d'expression de leurs gènes et en conséquence, à leur accumulation dans les différents tissus et organes des plantes (Figure 10)(Lee et al., 2002). Les protéines RGA et GAI régulent la croissance de la plante et le développement floral, elles sont donc accumulées dans l'ensemble des feuilles, entre-nœuds, inflorescences et racines (Cheng et al., 2004; Lee et al., 2002). Les protéines RGL1 et RGL2 sont des régulateurs du développement floral (Cheng et al., 2004). RGL2 régule aussi la germination des graines (Lee et al., 2002). Enfin, la protéine RGL3 s'accumule en réponse aux stress biotiques et abiotiques et est impliquée dans la résistance aux stress (Achard et al., 2008; Wild et al., 2012).

2.3.3 Dégradation des DELLA

A la suite de la formation du complexe GA-GID1-DELLA un changement conformationnel s'opère au niveau du domaine GRAS des protéines DELLA. Ce changement a pour conséquence d'augmenter l'affinité des protéines DELLA avec les sous-unités du complexe E3-ubiquitine ligase SPK1-Cullin-F-box (SCF), (Figure 11)(Hirano et al., 2010). Le complexe SCF ainsi recruté par cette augmentation d'affinité, se lie alors aux motifs VHIID et LHRIL de la protéine DELLA grâce au domaine C-terminal de la DELLA et d'une protéine F-box du complexe. Grâce à un crible génétique, il a été possible d'identifier les F-box interagissant spécifiquement avec les protéines DELLA, chez *Arabidopsis*, ce sont les F-box SLEEPY(SLY1) et

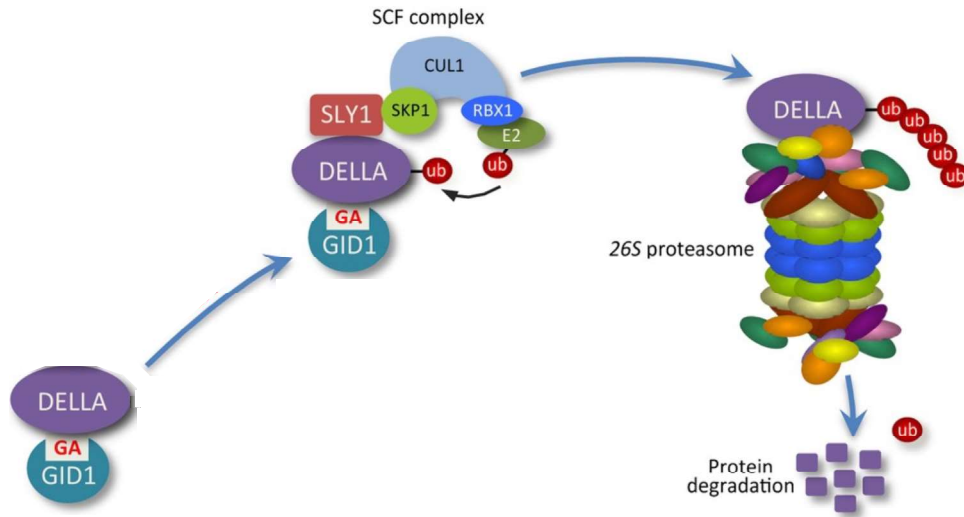


Figure 11 : Voie de dégradation des protéines DELLA

Une fois le complexe GA-GID1-DELLA formé, la protéine DELLA interagit avec le complexe SCF^{GID2/SLY1}, qui conduit à une polyubiquitination de la protéine DELLA. Le protéasome 26S, en mesure de reconnaître la polyubiquitination, dégrade la protéine DELLA.

Sleepy 1 : SLY ; SKP1 : S-phase kinase-associated protein 1; cullin 1 : CUL1; ring-box : RBX1 ; ubiquitin-conjugating enzyme : E2; ubiquitine : Ub.

(Adaptée de Davière et Achard., 2016)

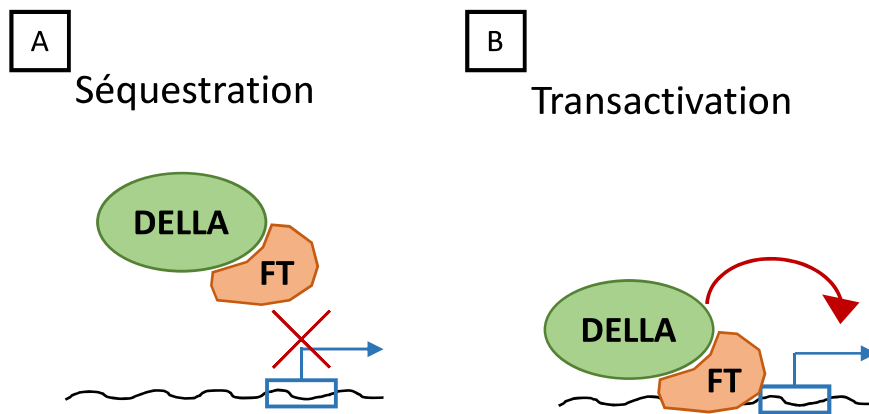


Figure 12 : Mécanismes d'action des protéines DELLA

- Mécanisme de séquestration, impliquant que les protéines DELLA par inhibition des facteurs de transcription ou des protéines régulatrices, les empêchant de se lier aux promoteurs des gènes cibles.
- Mécanismes de transactivation, nécessitant que les protéines DELLA se lient avec des facteurs de transcription, qui vont interagir avec le promoteur de gènes cibles, ainsi les DELLA induiront en *trans* l'expression des gènes cibles.

(Inspiré de Davière et Achard., 2016)

SNEEZY (SNE) et chez le riz la F-box GA INSENSITIVE DWARF 2 (GID2). L'interaction entre les complexes SCF et GA-GID1-DELLA, via les protéines F-box, est suivie d'une poly-ubiquitylation des protéines DELLA (ajout de 4 ubiquitines). Ces ubiquitines forment un signal de dégradation, reconnu par le protéasome 26S, qui conduit à la dégradation des protéines DELLA (Figure 11).

2.3.4 Mécanismes d'action des DELLA

Les DELLA sont des protéines nucléaires qui agissent comme régulateurs transcriptionnels, influençant ainsi, l'expression de nombreux gènes cibles (Zentella et al., 2007). Ces protéines n'ayant pas de domaine de liaison à l'ADN, ne peuvent pas directement agir sur leurs gènes cibles. Elles utilisent comme intermédiaires différents facteurs et régulateurs de transcription, nommés communément « DELLA-interacting Proteins (DIP) ». Nous connaissons actuellement deux différents modes d'actions permettant aux protéines DELLA de moduler l'expression de leurs gènes cibles : la séquestration et la transactivation.

Le mécanisme de séquestration repose sur une interaction entre les protéines DELLA et des facteurs ou régulateurs de transcription, qui résulte en une séquestration de ces derniers, les empêchant ainsi de se fixer aux promoteurs des gènes cibles (Figure 12A). Les premiers facteurs de transcription (FT) caractérisés pour interagir avec les protéines DELLA sont les PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS (PIF), membres de la famille bHLH (basic Helix-Loop-Helix) (De Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008). Cette étude a mis en évidence que ce mécanisme est possible grâce à l'interaction entre les domaines GRAS des DELLA et le domaine de liaison à l'ADN des FT PIF, formant ainsi un complexe inactif (Figure 12A). A l'inverse, en présence de GA bioactives, les protéines DELLA sont déstabilisées, libérant ainsi les DIP, capables d'activer une réponse physiologique.

Le mécanisme de transactivation réside sur une interaction entre les DELLA et les FT, qui n'altère pas leur aptitude à se fixer à l'ADN, et qui a pour conséquence d'induire l'expression des gènes cibles en *trans* (Figure 12B)(Hirano et al., 2010). Chez *Arabidopsis* plusieurs complexes FT-DELLA agissent selon ce mode d'action (Marín-de La Rosa et al., 2015; Yoshida et al., 2014). Le mécanisme de transactivation est encore mal compris, plusieurs

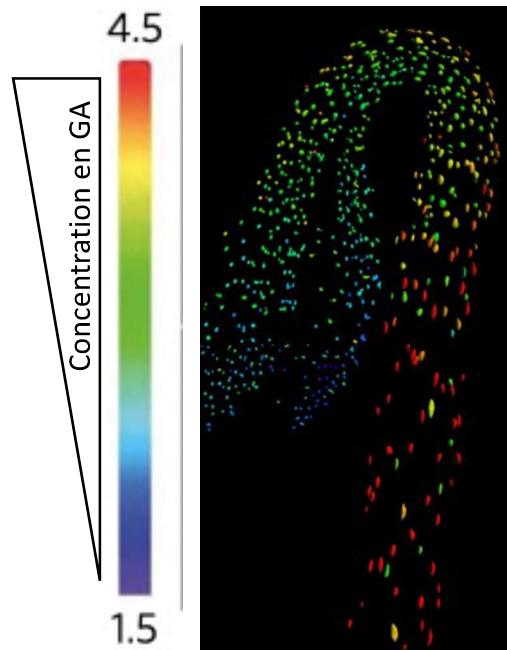


Figure 13 : Fret Bio-senseur de GA, nlsGPS1

Visualisation de la concentration de GA dans le noyau des cellules d'une plantule âgée de 3 jours, cultivée à l'obscurité. Les GA sont plus concentrées dans la zone de l'hypocotyle que dans la zone des cotylédons, à ce stade de développement.

(Adaptée de Rizza et al., 2017)

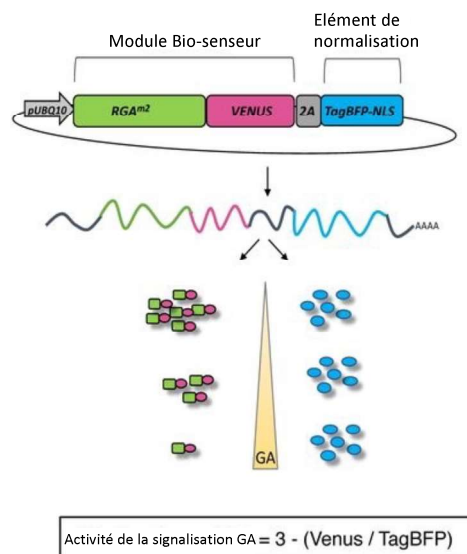


Figure 14 : Bio-senseur ratio-métrique de signalisation GA, *pUBQ10::RGA^{MPFYR}*

Représentation schématique du bio-senseur ratio-métrique développé par le laboratoire. Le bio-senseur est organisé en deux éléments qui sont reliés par le peptide auto-clivant 2A.

- Le module du bio-senseur
- Le module de normalisation

L'activité de la signalisation GA est mesurée par un ratio entre le signal du module bio-senseur et du module de normalisation.

(Adaptée de Shi et al., 2021)

hypothèses ont été émises. Le mécanisme pourrait être lié à des modifications de conformation de la chromatine dues à l'interaction entre les DELLA et un complexe de remodelage de la chromatine (Zhang et al., 2014a; Park et al., 2017b). A contrario, quand des GA bioactives sont présentes, elles induisent la dégradation des protéines DELLA, empêchant d'induire en *trans* l'expression des gènes.

Ces dernières années, de nombreux DIP ont été découverts et caractérisés et rendent compte de l'effet pléiotropique des fonctions biologiques des GA. Les travaux réalisés au laboratoire ont notamment mis en évidence l'interaction entre les DELLA et les TEOSINTE BRANCHED1(TB1) , CYCLOIDEA (CYC) , PROLIFERATING CELL FACTOR (PCF) aussi appelé TCP ou encore avec les Jasmonates ZIM-domain (JAZ) (Davière et al., 2014; Wild et al., 2012; Briones-Moreno et al., 2023; Lantzouni et al., 2020).

3 La distribution des Gibbérellines

Une distribution spatio-temporelle précise des phytohormones est requise, afin d'assurer une croissance, un développement adapté et une survie optimale des plantes. La distribution d'une hormone et son homéostasie sont contrôlées par : sa synthèse, son catabolisme, son stockage et son transport. L'ensemble de ces mécanismes forme un réseau complexe qui permet une distribution fine des phytohormones présentes en faible quantité dans la plante. Ainsi, les plantes peuvent accumuler rapidement ces molécules dans les organes/tissus où elles sont nécessaires, que ce soit pour leur croissance ou pour la réponse à un stress environnemental. Depuis plusieurs années, des études ont été menées sur la distribution de différentes phytohormones et des outils ont été développés pour les étudier. L'un des outils permettant de visualiser la distribution, notamment de GA, est l'utilisation de bio-senseurs.

Un premier Bio-senseur développé par l'équipe du Dr. Alexander Jones, basé sur le principe de Förster Resonance Energy Transfer (FRET), permet d'étudier l'accumulation de GA dans le noyau des cellules (Rizza et al., 2017). A l'aide de ce bio-senseur dénommé nlsGPS1, il

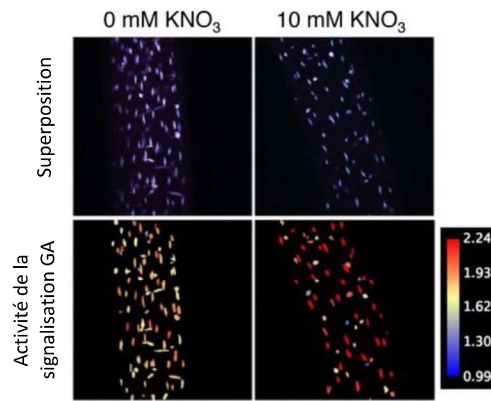


Figure 15 : Augmentation de l'activité de signalisation des GA en réponse au nitrate

Analyse d'hypocotyle de plantules *pUBQ10::RGAmPFYR* âgées de 6 jours, cultivées sur un milieu sans nitrate ou supplémenté avec 10mM KNO_3 . La disponibilité en nitrate induit une augmentation de l'activité de signalisation des GA, qui est visible à l'aide du bio-senseur ratio-métrique.

(Adaptée de Shi et al., 2021)

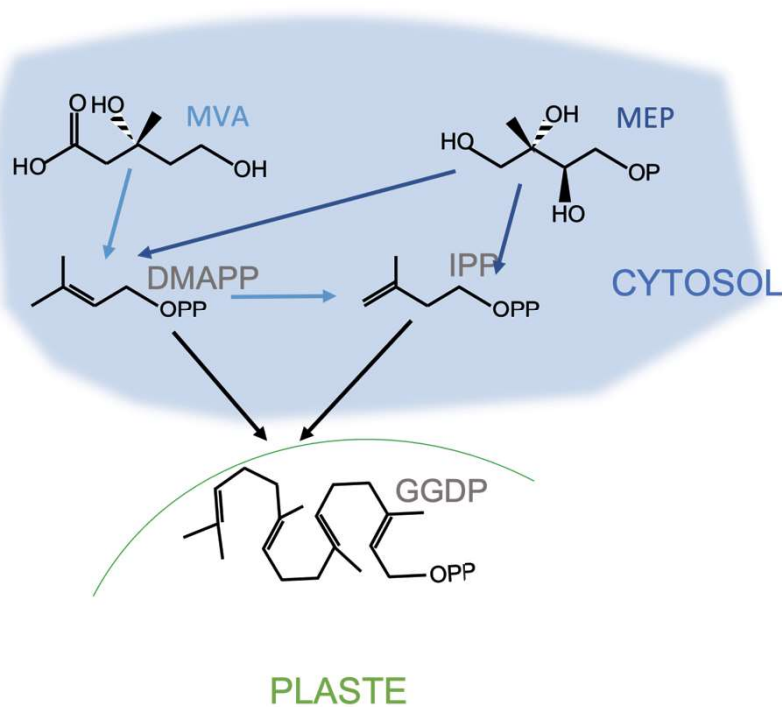


Figure 16 : Synthèse du précurseur des GA

La biosynthèse de GA commence avec la formation de l'isopentényl diphosphate (IPP) ou du diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP) dans le cytoplasme des cellules. Une série de réactions permettra de former le précurseur des GA, le géranyl-géranyl diphosphate (GGDP).

Mevalonate : Mevalonic acid : MVA ; Methylerythritol 4-phosphate : MEP

est possible de visualiser l'augmentation de la concentration de GA dans des cellules en élongation. En effet, des observations réalisées sur des plantules en développement à l'obscurité montrent une concentration de GA plus forte dans les cellules de l'hypocotyle, que pour des plantules qui se développent à la lumière (Figure 13)(Rizza et al., 2017). Cela peut s'expliquer par le phénotype de skotomorphogénèse des plantules se développant à l'obscurité et le processus de dé-étiolation conduisant au phénotype de morphogénèse des plantules qui croissent à la lumière (De Lucas et al., 2008; Davière et al., 2008) (voir Introduction Générale section 2.2.1).

Un second Bio-senseur, développé récemment par le laboratoire, permet de mesurer l'activation de la signalisation des GA, en rendant compte à la fois à la concentration en GA et sa perception (abondance en récepteurs GID1). Ce Bio-senseur, ratiométrique, code pour un variant de la protéine DELLA RGA^{mPFYR} (la mutation mPFYR rend la protéine RGA non fonctionnelle), fusionné à la protéine fluorescente VENUS, et une protéine TagBFP-NLS (module de référence), le tout conduit par un promoteur constitutifs (pUBQ10 ou pRPS5a) (Figure 14)(Shi et al., 2021). Le niveau d'activité de la signalisation GA est déterminé en mesurant le ratio de la fluorescence émise par la VENUS par rapport à celle émise par le TagBFP (Figure 14). Ce bio-senseur a déjà permis de mettre en évidence des modifications de la distribution de GA, à la suite de changements environnementaux. Par exemple, le nitrate stimule la croissance des plantes, en partie en activant la synthèse de GA (Fredes et al., 2019; Camut et al., 2021). De manière cohérente, le laboratoire a montré, avec le bio-senseur nouvellement développé, que la signalisation GA est fortement activée dans les cellules de l'hypocotyle de plantules traitées avec du nitrate, comparée à celles cultivées sur un milieu dépourvu en azote (Figure 15)(Shi et al., 2021).

La suite de cette partie sera consacrée à l'explicitation des différents mécanismes régulant dans la distribution des GA.

3.1 Le métabolisme GA

L'étude du métabolisme des GA chez les plantes repose essentiellement sur la génération de mutants affectés dans la biosynthèse des GA, pour la production d'une ou de

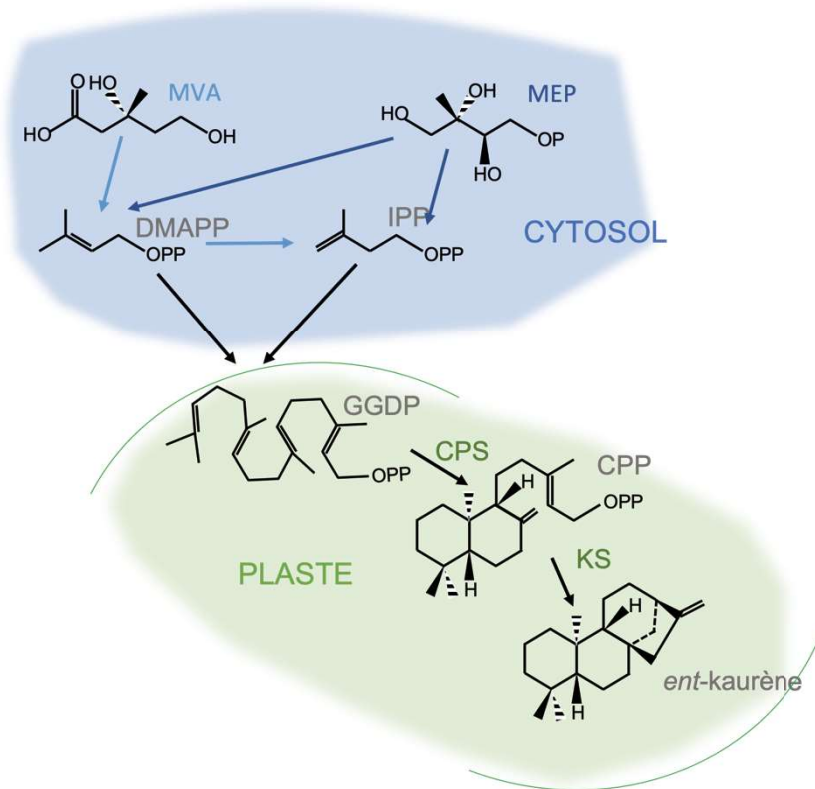


Figure 17 : Formation de l'ent-kaurène

La biosynthèse de GA se poursuit dans le chloroplaste, jusqu'à la formation de l'ent-kaurène par l'ent-kaurène synthase.

Mevalonate : Mevalonic acid : MVA ; Methylerythritol 4-phosphate : MEP ; Géranyl-géranyl diphosphate : GGDP ; ent-copalyl diphosphate : CPP; ent-copalyl diphosphate synthase : CPS ; ent-kaurène synthase : KS

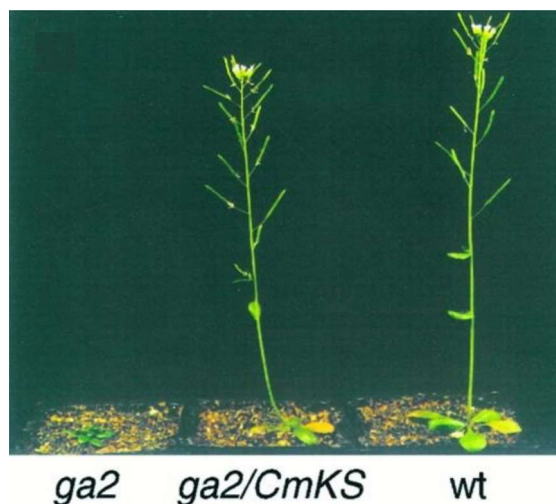


Figure 18 : Phénotype du mutant de biosynthèse de GA, *ga2* chez *Arabidopsis*

Analyse phénotypique de plantes d'*Arabidopsis*, âgées de 35 jours. Le mutant *ga2*, muté pour le gène codant pour la KS, présente un phénotype nain. Le nanisme du mutant *ga2* peut être complété (au centre) par l'enzyme KS du potiron (*Cucurbita maxima*, *CmKS*).

(Adapté de Yamaguchi et al., 1998)

plusieurs enzymes clés. La suite de cette partie décrira exclusivement le métabolisme des GA chez les plantes supérieures, celui des champignons et des bactéries sont décrits en détails dans plusieurs revues ([Yamaguchi, 2008](#); [Hedden et Thomas, 2012](#); [Hedden et Sponsel, 2015](#)).

3.1.1 Biosynthèse des GA

La synthèse de GA commence avec la formation de l'isopentényl diphosphate (IPP) ou de diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP), qui sont formés soit par la voie du mévalonate soit par la voie du méthylérythritol phosphate (MEP), respectivement dans le cytoplasme et dans les plastes (Figure 16). C'est la voie du MEP qui génère la majorité de l'IPP nécessaire à la synthèse de GA (Kasahara et al., 2002). L'IPP sera converti en géranyl-géranyl diphosphate (GGDP), précurseur commun à plusieurs diterpènes, qui se composent de 20 atomes de carbone. La voie de biosynthèse des GA est communément divisée en trois parties, se déroulant dans des compartiments subcellulaires différents et faisant intervenir des enzymes de diverses classes. La première phase se déroule dans les plastes et permet la conversion du GGDP en *ent*-kaurène par l'intermédiaire de terpènes synthase (TPS). La seconde phase a lieu au niveau des membranes plastidiales et du réticulum endoplasmique, elle permet la formation de GA₁₂ à partir de l'*ent*-kaurène grâce à des cytochromes P450 mono-oxygénases (P450). La troisième phase s'accomplit dans le cytosol des cellules, où des dioxygénases 2-oxoglutarate-dépendantes (2-ODD) transforment la GA₁₂ en formes bioactives.

3.1.1.1 1^{er} phase, synthèse de l'*ent*-kaurène

Le GGDP, une fois dans les plastes, est dans un premier temps cyclisé en *ent*-copalyl diphosphate (CPP) par la *ent*-copalyl diphosphate synthase (CPS). Le CPP est ensuite converti en *ent*-kaurène par l'*ent*-kaurène synthase (KS) (Figure 17). La localisation de ces deux enzymes au niveau des plastes a été confirmée à l'aide de lignées de fusion traductionnelle par microscopie confocale (Helliwell et al., 2001). La CPS et la KS sont toutes deux, chez *Arabidopsis*, codées par un gène unique. Les simples mutants pour ces deux enzymes, *ga1*

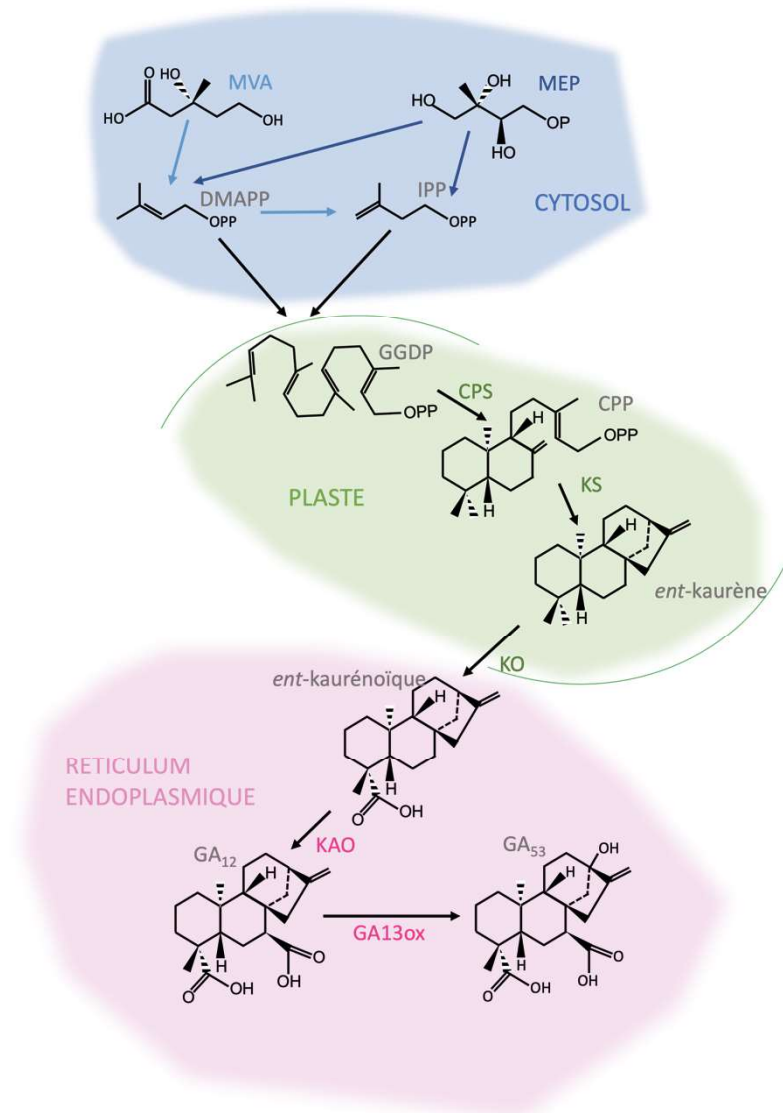
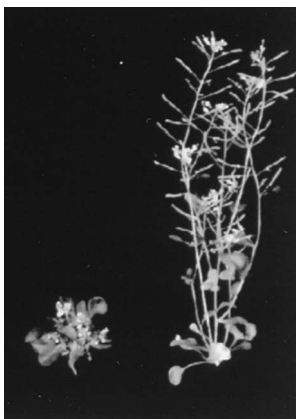


Figure 19 : Formation de la GA₁₂, précurseur commun à toutes les GA bioactives

L'ent-kaurène est, par l'action successive de l'ent-kaurène oxydase (KO) et de l'ent-kaurénoïque oxydase, converti en GA₁₂.

Mevalonate : Mevalonic acid : MVA ; Methylerythritol 4-phosphate : MEP ; Géranyl-géranyl diphosphate : GGDP ; ent-copalyl diphosphate : CPP; ent-copalyl diphosphate synthase : CPS ; ent-kaurène synthase : KS ; ent-kaurène oxydase : KO ; ent-kaurénoïque oxydase : KAO ; GA13oxydase : GA13ox.



ga3 *Ler*

Figure 20 : Phénotype du mutant de biosynthèse de GA, *ga3*, chez *Arabidopsis*

Analyse phénotypique de plantes âgées de 34 jours. Le mutant *ga3*, altéré pour la synthèse de la KO, présente un fort nanisme comparé à la plante sauvage.

(Adapté de Helliwell et al., 1998)

ga1 pour la CPS et *ga2* pour la KS, possèdent un phénotype avec un nanisme sévère, une forte infertilité et un défaut de germination caractéristique des mutants de biosynthèse de GA (Figure 5 et 18). Un traitement avec des GA bioactives exogènes permet de restaurer le phénotype de ces mutants (Koornneef et van der Veen, 1980). A l'inverse, la surexpression de ces deux enzymes n'a pas d'impact sur le phénotype des plantes, cependant une augmentation de la production d'*ent*-kaurène est visible sans pour autant qu'elle induise une accumulation des formes actives de GA. Cela signifie que ces deux étapes de la voie de biosynthèse ne sont pas limitantes (Fleet et al., 2003).

3.1.1.2 2^{ème} phase, synthèse de GA₁₂

L'*ent*-kaurène subira plusieurs étapes d'oxydations successives, catalysées par deux P450 de la sous famille des CYP701A, avant de former de la GA₁₂ (Figure 19). Tout d'abord, l'*ent*-kaurène est converti par trois oxydations successives en *ent*-kaurénoïque par l'*ent*-kaurène oxydase (KO). Le Paclobutrazol est un inhibiteur de croissance qui cible cette étape de la voie de biosynthèse des GA. Cet inhibiteur affecte également le métabolisme d'autres phytohormones telles que l'ABA ou les BR (Desta et Amare, 2021).

L'*ent*-kaurénoïque est ensuite oxydé trois fois, à nouveau, par l'intermédiaire de l'acide *ent*-kaurénoïque oxydase (KAO), en GA₁₂ (Helliwell et al., 1999, 2001a). Comme pour la CPS et la KS : la KO est codée par un gène unique, son mutant simple *ga3* présente un phénotype nain caractéristique (Figure 20) ; et la surexpression de cette enzyme n'altère pas le phénotype de la plante. Contrairement à la KO, chez *Arabidopsis*, la KAO est codée par deux gènes aux fonctions redondantes, *AtKAO1* et *AtKAO2* (Helliwell et al., 2001a). Une étude phénotypique des simples mutants *kao1* et *kao2* indique qu'ils ont un phénotype semblable à celui d'une plante sauvage, alors que le double mutant *kao1 kao2*, présente un fort nanisme, ce qui illustre les fonctions redondantes de ces deux enzymes (Figure 21).

Une fois la GA₁₂ synthétisée, la voie de biosynthèse de GA se divise pour former deux voies parallèles. Soit la GA₁₂ est directement oxydée pour former après plusieurs étapes, la GA₄ ; soit la GA₁₂ est préalablement convertie en GA₅₃ par la GA13-oxydase (voie 13-hydroxylée) pour former ultérieurement, la GA₁ (Figure 19). Ces deux formes, la GA₄ et la GA₁,

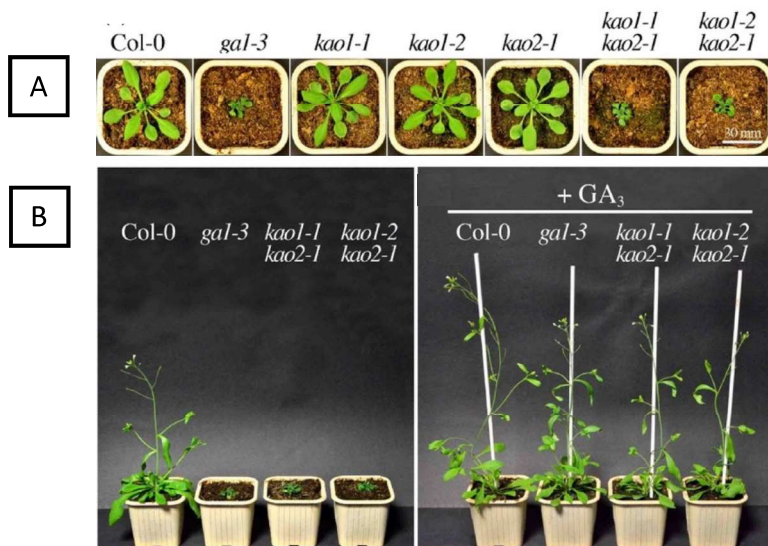


Figure 21 : Phénotypes des mutant *ga3-1*, *kao1* et *kao2*, chez *Arabidopsis*

- A. Analyse des phénotypes des rosettes des simples et doubles mutants *kao*; âgés de 21 jours. Les mutants simples *kao1* et *kao2* ont un phénotype semblable à celui de la plante sauvage. A l'inverse, le double mutant *kao1 kao2* présente un nanisme proche de celui du mutant *ga1-3*.
- B. Analyse des phénotypes des doubles mutants *kao1 kao2* de plantes âgées de 40 jours. La croissance des plantes mutantes peut être restauré par l'application de GA bioactives exogènes (à droite).

(Adapté de Regnault et al., 2014)

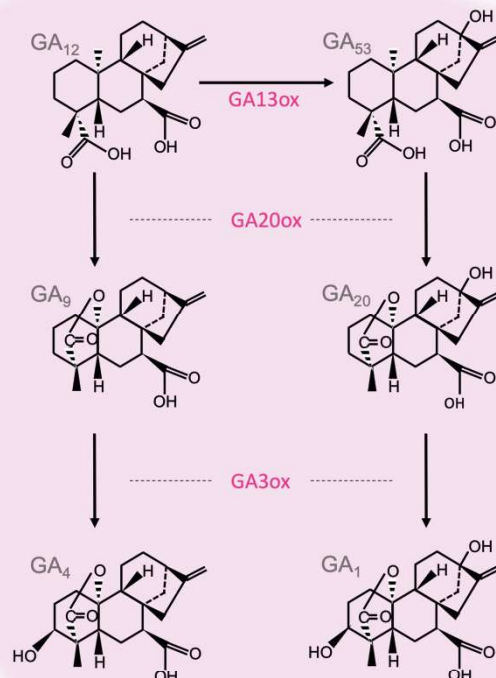


Figure 22 : Formation des GA bioactives

A partir de la GA_{12} et de la GA_{53} , les formes actives de GA vont pouvoir être synthétisées suite à l'action des GA20-oxydases (GA20ox) et des GA3-oxydases (GA3ox).

correspondent aux formes actives prédominantes chez les plantes. Le ratio entre les deux formes dépend de la présence de la GA13-oxydase, ainsi que de son activité, qui varie en fonction des tissus, mais aussi selon les espèces. Par exemple, la voie 13-hydroxyée prédomine chez les riz, contrairement à *Arabidopsis* (Magome et al., 2013).

3.1.1.3 3^{ème} phase, synthèse des formes bioactives

Les enzymes impliquées dans les dernières étapes de la voie de biosynthèse de GA appartiennent à la famille des 2-ODD, ce sont des enzymes solubles qui se trouvent dans le cytoplasme des cellules. Les 2-ODD sont codées par des familles multigéniques qui présentent généralement des fonctions redondantes.

Trois étapes d'oxydation successives en position C-20 par les GA20-oxydases (GA20ox) permettent de convertir les GA₁₂ et GA₅₃ respectivement en GA₉ et GA₂₀. Durant la troisième étape d'oxydation le carbone 20 est libéré sous forme de CO₂; ainsi les GA₉ et GA₂₀ sont des C19-GA (Figure 22). Chez *Arabidopsis*, 5 gènes codants pour les GA20ox ont été découverts (*AtGA20ox1* – *AtGA20ox5*). Plusieurs études ont mis en évidence que le mutant simple *ga20ox1* présente un phénotype semi nain alors que les mutants *ga20ox2* et *ga20ox3* ont des phénotypes proches de celui d'une plante sauvage (Figure 23). Parmi les doubles mutants, le double mutant *ga20ox1ga20ox2* présente un nanisme important légèrement plus fort que le simple mutant *ga20ox1*. Le triple mutant *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3*, quant à lui, présente un nanisme sévère (Figure 23)(Plackett et al., 2012). Par ailleurs, les plantes qui surexpriment les GA20ox montrent une croissance accrue comparée aux plantes sauvages, ce qui suggère que ce sont des étapes limitantes de la voie de biosynthèse des GA (Figure 23)(Plackett et al., 2012; Coles et al., 1999).

Enfin, les GA3-oxydases (GA3ox), une seconde classe de 2-ODD, catalysent la dernière étape de la voie de biosynthèse au cours de laquelle les GA₉ et GA₂₀ sont converties, par une oxydation de leur carbone en C3, en GA₄ et GA₁, respectivement (Figure 22). Quatre gènes ont été caractérisés chez *Arabidopsis thaliana* et codent pour quatre GA3-oxydases (*AtGA3ox1-AtGA3ox4*). Le simple mutant *ga3ox1* présente un phénotype de type semi-nain, alors que les autres simples mutants présentent une croissance similaire aux plantes sauvages, illustration



Figure 23 : Phénotypes des mutants et sur-expresseurs *GA20ox*, chez *Arabidopsis*

- A. Etude phénotypique des simples, doubles et triple mutants *ga20ox*, âgés de 44 jours. La mutation *ga20ox1* affecte la plante plus sévèrement que celle de *ga20ox2* et *ga20ox3*. (d'après Coles et al., 1999)
- B. Etude phénotypique de lignées sur-expressives, âgées de 63 jours. La sur-expression des différentes *GA20ox* conduit à une croissance accrue de la plante comparée au contrôle sauvage. (adapté de Plackett et al., 2012)

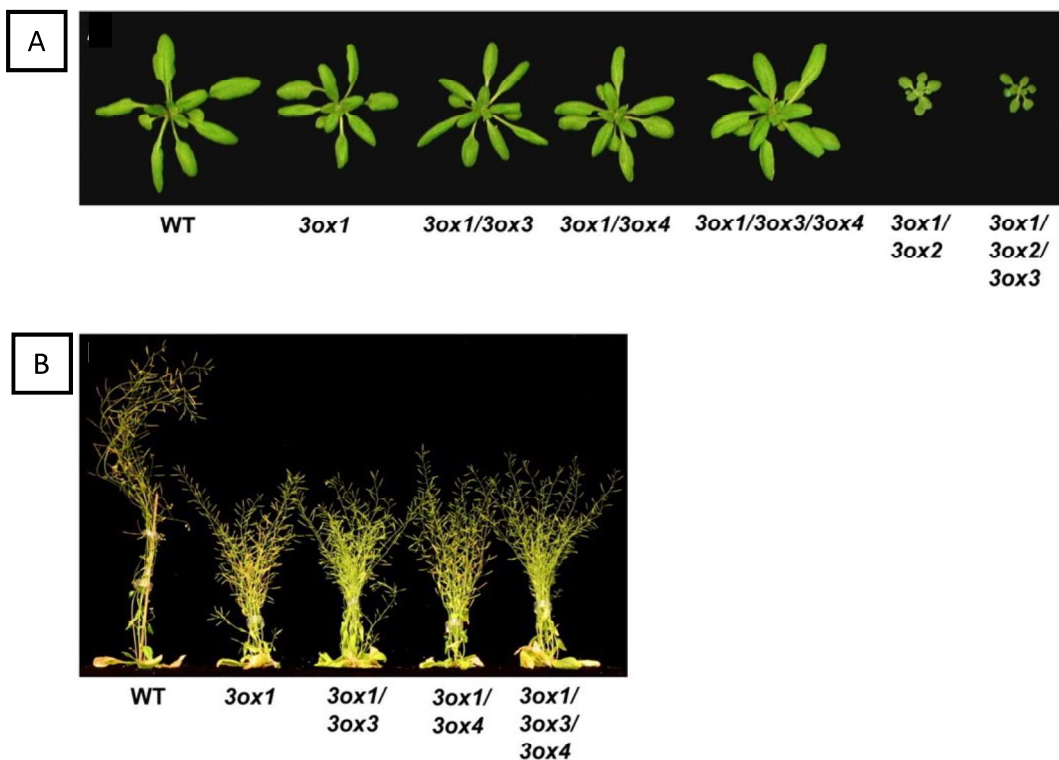


Figure 24 : Phénotype des mutants *ga3ox*, chez *Arabidopsis*

- A. Etude phénotypique des rosettes de simples, doubles et triple mutants *ga3ox* âgées de 24 jours. La double mutation *ga3ox1 ga3ox2* produit une perte de croissance significative de la plante.
- B. Etude phénotypique de plantes simples, doubles et triples mutants âgées de 44 jours. La mutation *ga3ox1* semble être suffisant à réduire la croissance en hauteur de la plante.

(adapté de Hu et al., 2008)

également de l'existence d'une redondance fonctionnelle entre ces enzymes. Les doubles et triples mutants montrent un phénotype semi-nain très proche de celui du mutant *ga3ox1*, à l'exception du double mutant *ga3ox1 ga3ox2* qui présente un nanisme encore plus marqué (Figure 24)(Hu et al., 2008; Mitchum et al., 2006).

3.1.2 Catabolisme des GA

“Pour ajuster le niveau d'accumulation des GA, les plantes peuvent agir sur la synthèse de GA (une réponse en général lente suite à l'activation des gènes de biosynthèse de GA) ou inactiver les GA bioactives (une réponse bien plus rapide). De nos jours, plusieurs mécanismes impliqués dans l'inactivation des GA ont été caractérisés (Figure 25).

Le mécanisme d'inactivation le mieux caractérisé chez les plantes consiste en une hydroxylation sur le carbone C2, par les GA2-oxydases (GA2ox), sur les formes actives ou les précurseurs C19-GA et C20-GA. Cette hydroxylation modifie la structure des GA supprimant leur affinité avec leur récepteur GID1. Les GA2ox sont divisées en deux sous-familles de 2-ODD, en fonction des formes de GA qu'elles hydroxylient ; les C19-GA2ox et les C20-GA2ox. Chez *Arabidopsis*, les C19-GA2ox sont codés par 5 gènes, à *GA2ox6* (excluant le pseudo-gène *GA2ox5*)(Rieu et al., 2008). Ces enzymes convertissent la GA₄ en GA₃₄, la GA₁ en GA₈, la GA₉ en GA₅₁ et la GA₂₀ en GA₂₉ (Figure 25). Dans le cas des C20-GA2ox, deux gènes ont été caractérisés et codent pour les enzymes, *GA2ox7* et *GA2ox8*. Le double mutant *ga2ox7 ga2ox8* accumule fortement les GA bioactives, et les qui sur-expriment ces deux gènes présentent un nanisme dû à l'inactivation massive des GA bioactives (Figure 26)(Schomburg et al., 2003). Contrairement aux C19-GA2ox, les C20-GA2ox n'inactivent que les précurseurs G₁₂ et GA₅₃ en respectivement GA₁₁₀ et GA₉₇ (Figure 25). De plus, chez *Arabidopsis*, le mutant *ga2ox7* demeure insensible au phénomène de thigmomorphogénèse, caractérisé par une croissance contrainte et un retard de floraison, en réponse à des touchers répétés (stimuli mécaniques)(Pimenta Lange et Lange, 2015). Enfin, récemment, deux nouveaux gènes, *AtGA2ox9* et *AtGA2ox10* ont été caractérisés chez *Arabidopsis*, et contribuent à la résistance au stress du froid et à la fertilité, respectivement (Lange et al., 2020).

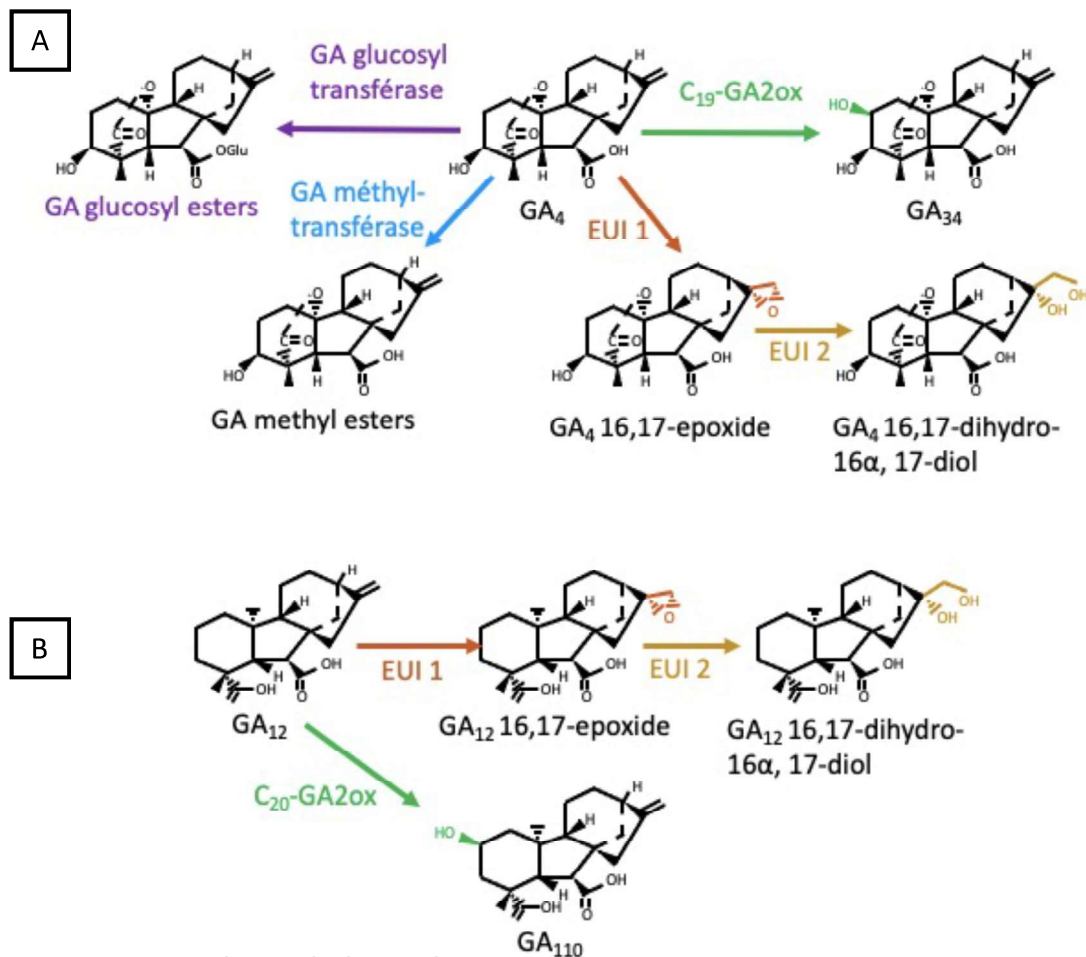


Figure 25 : Voie du catabolisme des GA

Plusieurs mécanismes permettent la désactivation des GA ont été mis en évidence. L'action des GA2-oxydases (GA2ox) (en vert) est le mécanisme le mieux caractérisé. D'autres mécanismes interviennent dans l'inactivation des GA, qui incluent des méthyltransférases (en bleu), des cytochromes P450 mono-oxygénases, appelées ELONGATED UPPERMOST INTERNODE (EUI1 et EUI2) (respectivement en orange et jaune) ou encore par une GA glucosyl transférase (en violet).

A. Inactivation des C_{19} -GA

B. Inactivation des C_{20} -GA

(inspiré de Hedden, 2020)

A



B



Figure 26 : Phénotypes des sur-expressseurs GA2ox, chez Arabidopsis

Etude phénotypique de plantes sur-exprimant la GA2ox7 et la GA2ox8. Ces plantes âgées de 48 jours présentent une croissance réduite comparée au témoin sauvage, due à une augmentation du catabolisme des GA.

A. Plante contrôle sauvage (écotype Wassilewskija)

B. Lignées sur-expressseurs

(adapté de Schomburg et al., 2003)

Un second mécanisme d'inactivation, très peu présent chez *Arabidopsis*, implique une méthylation du groupement carboxyle en position C6 par l'action des Gibbérelline Méthyltransferases 1 et 2 (GAMT1 et GAMT2). Ces enzymes peuvent inactiver à la fois les GA bioactives et leurs précurseurs (Figure 25). La surexpression de ces deux gènes chez *Arabidopsis*, induit une déficience en GA bioactives et en certains précurseurs, dans une moindre mesure, accompagnée d'un nanisme. A l'inverse, les mutants simples *gamt1* et *gamt2* montrent une forte accumulation de GA bioactives (Varbanova et al., 2007; Xing et al., 2007).

Un autre mécanisme d'action spécifique au riz a été découvert et se réfère à une hydroxylation de certaines formes de GA (GA₁, GA₄, GA₁₂, ou GA₅₃) en formes époxydes inactives, par l'action de cytochrome P450 mono-oxygénases, ELONGATED UPPERMOST INTERNODE 1 (EUI1) et EUI2 (Figure 25). Le mutant *eui* chez le riz, accumule davantage de GA bioactives au niveau de ses entre-nœuds (Zhu et al., 2006).

Un dernier mécanisme d'inactivation possible est la glycosylation, établissement de liaisons entre les GA et des molécules de sucres telles que le glucose, pour former des GA conjuguées (Schneider et Schliemann, 1994). A ce jour, aucune fonction biologique n'a été attribuée pour ces formes de GA conjuguées, même s'il a été avancé qu'elles pourraient être une forme de stockage ou mobile.

3.1.3 Régulation du métabolisme GA

Les contenus en GA bioactives sont précisément régulées pour assurer une croissance et un développement optimal des plantes, on parle ainsi d'homéostasie, ou équilibre homéostatique. Un appauvrissement en GA bioactives entraîne une altération de la croissance des plantes et un retard voire une absence de floraison, au contraire une forte accumulation de GA conduit à une croissance excessive de la plante, accompagnée d'une baisse de fertilité. La régulation du métabolisme des GA permet cet ajustement, elle se fait à différents niveaux et par l'intégration de différents facteurs internes et externes. Un des premiers niveaux de régulation s'effectue sur la biosynthèse de GA par un phénomène de rétrocontrôle. Cela est visible chez le mutant de biosynthèse *ga1-3* qui, après traitement avec des GA bioactives

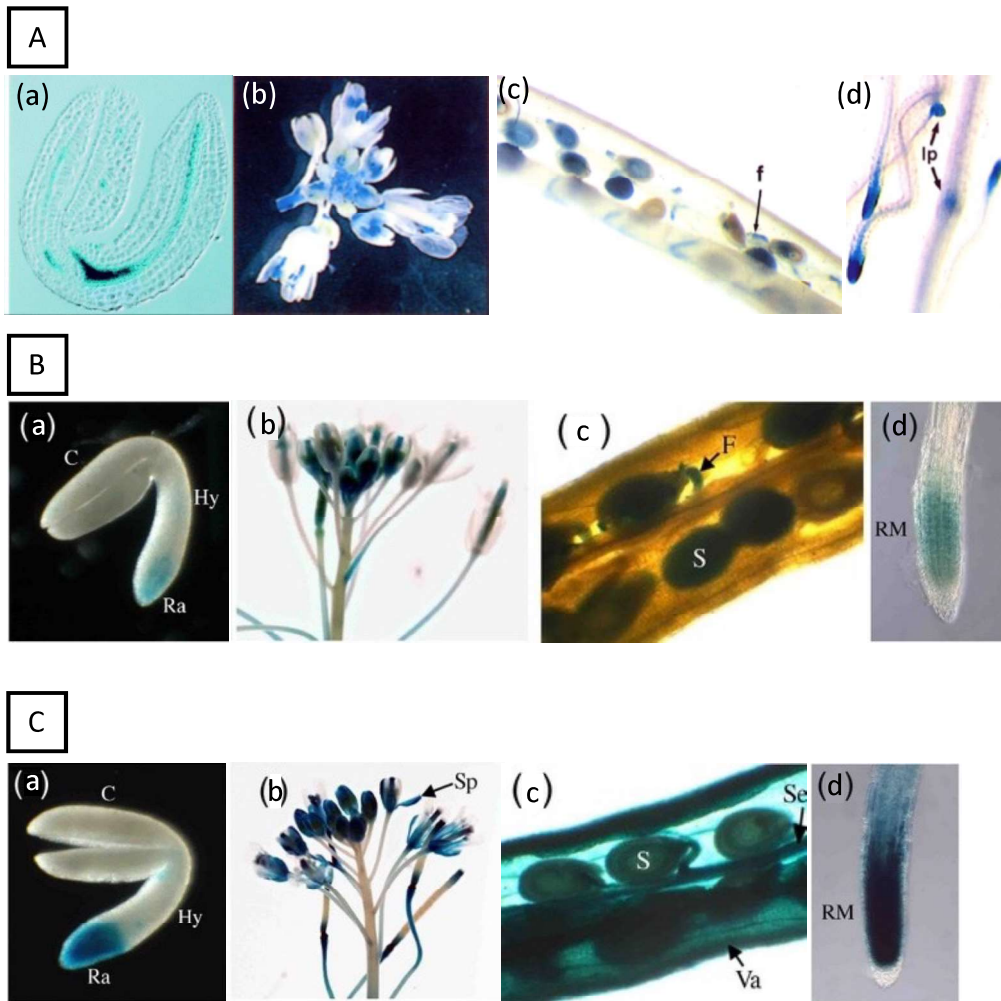


Figure 27 : Patrons d'expression des gènes *CPS*, *KAO1* et *KAO2* chez *Arabidopsis*

- A. Observation du patron d'expression de la lignée *pCPS:GUS* par coloration GUS. (a) embryon d'une graine mature ; (b) inflorescence ; (c) Silique mature; (d) Pointe racinaire. (Adaptée de Silverstone et al., 1997; Yamaguchi et al., 2001)
- B. Observation du patron d'expression de la lignée *pKAO1:KAO1-GUS*. (a) Embryon d'une graine mature; (b) inflorescence; (c) Silique mature; (d) Pointe racinaire. (Adaptée de Regnault et al., 2014)
- C. Observation du patron d'expression de la lignée *pKAO2:KAO2-GUS*. (a) Embryon d'une graine mature; (b) inflorescence; (c) Silique mature; (d) Pointe racinaire. (Adaptée de Regnault et al., 2014)

Funicule : f ; primordia racine latérale : lp ; Cotylédon : C ; Hypocotyle : Hy ; Radicule : Ra ; Graine : S ; Méristème racinaire : RM ; Sépale : Sp ; Septum : Se ; Valve : Va.

exogènes, montre une diminution rapide de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des GA (Olszewski et al., 2002). Ce rétrocontrôle permet d'ajuster une quantité optimale de GA en toute circonstance. La régulation de la synthèse de GA s'effectue également au niveau des sites de production de l'hormone. En règle générale, les formes actives de GA sont surtout produites dans les zones en croissance, où la prolifération et l'expansion cellulaire sont importantes. Les premières enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des GA, de la CPS à la KAO sont majoritairement rencontrées dans les tissus en croissance tels que les méristèmes apicaux, racinaires, caulinaires et les inflorescences (Figure 27)(Silverstone et al., 1997a; Yamaguchi et Kamiya, 2001; Regnault et al., 2014). Les GA20ox, qui interviennent après les KAO, présentent des patrons d'expression différents et variables en fonction du stade de développement. Les gènes *GA20ox1* à *GA20ox3* montrent des patrons d'expression proches, ils sont exprimés dans tous les tissus et stades de développement, incluant les graines matures. Les *GA20ox4* et *GA20ox5* montrent un niveau d'expression plus faible que les autres gènes GA20ox, mais ils sont également exprimés à tous les stades de développement (Figure 28)(Rieu et al., 2008; Plackett et al., 2012). Les dernières enzymes de la voie de synthèse de GA, les GA3ox, montrent aussi des patrons d'expression distincts, *GA3ox1* est exprimé à tous les stades de développement, alors que *GA3ox2* s'exprime surtout dans les graines en germination et les *GA3ox4* et *GA3ox5* sont spécifiques des fleurs et des siliques (Figure 29)(Mitchum et al., 2006; Hu et al., 2008).

Un second niveau de régulation est influencé par le développement de la plante. En effet, certains gènes impliqués dans la synthèse de GA sont régulés selon le stade de développement. C'est le cas du gène codant pour la CPS qui est fortement régulé par le développement de la plante, comme par exemple durant le développement des siliques, et qui ainsi peut moduler l'ensemble de la voie de biosynthèse (Silverstone et al., 1997a). Un autre exemple, celui des facteurs de transcription LEAFY COTYLEDON 2 et FUSCA 3, qui répriment la synthèse de GA pendant le développement de l'embryon, inhibent l'expression du gène *AtGA3ox2* dans l'épiderme (Curaba et al., 2004). Divers autres exemples sont explicités, tel que l'exclusion des GA de certains tissus afin de maintenir le nombre de cellules indéterminés, dans les revues suivantes : Yamaguchi, 2008; Hedden et Thomas, 2012; Hedden, 2020).

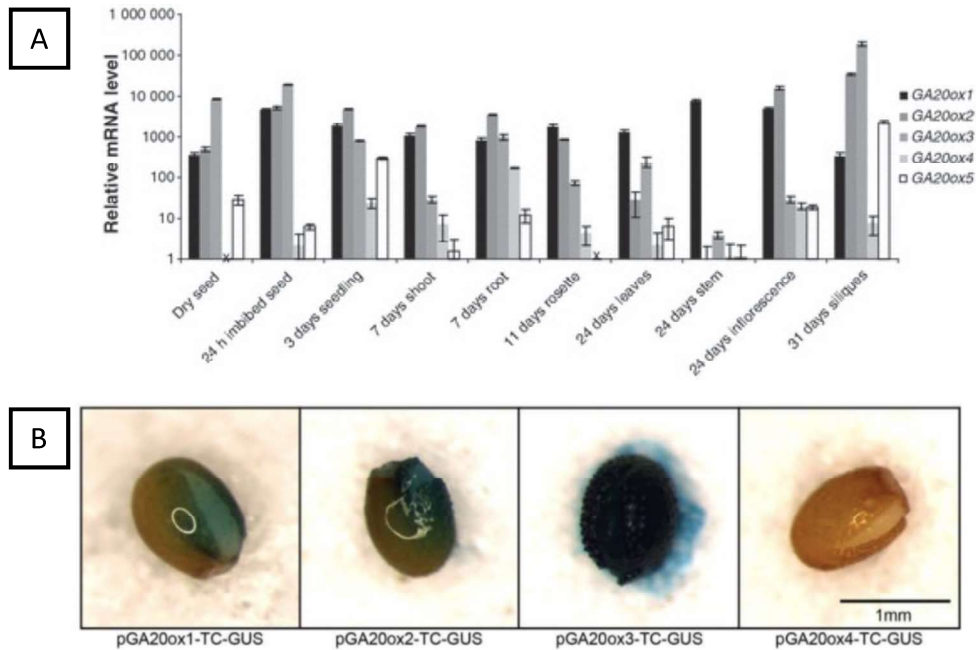


Figure 28 : Analyse du patron d'expression des *GA20ox*, chez *Arabidopsis*

- A. Analyse de l'expression relative des transcrits des différentes *GA20ox* par PCR quantitative. (d'après Rieu et al., 2008).
- B. Observation du patron d'expression des différentes lignées transgéniques *pGA20ox:GUS* par coloration GUS, sur des graines imbibées. (d'après Plackett et al., 2012).

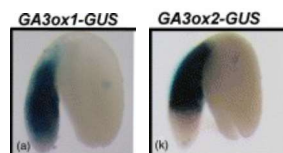


Figure 29 : Analyse du patron d'expression des *GA3ox1* et *GA3ox2*, chez *Arabidopsis*

Observation du patron d'expression des lignées transgéniques *pGA3ox1:GUS* et *pGA3ox2:GUS*, par coloration GUS sur des graines imbibées.

(Adapté de Mitchum et al., 2006)

Un troisième niveau de régulation implique la voie de signalisation des GA. Un mutant perte de fonction DELLA montre une expression des gènes de biosynthèse de GA inférieure à celle d'une plante sauvage (Dill et al., 2001; Martin et al., 1996; Silverstone et al., 2001). Au contraire une plante qui accumule fortement les protéines DELLA, présente des concentrations de GA bioactives plus élevées que celles d'une plante sauvage (Talon et al., 1990).

Diverses interactions existantes entre les phytohormones créent un autre niveau de régulation. Par exemple, l'accumulation de GA est régulée par la signalisation de l'auxine, qui induit l'expression des gènes *GA20ox* et/ou *GA3ox*, et dans certains cas, réprime aussi l'expression des gènes *GA2ox*; cette action combinée augmente ainsi, la concentration de GA bioactives (Frigerio et al., 2006). Autre exemple, celui du facteur de transcription CHOTTO1, gène sous contrôle de la voie de signalisation de l'ABA, qui promeut la dormance des graines imbibées chez *Arabidopsis* en inhibant la synthèse de GA. Pour ce faire, il réprime l'expression du gène *AtGA3ox2* (Yano et al., 2009; Nambara et al., 2002).

Un dernier niveau de régulation s'exerce au niveau de l'homéostasie des GA, à travers des phénomènes de rétrocontrôle, qui opèrent sur la transcription des enzymes 2-ODD des dernières étapes de la biosynthèse de GA. Une illustration possible se rencontre chez le mutant *ga1-3*, déficient en GA, chez qui l'expression des gènes codant pour les *GA20ox1* à *GA20ox3* et *GA3ox1* reste élevée par rapport à leur niveau d'expression chez une plante sauvage. De plus, leur niveau d'expression chez le mutant diminue rapidement après un traitement aux GA exogènes (Mitchum et al., 2006; Rieu et al., 2008). Inversement, une forte augmentation de l'expression des *GA2ox*, impliquées dans la désactivation des formes actives de GA, est visible lors d'une accumulation élevée de GA (Thomas et al., 1999; Rieu et al., 2008). En outre, la voie de signalisation même des GA, établit un rétrocontrôle et module l'expression des *GA20ox*, *GA3ox*, et *GA2ox*. Ce phénomène s'observe, notamment chez le mutant *gid1* du riz, où l'accumulation de SRL1 (protéine DELLA) induit la surexpression du gène *OsGA20ox1* et donc augmente la production de GA bioactives (Sasaki et al., 2003).

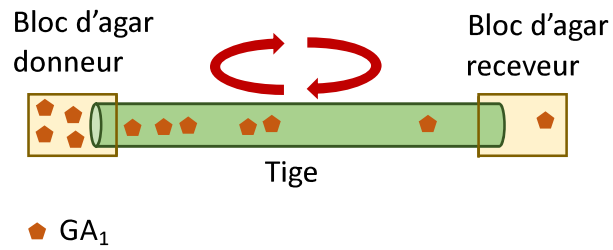


Figure 30 : Transport de GA non polarisé dans la tige de pois

Schéma explicatif de l'expérience réalisée par Jiro Kato en 1958. Des blocs d'agar sont disposés de part et d'autre d'une tige de pois. Dans le bloc donneur de la GA_1 , GA bioactive, est ajoutée. Après un temps d'imbibition la concentration de GA dans le bloc receveur est mesurée.

3.2 Le stockage des GA

Peu d'évidences rendent compte de l'existence d'un stockage de GA. De rares études se sont penchées sur ce sujet, cependant, plusieurs hypothèses ont été émises. Il se pourrait que des formes conjuguées de GA bioactives puissent être stockées dans les chloroplastes (Jin et al., 2011). La découverte récente d'un exporteur de GA, NPF2.14, au niveau de la membrane de la vacuole conforte l'idée de l'existence d'un stockage de GA chez les plantes (Binenbaum et al., 2023).

3.3 Le transport de GA

On distingue deux grands types de transport d'hormones chez les plantes. Le transport sur de courtes distances, aussi appelé, transport local durant lequel les molécules vont se déplacer au sein d'un même tissu ou organe, et à contrario, le transport sur de longues distances, où les molécules vont être transportées d'un organe à un autre. Plusieurs mécanismes de transport ont été caractérisés d'après la vitesse du transport (Lacombe et Achard, 2016). Le transport d'Auxine relativement bien étudié, a permis de caractériser ces deux mécanismes de transport : d'une part, le transport non polarisé, assez rapide ($5-10 \text{ cm.h}^{-1}$), qui passe par le système vasculaire des plantes, d'autre part, le transport de cellule à cellule, polarisé, relativement lent ($5-10 \text{ mm.h}^{-1}$), appelé Polar Auxine Transport (PAT) (Friml et Palme, 2002)

Les premières études menées sur le transport de GA, datant des années 50, ont rapidement mis en avant l'existence d'un transport non polarisé de la molécule. Une expérience utilisant une tige de pois, à laquelle était disposé de part et d'autre, des blocs d'agar, dont l'un contenant de la GA_1 , a permis de déterminer que les GA peuvent être transportées de façon bidirectionnelle (transports acropète et basipète) (Figure 30) (Kato, 1958). Deux décennies plus tard environ, des études ont été réalisées, sur le même principe que précédemment, avec des tiges de haricot relativement longues (environ 8cm), et des GA

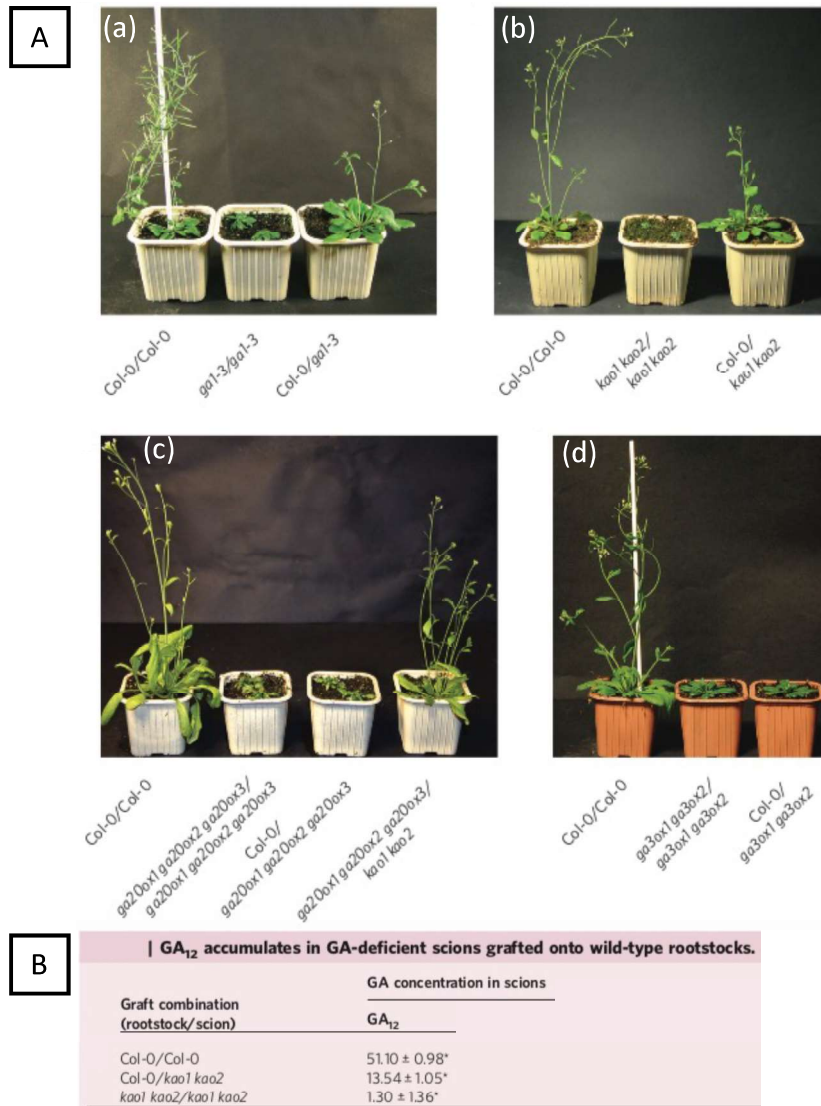


Figure 31 : Analyse phénotypique de greffons et quantification de GA dans le xylème

- A. Analyse phénotypique de greffons, âgés de 4 à 5 semaines, déficitaires pour la synthèse de GA, greffés à différents portes greffes, sauvage ou également déficiente pour la synthèse de GA. (a-b) Le porte-greffe sauvage permet de restaurer la croissance du greffon *ga1-3* et du greffon *kao1 kao2*, respectivement. (c) Le porte greffe sauvage ne restaure pas la croissance du greffon *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3*, indiquant que la molécule transportée dans le greffon n'est pas suffisante en elle-même pour activer la croissance de celui-ci. Cependant, le porte-greffe *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3* est suffisant pour restaurer la croissance du greffon *kao1 kao2*. (d) Le porte greffe sauvage ne permet pas de restaurer la croissance du greffon mutant *ga3ox1 ga3ox2*.

- B. Quantification des concentrations de GA₁₂, dans le xylème de plantes greffées, âgées de 4 à 5 semaines, en ng ml⁻¹.

(adaptée de Regnault et al., 2015)

radioactives. Des résultats similaires ont été obtenus, à l'exception d'une augmentation du transport chez les tiges matures, comparé à celles plus juvéniles (Phillips et Hartung, 1974). Ces résultats intéressants ont été révélés par des quantifications de la radioactivité, qui confirment une mobilité accrue dans les sections matures par rapport aux sections plus jeunes.

En parallèle, des études, sur des plantes de pois entières, ont montré qu'après un traitement de feuilles matures avec des GA radioactives, ces mêmes GA sont retrouvées au niveau des jeunes feuilles (McComb, 1964). A l'inverse, si des jeunes feuilles sont traitées, il n'est pas possible de voir une propagation de ces GA radioactives tant que la feuille se développe. Ainsi, le modèle suivant a été proposé : Les GA, que l'on applique sur une plante seraient transportées des feuilles matures aux jeunes feuilles, *via* les tissus en développement de la tige, qui prélèveront des GA en fonction des quantités produites et des besoins des organes juvéniles (McComb, 1964).

Ces différentes études réalisées à l'aide de GA exogènes ont mis en évidence que les vaisseaux, c'est-à-dire le phloème et le xylème, sont impliqués dans le transport de GA. Le phloème véhicule les produits issus de la photosynthèse, tels que les glucides, des feuilles vers les autres organes de la plante. Les faisceaux du xylème transportent majoritairement les nutriments et l'eau prélevée au niveau du sol vers les parties aériennes.

Le transport endogène de GA a été étudié grâce à une stratégie reposant sur des greffes. Cela consiste à greffer des parties aériennes et des parties racinaires de deux génotypes différents. Des greffes ont été réalisées entre un pois sauvage et mutant nain. Quand des racines d'un génotype nain sont greffées sur des parties aériennes d'un phénotype sauvage la longueur de la tige ne change pas. De la même façon quand les génotypes sont inversés la tige reste naine (Lockard et Grunwald, 1970). Cette étude n'a pas permis de mettre l'existence ou l'absence d'un transport endogène de GA. Quelques années plus tard, des greffes réalisées avec le mutant nain *na1* chez le pois, mutant ne pouvant pas synthétiser la GA₁₂, montrent une croissance des greffons mutants rétablie en présence d'un porte-greffe sauvage (Reid et al., 1983). Il a donc été émis qu'une forme précise de GA est transportée du porte-greffe vers le greffon, forme synthétisée tôt dans la voie de biosynthèse. Des expériences similaires ont été menées sur *Arabidopsis* (écotype *Ler*), avec un génotype

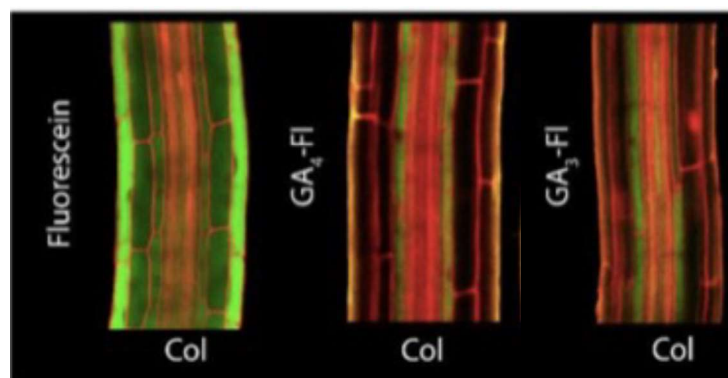


Figure 32 : Accumulation de GA-FI dans l'endoderme des racines

Analyse de la distribution de fluorescéine (FI) ou de GA-fluorescéine (GA-FI) dans la zone d'élongation de racines, après 3 heures d'incubation. La solution de FI est concentrée à 1 μM et les solutions de GA-FI à 5 μM .

(adaptée de Tal et al., 2016)

sauvage et un mutant *ga1-3* ont permis d'obtenir des résultats similaires (Ragni et al., 2011). Des études bien plus récentes, menées au laboratoire, utilisant différents mutants de biosynthèse de GA ont permis de mettre en évidence que le précurseur GA₁₂ est la forme majoritairement transporter sur de longue distance, à la fois lors d'un transport acropète et basipète (Figure 31)(Regnault et al., 2015). Pour cela de nombreuses greffes ont été réalisées entre un porte greffe sauvage et des greffons mutants pour différentes étapes de la voie de biosynthèse des GA, *ga1-3*, *kao1 kao2*, *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3* et *ga3ox1 ga3ox2*. Le porte greffe sauvage n'est pas suffisant pour restaurer la croissance des greffons *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3* et *ga3ox1 ga3ox2* indiquant que la molécule de GA transportée n'est pas suffisante à elle seule pour initier la croissance du greffon et que cette forme se situe en amont de la voie de biosynthèse. Cependant quand un greffon *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3* est greffé à un porte greffe *kao1 kao2*, une récupération de la croissance du greffon est visible, cela signifie que le mutant *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3* produit une molécule de GA que le mutant *kao1 kao2* peut utiliser pour initier sa croissance (Figure 31)(Regnault et al., 2015). Ces expériences de greffes, ainsi qu'un dosage de GA dans la sève issu du xylème ont permis de mettre en évidence que la GA₁₂ est la forme mobile, lors de ce transport longue distance.

Depuis ces études, des rôles biologiques ont pu être associés au transport, local et sur de longue distance, de GA. Par exemple, les GA sont impliquées dans le développement floral, il a été récemment démontré chez le concombre, que le précurseur GA₉ est transporté des ovaires jusqu'aux pétales et sépales, afin d'assurer leur développement (Pimenta Lange et Lange, 2016). Il a été possible de visualiser le transport de GA dans les racines grâce à des GA fusionnées avec une molécule de fluorescéine (GA-FI) (Shani et al., 2013). Ces travaux ont mis en évidence que les GA-FI s'accumulent dans l'endoderme des racines au niveau de la zone d'élongation (Figure 32). Une étude réalisée par le laboratoire en collaboration, a mis en évidence que le transport longue distance basipète de GA₁₂, véhiculé par le phloème, promeut la subérisation de l'endoderme dans la zone de différenciation des racines (Binenbaum et al., 2023).

Les GA sont des acides faibles, c'est-à-dire qu'elles ne se dissocient qu'en partie en solution. Ainsi, elles existent sous deux formes en équilibre, une forme protonée et une forme ionique. La proportion de chacune des 2 formes dépend du pH de la solution contenant les

GA-H : Forme Protonée
 GA⁻ : Forme ionisée

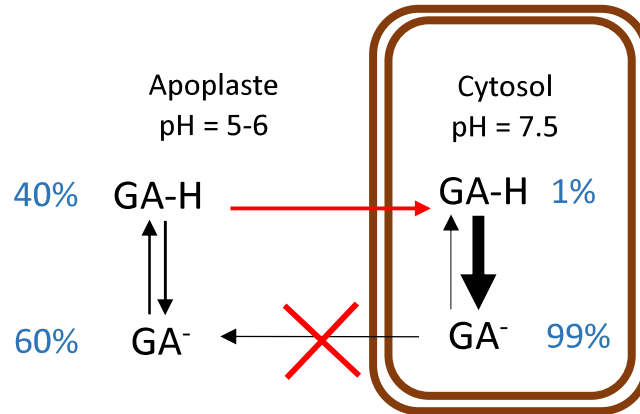


Figure 33 : Principe du « Ionic trap Model »

Dans l'apoplaste les formes protonées des GA (GA-H) vont pouvoir diffuser à travers la membrane plasmique (en brun). A l'inverse, les formes ionisées de GA (GA⁻), présentes dans le cytosol, sont incapables de passer la membrane plasmique, et restent ainsi séquestrées dans la cellule.

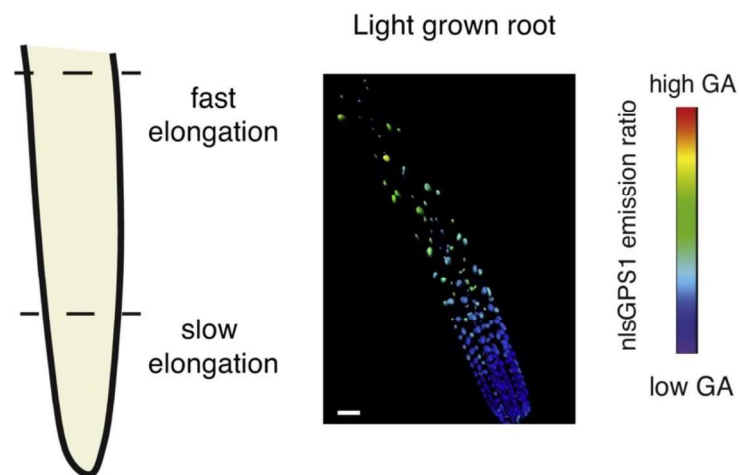


Figure 34 : Gradients de concentration de GA dans la racine

Analyse de la concentration de GA dans les noyaux des cellules de racines âgées de 3 jours, à l'aide du bio-senseur nlsGPS1.

(adaptée de Rizza et Jones, 2019)

molécules. Chaque acide possède un pKA (constante d'acidité), qui permet de déterminer la force de celui-ci. Ainsi, quand le pH est égal au pKA, l'acide existe sous les deux formes à égalité. Si le pH est inférieur au pKA, l'acide existera majoritairement en forme protonée, à l'inverse, si le pH est supérieur au pKA, l'acide s'accumulera en forme ionique. Les GA comme d'autres acides faibles, tels que l'ABA subissent ce qu'on appelle le « ionic trap model ». Dans l'apoplaste le pH est acide, ainsi les GA sont majoritairement sous la forme protonée. Comme la membrane plasmique est perméable aux formes protonées, les GA vont pouvoir diffuser à l'intérieure des cellules. Le pH du cytoplasme, quant à lui, est plus basique et les GA vont en grande majorité être sous leur forme ionisée. Cependant, étant donné que la membrane plasmique n'est pas perméable aux formes ionisées, les GA vont s'accumuler dans les cellules sans pouvoir s'en extraire (Figure 33)(Boursiac et al., 2013). Cette étape sera donc limitante pour la distribution de GA.

Le recours à des transporteurs actifs (exporteurs) devient indispensable, afin de contourner cet « ionic trap model » et ainsi pouvoir sortir des cellules. En conclusion, pour que les GA soient distribuées efficacement, il est nécessaire que les cellules disposent d'importeurs et exporteurs. L'absence d'un des deux types de transporteurs cause des dérèglements de distribution. En effet, si les cellules ne possèdent que des exporteurs, les GA vont être diluées dans l'apoplaste et ne pourront plus assurer certaines de leurs fonctions. A l'inverse, si les tissus ne possèdent que des importeurs, les GA vont être piégées dans les cellules et ne pourront donc plus être transportées là où elles sont nécessaires. Cette séquestration s'observe aisément, chez des plantes qui surexpriment l'importeur NPF3.1, de par leur phénotype nain (Tal et al., 2016)(Détails section 3.4.3.1 de l'introduction). L'action combinée des importeurs et exporteurs de GA permet la création d'un gradient de GA. C'est par exemple le cas dans la racine où un gradient de GA a été mis en évidence : la concentration en GA augmente progressivement de la pointe de la racine jusqu'à la zone d'élongation, et ceci est assuré en grande partie grâce au transport de l'hormone (Figure 34)(Rizza et Jones, 2019).

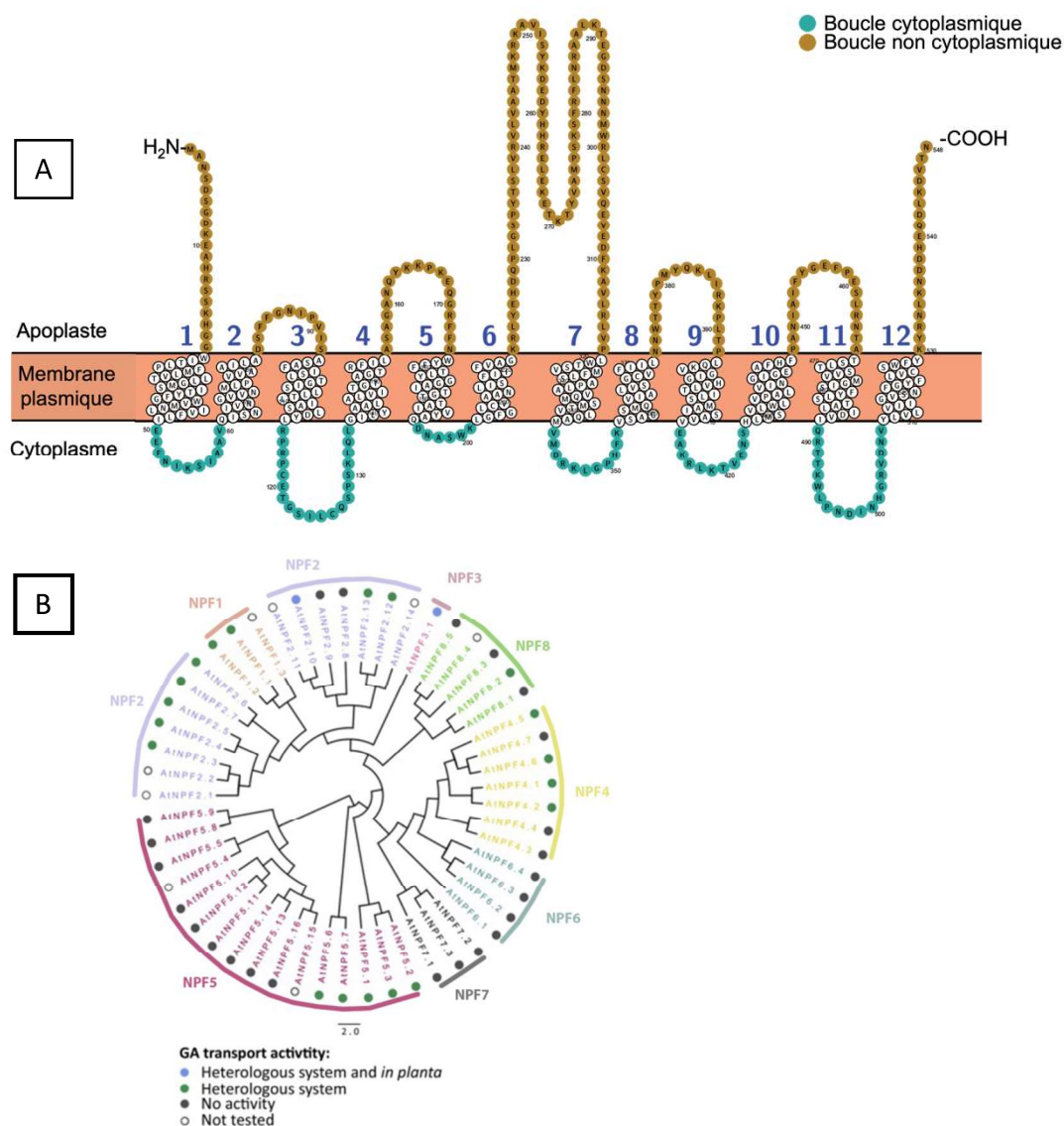


Figure 35 : Structure et phylogénie de la famille des ‘NITRATE TRANSPORTER1/PEPTIDE TRANSPORTER FAMILY’ (NPF)

- A. Structure schématique du transporteur NPF2.4, les domaines extracellulaires sont représentés en orange et les domaines intracellulaires, en bleu. (structure obtenue par <http://wlab.ethz.ch/protter/start/>)
- B. Arbre phylogénétique de la famille des NPF, présentant les 8 sous-groupes qui composent cette famille. Les NPF dont l’activité de transport a été testée en système hétérologue, levure ou ovocytes de Xénope, sont marqués en bleu et ceux testés *in planta* sont marqués en vert. (adapté de Binenbaum et al, 2018)

3.4 Les transporteurs

Il existe différents types de transporteurs au niveau cellulaire, tels que les canaux, les pompes ou encore les transporteurs transmembranaires, qui jouent un rôle dans le cycle de la vie de la plante. Durant ma thèse, je me suis intéressée spécifiquement aux transporteurs transmembranaires. Ces derniers permettent un déplacement rapide de différentes molécules (nutriments, eau, hormones, etc...) pour assurer la croissance et le développement des plantes. Ils ont pour rôle de maintenir l'homéostasie des cellules en modulant le transport ionique à travers les canaux cellulaires des racines vers les parties aériennes (Gill et al., 2021). Le transport de molécule d'un organe source à un organe receveur joue un rôle pivot dans la croissance des plantes, mais aussi, dans leur adaptation aux changements environnementaux.

3.4.1 Les transporteurs d'hormones

Depuis de nombreuses années, plusieurs grandes familles de transporteurs ont été découvertes chez les plantes. Ces protéines transmembranaires font preuves d'une grande diversité de fonction en transportant une à plusieurs molécules, de façon directionnelle ou bidirectionnelle. Parmi ces familles de transporteurs nous pouvons citer les Nitrate transporter/Peptide transporter Family (NPF), les ATP-Binding Casette superfamily (ABC), les Pin-formed (PIN), les Sweet family (SWEET), et les Major Facilitator Superfamily (MST). Ces familles souvent multigéniques codent pour des transporteurs qui de par leur homologie de séquence et leur patron d'expression ont fréquemment des fonctions redondantes. Dans le cadre de ma thèse, je détaillerai essentiellement les deux grandes familles de transporteurs d'hormones, les ABC et les NPF (Park et al., 2017a).

Les ABC forment une très large famille de transporteurs ubiquitaires, impliqués dans le transport de diverses molécules, tels que des sucres, des acides aminés, des ions et des phytohormones. Ce sont essentiellement des pompes qui utilisent l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP, pour mobiliser leur substrat. Certains d'entre eux peuvent également avoir une activité de canal intrinsèque (Higgins, 1992). Les ABC sont généralement composés

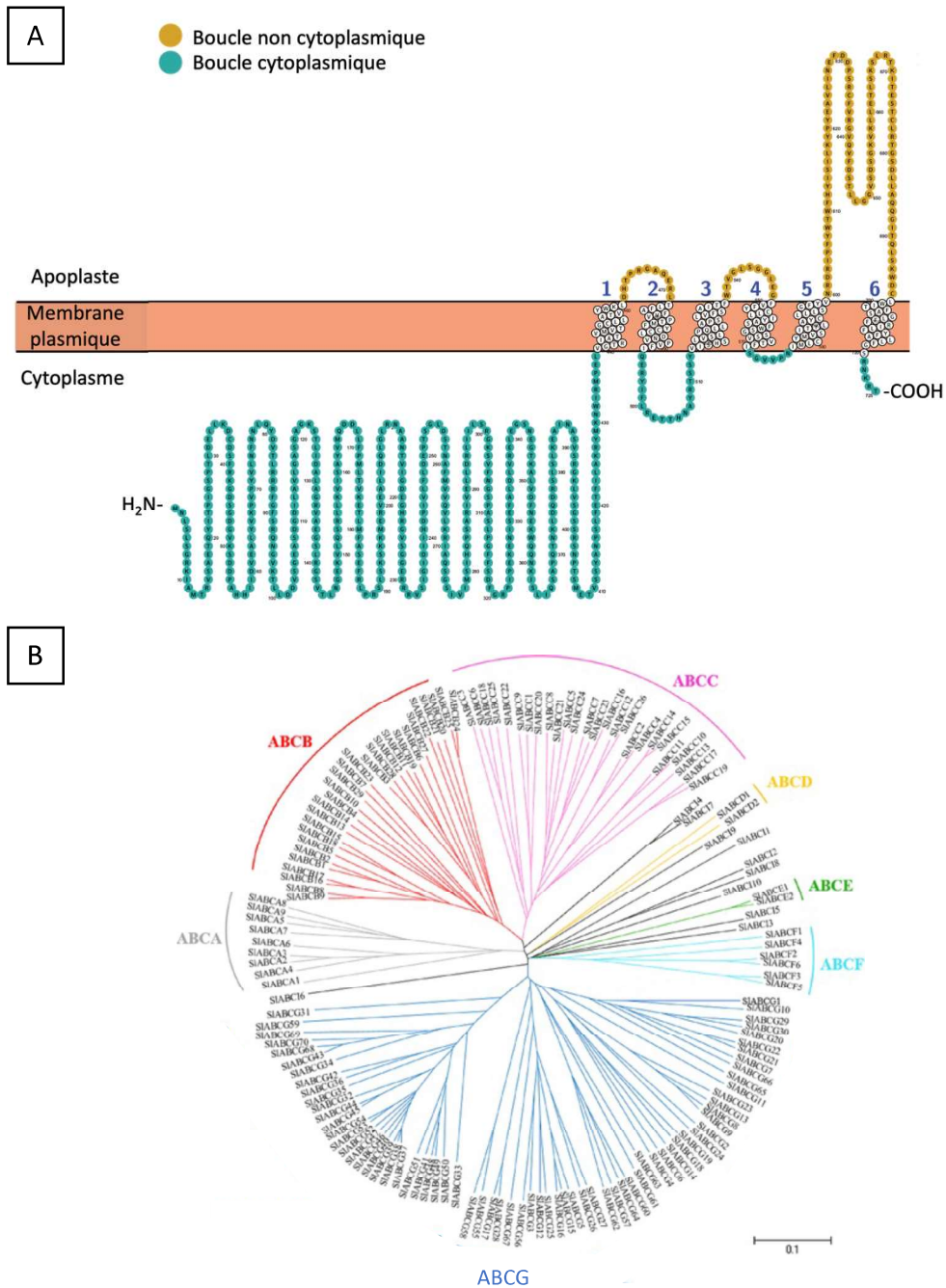


Figure 36 : Structure et phylogénie de la famille des ATP-Binding cassettes (ABC)

- A. Structure schématique du transporteur ABC-G19, les domaines extracellulaires sont représentés en orange et les domaines intracellulaires, en bleu. (structure obtenue par <http://wlab.ethz.ch/protter/start/>).
- B. Arbre phylogénétique de la famille des ABC, chez la Tomate, présentant les 8 sous-groupes qui composent cette famille. (adapté de Ofori et al, 2018)

de deux domaines transmembranaires hautement hydrophobes (TMD) et de deux domaines de liaison à l'ATP, qui sont normalement suffisants et nécessaires pour permettre leur activité de transport (Theodoulou, 2000). Les ABC sont subdivisés en 8 sous-familles nommées de A à H, la sous-famille G est fortement représentée chez les plantes et ses membres montrent des activités de transport de phytohormones (Figure 35)(Verrier et al., 2008; Gräfe et Schmitt, 2021).

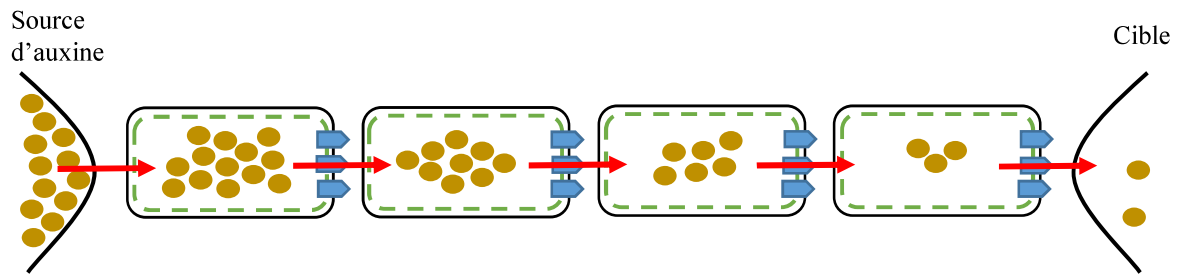
Les NPF ont été découverts chez *Arabidopsis* dans les années 90, avec comme premier membre caractérisé, CHL1, un transporteur de nitrate (Tsay, 1993). Depuis, des travaux ont montré que ces protéines peuvent aussi transporter des di/tri-peptides, des glucosinolates et des phytohormones (Léran et al., 2014). Ces protéines ubiquitaires sont composées de 12 domaines transmembranaires (TM), très conservés, ainsi qu'une grande boucle hydrophile entre les domaines TM 6 et 7 (Figure 36)(Léran et al., 2014). Chez *Arabidopsis*, 53 membres ont été caractérisés, et classés en 8 sous-groupes en fonction de leur phylogénie. Les membres d'un même sous-groupe sont souvent exprimés en tandem sur le même chromosome. De plus, certains NPF montrent des affinités plus ou moins forte pour les différents substrats qu'ils transportent (Figure 36)(Léran et al., 2014).

A l'inverse des ABC et des NPF, certains transporteurs tels que les PIN, sont spécialisés dans le transport d'une seule hormone, l'Auxine. Ces transporteurs permettent la mise en place d'un efflux d'Auxine, hors des cellules. Ils sont généralement distribués le long d'un gradient de concentration de l'hormone, pour assurer son transport directionnel (Figure 37) (Adamowski et Friml, 2015).

3.4.2 Les transporteurs de GA

3.4.2.1 Les transporteurs de GA caractérisés

Plusieurs transporteurs de GA ont déjà été caractérisés chez *Arabidopsis*. Ces transporteurs appartiennent à deux familles, les SWEET et les NPF.



Gradient de concentration d'auxine

- auxine
- ➡ PIN
- AUX1/LAX

Figure 37 : Transport local d'Auxine

Modèle du transport polarisé d'Auxine (PAT). Certains PIN-FORMED (PIN), transporteurs permettant l'efflux d'Auxine hors des cellules, sont différenciellement disposés (de façon non uniforme) dans les cellules et la succession de cette disposition, répétée dans les cellules voisines d'un tissu, génère un flux d'auxine et définit le sens du transport de cette hormone. Les AUXIN RESISTANT1/LIKE AUXIN RESISTANT (AUX1/LAX), transporteurs permettant l'influx d'Auxine dans les cellules, sont distribués de façon homogène sur le pourtour des cellules.

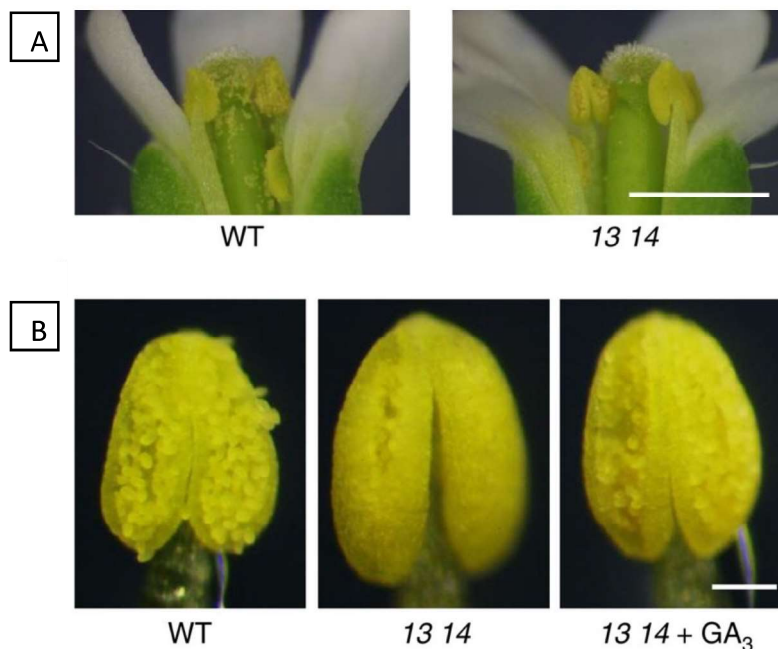


Figure 38 : Effet des mutations *sweet13* et *sweet14* sur le développement des étamines

- A. Photos représentatives de fleurs et d'étamines d'une plante sauvage (WT) et du double mutant *sweet13 sweet14* (13 14). Le double mutant présente un défaut de déhiscence des étamines, affectant la pollinisation du pistil.
- B. Photos représentatives d'étamines sauvages et du double mutant *sweet13 sweet14* avec ou sans traitement de GA₃ exogène. Le traitement par des GA bioactives permet de restaurer partiellement le phénotype du double mutant *sweet13 sweet14*.

(adapté de Kanno et al, 2016)

Les SWEET sont des protéines transmembranaires au nombre de 17 chez *Arabidopsis*, qui ont été initialement décrites comme transporteurs de sucres (Ji et al., 2022). En effet, elles sont impliquées dans le transport de différents sucres, tels que le glucose, le fructose ou le sucrose, de façon bidirectionnelle, en fonction de leur concentration (Chen et al., 2010). Outre les sucres, au moins deux de ses membres transportent également des GA. Par des tests d'import en systèmes hétérologues, une étude a récemment démontré que AtSWEET13 et AtSWEET14 ont la capacité d'importer des GA (Kanno et al., 2016). Des analyses génétiques et moléculaires ont révélé que ces transporteurs sont impliqués principalement dans la distribution de GA dans les étamines. En effet, les deux transporteurs sont exprimés dans les étamines et le double mutant *sweet13 sweet14* présente une fertilité réduite liée à un défaut de déhiscence des étamines. Un traitement des plantes avec des GA bioactives restaure la fertilité et la déhiscence des étamines (Figure 38)(Kanno et al., 2016). En plus d'une altération du développement des étamines, le double mutant *sweet13 sweet14* observe également des défauts de germination et une altération du développement au stade plantule. Enfin, les auteurs ont montré que SWEET13 et SWEET14 seraient impliqués dans le transport longue distance de GA. En effet, le transport acropète de GA exogènes appliquées au niveau racinaire est altéré chez le double mutant *sweet13 sweet14* (Kanno et al., 2016).

Parmi la grande famille des NPF, plusieurs membres ont la capacité de transporter des GA. Le transporteur NPF2.10 / GTR1 (Glucosinolate transporter 1), initialement décrit pour transporter des glucosinolates, transporte aussi des phytohormones (Saito et al., 2015). Des expériences d'imports en ovocytes de Xénope ont révélé que GTR1 a la capacité de transporter plusieurs formes de GA, ainsi que le jasmonyl-isoleucine (Saito et al., 2015). Le mutant *gtr1* présente un défaut d'allongement des filaments d'étamines et une altération de leur déhiscence entraînant une baisse de fertilité. Un traitement GA restaure la fertilité des plantes, confirmant l'implication de GTR1 dans le transport de GA dans les étamines (Saito et al., 2015).

NPF3.1 / Nitr est un autre transporteur de GA appartenant à la famille des NPF (Tal et al., 2016; David et al., 2016). *NPF3* est essentiellement exprimé dans l'endoderme de la racine, mais aussi dans d'autres organes tels que l'hypocotyle, la tige, les étamines ou la graine. Dans la racine, NPF3 est impliqué dans le transport de GA bioactives dans l'endoderme de la zone d'élongation de la racine. En utilisant des GA fusionnées à la fluorescéine (GA₃-Fl), les auteurs

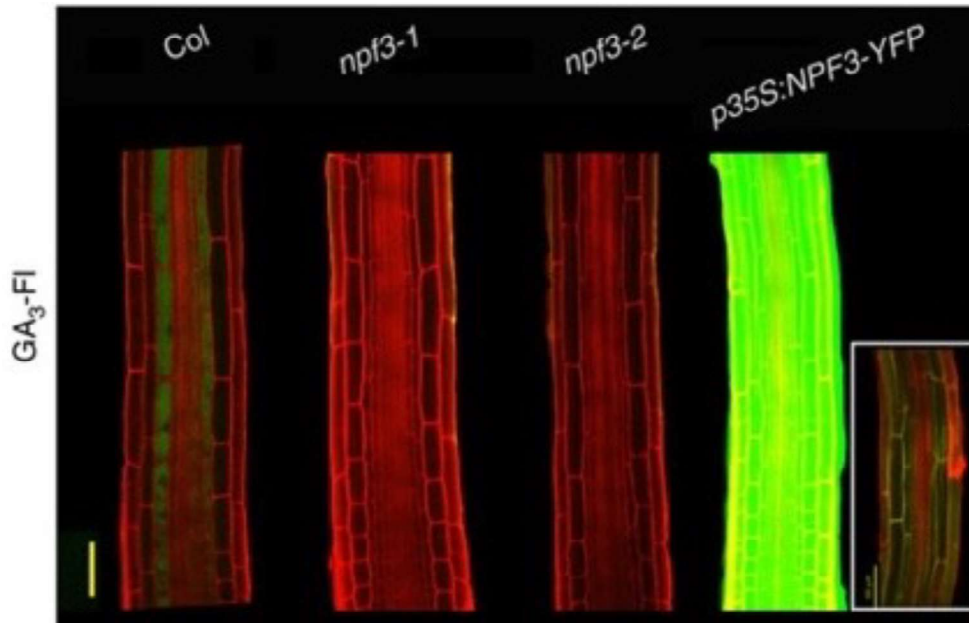


Figure 39 : La mutation *npf3.1* altère l'accumulation de GA-FI dans l'endoderme des racines

Analyse de la distribution de GA₃-fluorescéine dans la zone d'élongation de racines, après 3 heures d'incubation. Les mutations *npf3.1* et *npf3.2* provoquent une perte d'accumulation du signal dans les couches de l'endoderme. A l'inverse, la surexpression du transporteur *NPF3* induit une accumulation des GA₃-fluorescéines dans toutes les cellules de la racine.

(adaptée de Tal et al., 2016)

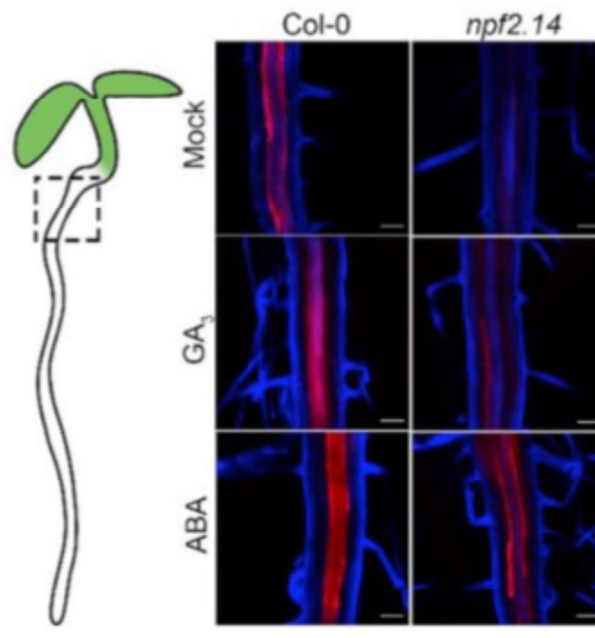


Figure 40 : La mutation *npf2.14* induit un défaut de subérisation des racines

Analyse confocale de racines de plantules, sauvage ou mutant *npf2.14*, âgées de 5 jours, après coloration au Nile red (marqueur de subérine). La mutation *npf2.14* provoque une perte de la coloration au Nile red. Des traitements avec des GA₃ à 5μM ou de l'ABA à 1μM ont été réalisés et ont conduit à une récupération de la coloration.

(adaptée de Binenbaum et al., 2023)

ont montré que la fluorescence de la molécule qui s'accumule normalement dans l'endoderme de la racine est absente chez le mutant *npf3.1*, confirmant le rôle primordial de ce transporteur pour la translocation de GA dans l'endoderme et la croissance de la racine (Figure 39) (Tal et al., 2016; Ubeda-Tomás et al., 2008). Il est à noter que NPF3.1 montre également une activité d'import d'ABA en système hétérologue (Tal et al., 2016).

Enfin, une étude récente du laboratoire, réalisée en collaboration, a caractérisé 3 nouveaux transporteurs de GA, toujours au sein de la famille des NPF. Il s'agit de NPF2.12, NPF2.13 et NPF2.14 (Binenbaum et al., 2023). Alors que NPF2.12 et NPF2.13 sont localisés au niveau de la membrane plasmique des cellules, NPF2.14 est localisé dans la membrane de la vacuole est représentée à ce jour le premier transporteur subcellulaire de GA décrit (Binenbaum et al., 2023). Des études réalisées en ovocytes de *Xénope* ont confirmé que ces 3 transporteurs ont une activité d'import de GA, mais aussi d'ABA. En s'appuyant sur une approche génétique et de modélisation, il a été proposé que ces transporteurs favorisent l'accumulation de GA et d'ABA dans l'endoderme et le péricycle des racines, nécessaire à la subérisation (Figure 40)(Binenbaum et al., 2023). Cette étude a aussi mis en lumière que NPF2.12 et NPF2.13, localisés dans les cellules compagnes du pétiole des feuilles, facilitent le chargement de GA₁₂ dans le phloème, contribuant ainsi à l'accumulation de GA bioactives dans les racines (Binenbaum et al., 2023).

3.4.2.2 Les transporteurs de GA identifiés en systèmes hétérologues

Depuis une dizaine d'années, plusieurs cribles ont été menés dans le but d'identifier de nouveaux transporteurs de GA. Ces cribles ont été réalisés dans deux systèmes hétérologues différents, en levure et en ovocytes de *Xénope*. Chacun de ces cribles a permis d'identifier un grand nombre de transporteurs candidats au transport de GA.

Le premier crible, réalisé en 2015, s'appuie sur un système modifié du double hybride en levure (Chiba et al., 2015). Le principe est le suivant. Des levures sont cotransformées avec des plasmides qui expriment le récepteur des GA *GID1a* fusionné au domaine DBD (DNA binding Domain), la protéine *DELLA GAI* fusionnée au domaine AD (Activation Domain), et un

Système Double Hybride Chez la levure	Système d'ovocytes de Xénope (GA peu perméables)
NPF 1.1	NPF 1.1
NPF 1.2	NPF 1.2
	NPF 2.1
NPF 2.3	NPF 2.3
NPF 2.4	NPF 2.4
NPF 2.5	NPF 2.5
NPF 2.6	
NPF 2.7	NPF 2.7
	NPF2.9
NPF 2.10	
NPF 2.12	NPF 2.12
NPF 2.13	NPF 2.13
NPF 3.1	NPF 3.1
NPF 4.1	NPF 4.1
NPF 4.2	
NPF 4.5	
NPF 4.6	NPF 4.6
NPF 5.1	
NPF 5.2	
NPF 5.6	
NPF 5.7	
NPF 6.3	
NPF 8.2	

Tableau 1: Récapitulatif des transporteurs NPFs présentant des capacités d'import de GA, en systèmes hétérologues

Deux cribles en systèmes hétérologues ont permis de tester les capacités de transports des différents membres de la famille des NPFs. Un premier crible a été réalisé dans un système double hybride modifié, chez la levure (Chiba et al., 2015). Le second crible repose sur un système d'ovocytes de Xénope et d'une analyse par LC-MS/MS (Wulff et al., 2019). Les auteurs des cribles ont différencié les GA peu perméables (qui ne diffusent pas) (GA_1 , GA_3 , GA_8 , GA_{19}) des GA perméables (GA_4 , GA_{24}). Les résultats présentés dans ce tableau correspondent aux capacités de transport des GA peu perméables par les NPFs.

plasmide qui exprime un transporteur candidat. Les levures sont ensuite incubées dans un milieu contenant des GA bioactives. Si le transporteur candidat est un transporteur de GA, ce dernier, localisé dans la membrane plasmique de la levure, va activement importer des GA au sein de la cellule. En présence de GA, le complexe GA/GID1a-DBD/GAI-AD se forme et active l'expression des gènes levant l'auxotrophie, permettant aux levures de se multiplier sur milieu sélectif. En utilisant cette stratégie, plus de 20 transporteurs appartenant à la famille des NPF ont montré une capacité d'import de GA (Tableau 1)(Chiba et al., 2015).

Le second crible, réalisé en 2019, est basé sur un test d'import de GA en ovocytes de Xénope. Pour ce test, les ovocytes sont préalablement transformés avec un ARN qui code pour un transporteur candidat, puis incubés pour une courte durée dans une solution contenant des GA. Après lavage, la quantité de GA incorporée par les ovocytes est déterminée par chromatographie en phase liquide, couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS)(Wulff et al., 2019). Pour le crible, les auteurs ont testé l'activité d'import de GA des 53 membres de la famille NPF, et l'analyse a révélé que 13 d'entre eux sont capables de transporter des GA (Tableau 1) (Wulff et al., 2019). De manière intéressante, cette analyse a également démontré que certaines formes de GA sont plus sujettes à la diffusion que d'autres formes. Ainsi, les GA hydroxylées en position c13 (Figure 22 ; ex. GA₁, GA₃, GA₈ et GA₁₉) diffusent très peu au contraire des formes non hydroxylées (GA₄ et GA₂₄).

Enfin, en comparant les résultats obtenus à partir des deux cribles réalisés en levure et en ovocytes de Xénope, nous pouvons constater que les membres de la sous-famille NPF2 sont surreprésentés. En plus de NPF2.10, NPF2.12 et NPF2.13 qui ont déjà été caractérisés (paragraphe 3.4.2.1. Transporteurs de GA caractérisés), les transporteurs NPF2.3, NPF2.4, NPF2.5 et NPF2.7 ont été identifiés comme transporteurs de GA dans les deux cribles. Bien que ces derniers n'ont pas encore été confirmés *in planta*, ils sont des candidats sérieux pour le transport de GA.

3.5 Objectifs de la thèse

Les GA jouent un rôle crucial dans le développement et la croissance des plantes tout au long de leur cycle de vie. Du fait de leur importance, la distribution spatio-temporelle des

GA est finement régulée à différents niveaux pour adapter la croissance des plantes aux facteurs de l'environnement. Parmi les mécanismes de régulation, le transport de GA exerce un rôle majeur. Bien que le transport de GA ait été mis en évidence il y a plus de 60 ans (Kato, 1958), son mécanisme et les transporteurs impliqués commencent seulement à être caractérisés. Dans le but d'approfondir nos connaissances sur le transport de GA, mon projet de thèse, subdivisé en 3 parties, a pour objectif principal d'identifier et de caractériser fonctionnellement des transporteurs de GA impliqués dans le mouvement local de GA (de cellule à cellule dans un tissu ou organe) et sur de plus longues distances, par le système vasculaire.

3.5.1 Transport local de GA

Dans les deux premières parties de ma thèse, mes recherches se sont focalisées sur le transport local de GA. En premier lieu, j'ai étudié l'importance du transport de GA dans la graine pour la germination, puis j'ai identifié les transporteurs impliqués. Dans une deuxième partie, j'ai étudié la fonction de certains membres de la sous-famille NPF2, pour le transport de GA dans la racine.

3.5.1.1 Le transport de GA lors de la germination

Les GA sont fondamentales pour promouvoir la germination de la graine, en agissant sur différents mécanismes de régulation. Parmi ces mécanismes, il a été mis en lumière que la rupture des téguments, comprenant les testa et l'endosperme, induite par les GA, représente une phase clé pour le succès de la germination (Lee et al., 2010). Les GA étant principalement produites dans l'embryon, il a été proposé qu'un transport de GA de l'embryon vers l'endosperme était indispensable pour induire la rupture des téguments (Lee et al., 2010). Pour étayer cette hypothèse, j'ai analysé finement où et quand étaient produites les GA dans la graine au cours de la germination. Puis, j'ai recherché et caractérisé les transporteurs impliqués dans la translocation des GA de l'embryon vers l'endosperme.

3.5.1.2 Le transport de GA au cours de la croissance racinaire

De précédentes études ont révélé que la distribution des GA dans la racine était contrôlée par un ensemble complexe de transporteurs de GA appartenant à la famille des NPF. NPF3 participe à la relocalisation de GA dans l'endoderme dans la zone d'élongation de la racine pour induire sa croissance (Tal et al., 2016; Ubeda-Tomás et al., 2008). Plus récemment, il a été rapporté que les transporteurs NPF2.12, NPF2.13 et NPF2.14 contribuaient au transport de GA dans la racine, nécessaire à la formation de subérine (Binenbaum et al., 2023). Pour poursuivre la caractérisation des transporteurs de GA dans la racine, j'ai étudié le rôle de 4 nouveaux membres de la sous-famille NPF2 (NPF2.3, NPF2.4, NPF2.5 et NPF2.7) qui sont majoritairement exprimés dans la racine et qui possèdent une activité de transport de GA en systèmes hétérologues (Chiba et al., 2015; Wulff et al., 2019), voir paragraphe 3.4.2.2.).

3.5.2 Transport longue distance de GA

De précédentes études menées au laboratoire ont montré l'existence d'un transport longue distance de GA₁₂, véhiculé par le système vasculaire, permettant une translocation acropète et basipète de la molécule (Regnault et al., 2015). En se basant sur le transport longue distance d'autres hormones, le laboratoire a émis l'hypothèse que des transporteurs de GA seraient requis pour le chargement et le déchargement de GA₁₂ dans les vaisseaux. Du ma thèse, le laboratoire a caractérisé deux transporteurs (NPF2.12 et NPF2.13) qui facilitent le chargement de GA₁₂ dans le phloème (Binenbaum et al., 2023). A ce stade, aucun transporteur impliqué dans la translocation acropète (xylémien) de GA₁₂ n'a été identifié. Afin d'identifier ces transporteurs, j'ai réalisé un crible génétique chez *Arabidopsis*, en utilisant la technique CRISPR/Cas9, qui présente l'avantage de muter avec efficacité plusieurs gènes d'intérêts. Dans ce but, j'ai utilisé la collection « Transporter CRISPR Library » générée par le Dr Eilon Shani (Université de Tel Aviv), composée d'une collection d'ARNs guides qui ciblent l'ensemble des transporteurs existants chez les plantes (Hu et al., 2023), et une lignée transgénique créée au laboratoire, qui produit des GA₁₂ essentiellement dans les racines.

Résultats

Chapitre 1 : Implication des GA pendant la germination de la graine, et rôle de leur transport

1 Introduction

Les graines, spécificités des spermatophytes (plantes à graines), qui incluent les gymnospermes et les angiospermes ; avec une différence notable, les Gymnospermes possèdent des graines nues, alors que les Angiospermes ont leurs graines protégées par des fruits (secs ou charnus).

Les graines matures sont le premier stade de la vie des plantes, elles existent à l'état dormant ou non dormant. La dormance permet une stabilité des graines dans le temps, de plusieurs semaines à plusieurs années, afin de maximiser la dispersion des graines et d'empêcher leur germination à la mauvaise saison. Elle est modulée par de nombreux facteurs, incluant des facteurs intrinsèques et environnementaux. Une fois toutes les conditions environnementales favorables réunies, les graines peuvent débuter le processus de germination en commençant par une étape d'imbibition, permettant la reprise progressive de l'ensemble du métabolisme de la graine (Bewley et al., 2013). La germination représente le premier processus développemental de la vie d'une plante, qui joue donc un rôle crucial dans la survie des espèces. Son importance a entraîné la mise en place d'une régulation très fine, impliquant, comme pour la dormance, une interaction avec les facteurs environnementaux et le programme génétique intrinsèque de la plante. Ainsi, les plantes augmentent leurs chances que la germination s'opère de façon optimale et assure la survie de la future plante.

Chez beaucoup d'espèces, incluant *Arabidopsis thaliana*, deux phytohormones régulent principalement la germination, du fait de leur rôle antagoniste : les GA et l'ABA. L'acide abscissique induit et maintient la dormance des graines, inhibant ainsi, la germination (Nambara et al., 2010). Et, les Gibbérellines promeuvent la germination (Koornneef et van der Veen, 1980).

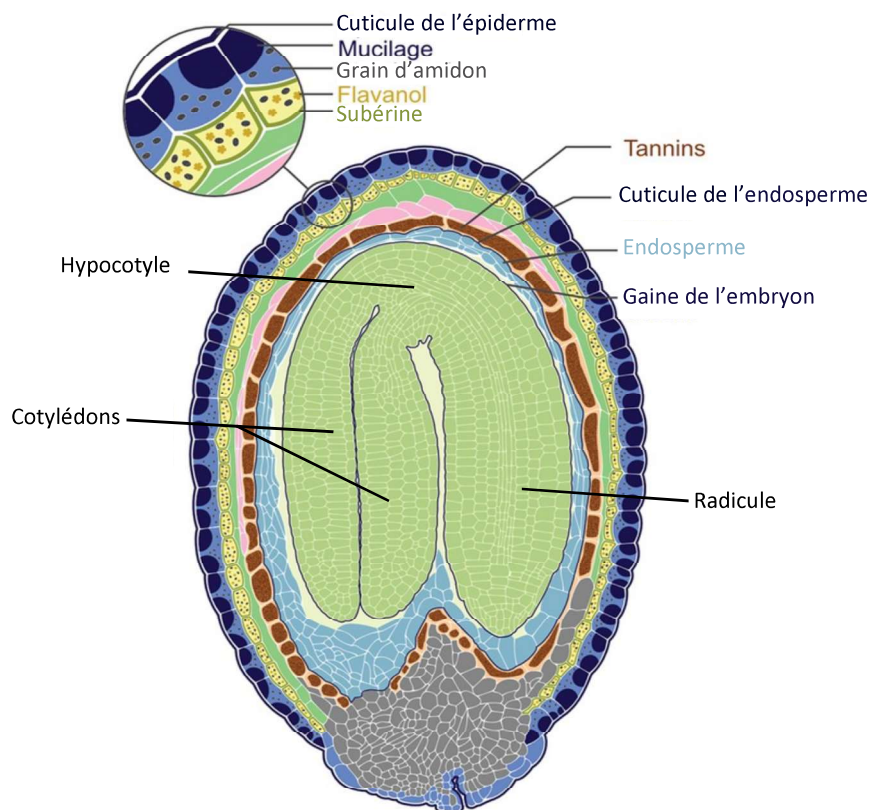


Figure 41 : Schéma d'une graine mature d'*Arabidopsis thaliana*

Représentation schématique des différentes structures d'une graine mature d'*Arabidopsis thaliana*. L'embryon, ici représenté en vert, est composé d'un axe embryonnaire sur lequel s'articulent deux cotylédons, un hypocotyle et une radicule. Les téguments sont composés à la fois de l'endosperme (représenté en bleu clair) et des testas détaillés dans l'agrandissement.

(Adaptée de Verma et al., 2022)

1.1 Structure de la graine mature

Le cycle de vie des angiospermes se conclue par une reproduction sexuée entre l'ovule (femelle) et le pollen (mâle), qui donnera naissance aux graines. Les graines sont par la suite propagées dans l'environnement, afin de générer de nouveaux individus et de perpétuer l'espèce. Les graines produites diffèrent par leur taille, couleur, structure, composition, selon les espèces, et en fonction des conditions environnementales ainsi que des voies de propagations. A la fin de leur maturation, les graines subissent un processus de post-maturation qui provoque une diminution progressive de leur contenu en eau. Les graines ainsi sèches, présentent une activité métabolique réduite et restent viables de nombreuses années, permettant une meilleure survie de l'espèce.

1.1.1 Embryon

À la suite de la reproduction sexuée entre les gamètes mâles et femelles, un zygote diploïde est formé et subi une embryogénèse pour générer l'embryon. Pendant le développement du zygote, un certain nombre de structures sont mises en place. Dans la région apicale de l'embryon se développera le méristème apical caulinaire protégé par les cotylédons (Figure 41). Dans la région médiane se forme l'hypocotyle, cylindre dans lequel sont disposés en couches concentriques l'épiderme, les tissus fondamentaux et vasculaires, et dans la région basale, la radicule (Figure 41)(Dolan et al., 1993; Scheres et al., 1994). Une fois que la graine germe, la radicule forme la première racine et les cotylédons les premières 'feuilles' et ensuite, le méristème apical caulinaire prend le relai pour développer la nouvelle plant(ul)e.

1.1.2 Téguments

Les téguments (ou spermoderme) des graines sont formés de deux structures : les testa à l'extérieur, composés de cellules mortes, lors de l'achèvement de la maturation de la graine, et qui protègent la graine, comme barrière mécanique ; Et l'endosperme, plus interne, qui entoure l'embryon, et possède un double rôle de supplémentation nutritive et de régulation de la germination.

1.1.2.1 Testa

Les téguments de l'ovule correspondent aux testas composés de 5 couches cellulaires. Les deux couches extérieures, qui proviennent des téguments externes de l'ovules, produisent des granules d'amidon, des flavanols (essentiellement des tanins) et de la subérine (Figure 41)(Golz et al., 2018; Francoz et al., 2018). La couche la plus externe produit du mucilage s'accumulant spécifiquement au coin externe de la cellule (Verma et al., 2022). Parmi les trois couches internes, qui sont issues des téguments internes de l'ovules, la couche la plus interne produit des pro-anthocyanidines, qui s'oxyderont pour donner la coloration brune aux testas (Verma et al., 2022). Les graines mutantes *transparent testa (tt)*, présentant des testas transparents montrent des défauts de synthèse des flavonoïdes et des anomalies dans la structure et le fonctionnement de l'endosperme (Debeaujon et al., 2000). De plus, les testas sont entourés par deux couches de cuticule, interne et externe, améliorant l'imperméabilité des graines (Figure 41)(Bewley et al., 2013; Chandra et al., 2017). Enfin, les testas jouent aussi un rôle dans le maintien de la dormance primaire des graines (Debeaujon et al., 2000).

1.1.2.2 Endosperme

En dessous des testas, se déploie l'endosperme, formé d'une seule couche de cellules vivantes. Les angiospermes ont la particularité, comparée aux autres Spermaphytes, d'avoir mis en place une double fertilisation entre : un gamète mâle (pollen) et l'oosphère, qui constituent le zygote (diploïde) donnant naissance à l'embryon ; et un gamète mâle et les deux noyaux centraux accessoires du sac embryonnaire, qui génèrent un tissu nourricier triploïde,

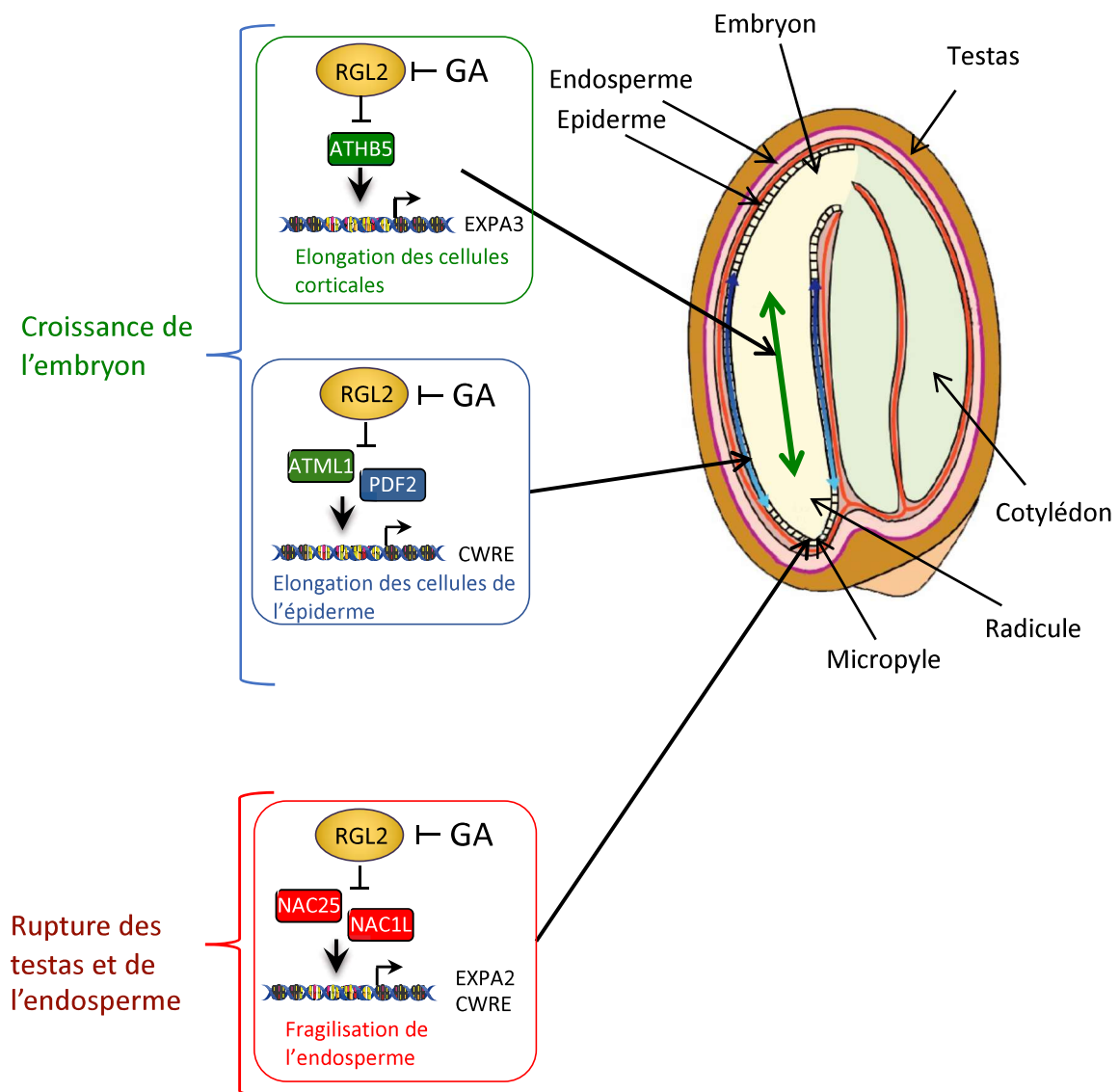


Figure 42 : Représentation des évènements concomitants permettant la germination des graines

Les GA promeuvent la germination à la fois par la stimulation de la croissance de l'embryon et la fragilisation des testas et de l'endosperme.

La croissance de l'embryon médiée par les GA survient suite à la dégradation de la protéine RGL2 qui inhibe l'action de différents facteurs de transcription. Parmi ces facteurs de transcription, nous retrouvons ATHB5 qui induit l'élongation cellulaire des cellules corticales ou encore ATMHL1 et PDF2 impliqués dans la l'élongation des cellules de l'épiderme.

Les GA induisent la fragilisation des téguments en activant la dégradation de la protéine RGL2, libérant ainsi, des facteurs de transcription tels que NAC25 et NAC1L, qui stimulent en retour, la production des enzymes CWRE, tels que EXPA2.

(Adaptée de Carrera-Castano et al., 2020)

l'albumen. En français, le terme endosperme désigne le tissu de réserve haploïde s'étant développé à partir du prothalle femelle, chez les Gymnospermes. Dans ma thèse, j'ai décidé d'utiliser le terme 'endosperme' pour désigner l'albumen des graines d'*Arabidopsis thaliana*, afin de faciliter la compréhension vis-à-vis de la langue anglaise, qui ne possède pas de terme équivalent à « albumen » et qui parle donc d'endosperme (Figure 41). Ce tissu nourricier accumule une forte proportion de protéines et de lipides sous forme de triacylgérols, qui seront par la suite catabolisés en saccharose, au cours de la germination (Penfield et al., 2004). De plus, cette même étude, a mis en lumière le fait que la composition lipidique diffère entre l'embryon et l'endosperme, celui-ci possédant une plus grande quantité d'acide palmitique et vaccénique (Penfield et al., 2004). Les gènes exprimés abondamment dans l'endosperme sont pour beaucoup impliqués dans la mobilisation des réserves, les modifications des parois cellulaires, le métabolisme des carbones ou le transports de métabolites (Penfield et al., 2006). De plus, l'endosperme apporte une protection mécanique pour les graines matures, régulant par la même occasion, la germination (Yan et al., 2014). La zone de l'endosperme adjacente à la radicule, le micropyle, joue un rôle important durant la germination (Figure 41). L'endosperme dans les graines en germination présente une forte sensibilité à l'ABA, ainsi qu'aux GA (Penfield et al., 2006; Bethke et al., 2007).

1.2 Le processus de germination

Le processus de germination nécessite une imbibition préalable des graines matures non dormantes, qui délimite la fin de la période de repos de la graine. La réhydratation des tissus induit la reprise de l'activité métabolique de la graine, qui sera plus tard nécessaire à sa germination (Holdsworth et al., 2008).

A la suite de l'imbibition, deux processus concomitants impliquant les différents tissus de la graine ont lieu (Figure 42). La germination est permise par un équilibre entre les contraintes physiques imposées par les téguments et la capacité de croissance et de protrusion de l'embryon (Finch-Savage et Leubner-Metzger, 2006).

Le premier processus est la fragilisation des téguments, qui permet en partie de réguler la germination. C'est la modification des parois cellulaires, des cellules de la région du

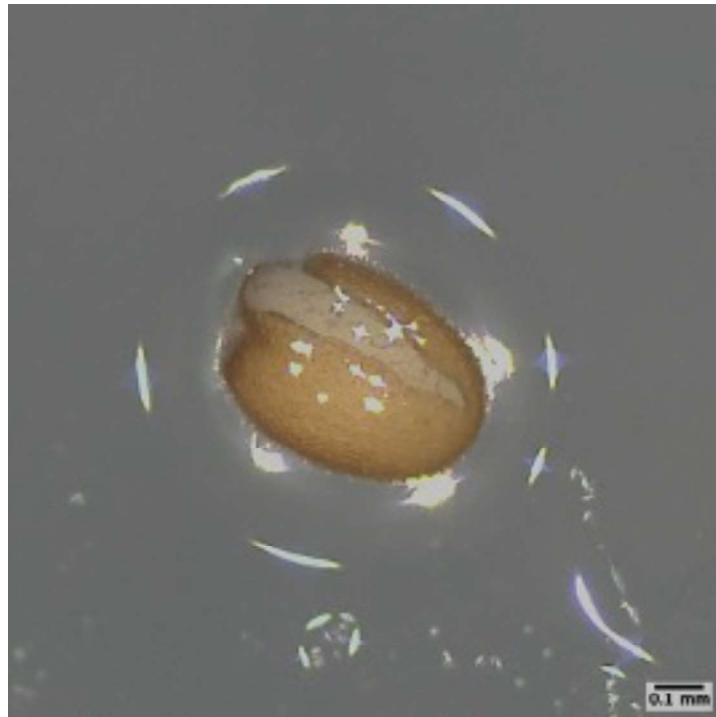


Figure 43 : Image représentative de la rupture des téguments d'une graine

Photo d'une graine d'*Arabidopsis*, après 24 heures d'imbibition, représentative de la rupture des téguments.

micropyle, qui induit une fragilisation de cette zone. Les parois cellulaires composées notamment de cellulose, hémicellulose et pectine seront modifiées par des CELL-WALL REMODELING ENZYME (CWRE), afin de les fragiliser (Yan et al., 2014). Le rôle que joue l'endosperme sur la rupture des testas n'a pas encore été totalement identifié, deux hypothèses existent : l'endosperme est susceptible de sécréter des enzymes lytiques pour fragiliser les testa ou l'expansion de l'endosperme induit une pression mécanique sur les testas causant leur rupture (Figure 43)(Holdsworth et al., 2008). Le second processus est la croissance de l'embryon, notamment l'élongation de la radicule qui induit une pression mécanique sur les téguments. Une étude a mis en évidence que les cellules basales de l'hypocotyle au niveau de la jonction avec la radicule sont les premières à s'allonger durant la germination, suivies des cellules proches de la jonction avec les cotylédons (Figure 42) (Sliwinska et al., 2009). De plus, cette même étude a révélé que l'achèvement de la germination est possible grâce à l'expansion cellulaire et non à la division des cellules dans la zone de l'hypocotyle, adjacente à celle de la radicule (Sliwinska et al., 2009).

Après l'action combinée de la fragilisation des téguments et de la croissance de l'embryon, permettant la rupture des téguments, l'embryon va continuer à s'accroître jusqu'à protrusion de la radicule en dehors des téguments. Il est généralement admis que le processus de germination est complet quand la croissance de l'embryon outrepassé les contraintes mécaniques imposées par les téguments (Finch-Savage et Leubner-Metzger, 2006).

La fin du processus de germination aboutit sur développement de l'embryon qui demande une utilisation efficace des réserves endogènes et des ressources présentes dans l'environnement, comprenant l'accès à la lumière, à l'eau et au nutriments (Martin et al., 2002). La racine croît et pénètre dans le sol afin d'y puiser les ressources indispensables à la plantule (Peer et al., 2009). Les cotylédons s'ouvrent et une accumulation de chlorophylle entraîne leur verdissement, ainsi que le début de leur activité photosynthétique (Zhong et al., 2009). Leur système vasculaire encore précoce se développera pour permettre les échanges acropètes et basipètes de composés (Peer et al., 2009).

La germination est un processus contrôlé par divers facteurs environnementaux tels que la lumière, la température, les nutriments et l'eau, évitant en conséquence, que les graines ne germent sur leur plante mère, et permettant ainsi, que ce processus se déroule uniquement lorsque les conditions environnementales sont favorables (Oh et al., 2007; Yamauchi et al., 2004; Matakias et al., 2009; Bai et al., 2012). Certains facteurs inhibent la germination, alors que d'autres la stimulent, c'est le cas de la température et la lumière qui provoquent des changements au niveau transcriptomique dans la graine (Finch-Savage et Leubner-Metzger, 2006). A la suite de cette découverte, il a été supposé que ces changements transcriptomiques agissent sur les métabolismes et la signalisation de certaines phytohormones. En réponse à cette hypothèse, des études ont été réalisées et ont mis en évidence, qu'en effet, des signaux environnementaux peuvent réguler le métabolisme de certaines phytohormones (notamment les GA et l'ABA) dans la graine (Seo et al., 2009; Nambara et al., 2010).

1.2.1 Régulation hormonale de la germination

1.2.1.1 L'ABA et la dormance des graines

L'ABA s'accumule dans les graines au cours de leur développement, principalement durant les derniers stades, pour induire : l'accumulation des réserves, l'arrêt de croissance de l'embryon, la dessiccation des graines et surtout leur dormance. La dormance permet de retarder la germination, empêchant la viviparité et maximisant la dispersion des graines, en attendant que les conditions soient réunies pour leur germination.

Durant les premières étapes de maturation et les étapes dites de mi-maturation des graines, l'ABA est majoritairement synthétisé dans les tissus maternels et est transporté dans les graines en maturation où l'hormone est accumulée (Karssen et al., 1983). La fin de maturation des graines, ainsi que l'induction de la dormance, sont permises en grande partie par une synthèse d'ABA dans les tissus embryonnaires (Karssen et al., 1983; Debeaujon et Koornneef, 2000). La dormance débute une fois que la graine n'est plus dépendante de sa plante mère et que l'ABA synthétisé *de novo* est stocké (Gutierrez et al., 2007). Il a été mis en évidence qu'une étape spécifique de la voie de biosynthèse d'ABA, durant laquelle les

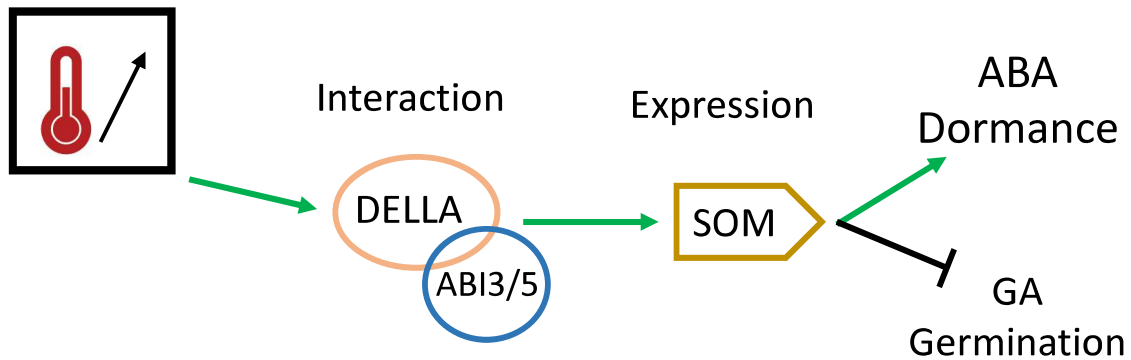


Figure 44: Exemple de régulation de la dormance par un facteur environnemental

Modèle illustrant une partie la régulation hormonale, moléculaire et environnementale de la germination et de la dormance. L'augmentation forte de la température favorise l'interaction entre les protéines DELLA, ABI3 et ABI5. Ce complexe induit l'expression de SOM qui activera la dormance par induction de l'ABA et inhibera la germination par répression des GA.

Acide Abscissique : ABA ; ABSCISSIC ACID INSENSITIVE 3/5 : ABI3/5 ; Protéine DELLA : DELLA ; SOMNUS : SOM ; Gibbérelline : GA

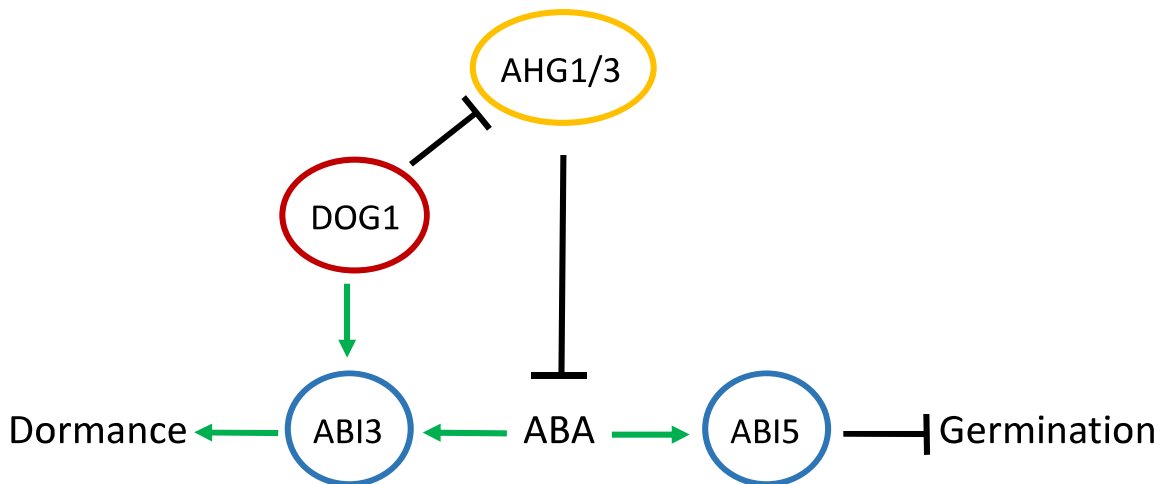


Figure 45 : Modèle d'un des mécanismes moléculaires régulant la dormance

Modèle illustrant une partie la régulation hormonale et moléculaire de la germination et de la dormance. L'ABA active la dormance par l'induction d'ABI3 et réprime la germination par l'induction d'ABI5. DOG1 induit la dormance en activant à la fois l'activité d'ABI3 et en réprimant l'activité de AHG1 et AHG3 qui inhibent l'action de l'ABA.

Acide Abscissique : ABA ; ABSCISSIC ACID INSENSITIVE 3/5 : ABI3/5 ; ABA-HYPERSENSITIVE GERMINATION 1/3 : AHG1/3; DELAY OF GERMINATION-1 : DOG1; Gibbérelline : GA

caroténoïdes sont clivés par les 9-*cis* epoxy-carotenoid dioxygenase (NCED), constitue une étape de régulation clé pour le contrôle de l'accumulation d'ABA (Sano et Marion-Poll, 2021). En effet, l'analyse de plusieurs mutants (*ncde*) a montré une contribution majeure de certains d'entre eux, pour la production d'ABA et l'induction de la dormance (Lefebvre et al., 2006; Frey et al., 2012). La tolérance à la dessiccation, ainsi que la dormance sont favorisées par différents facteurs de transcription (FT) tels que les LEAFY COTYLEDON 1 (LEC1) et LEC2, l'ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3) et FUSCA3 (FUS3) plus communément regroupés sous le terme de « LAFL protéines ». Ces FT stimulent la dormance en grande partie en induisant l'accumulation d'ABA dans les graines (Penfield, 2017). Le phénomène de dormance est défini comme étant l'incapacité des graines matures viables à germer lors de conditions favorables (Hilhorst et Koornneef, 2007). Deux types de dormance, séparés dans le temps, sont distinguables.

La dormance primaire est établie à la fin de la maturation des graines et modulée par l'ABA (Bewley et al., 2013). Elle perd de son efficacité au fil du temps, rendant les graines plus sensibles aux conditions environnementales favorables. La production d'ABA dans l'endosperme, stimulée par RGL2 (protéine DELLA), ainsi que son transport dans l'embryon permet de contrôler la croissance de l'embryon et de maintenir la dormance de la graine (Lee et al., 2010). Cette même protéine stimule la synthèse et l'activité du facteur de transcription ABI5, impliqué dans la répression de la germination (Piskurewicz et al., 2008). Chez *Arabidopsis*, les signaux indiquant la présence de lumière et d'une haute température semblent être intégrés par le gène SOMNUS (SOM) (Sano et Marion-Poll, 2021). Quand les graines subissent de fortes températures, ABI3 et ABI5 vont former un complexe avec des protéines DELLA qui se lieront au promoteur de SOM pour activer son expression (Figure 44) (Lim et al., 2014). A cela, s'ajoute le fait que SOM participe à une rétroaction positive avec les protéines DELLA, ABI3 et ABI5, afin d'activer la synthèse d'ABA et d'inhiber celle de GA (Sano et Marion-Poll, 2021). Plusieurs ABA INSENSITIVE MUTANTS (*abi1 – abi3*) sont affectés dans la dormance de leur graines et sont capables de germer malgré des traitements à l'ABA exogènes suffisants pour inhiber la germination de graines sauvages (Koornneef et al., 1984). Le principal régulateur de la dormance primaire, DELAY-OF GERMINATION-1 (DOG1), agit avec l'ABA, afin de réprimer la germination. Pour ce faire, il réprime l'activité des protéines ABA-HYPERSENSITIVE GERMINATION 1 (AHG1) et AHG3, afin d'améliorer la sensibilité de la graine

à l'ABA et maintenir la dormance (Figure 45)(Née et al., 2017). L'action combinée de l'ABA et de DOG 1 est nécessaire à l'établissement de la dormance ; en effet, une augmentation de la concentration d'ABA chez le mutant simple *dog1* et inversement une surexpression de DOG1 chez le mutant *aba1* ne permet pas la mise en place de la dormance (Nakabayashi et al., 2012).

La dormance secondaire, quant à elle, peut être induite dans des graines matures imbibées, quand les conditions environnementales sont défavorables (Finch-Savage et Leubner-Metzger, 2006). Le catabolisme de l'ABA joue un rôle crucial dans la régulation de la concentration d'ABA et la levée de la dormance des graines imbibées. Un traitement avec un inhibiteur d'ABA promeut la germination des graines dormantes chez *Arabidopsis* (Debeaujon et Koornneef, 2000). Une température forte peut conduire à l'inhibition de la germination, en partie grâce à l'action du Phytochrome D (PHYD) qui module la dormance secondaire et qui induit la dégradation du PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 1 (PIF1), ce qui favorise l'accumulation d'ABA (Martel et al., 2018). Un passage au froid et à l'obscurité, conditions similaires à la saison hivernale, permet d'initier la levée de la dormance (Hauvermale et al., 2015).

La dormance est levée après imbibition des graines par la dégradation de l'ABA et la concomitante activation de la synthèse de GA. La balance entre les deux hormones intègre la lumière, la température et le nitrate (Sano et Marion-Poll, 2021). Les facteurs environnementaux qui permettent de lever la dormance, le font via l'induction des CYTOCHROME P450 707A (CYP707A), impliqués dans le catabolisme de l'ABA (Penfield, 2017). Suite à l'imbibition des graines, l'expression de *CYP707A* est rapidement induite, la réduction de la quantité d'ABA dans les graines imbibées commence à être visible 6 heures après le début de l'imbibition (Preston et al., 2009).

1.2.1.2 Les GA et la germination

L'importance des GA pour la germination est connue depuis de nombreuses années. En effet, les plantes mutées pour la biosynthèse de GA présentent des défauts de germination (Koornneef et van der Veen, 1980). Ces défauts ont pu être confirmés quelques années plus tard, suite à la caractérisation de la voie de biosynthèse des GA et des mutants associés,

comme par exemple pour le mutant *ga1-3*, qui ne peut germer sans un apport exogène de GA bioactives (Debeaujon et Koornneef, 2000). Les GA induisent la germination des graines d'*Arabidopsis* par deux mécanismes distincts et simultanés.

Le premier mécanisme d'action des GA est de promouvoir la croissance de l'embryon, en induisant la multiplication et l'élongation des cellules. Pour ce faire, les GA induisent la dégradation du répresseur de croissance RGL2, protéine DELLA majoritaire dans les graines. La transcription de *RGL2* augmente rapidement au début de l'imbibition des graines, puis diminue au cours de la germination (Figure 42)(Lee et al., 2002). RGL2 inhibe la croissance de l'embryon en réprimant l'activité de divers facteurs de transcription, les empêchant d'activer la transcription de protéines. C'est le cas par exemple du FT ATHB5 qui, quand il n'est pas réprimé par RGL2, active la transcription de l'ALPHA EXPANSINS3 (*EXPA3*), afin d'induire l'élongation des cellules corticales ou encore des FT ATML1 et PROTODERMAL FACTOR 2 (*PDF2*) qui induisent l'expression de CWRE importantes pour l'élongation des cellules de l'épiderme (Figure 42)(Stamm et al., 2017; Rombolá-Caldentey et al., 2014). L'expansion de l'axe embryonnaire, médiée par les GA, permet du côté de l'hypocotyle de favoriser la rupture des téguments et du côté de la radicule de favoriser sa protrusion à travers les téguments (Stamm et al., 2017). L'action des GA dans l'épiderme de l'embryon, le long de l'axe embryonnaire, est requise pour une germination complète (Rombolá-Caldentey et al., 2014; Nobusawa et al., 2013).

Le second mécanisme d'action des GA est d'induire la rupture des téguments, barrière mécanique empêchant la protrusion de la radicule. Pour ce faire, les GA activent l'expression de différentes CWRE qui induiront des modifications spécifiques de la paroi cellulaire des cellules du micropyle de l'endosperme permettant ainsi, la fragilisation et sa rupture (Figure 42)(Sechet et al., 2016; Zhang et al., 2014b; Sánchez-Montesino et al., 2019). Par exemple, les GA promeuvent l'expression des FT NAC25 et NAC1 LIKE (*NAC1L*), par la dégradation de RGL2, qui vont ainsi, pouvoir activer la transcription de CWRE incluant *EXPA2* et induire la fragilisation du micropyle (Figure 42) (Sánchez-Montesino et al., 2019). Plusieurs autres CWRE ont déjà été étudiées et caractérisées telles que l'endo- β -1,3 glucanase, la β - 1,4 man-non endohydrolase, l'EXTENSIN-LIKE PROTEIN1 (*AtERP1*) et bien d'autres (Leubner-Metzger et al., 1995; Sánchez et De Miguel, 1997; Dubreucq et al., 2000; Holdsworth et al., 2008). Le

micropyle de l'endosperme est un régulateur clé de la germination, car sa fragilisation et sa rupture sont déterminantes pour permettre ce processus.

1.2.2 Les contraintes mécaniques

Durant le processus de germination deux forces opposées s'affrontent, le potentiel de croissance de l'embryon et la barrière physique, que lui imposent les téguments.

Les cellules végétales se développent de manière contrôlée, leur expansion est possible par une force motrice liée à l'absorption de l'eau, couplée à une diminution de la turgescence permise par le relâchement des contraintes de la paroi cellulaire (Fry, 2004; Schopfer, 2006). Le relâchement de la paroi cellulaire s'établit par l'éloignement des polymères qui la composent, permettant ainsi, l'expansion de la cellule en raison de l'afflux d'eau dans la vacuole. Les acteurs de ce phénomène sont les CWRE. Le développement de l'embryon nécessaire pour la germination et la protrusion de la radicule sont le résultat d'une croissance cellulaire, et non de la division (Sliwinska et al., 2009). L'augmentation de l'extensibilité de la paroi cellulaire de l'embryon augmente les contraintes des couches le recouvrant (Steinbrecher et Leubner-Metzger, 2016).

L'affaiblissement de l'endosperme est nécessaire à la germination des graines d'*Arabidopsis*, ce tissu à lui seul est suffisant pour empêcher la germination (Bethke et al., 2007). Ce phénomène comprend une rupture précoce des réserves, favorisée par les GA (Bethke et al., 2007). L'expression des différentes CWRE dans l'endosperme permet un remodelage de la paroi cellulaire, avec pour cible, les micro-fibrilles de cellulose ou directement les polysaccharides (Morris et al., 2011; Scheler et al., 2014). A cela, s'ajoute une séparation cellulaire par perturbation de l'adhésion cellulaire et une mort cellulaire programmée et localisée, qui s'additionnent/contribuent aussi à la fragilisation de l'endosperme (Bethke et al., 2007; Morris et al., 2011).

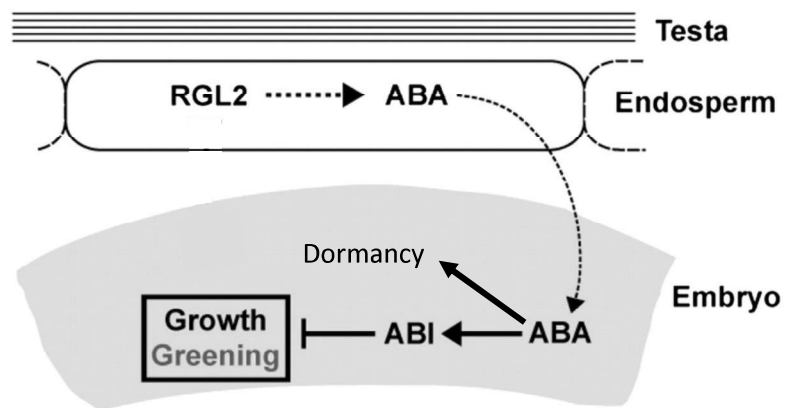


Figure 46 : Modèle d'interaction entre l'embryon et l'endosperme

Modèle illustrant la répression de la croissance de l'embryon médiée par l'ABA et l'endosperme durant la dormance des graines. La dormance inhibe l'action des GA, ainsi RGL2 peut induire la synthèse d'ABA dans l'endosperme. L'ABA sera ensuite transporté dans l'embryon où il inhibera la croissance de celui-ci.

(adapté de Lee et al, 2010)

1.3 Communication entre l'embryon et l'endosperme

Une communication bidirectionnelle entre l'embryon et l'endosperme est essentielle au bon déroulement des processus de dormance et de germination.

Plusieurs études ont déjà mis en avant, l'existence d'un transport de l'endosperme vers l'embryon notamment par des expériences de « Bedding » consistant à mettre en contact des embryons et des téguments, après différents temps d'imbibition et/ou de différents génotypes. Cette technique a permis de montrer que l'ABA produit dans l'endosperme est transporté dans l'embryon, afin d'y maintenir la dormance (Figure 46) (Steinbrecher et Leubner-Metzger, 2016). Depuis, d'autres études ont été réalisées et des transporteurs d'ABA potentiellement impliqués dans l'exportation d'ABA de l'endosperme vers l'embryon, ont été identifiés. C'est le cas des transporteurs ABCG25 et ABCG31, tous deux exporteurs d'ABA, possiblement impliqués dans la modulation de la croissance de l'embryon par l'ABA (Kang et al., 2015). D'autres études ont émis l'hypothèse que les GA ou des molécules dérivés des GA seraient transportées de l'endosperme à l'embryon, pour induire l'expression de *LeABI3* (gène orthologue d'*ABI3*), chez la tomate (Bassel et al., 2006).

Inversement, plusieurs communications de l'embryon vers l'endosperme ont déjà été révélées. Il y a une vingtaine d'année, une étude a émis l'hypothèse de l'existence d'un transport d'ABA de l'embryon vers les téguments (Debeaujon et Koornneef, 2000). Un peu plus tard une étude a mis en avant que l'endosperme sécrète de l'ABA, afin de contrôler la croissance de l'embryon (Lee et al., 2010). Très récemment, il a été découvert que le transporteur NPF5.1 transporte de l'ABA dans l'endosperme, afin de maintenir son homéostasie durant la germination (Shimizu et al., 2022).

Une autre hypothèse émise est l'existence d'un signal, encore inconnu, allant de l'embryon à l'endosperme pour stimuler la répression de *RGL2* par les GA, afin d'activer les CWRE (Sánchez-Montesino et al., 2019).

Différents transporteurs d'ABA et GA se sont déjà révélés être plus ou moins indirectement impliqués dans le processus de germination des graines. Par exemple, le double mutant *sweet13 sweet14*, qui présente des graines plus grosses que celles d'une plante sauvage, montre une perte de sensibilité aux traitements avec de l'ABA ou du PAC (un

inhibiteur de biosynthèse de GA), permettant d'inhiber la germination de graines sauvages (Kanno et al., 2016). Un autre exemple est celui du transporteur NPF3, importeur de GA, qui est impliqué dans la germination dans des conditions de restriction de nitrate ; en effet, le mutant *npf3* montre une altération de ses capacités germinatives dans ces conditions. De plus, la surexpression de *NPF3* semble permettre aux graines une plus grande habilité à rompre la dormance (Tal et al., 2016; David et al., 2016).

1.4 Objectifs

Il est admis depuis les années 90, à partir d'études effectuées sur des graines d'orge, que les GA induisent la germination *via* leur action sur les téguments. Les graines d'orge, ainsi que des autres céréales, possèdent un endosperme très développé, incluant des cellules spécialisées pour le stockage de protéines de réserves (Olsen, 2001). Les GA produites dans l'embryon sont transportées dans les cellules de l'aleurone, afin d'induire l'expression du FT GA-regulated Myb (GAMyb) (Gubler et al., 1995). GAMyb induit par transactivation du promoteur, l'expression d'une α -amylase nécessaire à l'hydrolyse des cellules de l'aleurone (Gubler et al., 1995). Cette hydrolyse des cellules de l'aleurone est impliquée dans le processus de germination de la graine et la remobilisation des protéines de réserves, pour la croissance de l'embryon.

Cependant, chez *Arabidopsis* le mécanisme par lequel les GA promeuvent les CWRE dans l'endosperme, afin de permettre la fragilisation des téguments, est mal compris. Nous supposons, à l'instar de l'orge, qu'une forme de GA ou qu'un signal induit par les GA dans l'embryon, soit transporté dans l'endosperme, afin d'induire les différentes CWRE et d'initier la rupture des téguments. Aussi, pendant ma thèse, nous avons cherché à caractériser :

D'une part, la molécule de GA ou induite par les GA, produite dans l'embryon et transportée dans les téguments, afin d'initier le processus de germination ;

D'autre part, l'identification et la caractérisation de transporteurs impliqués dans cette translocation de l'embryon vers l'endosperme.

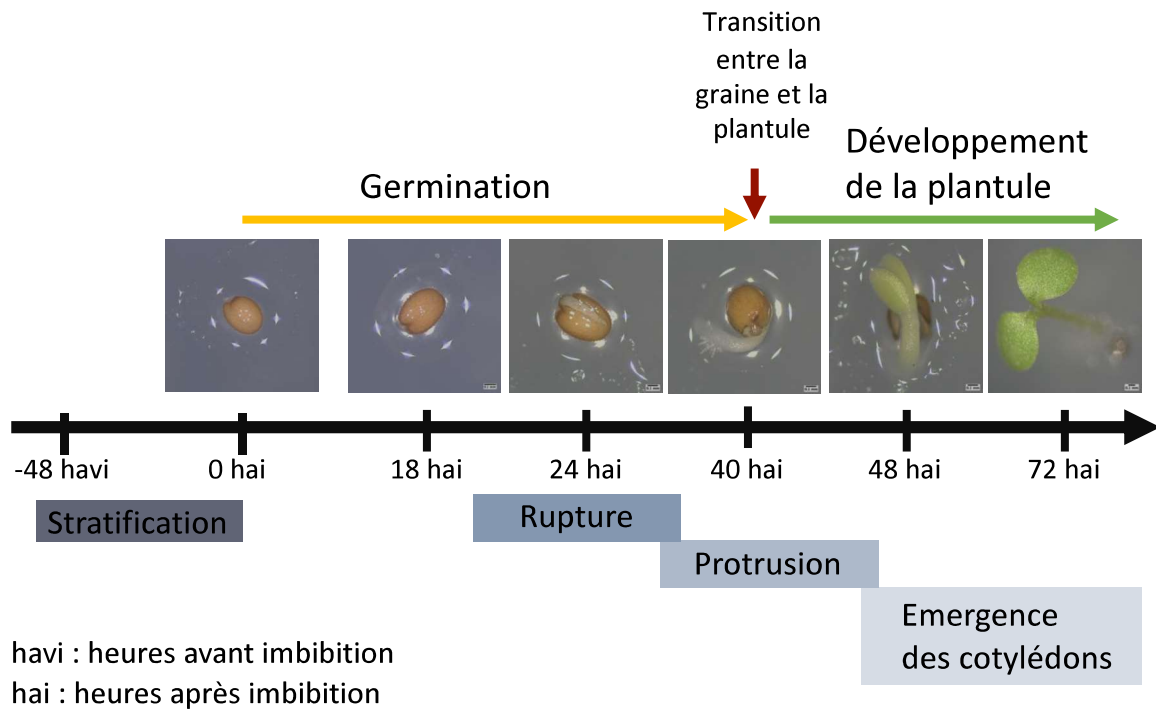


Figure 47 : Processus représentatif de la germination d'une graine sauvage d'*Arabidopsis*

Suite à l'initiation de l'imbibition des graines (temps 0 hai), la rupture des testas s'observe, précédant celle de l'endosperme, aux alentours de 24 hai. La protrusion de la racicule s'effectue de façon coordonnée après la rupture des testas, autour de 40 hai. Toutes les photos sélectionnées sont représentatives d'une centaine d'individus.

2 Résultats

Nous avons décidé d'utiliser un protocole commun et unifié pour la stratification, l'imbibition et la culture des graines pour l'ensemble des expériences réalisées. Ainsi faisant, nos résultats sont corrélables entre eux. Dans un premier temps, nos expériences ont été réalisées avec une imbibition des graines avec de l'eau sur papier Whatman, cependant nous avons remarqué une humidité variable avec ce type d'imbibition, entraînant dans certain cas, des résultats peu homogènes entre les répliques techniques (voir section 2.1.1.3 Matériels et Méthodes). C'est pour cela que dans un second temps nous avons réalisé nos expériences sur un milieu gélosé peu nutritif, où l'humidité est plus stable et les résultats plus homogènes au sein des répliques techniques (voir section 2.1.1.4 Matériels et Méthodes). Nous considérons comme « temps 0 » pour l'imbibition des graines, leur mise en culture et cela qu'elles soient stratifiées préalablement ou non. Ainsi, lorsque nous parlons de 6 heures d'imbibition cela signifie 6 heures après que les graines ont été mises en chambre de culture. Nos expériences ont été réalisées, en grosse majorité, avec une stratification préalable des graines. Cette stratification préalable permet de lever la dormance des graines et nous permet de limiter l'impact du transport d'ABA sur nos résultats. Limité cet impact est important étant donné que la plupart des transporteurs que nous avons étudiés sont à la fois des transporteurs de GA et d'ABA. De plus nous considérons pour l'ensemble des tests de germination (sauf exception pour les tests comprenant des dissections) que la germination est entière dès protrusion de la radicule (Figure 47).

2.1 Les GA sont nécessaires pour la germination

Bien qu'il soit connu et admis depuis de nombreuses années que les GA sont essentielles pour la germination, nous avons cherché à comprendre lequel des deux grands processus contrôlés par les GA, croissance de l'embryon et fragilisation des téguments, est limitant. Pour répondre à cette question, un test de germination a été réalisé avec des graines sauvages et mutantes pour la biosynthèse de GA, *ga3ox1 ga3ox2* et *ga20ox1 ga20ox2*

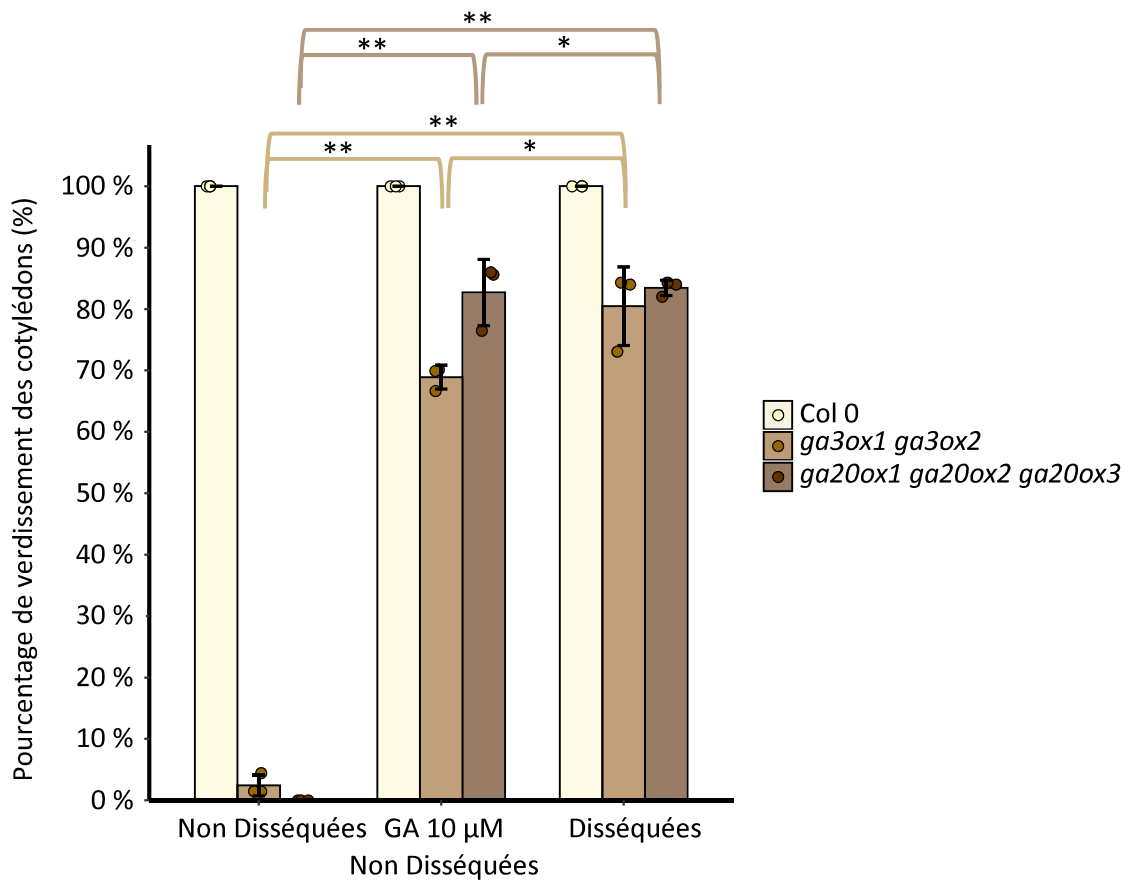


Figure 48 : Test de germination de mutants de biosynthèse de GA

Le comptage des cotylédons verts est réalisé 96h après le début de l'imbibition. Le pourcentage moyen est calculé à partir de 3 boîtes individuelles par génotype, pour chaque condition. Pour la condition « disséquées », les graines sont mises 3 heures à imbibition avant d'être disséquées. Par la suite, 50 embryons intacts sont replacés en imbibition.

Résultats discutés dans le texte.

L'erreur standard (moyenne de 3 boîtes, $n \geq 50$ graines) est indiquée par les barres d'erreurs.

Les étoiles sur le graphique indiquent des différences significatives (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,001$, ANOVA à 1 facteur, suivie du test de comparaisons multiples de Tukey).

ga20ox3, présentant un phénotype sévère dû au manque de GA bioactives (Figure 5 et 23) (Debeaujon et Koornneef, 2000; Plackett et al., 2012). Des graines entières ou disséquées (endosperme retiré mécaniquement), de chaque génotype, sont imbibées sur un milieu contenant ou non des GA bioactives, après une stratification préalable de 48h. Nous espérons ainsi, visualiser l'impact des GA et leur importance sur la fragilisation des téguments (Figure 48). Du fait de la dissection des graines, nous ne pouvons pas comptabiliser la germination par la protrusion de la radicule, comme pour le reste de nos expériences. Pour cette expérience, nous avons considéré le verdissement des cotylédons comme l'accomplissement de la germination et nous avons durant notre étude, comptabilisé le nombre de cotylédons ayant verdi, après 96 heures d'imbibition. Les résultats obtenus pour la lignée sauvage montrent que les cotylédons verdissent à des niveaux semblables et sans différences significatives, que ce soit avec et sans apport de GA exogènes et d'une dissection préalable ou non (Figure 48). Le double mutant *ga3ox1 ga3ox2* et le triple mutant *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3* ne présentent pas de verdissement des cotylédons, sur un milieu standard, car comme nous le savons déjà, ils ne sont pas capables d'accomplir le processus de germination (Debeaujon et Koornneef, 2000; Plackett et al., 2012). L'ajout de GA bioactives exogènes dans le milieu de culture permet une récupération très significative des capacités germinatives des deux mutants de biosynthèse de respectivement 70 et 80 %. Dans le cas des graines disséquées, autour de 80% de verdissement des cotylédons est observé pour les mutants. Une analyse statistique a mis en évidence que, pour les mutants de biosynthèse, les récupérations du potentiel de germination, observées avec application de GA exogènes ou après dissection, sont légèrement significatives entre elles, cependant moins prononcées qu'avec celles obtenues en comparaison du milieu standard. Les résultats obtenus confirment que les mutants de biosynthèse de GA ne sont pas capables de germer par eux-mêmes, dans des conditions classiques de culture, contrairement aux graines sauvages. Ainsi, le développement de l'embryon et des cotylédons n'est pas l'étape limitante du processus de germination. Cependant, il ne faut pas oublier que les GA exercent aussi un rôle essentiel pour le développement et la croissance de la plantule. Pris dans leur ensemble, ces résultats révèlent que la fragilisation des téguments induite par les GA, est l'étape limitante du processus de germination.

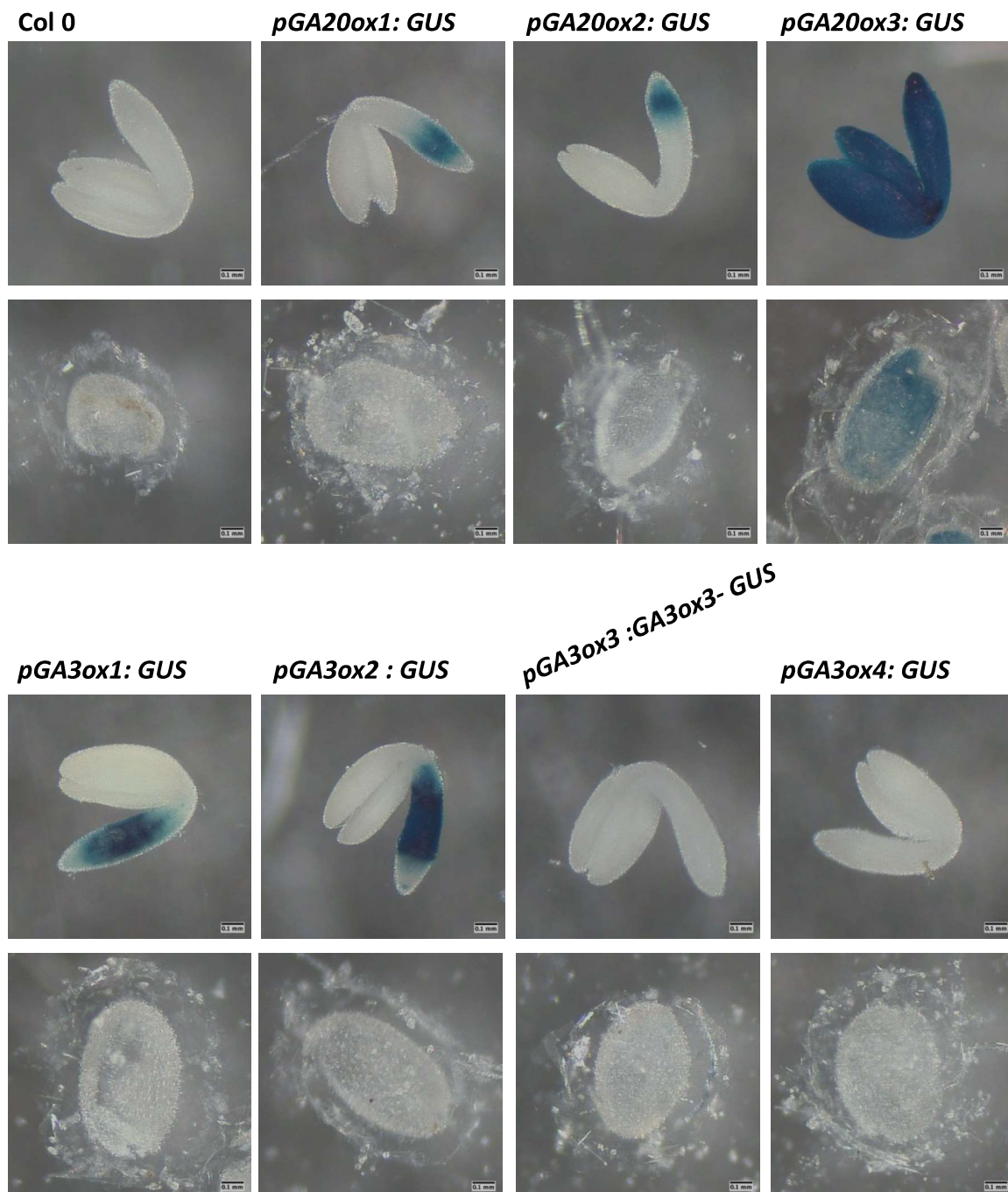


Figure 49 : Patterns d'expression des gènes de biosynthèse de GA dans la graine par coloration histochimique GUS

Les graines ont été disséquées 18h après imbibition, par la suite, une coloration a été réalisée sur les embryons et les téguments, séparément. Après incubation sur la nuit, l'observation révèle que les gènes étudiés de biosynthèse ne sont pas exprimés dans nos conditions, dans l'endosperme, à l'exception de *GA20ox3*.

Photos représentatives de 15 échantillons par géotypes.

Dans le but d'analyser les effets et le mécanisme d'action des GA sur la fragilisation des téguments, toutes les expériences qui suivent, se focalisent spécifiquement sur ce processus.

2.1.1 Lieux de production des GA dans les graines

Afin de mieux appréhender la provenance des GA nécessaires pour la fragilisation des téguments, nous nous sommes intéressés aux sites de production des GA dans les tissus de la graine. Même si de nombreuses données sont disponibles dans la littérature, nous avons souhaité réexaminer, dans nos conditions de culture, le patron d'expression des gènes codant pour les étapes limitantes de la biosynthèse de GA, dans la graine. Pour ce faire, deux approches différentes ont été mises en œuvre.

Une analyse histochimique a été réalisée à l'aide de différentes lignées transgéniques de fusion, transcriptionnelle ou traductionnelle, avec la β -glucuronidase, sous le contrôle du promoteur de différents gènes impliqués dans la biosynthèse de GA. Nous nous sommes intéressés au patron d'expression des *GA20ox1* à 3 et des *GA3ox1* à 4, respectivement les avant-dernières et dernières enzymes de la voie de biosynthèse des GA (Figure 49). Les graines ont été stratifiées pendant 48h avant d'être imbibées 18 heures, sur un milieu gélosé, avant que la dissection des tissus ne soit réalisée. Ce temps d'imbibition correspond à quelques heures avant l'étape de rupture de l'endosperme et des testas (Figure 47). Dans nos conditions, seul le gène codant la *GA20ox3* présente une expression dans l'endosperme, alors que les autres gènes sont restreints aux tissus embryonnaires ou trop peu exprimés pour être détectés par cette approche.

Ces résultats suggèrent que des précurseurs de GA bioactives (notamment la GA₉) peuvent être synthétisés dans l'endosperme, par l'action de la *GA20ox3*, mais que la conversion en GA bioactives se fait essentiellement dans l'embryon, où sont exprimés les *GA3oxidases* (*GA3ox1* et *GA3ox2*). Des résultats similaires ont été obtenus à partir de graines déposées sur papier Whatman imbibé avec de l'eau durant 24h avec et sans stratification préalable.

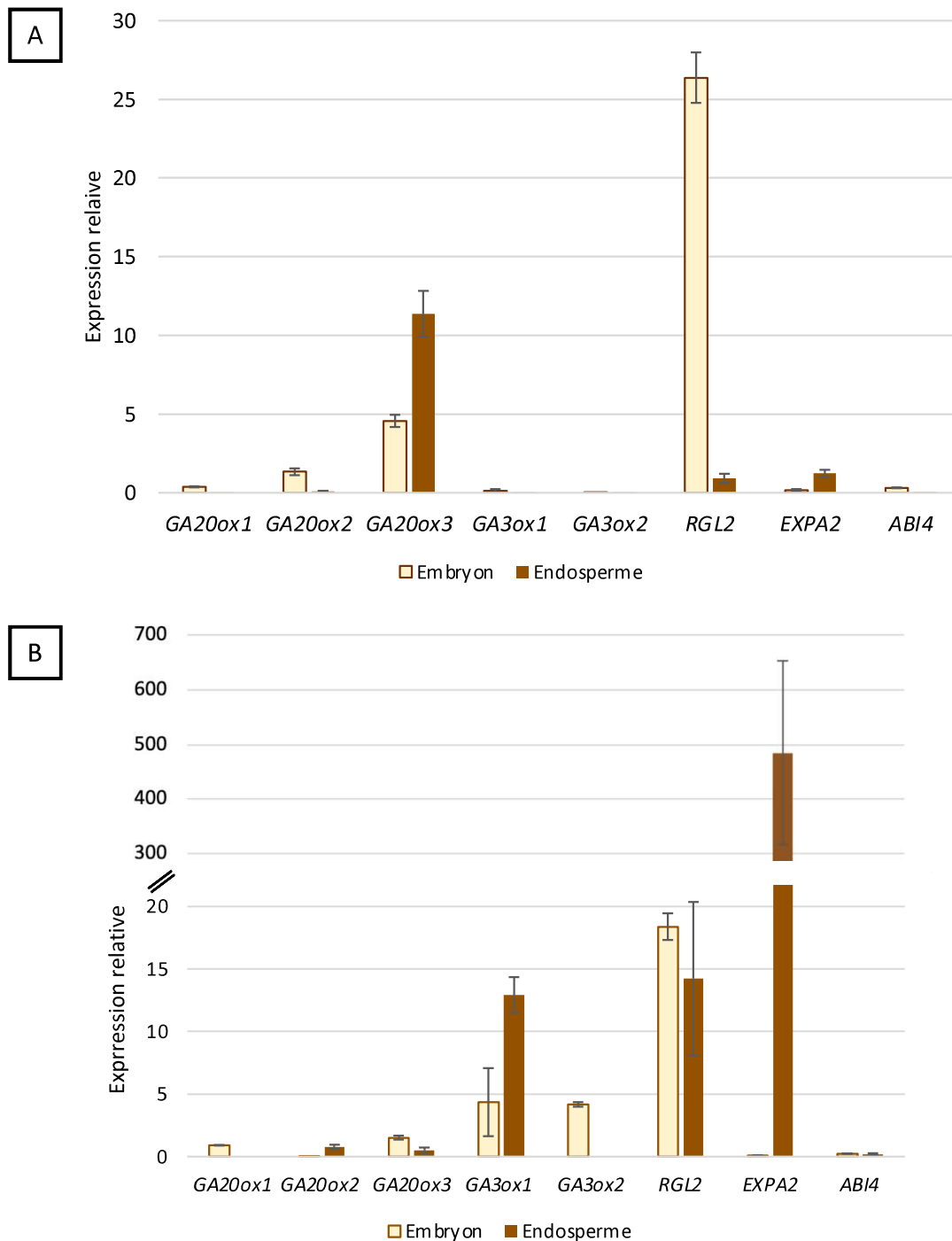


Figure 50 : Patterns d'expression des gènes de biosynthèse de GA, dans les différents tissus de la graine, par RT-qPCR

Analyse du niveau d'expression par RT-qPCR, des *GA20ox 1-3*, des *GA3ox 1-2*, de *RGL2* et des deux marqueurs spécifiques aux tissus *EXPA2* (endosperme) et *ABI4* (embryon) à partir des ARNs totaux extraits des embryons ou des téguments des graines, après (A) 6 ou (B) 18 heures d'imbibition, respectivement sur papier Whatman et milieu gélosé. L'expression relative des gènes est calculée en fonction de l'expression du gène *SAND*, dans chaque tissu. L'erreur standard (moyenne de 3 répliques techniques) est indiquée par les barres d'erreurs.

Afin de conforter ces résultats, le niveau d'expression des *GA20ox* et *GA3ox* ont été déterminés par RT-qPCR à partir des embryons et des téguments comprenant l'endosperme, séparément, préalablement stratifiés et disséqués après 6 h ou 18h d'imbibition (Figure 50). L'endosperme étant, chez *Arabidopsis*, restreint à une unique couche cellulaire, la quantité d'ARN extrait est assez faible, ce qui a nécessité l'ajout d'une étape d'amplification de l'ARN à la suite de leurs extractions (voir matériel et méthodes). Nous avons utilisé deux marqueurs spécifiques à l'embryon et à l'endosperme, respectivement *ABI4* et *EXPA2*, afin de déterminer la pureté de nos échantillons suite à la dissection (Penfield et al., 2006; Sánchez-Montesino et al., 2019). Les résultats obtenus avec les deux gènes marqueurs de l'embryon et de l'endosperme indiquent que les échantillons d'embryons sont relativement purs, en effet aucunes traces d'expression des gènes *EXPA2* et *ABI4* ne sont détectable (Figure 50).

Les gènes *GA3ox3* et *GA3ox4* sont pas ou peu exprimés dans la graine et n'ont pas été détectés par RT-qPCR. Il a été décidé, à la suite de ces résultats et ceux obtenus lors de l'analyse histochimique, de ne plus inclure ces deux gènes dans les analyses suivantes. Les résultats obtenus mettent en évidence que les *GA20ox 1* à *3* sont peu exprimés dans les graines. Après 6 heures d'imbibition, les *GA20ox1* et *GA20ox2* ne semblent être exprimés que dans l'embryon alors que *GA20ox3* est exprimé dans les deux tissus, avec une proportion majoritaire dans l'endosperme. Après 18 heures d'imbibition, une légère expression de *GA20ox2* est visible dans l'endosperme. Par contre, une chute marquée de l'expression de *GA20ox3* est visible dans l'endosperme, ce résultat nécessitera confirmation car nous n'avons étudié l'expression des *GA20ox1* à *3* que sur un seul réplica. Après 6 h d'imbibition, *GA3ox1* et *GA3ox2* ne sont pas suffisamment exprimés dans la graine pour être détectés. Après 18 h d'imbibition, nous pouvons voir que *GA3ox1* est exprimé dans les deux tissus alors que *GA3ox2* se limite à l'embryon. L'expression de *RGL2*, codant pour la DELLA inhibant le processus de germination (Lee et al., 2002), est visible dans les deux tissus, comme attendu. Cependant, le gène présente une faible expression dans l'endosperme après 6h, et au contraire, une forte expression après 18h (Figure 50).

En conclusion, les gènes de biosynthèse codant pour les *GA20ox*, responsables de la synthèse de l'intermédiaire inactif GA_9 , sont en général plus exprimés dans l'embryon que dans l'endosperme, et avec un pic d'expression quelques heures après imbibition. En ce qui concerne les gènes *GA3ox*, qui catalysent la conversion du GA_9 en GA_4 bioactive, ils sont

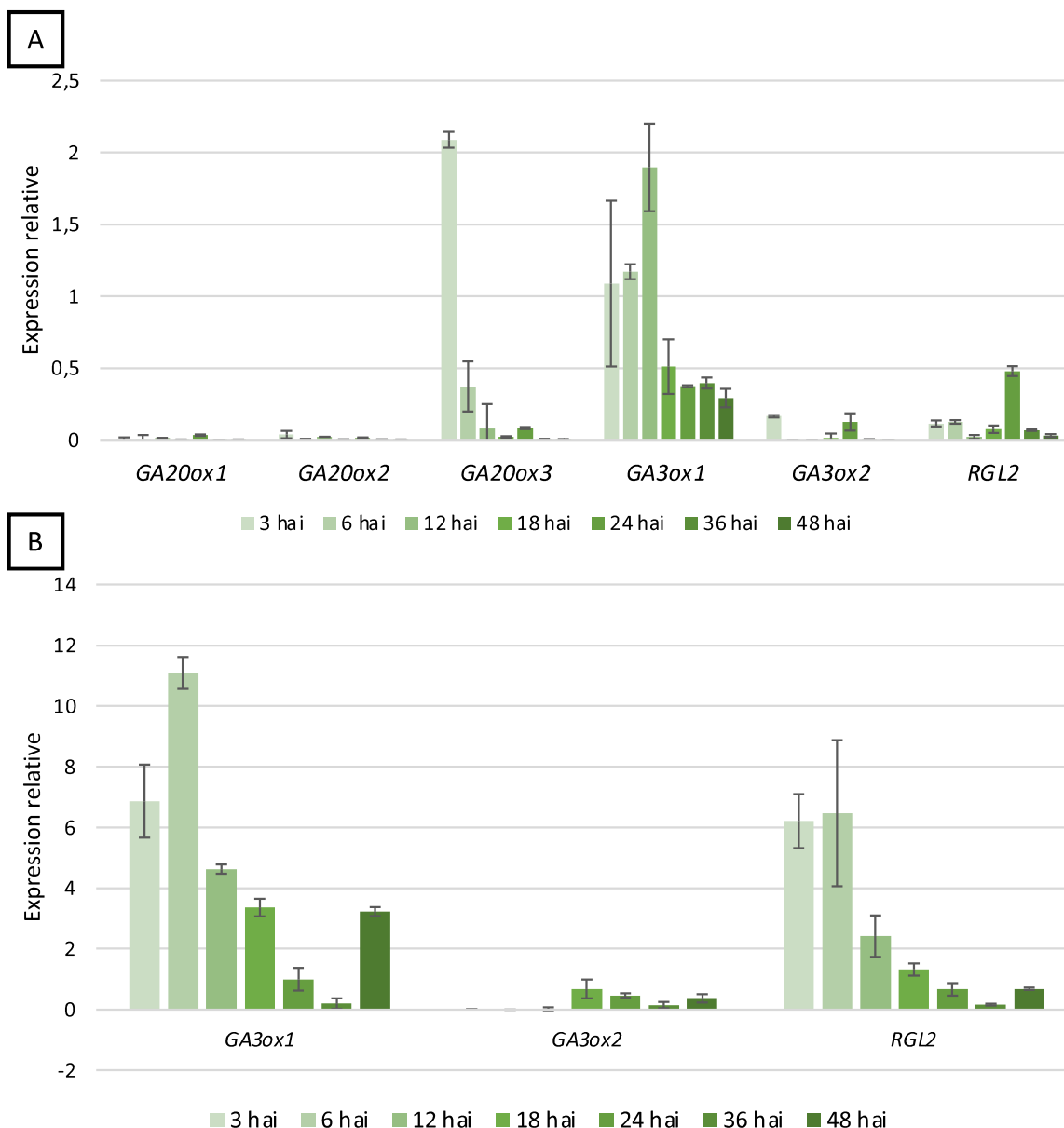


Figure 51 : Cinétiques d'expression des gènes de biosynthèse de GA pendant la germination

Analyse du niveau d'expression par RT-qPCR, des *GA20ox 1-3*, des *GA3ox 1-2* et de *RGL2* à partir des ARNs totaux extraits de graines entières, après différents temps d'imbibition.

A : Imbibition réalisée sur milieu gélosé peu nutritif, avec stratification préalable.

B : Imbibition réalisée sur papier Whatman, sans stratification préalable.

L'expression relative des gènes est calculée en fonction de l'expression du gène *SAND*, au point 3h. L'erreur standard (moyenne de 3 répliques techniques) est indiquée par les barres d'erreurs.

L'expérience a été reproduite 2 autres fois : avec une imbibition sur milieu gélosé et stratification préalable ; avec une imbibition sur Papier Whatman et une stratification préalable.

exprimés plus tardivement (au moment de la rupture de l'endosperme), et à la fois dans l'embryon et dans l'endosperme. Ces résultats suggèrent que les GA sont produites majoritairement dans l'embryon, pendant les premières heures d'imbibition, et qu'une production et/ou conversion des formes bioactives se met en place dans l'endosperme au fur et à mesure de l'imbibition.

Afin de compléter cette étude, nous avons analysé l'évolution de l'expression des gènes de biosynthèse, des premières heures d'imbibition jusqu'à la germination de la graine, sur papier Whatman ou milieu gélosé, avec et sans stratification préalable. Cette cinétique a été réalisée sur des graines entières (non disséquées), dont les temps d'imbibition varient entre 3 et 48h (Figure 51). Les résultats obtenus sur milieu gélosé mettent en lumière que les gènes de biosynthèse *GA20ox1* et *GA20ox2* sont peu exprimés dans les graines. A l'inverse, le gène codant pour la *GA20ox3* est exprimé dans les graines, surtout lors des premières heures après le début de l'imbibition, confortant nos résultats précédents. De manière inattendue, l'expression du gène *GA3ox1* diminue elle aussi durant les premières heures d'imbibition (sur milieu gélosé et sur papier Whatman), contrairement aux données obtenues à partir de graines disséquées (Figure 50). *GA3ox2* est moins exprimé que *GA3ox1* et reste stable au cours du temps (Figure 51). Enfin, le gène *RGL2* est plus fortement exprimé durant les premières heures d'imbibition sur papier Whatman, puis présente une diminution progressive et est plutôt stable sur milieu gélosé.

Nous pouvons conclure de ces études que les gènes *GA20ox1*, *GA20ox2* et *GA3ox2* sont peu exprimés dans la graine, et que les gènes *GA3ox1* et *RGL2* ont une expression plus forte au début de l'imbibition des graines, qui diminue progressivement au fur et à mesure qu'on se rapproche de l'émergence de la radicule. Nous pouvons aussi conclure au vu des différents résultats, que la synthèse de GA bioactives dans les téguments est très restreinte ; en effet, les gènes de biosynthèse de GA ne sont pas exprimés abondamment dans les graines : les gènes *GA3ox3* et *GA3ox4* ne sont pas exprimés dans les graines ; Le gène *GA3ox2* est faiblement exprimé et peu détectable en RT-qPCR ; quant au gène *GA3ox1*, son expression est suffisante pour être détectée par RT-qPCR, les cinétiques réalisées tendent à dire que son expression diminue au fur et à mesure du temps d'imbibition, mais son expression n'est pas suffisante pour être visible dans l'endosperme lors d'une coloration histochimique. Le peu de

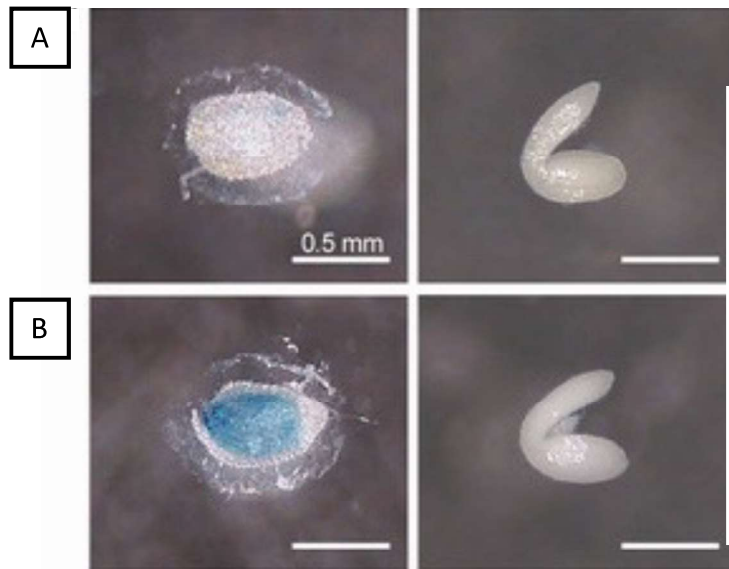


Figure 52 : Analyse histochimique GUS de l'expression *EXPA2*, induite par les GA

Des graines *pEXPA2:GUS* ont été imbibées, pendant 24 heures, et disséquées précocement (après 4 heures) ou tardivement (après 24h), avant la phase de coloration.

A. Les graines ont été disséquées après 4h d'imbibition, puis les tissus disséqués ont été remis à imbiber.

B. Les graines ont été disséquées, après 24h d'imbibition.

Seules les graines ayant été disséquées tardivement, montrent une expression de la construction *pEXPA2:GUS*.

Photos représentatives sur 10 échantillons.

GA bioactives produites dans l'endosperme ne semble pas être suffisant pour initier la fragilisation des téguments, nécessaire à la germination, nous supposons donc qu'un transport de GA de l'embryon vers l'endosperme est requis pour l'accomplissement du processus de germination.

2.1.2 Étude du transport de GA de l'embryon vers l'endosperme

Sachant que les GA bioactives sont essentiellement synthétisées au sein de l'embryon, et qu'elles sont nécessaires pour l'induction de la fragilisation des téguments, nous avons émis l'hypothèse que des GA produites dans l'embryon sont transportées dans l'endosperme. Pour étudier la cinétique et le mécanisme de ce transport, nous avons utilisé au cours d'une série d'analyses, la lignée rapportrice *pEXPA2:GUS* (Sánchez-Montesino et al., 2019). Le gène *EXPA2* code pour une CWRE (impliquée dans la fragilisation des téguments), qui est strictement exprimé dans l'endosperme, et qui est induit par les GA (Sánchez-Montesino et al., 2019). A l'aide de cette lignée, une succession d'analyses histochimiques a été réalisée.

Dans une étude récente, il a été démontré que l'induction du gène *EXPA2* intervenait 18 heures après imbibition, coïncidant ainsi, avec la rupture des téguments et l'émergence de la radicule (Sánchez-Montesino et al., 2019). Pour confirmer ce résultat et démontrer qu'un signal émis par l'embryon (une GA ?) est responsable de l'induction de *EXPA2* dans l'endosperme, nous avons analysé la présence ou l'absence de coloration GUS dans l'endosperme de graines *pEXPA2:GUS*, mises à imbiber sur milieu gélosé et disséquées (téguments retirés) à différents temps. Chez un premier lot de graines, les téguments ont été retirés 4h après imbibition, puis replacés sur milieu gélosé pendant 20h (soit 24 heures au total). Chez un second lot de graines, les téguments ont été retirés 24 heures après imbibition. Une coloration GUS a ensuite été immédiatement réalisée sur les téguments issus des deux modalités (Figure 52). Comme rapporté précédemment, nous observons que les téguments retirés 4 heures après imbibition des graines, ne présentent aucune coloration GUS, indiquant

Embryon / Téguments

ga3ox1 ga3ox2 / *pEXPA2 : GUS*

Col 0 / *pEXPA2 : GUS*

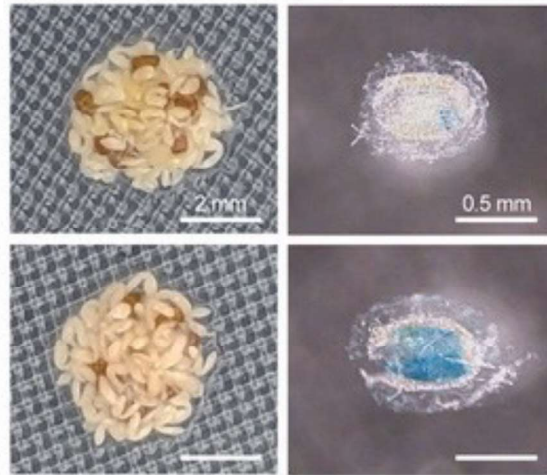


Figure 53 : Analyse histochimique EXPA2-GUS dans des endospermes exposés à un « Embryo bedding assay »

Des téguments *pEXPA2:GUS* ont été mis à imbiber sur un lit d'embryons sauvages, ou mutants pour la biosynthèse de GA, pendant 24 heures, suite à une dissection, suivi d'un traitement de coloration GUS. Les embryons *ga3ox1 ga3ox2* ne sont pas suffisants pour induire l'expression de la construction *pEXPA2:GUS*.

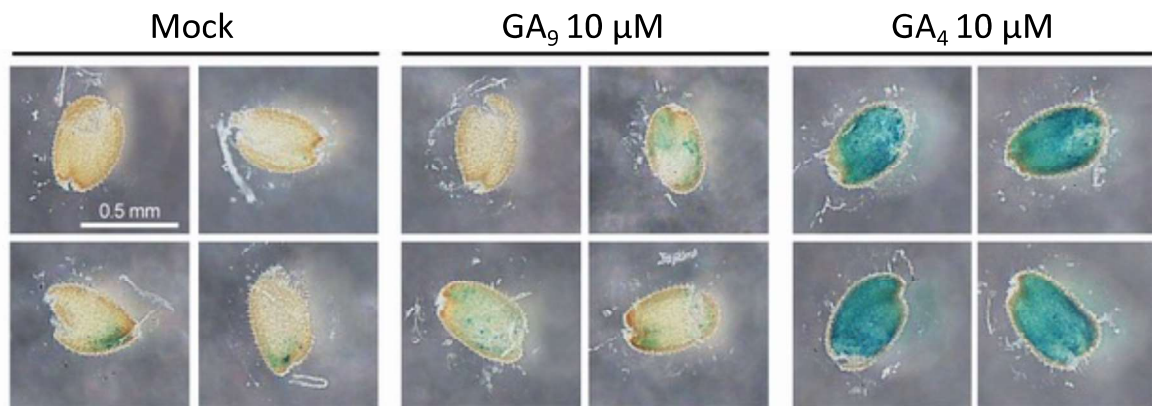


Figure 54 : Effet de GA₄ et GA₉ sur l'induction d'EXPA2 par analyse histochimique GUS

Des téguments *pEXPA2:GUS* ont été mis à imbiber sur différents milieux contenant ou non des GA, pendant 24h. Deux formes différentes de GA ont été testées, la forme bioactive GA₄ et son plus proche précurseur, GA₉.

Seule la GA₄ permet d'induire l'expression de la construction *pEXPA2:GUS*.

Photos représentatives sur n ≥ 12 échantillons.

que le gène *EXPA2* n'est pas induit dans ces conditions. Au contraire, les téguments de graines disséquées 24 heures après imbibition montrent une coloration GUS intense et uniforme. Ces résultats mettent en évidence que l'induction de l'expression du gène *EXPA2* dans l'endosperme est sous le contrôle d'un signal provenant de l'embryon. Par ailleurs, ils indiquent que ce signal est émis entre 4 et 24h après imbibition.

Pour étudier la nature de ce signal, nous avons ensuite réalisé une expérience que nous nommerons « Embryo Bedding assay » reprenant le principe du « Seed Coat Bedding assay » développé par le groupe de Luis Lopez-Molina (Lee et al., 2010). Dans cet essai, des téguments isolés de graines *pEXPA2:GUS* ont été placés sur un « lit » d'embryons isolés de graines de différents génotypes (Figure 53). Étant donné que le gène *EXPA2* est induit par les GA, nous pensons que ce signal est une GA. Pour examiner cette hypothèse, les téguments *pEXPA :GUS*, isolés dès le début de l'imbibition, ont été placés sur un lit d'embryons isolés de graines *ga3ox1 ga3ox2* (qui ne produit aucune GA bioactive dans la graine) ou de graines sauvages (contrôle Col-0). Après 24h d'incubation sur milieu gélosé, une coloration GUS a été réalisée sur les téguments *pEXPA2:GUS* des deux combinaisons. De manière intéressante, seuls les téguments *pEXPA2:GUS* incubés avec les embryons Col-0 montrent une coloration bleue (Figure 53). Ce résultat démontre que le signal émis par l'embryon est bien une GA, et probablement une forme active.

Pour confirmer ce résultat, une étude complémentaire a été réalisée avec des GA exogènes. Pour cette étude, des téguments disséqués de graines *pEXPA2:GUS* dès le début de l'imbibition, ont été mis à incuber, pendant 24 heures, sur un milieu gélosé supplémenté avec de la GA₉ (substrat de la GA3ox) ou de la GA₄ (forme active), ou sans GA (Mock, contrôle). Après incubation, une coloration GUS a été effectuée sur les téguments des 3 modalités (Figure 54). Les résultats montrent clairement que seule la forme active de la GA (GA₄) est capable d'induire l'expression de *EXPA2* dans l'endosperme. Pris dans leur ensemble, ces résultats confirment que l'embryon produit de la GA₄ qui est transportée dans l'endosperme, où elle induit l'expression des CWRE (dont *EXPA2*) nécessaires à la fragilisation des téguments, chez *Arabidopsis*.

Enfin, dans le but d'identifier l'intervalle de temps durant lequel le transport de GA₄ de l'embryon à l'endosperme est actif, afin de promouvoir la germination, une cinétique

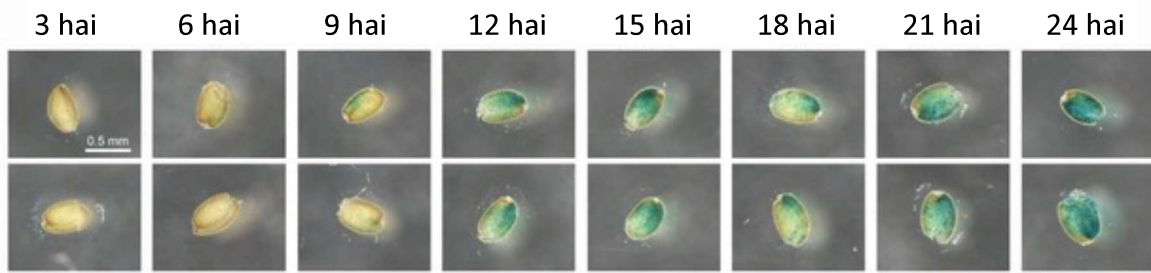


Figure 55 : Cinétique d'induction de EXPA2-GUS

Des graines *pEXPA2:GUS* ont été mises à imbiber pendant différents temps (entre 3 et 24hai) avant d'être disséquées. Les téguments disséqués ont, ensuite, subi une coloration GUS.

Le signal permettant l'induction de l'expression de la construction *pEXPA2:GUS* est visible à partir de 9 - 12hai.

Photos représentatives sur $n \geq 10$ échantillons.

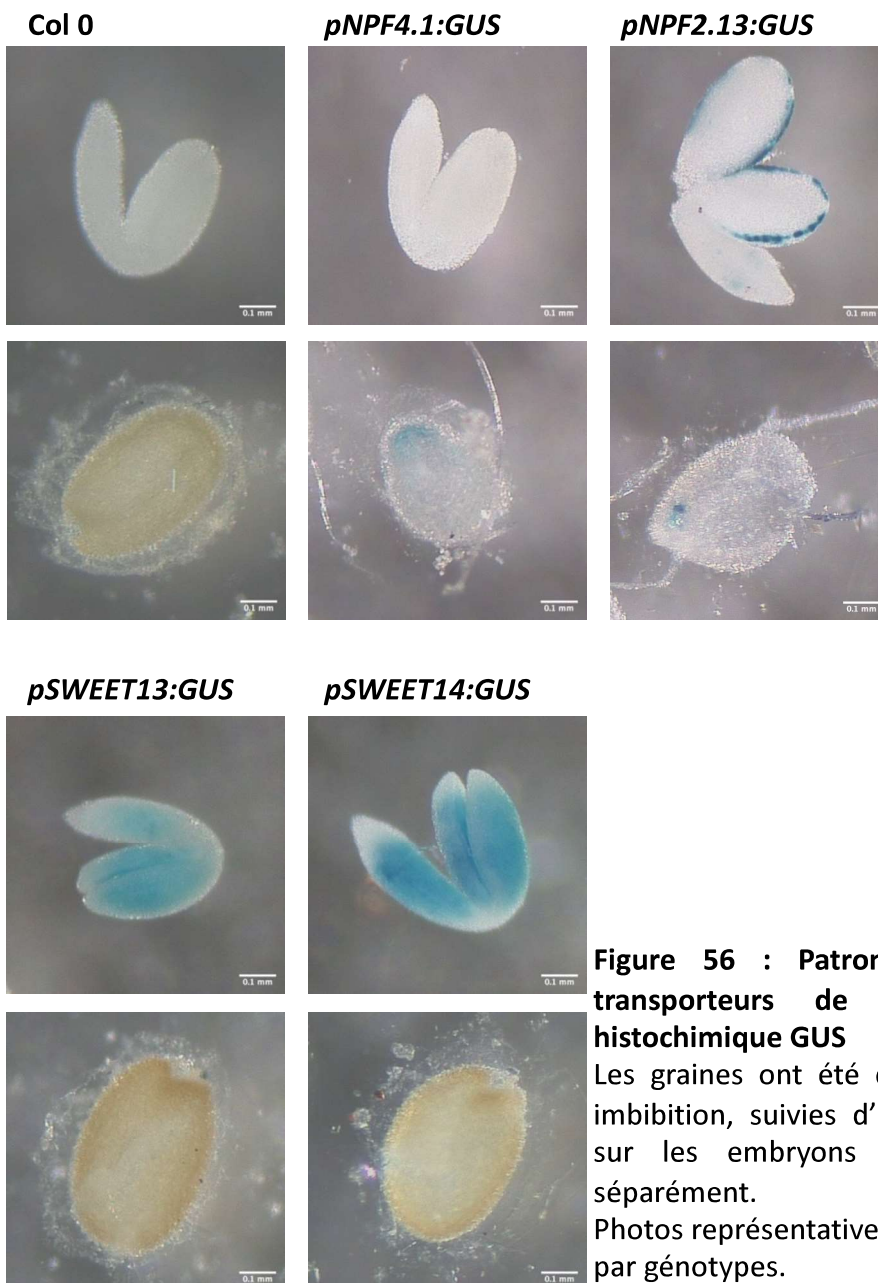


Figure 56 : Patrons d'expression de transporteurs de GA par analyse histochimique GUS

Les graines ont été disséquées 9h après imbibition, suivies d'une coloration GUS, sur les embryons et les téguments, séparément.

Photos représentatives de 15 échantillons par géotypes.

d'imbibition a été réalisée avec les graines *pEXPA2:GUS*. Dans cette expérience, les téguments des graines ont été disséqués à différents temps d'imbibition (allant de 3 à 24 heures), puis replacés sur milieu gélosé pour une incubation totale de 24 heures. Puis, une coloration GUS a été effectuée pour suivre l'induction de l'expression *EXPA2* au cours du temps (Figure 55). Les résultats montrent une coloration GUS faible dès 9 heures d'imbibition, puis une coloration plus forte à partir de 12 heures d'imbibition. Nous pouvons donc supposer que la GA₄ produite dans l'embryon commence à être transportée dans l'endosperme un peu en amont de son activité (induction de *EXPA2*), soit un peu avant 9 heures d'imbibition.

2.2 Sélection de transporteurs de GA candidats

Même si les GA ont des propriétés physico-chimiques leur permettant de diffuser, à un certain degré, de cellule à cellule (voir introduction générale partie 3.3), plusieurs études ont souligné l'existence et l'importance de transporteurs transmembranaires pour orienter la distribution des GA des sites de production vers les sites d'action (Binenbaum et al., 2018). Dans le cadre de notre étude sur la germination, nous avons recherché des transporteurs candidats qui pourraient être impliqués dans la translocation de GA bioactives de l'embryon vers l'endosperme. Nous avons principalement axé notre recherche sur des transporteurs déjà caractérisés, dont l'activité d'import de GA a été mise en évidence dans des systèmes hétérologues, en levure et en ovocytes de xénope (Chiba et al., 2015; Wulff et al., 2019). En s'appuyant sur la littérature, nous avons sélectionné les transporteurs NPF2.12, NPF2.13, NPF2.14, NPF3.1, NPF4.1, SWEET13 et SWEET14, qui ont tous la capacité de transporter des GA (Binenbaum et al., 2023; Tal et al., 2016; David et al., 2016; Kanno et al., 2012, 2016).

Dans un deuxième temps, nous avons étudié le patron d'expression de ces transporteurs, 9h après imbibition de la graine, période de temps à partir de laquelle les GA bioactives commencent à être transportées de l'embryon vers l'endosperme (Figure 55). Pour ce faire, deux techniques similaires à celles utilisées précédemment pour étudier les patrons d'expression des gènes de biosynthèse de GA dans la graine, ont été mises en place. La première est basée sur une analyse histochimique de graines exprimant des constructions de fusion transcriptionnelle transporteur:GUS (Figure 56). Les résultats obtenus ont mis en

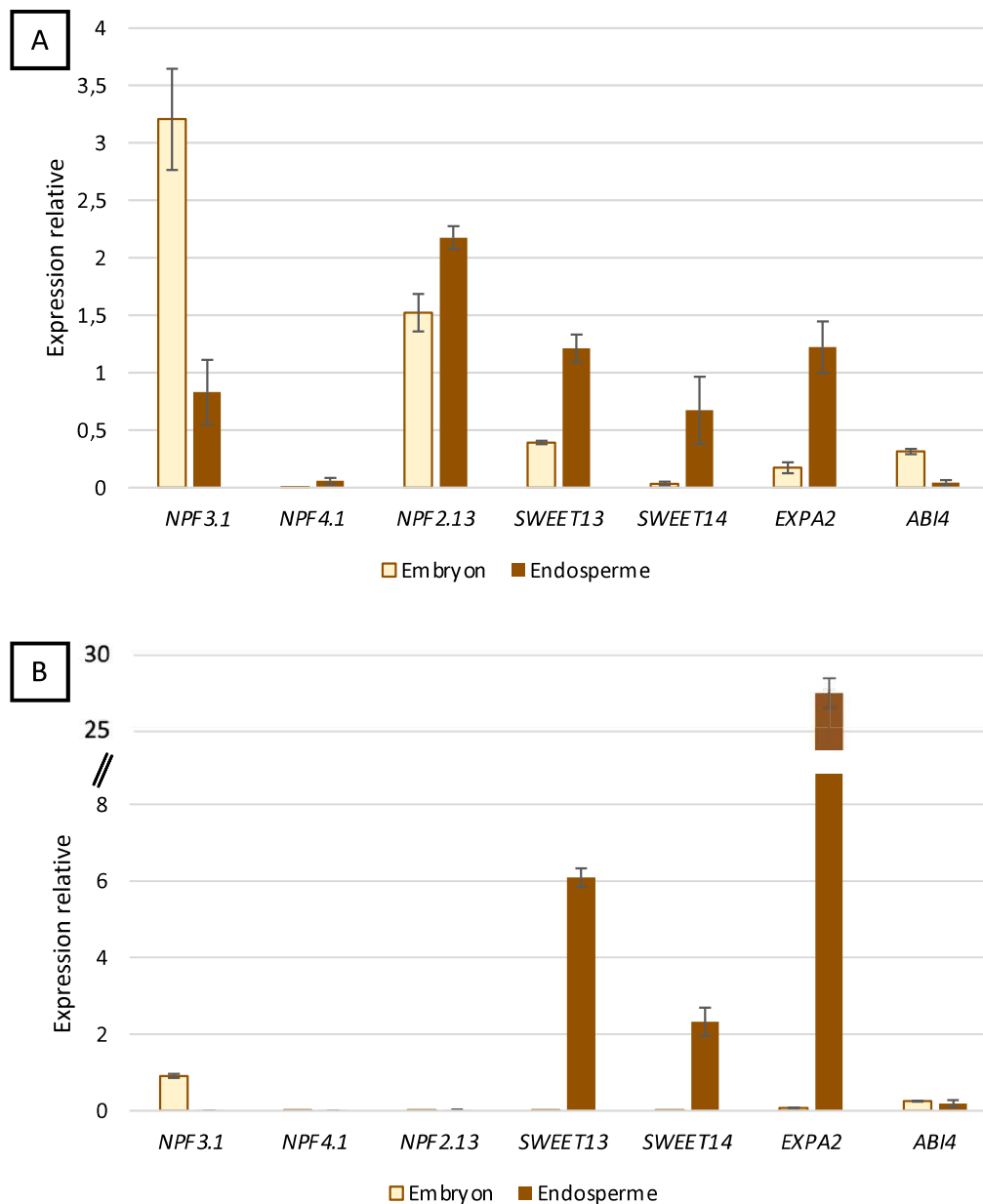


Figure 57 : Patrons d'expression de transporteurs de GA dans différents tissus de la graine, par RT-qPCR

Analyse du niveau d'expression par RT-qPCR, de *NPF3.1*, *NPF4.1*, *NPF2.13*, *SWEET13*, *SWEET14* et des deux marqueurs spécifiques aux tissus *EXPA2* (endosperme) et *ABI4* (embryon), à partir des ARNs totaux, extraits des embryons ou des téguments des graines, après (A) 6 et (B) 18 heures d'imbibition. L'expression relative des gènes est calculée en fonction de l'expression du gène *SAND*, dans chaque tissu. L'erreur standard (moyenne de 3 réplicas techniques) est indiquée par les barres d'erreurs.

évidence que *NPF2.12* et *NPF2.14* ne sont pas exprimés dans la graine dans nos conditions, après 9 heures d'imbibition. *NPF4.1* est exprimé uniquement dans l'endosperme, son expression est restreinte à une petite zone qui semble être la zone du micropyle, de l'endosperme. *NPF2.13* est exprimé à la fois dans l'embryon et dans l'endosperme. Dans l'embryon, le gène est exprimé au niveau du pourtour des cotylédons et légèrement dans la radicule. Au niveau de l'endosperme, son expression est restreinte à une petite zone (quelques cellules), localisée potentiellement dans la région du micropyle. Les gènes *SWEET13* et *SWEET14* présentent des patrons d'expression similaires dans la graine. Ils sont tous deux exprimés uniquement dans l'embryon, dans sa globalité à l'exception des pointes des cotylédons et de la radicule. Des résultats similaires ont été obtenus à partir des graines imbibées sur papier Whatman pendant 6 heures.

La seconde approche est une analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR, dans des graines sauvages (Col-0), respectivement imbibées sur papier Whatman ou milieu gélosé (Figure 57). Nous avons utilisé deux marqueurs spécifiques des tissus, *EXPA2* pour l'endosperme et *ABI4* pour l'embryon, qui nous ont permis de déceler une légère contamination de l'échantillon d'embryon pour le premier réplica réalisé. Pour cette étude, les graines stratifiées ont été imbibées pendant 6 et 18h, puis disséquées, pour obtenir d'un côté les embryons et de l'autre, les téguments comprenant l'endosperme. Nous avons utilisé les gènes *SAND* et *DUF106*, comme gènes de référence, et le gène *SAND* a aussi été utilisé comme gène de normalisation. Les résultats obtenus confirment que les gènes *NPF2.12* et *NPF2.14* ne sont pas exprimés dans la graine, quelque que soit le temps d'imbibition. Le gène *NPF3.1* est exprimé à la fois dans l'embryon (majoritairement) et dans l'endosperme après 6h d'imbibition, puis son expression chute totalement dans l'endosperme après 18h d'imbibition. Au contraire, le gène *NPF4.1* est uniquement exprimé dans l'endosperme après 6 heures d'imbibition et n'est pas détecté après 18h d'imbibition. Le gène *NPF2.13* est, quant à lui, exprimé à la fois dans l'embryon et l'endosperme, uniquement après 6 heures d'imbibition. *NPF2.13* n'est quasiment plus exprimé après 18h d'imbibition. Enfin, les gènes *SWEET13* et *SWEET14* sont tous les deux exprimés dans l'endosperme des graines, plus fortement après 18h d'imbibition que 6h. Dans l'ensemble, à l'exception des résultats obtenus pour *SWEET13* et *SWEET14* qui sont contradictoires, les patrons d'expression de *NPF3.1*, *NPF4.1*, *NPF2.12*,

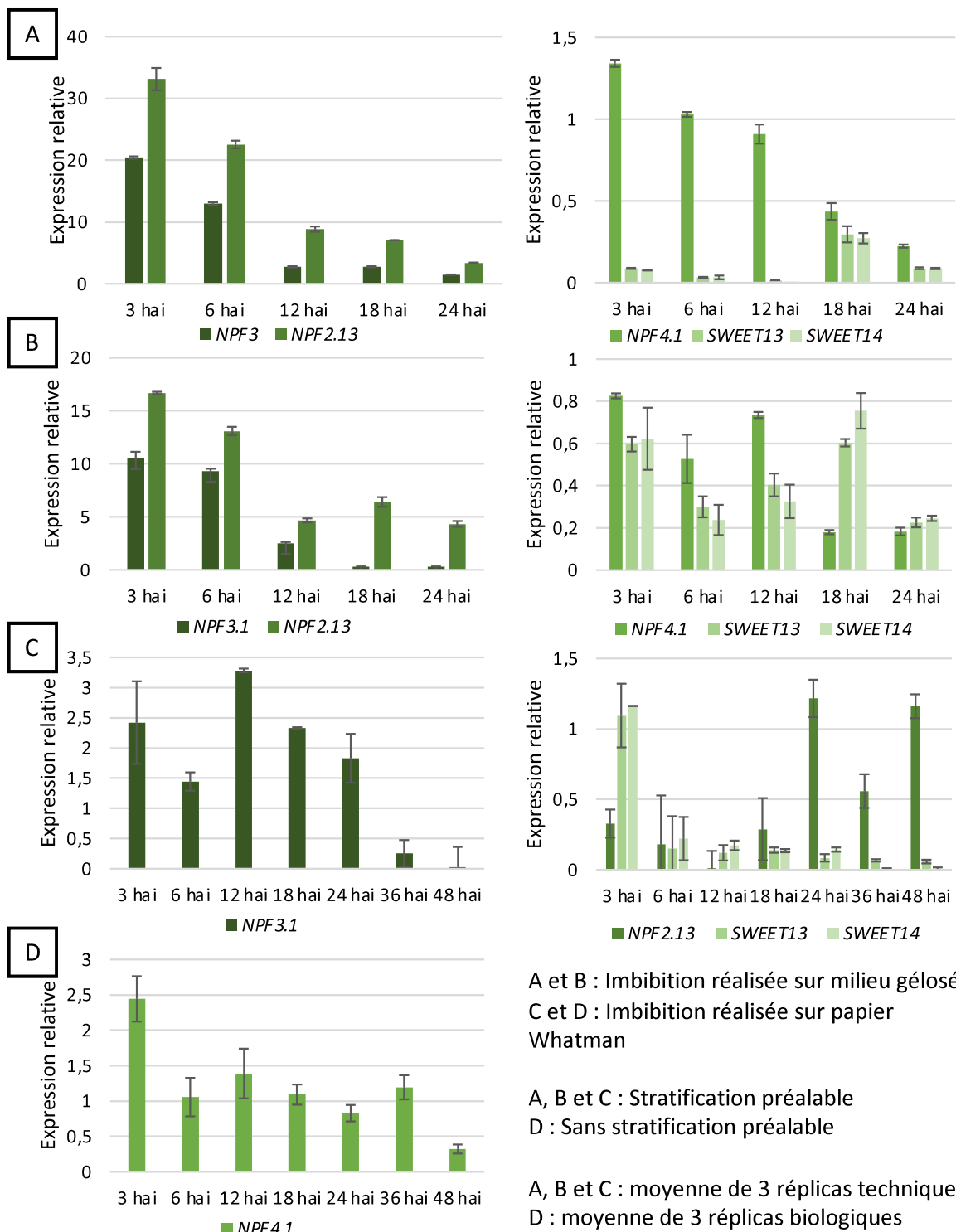


Figure 58 : Cinétiques d'expression des transporteurs de GA pendant la germination

Analyse du niveau d'expression par RT-qPCR, des gènes *NPF3.1*, *NPF4.1*, *NPF2.13*, *SWEET13* et *SWEET14* à partir des ARNs totaux extraits de graines entières stratifiées ou non, après différents temps d'imbibition.

L'expression relative des gènes est calculée en fonction de l'expression du gène *SAND*, au point 3h.

L'expérience a été reproduite (Voir Annexe 7) :

- 2 fois : Imbibition (de 3h à 48h) sur milieu gélosé avec stratification

- 1 fois : Imbibition (de 3h à 48h) sur Papier Whatman, avec et sans stratification préalable

NPF2.13 et *NPF2.14* sont confirmés par les deux approches (lignées transcriptionnelles GUS et par RT-qPCR).

Pour compléter l'étude, nous avons ensuite analysé l'évolution du niveau d'expression des transporteurs sur des graines entières imbibées sur milieu gélosé ou papier Whatman, avec ou sans stratification préalable, au cours d'une cinétique s'échelonnant entre 3 et 48 heures après imbibition, par RT-qPCR (Figure 58). Les résultats de l'ensemble des tests ont mis en évidence que les gènes *NPF3.1* et *NPF2.13* sont ceux présentant les plus forts niveaux d'expression en comparaison des gènes *NPF4.1*, *SWEET13* et *SWEET14*. Le gène *NPF3.1* a une expression importante durant les premières heures d'imbibition, puis celle-ci diminue progressivement. De plus son expression diminue autour de 12h sur milieu gélosé et autour de 24h sur papier Whatman, cette différence reproductible entre nos différents réplicas n'a actuellement pas encore été expliquée (Figure 58A, B et C). Le gène *NPF2.13* est, comme le gène *NPF3.1*, plus exprimé durant les premières heures d'imbibition, avant de s'éteindre complètement autour de 24h (Figure 58A et B). Bien que cette tendance soit inversée lors d'une imbibition sur papier à la suite d'une stratification préalable (Figure 58C), nous avons retrouvé cette tendance initiale lors d'une imbibition sur papier Whatman sans stratification préalable (Annexe 7A), nous supposons donc que les résultats obtenus (Figure 58C) lors de cet essai, ne reflètent pas le patron d'expression du gène *NPF2.13*. Le gène *NPF4.1* présente lui aussi une expression plus forte durant les premières heures d'imbibition avec une diminution graduelle jusqu'à 48 heures après imbibition, avant de s'éteindre. Ce patron d'expression a été confirmé sur milieu gélosé avec stratification et sur papier Whatman sans stratification, lors de respectivement, 2 et 3 réplicas biologiques (Figure 58A, B, D). Les gènes *SWEET13* et *SWEET14* sont faiblement exprimés, présentent un patron d'expression relativement similaire entre eux pour chaque temps d'imbibition étudié, et montrent une expression variable d'un réplica à un autre. Lors d'une imbibition sur milieu gélosé, nous avons pu obtenir une expression forte à la fin de l'imbibition, (Figure 58A), une expression relativement constante (Figure 58B), ainsi qu'une expression forte sur les premières heures d'imbibition (Annexe 7B). Alors que lors d'une imbibition sur papier Whatman, que ce soit avec ou sans stratification préalable, nous retrouvons un patron d'expression fort à 3 heures après imbibition, puis suivi d'une chute drastique de l'expression (Figure 58C)(Annexe 7A). Nous supposons que ces variations sont dues à la faible expression de ces transporteurs dans la graine pouvant

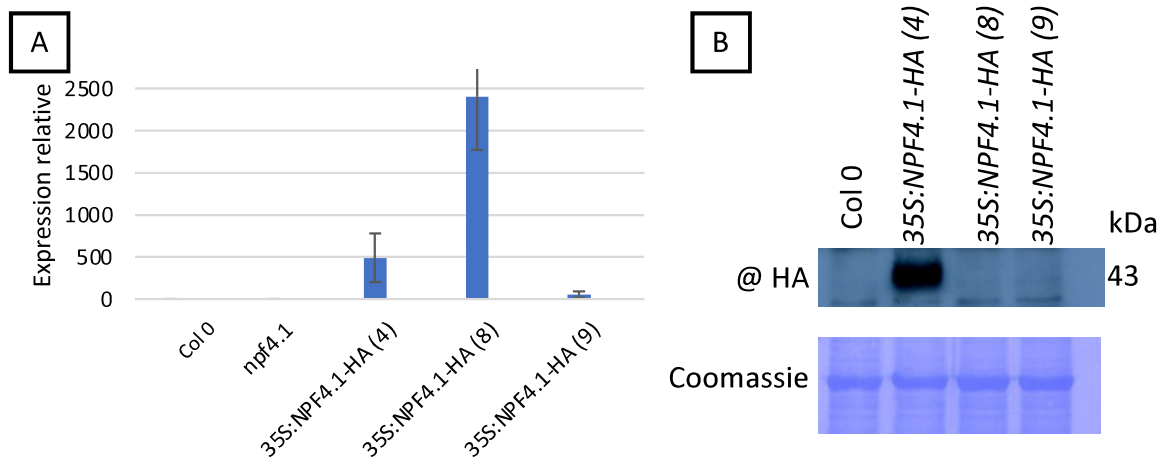


Figure 59 : Analyse du surexpresseur *NPF4.1*

Analyse des différentes lignées indépendantes de la construction *35S:NPF4.1-HA*.

- A. Analyse du niveau d'expression du gène *NPF4.1*, chez une lignée sauvage, chez le mutant *npf4.1*, et chez les trois lignées indépendantes *35S:NPF4.1-HA*. Les moyennes et les barres d'erreurs ont été calculées à partir de 3 répliques techniques.
- B. Immuno-détection de la protéine *NPF4.1-HA*, dans de jeunes plantules sauvages et chez trois lignées indépendantes *35S:NPF4.1-HA*.

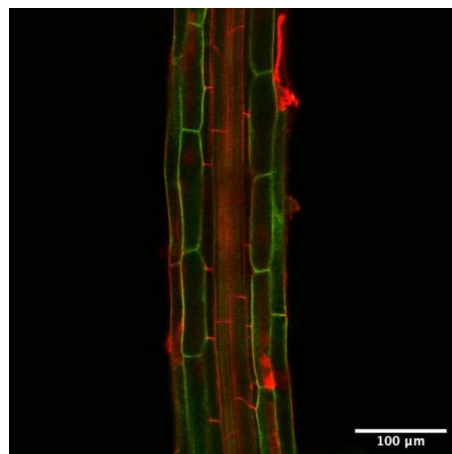


Figure 60 : Analyse de la localisation subcellulaire de *NPF4.1*

Des racines de plantules *35S:NPF4.1-GFP* âgées de 7 jours ont été observées à l'aide d'un microscope confocal, après une coloration au iodure de propidium. Photos représentatives de 15 échantillons.

entraîner des difficultés que ce soit au niveau de l'extraction des ARNs ou de la RT-qPCR. Pris dans leur ensemble, ces résultats montrent que les transporteurs de GA sont exprimés principalement durant les premières heures de l'imbibition des graines, puis présentent une diminution plus ou moins rapide de leur expression au fur et à mesure que le temps d'imbibition se prolonge.

En se basant sur l'ensemble des résultats, nous avons décidé de focaliser l'étude sur 5 transporteurs de GA : NPF2.13, NPF3.1, NPF4.1, SWEET13 et SWEET14.

2.3 Étude de la localisation subcellulaire de NPF4.1

Une étude bibliographique des différents candidats a révélé que NPF3.1, NPF2.13, SWEET13 et SWEET14 sont localisés au niveau de la membrane plasmique des cellules. Ces résultats ont été acquis à l'aide de lignées de fusion traductionnelle, étiquetées avec une protéine fluorescente, le tout sous contrôle du promoteur constitutif *p35S* (Tal et al., 2016; Binenbaum et al., 2023; Kanno et al., 2016).

Pour étudier la localisation cellulaire de la protéine NPF4.1, une lignée transgénique *p35S:NPF4.1-GFP* a été générée (Figure 59). La localisation cellulaire de la protéine NPF4.1-GFP a été déterminée par suivi de la fluorescence GFP par microscopie confocale, dans des racines de plantules *p35S:NPF4.1-GFP*, âgées de 7 jours (Figure 60). Les résultats indiquent que NPF4.1 est une protéine transmembranaire localisée au niveau de la membrane plasmique des cellules. Ainsi, tous les transporteurs candidats étudiés dans cette étude sont adressés à la membrane plasmique des cellules.

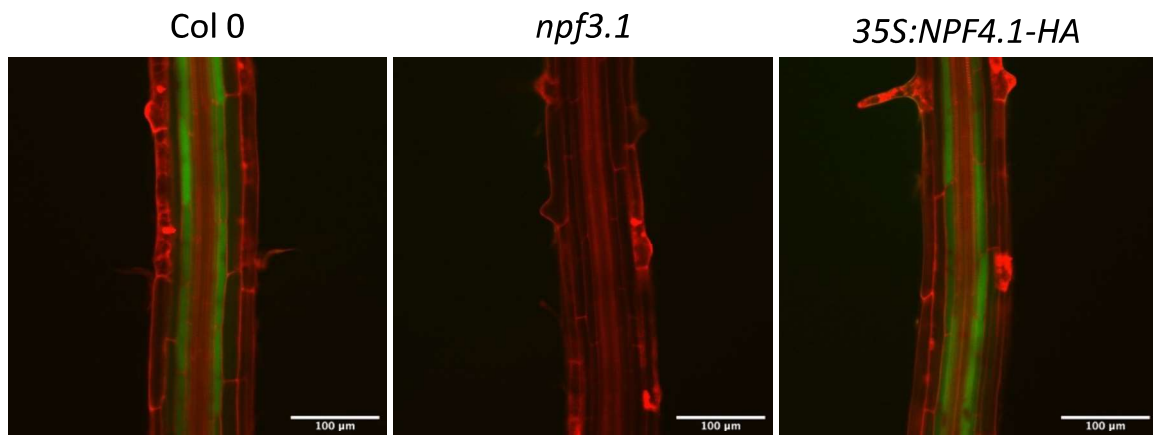


Figure 61 : Localisation tissulaire de GA₃-FI dans les racines de plantules 35S:NPF4.1-HA

Des racines de plantules 35S:NPF4.1-HA âgées de 7 jours ont été incubées 3h dans une solution contenant des GA₃-FI, avant d'être colorées au iodure de propidium et observées à l'aide d'un microscope confocal.

Photos représentatives de 5 échantillons.

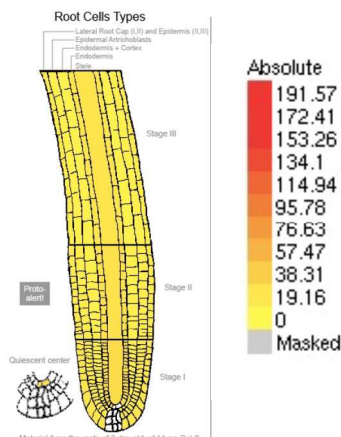


Figure 62 : Patron d'expression de NPF4.1 au sein des racines

Patron d'expression du gène NPF4.1 dans les racines. Prédiction chez *Arabidopsis thaliana* obtenue sur eFP Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp//cgi-bin/efpWeb.cgi>).

2.4 Étude *in planta* de l'activité de transport de GA de NPF4.1

Si l'activité de transport de GA a été confirmée *in planta* pour les transporteurs NPF3.1, NPF2.13, SWEET13 et SWEET14 (Tal et al., 2016; David et al., 2016; Binenbaum et al., 2023; Kanno et al., 2016), cette activité n'a pas été validée pour NPF4.1, où seuls des tests d'imports de GA en systèmes hétérologues ont été réalisés (Kanno et al., 2012). Pour analyser *in planta* l'activité de transport de GA de NPF4.1, nous avons effectué des tests d'imports de GA₃-Fl chez le mutant *npf4.1* et le surexprimeur *NPF4.1*, de façon similaire à ce qui avait été fait pour NPF3.1 et NPF2.13 (Tal et al., 2016; Binenbaum et al., 2023). En suivant le même principe, nous avons analysé la distribution de GA₃-Fl dans les racines de plantules du mutant *npf4.1* ou qui surexpriment *NPF4.1* (au sein d'une lignée *p35S:NPF4.1-HA*). Chez le mutant *npf4.1*, au contraire du mutant *npf3.1*, la fluorescence de GA₃-Fl se concentre dans l'endoderme de la racine, de façon similaire au Col-0 (résultat non montré). Ce résultat peut s'expliquer par le fait que *NPF4.1* n'est pas exprimé dans la racine (Figure 62). De manière surprenante, la surexpression de *NPF4.1* n'altère pas non plus la localisation et l'intensité de la fluorescence (Figure 61). A ce stade de l'étude, il est difficile d'interpréter ce résultat puisque NPF4.1 montre une forte activité d'import de GA bioactives en ovocytes de Xénope, tout comme NPF3.1 (Kanno et al., 2016; Tal et al., 2016). Des analyses complémentaires devront être réalisées, notamment avec d'autres lignées de surexpression *NPF4.1*.

2.5 Influence des transporteurs de GA sélectionnés sur la capacité germinative des graines

Dans des études précédentes, il a été démontré que NPF3.1, SWEET13 et SWEET14 jouent un rôle important sur la germination. Si les graines du mutant *npf3.1* sont hypersensibles au PAC (elles germent moins bien que les graines contrôles Col-0 dans ces conditions), les graines du double mutant *sweet13 sweet14* sont plus résistantes au PAC

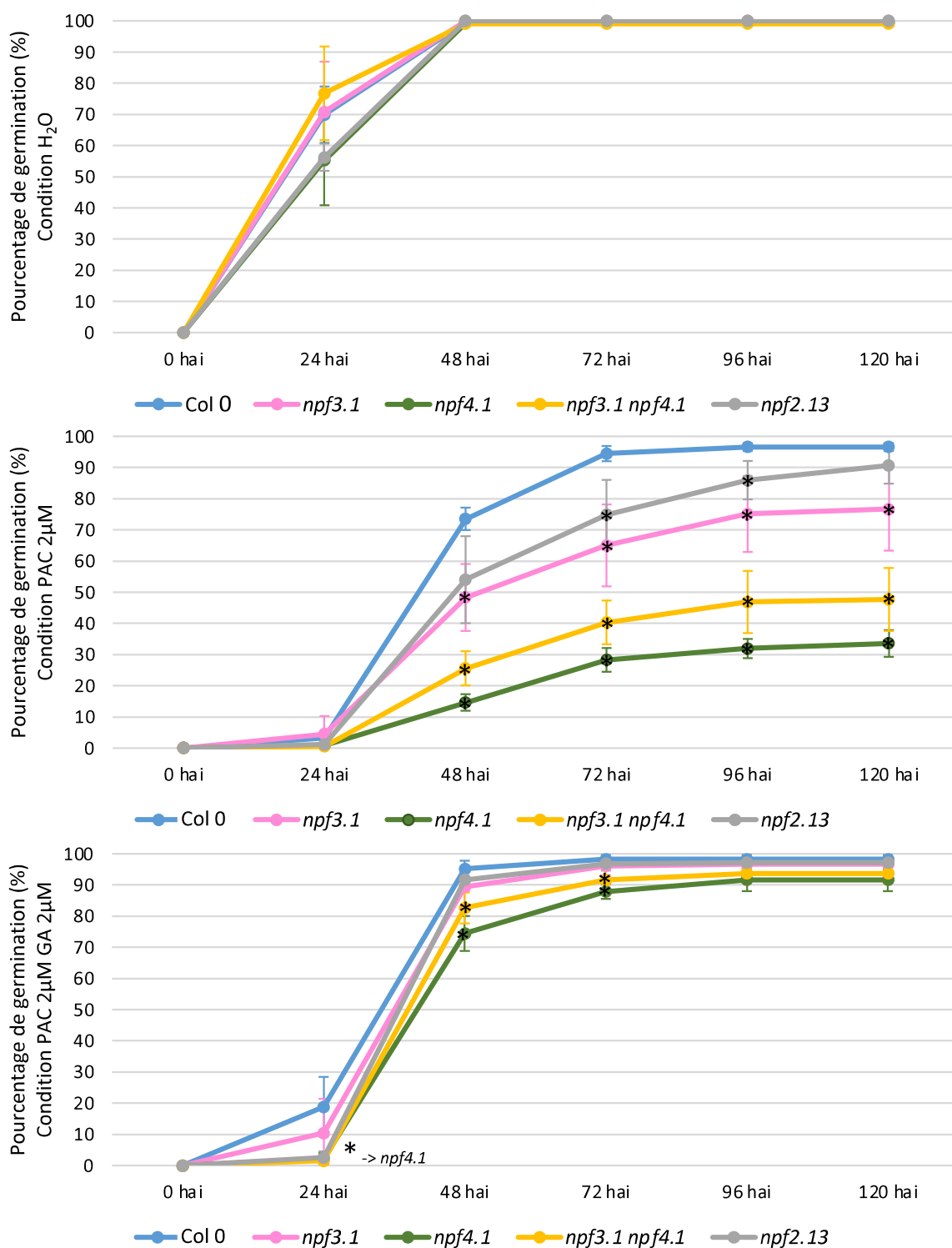


Figure 63 : Capacité germinative des mutants des transporteurs NPF de GA

Les tests de germination ont été réalisés sur des graines stratifiées et imbibées sur un milieu gélosé. Le comptage des graines montrant une protrusion de la radicule est réalisé à différents temps post imbibition. Le pourcentage moyen ainsi que l'erreur standard sont calculés à partir de 3 réplicas biologiques comprenant chacun 2 boîtes individuelles par génotype, pour chaque condition. Résultats discutés dans le texte.

Les étoiles sur le graphique indiquent des différences significatives comparées au Col 0 sur le même milieu et au même temps d'imbibition suite à un test « pairwise.wilcox.test » réalisé avec R.

Les figures 63 et 64 correspondent au même test de germination, les résultats sont juste représentés indépendamment.

(David et al., 2016; Kanno et al., 2016). Afin d'étudier le rôle de ces transporteurs et en particulier celui de *NPF4.1* pour la germination des graines dans nos conditions expérimentales, nous avons effectué des tests de germination avec chacun des mutants et le surexprimeur *NPF4.1*. Etant donné que l'état physiologique des graines a un impact important sur la qualité germinative, avant de réaliser ces tests, nous avons produit en parallèle plusieurs lots de graines pour chaque génotype. Ainsi, tous les lots de graines sont identiques, ils ont été générés dans les mêmes conditions de culture, et ils ont tous le même âge. Par ailleurs, nous avons sélectionné avant les tests, les lots de graines qui présentent une qualité germinative homogène pour chaque génotype. Nous avons ensuite déterminé les conditions optimales pour effectuer le test. Les premiers essais ont été effectués sans et avec stratification préalable par imbibition des graines sur papier Whatman. Comme lors d'études précédentes, les essais ont été réalisés en présence de PAC, avec ou sans GA (et contrôles sans PAC et GA). Ces essais ont mis en évidence que la stratification des graines accélère le processus de germination, mais a peu d'impact sur la tendance des résultats. Le principal problème rencontré est l'homogénéité des résultats entre les différents réplicas techniques pour chaque génotype et chaque condition testée (résultats non montrés). Pour atténuer ce problème, nous avons décidé de réitérer ces essais sur un milieu gélosé avec stratification préalable des graines, pour limiter au maximum l'effet de la dormance et de l'ABA. Lors de ces essais, nous avons également testé différentes concentrations de PAC et de GA, de sorte à déterminer les concentrations optimales pour obtenir les plus grandes différences entre les génotypes. A la suite de plusieurs essais, nous avons choisi de réaliser nos tests de germination sur un milieu gélosé supplémenté avec 2 μ M PAC et 2 μ M PAC + 2 μ M GA₃ (et contrôles sans PAC et GA). Sur un milieu de culture standard (sans PAC et GA), aucun des mutants étudiés n'a montré de différences significatives avec la lignée contrôle Col-0, démontrant que la qualité germinative des graines est équivalente pour chacun des génotypes (Figure 63 et 65). Sur un milieu supplémenté avec du PAC, les mutants *npf3.1* et *npf2.13* ont une qualité germinative similaire, inférieure à celle du Col-0 (Figure 63), confirmant pour *npf3.1* les résultats d'une précédente étude (David et al., 2016). L'ajout de GA permet de restaurer entièrement la capacité germinative des graines *npf3.1* et *npf4.1* (sur milieu PAC + GA), pour atteindre des taux de germination semblables à ceux du Col-0 (Figure 63). Le mutant *npf4.1* est encore plus sensible au PAC que les mutants *npf3.1* et *npf2.13*. A l'issue de l'essai (5 jours

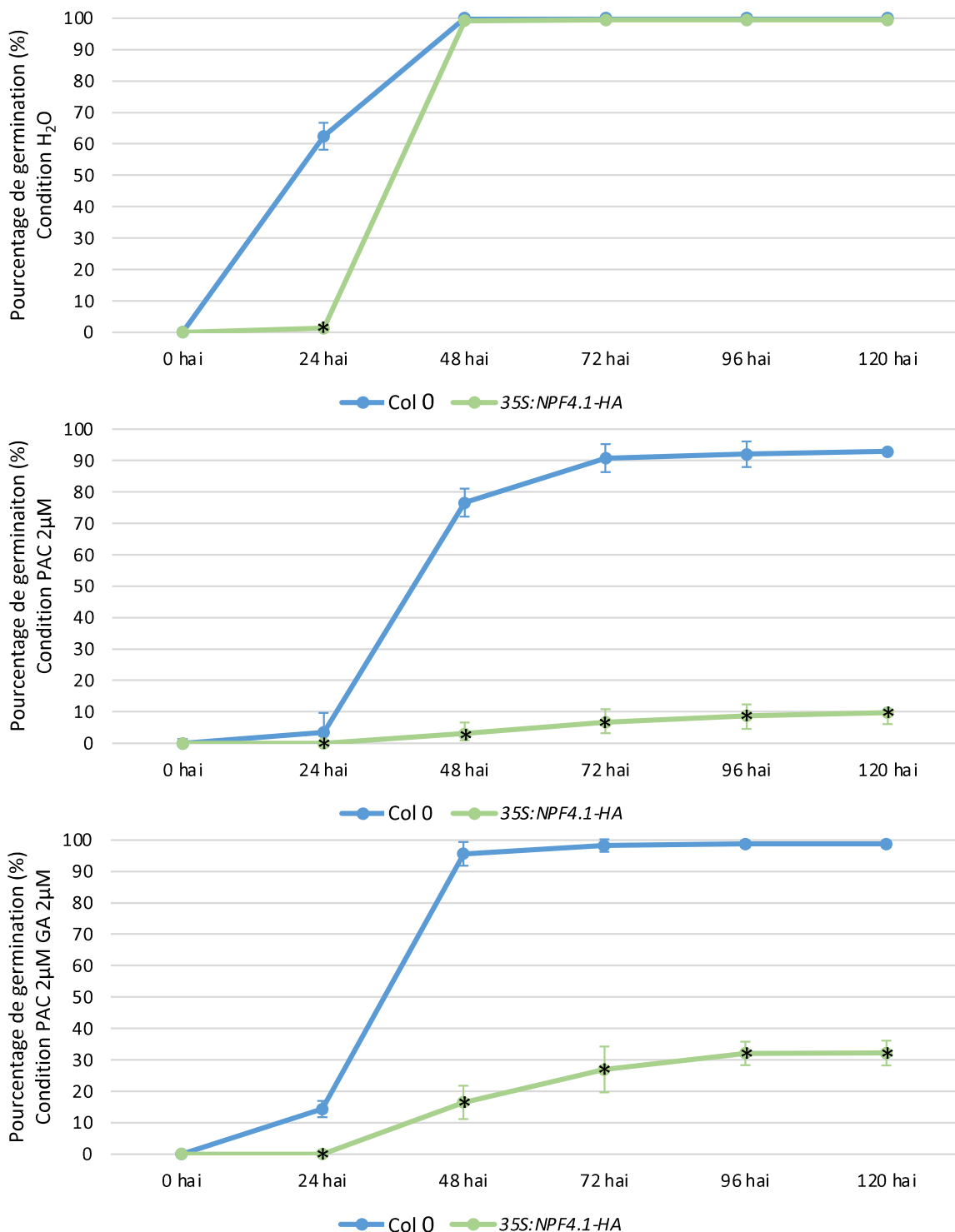


Figure 64 : Capacité germinative du surexpressueur *NPF4.1*

Les tests de germination ont été réalisés sur des graines stratifiées et imbibées sur un milieu gélosé. Le comptage des graines montrant une protrusion de la radicule est réalisé à différents temps post imbibition. Le pourcentage moyen ainsi que l'erreur standard sont calculés à partir de 3 réplicas biologiques comprenant chacun 2 boîtes individuelles par génotype, pour chaque condition. Résultats discutés dans le texte.

Les étoiles sur le graphique indiquent des différences significatives comparé au Col 0 sur le même milieu et au même temps d'imbibition suite à un test « pairwise.wilcox.test » réalisé avec R.

après imbibition), à peine 50% des graines ont germé sur PAC, alors que plus de 90% des graines ont germé pour le Col-0 (Figure 63). Si l'ajout de GA améliore la qualité germinative des graines *npf4.1*, il ne permet pas toutefois d'atteindre les mêmes taux que ceux du Col-0. De manière intéressante, le surexprimeur *35S:NPF4.1-HA* présente également des défauts de germination (Figure 64). Si sur milieu gélosé standard la surexpression de *NPF4.1* entraîne un léger retard de germination (environ 12 à 24h), sur PAC, à peine plus de 10% des graines ont germé après 5 jours d'imbibition (Figure 64). L'ajout de GA permet de restaurer très légèrement la capacité germinative des graines (sur PAC + GA). Il est vraisemblable que l'expression constitutive de *NPF4.1* perturbe la distribution des GA dans la graine, les piégeant à l'intérieur des cellules, comme cela a été proposé pour expliquer les phénotypes du surexprimeur *NPF3.1* (Tal et al., 2016). Suite à ces résultats, nous avons souhaité étudier l'effet de la double mutation *npf3.1 npf4.1*, dans le but de déterminer si ces deux transporteurs de GA ont des actions redondantes, à savoir s'ils sont impliqués dans des processus identiques. Nous avons trouvé que la capacité germinative des graines du double mutant *npf3.1 npf4.1* est similaire à celle du simple mutant *npf4.1*, sur PAC et sur PAC + GA (Figure 63). Ce résultat suggère fortement que *NPF3.1* et *NPF4.1* agissent à des niveaux différents. Enfin, nous avons étudié le comportement du double mutant *sweet13 sweet14*. Au contraire des mutants *npf3.1*, *npf4.1* et *npf2.13*, les graines du mutant *sweet13 sweet14* sont légèrement plus résistantes au PAC que celles du contrôle Col-0 (48h après imbibition)(Figure 65). Si cette tendance va dans le sens des résultats d'une précédente étude (Kanno et al., 2016), l'amplitude des réponses est toutefois bien différente entre les deux études. Dans nos conditions de culture, *SWEET13* et *SWEET14* exercent un rôle bien moindre sur la germination que *NPF3.1*, *NPF4.1* ou *NPF2.13*.

Pour l'ensemble des tests de germination, nous avons décidé de réaliser nos études statistiques sur chaque point de cinétique, indépendamment les uns des autres. Étant donné que les données, pour chaque point de cinétique, ne validait pas tous les mêmes critères (normalité des résidus et homogénéité des variances), nous avons pris la décision d'utiliser un unique test pour chaque point. Nous avons utilisé le « pairwise.wilcox.test », à l'aide du logiciel R, test non paramétrique pour étudier la significativité de nos résultats. Bien que ce test ne soit pas le plus robuste et ne permette pas de distinguer les différents niveaux de

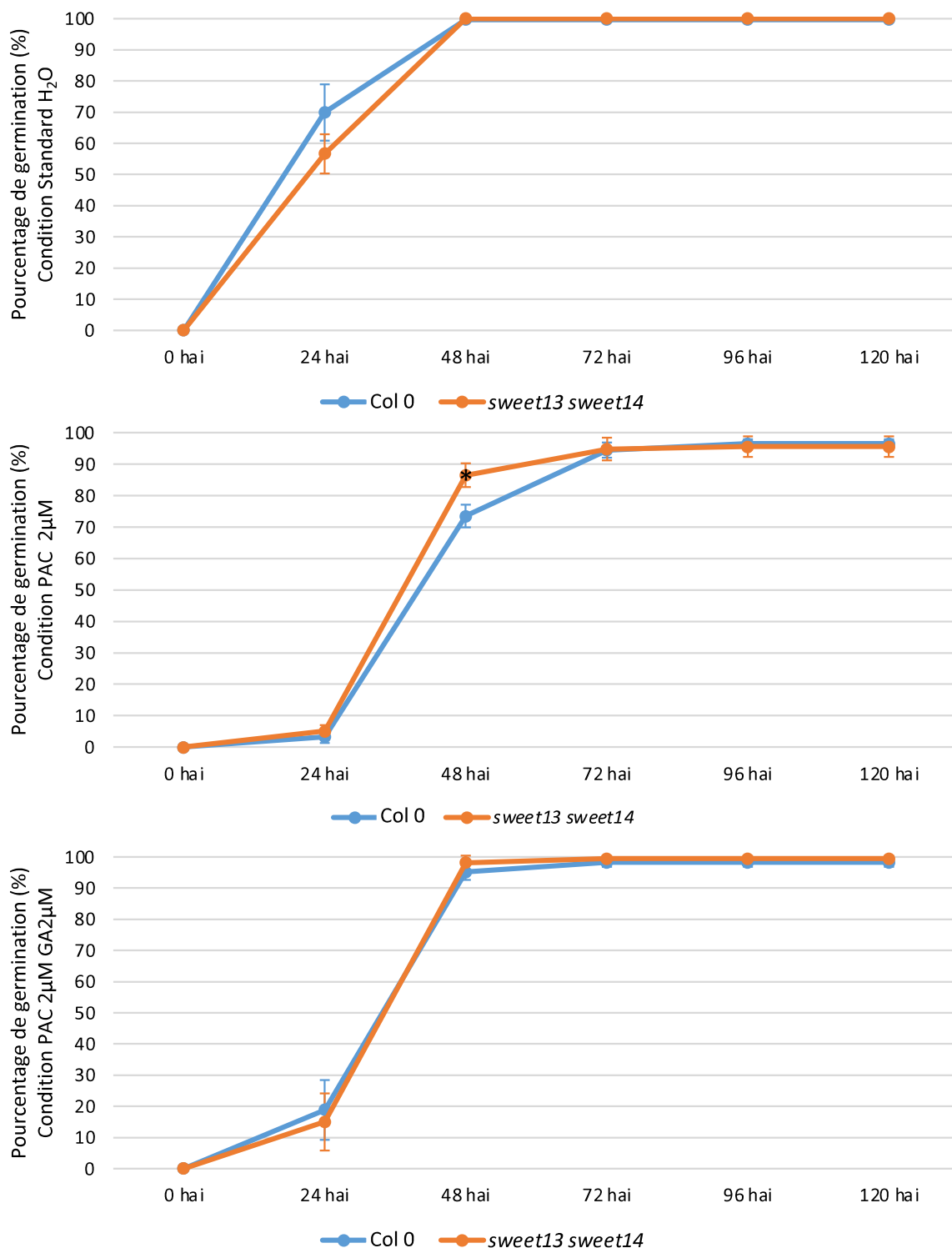


Figure 65 : Capacité germinative du double mutant *sweet13sweet14*

Les tests de germination ont été réalisés sur des graines stratifiées et imbibées sur un milieu gélosé. Le comptage des graines montrant une protrusion de la radicule est réalisé à différents temps post imbibition. Le pourcentage moyen ainsi que l'erreur standard sont calculés à partir de 3 réplicas biologiques comprenant chacun 2 boîtes individuelles par génotype, pour chaque condition. Résultats discutés dans le texte.

Les étoiles sur le graphique indiquent des différences significatives comparé au Col 0 sur le même milieu et au même temps d'imbibition suite à un test « pairwise.wilcox.test » réalisé avec R.

Les figures 63 et 64 correspondent au même test de germination, les résultats sont juste représentés indépendamment.

significativité, nous avons privilégié l'homogénéité de nos études statistiques afin de pouvoir plus aisément comparer nos résultats.

3 Discussion

Il est admis depuis des décennies que lors de la germination des graines de céréales, des GA produites dans l'embryon sont mobilisées vers les couches d'aleurone, pour induire la production et la sécrétion d' α -amylase et autres enzymes hydrolytiques qui dégradent l'amidon et divers polymères de réserves (tels que des carbohydrates) dans l'endosperme, fournissant ainsi, des nutriments à la jeune plantule en développement (Jacobsen et al., 1995). Cette affirmation est essentiellement basée sur le fait que l'embryon est nécessaire pour induire l'hydrolyse de l'amidon dans l'endosperme. Chez l'orge, il a été démontré que l'excision de l'embryon empêche l'accumulation de GA dans l'endosperme et l'activation de l' α -amylase (Woodger et al., 2010). Par ailleurs, l'application exogène de GA permet de remplacer l'action de l'embryon et induire l'expression de l' α -amylase (Atzorn et Weiler, 1983). Toutes ces observations indiquent que ce sont des GA produites dans l'embryon qui induisent la synthèse d' α -amylase dans l'aleurone. Cependant, la nature du signal (la forme de GA transportée), la cinétique et le mécanisme de transport sont toujours inconnus.

Pour apporter des réponses à ces questions, nous avons étudié le transport de GA dans des graines d'*Arabidopsis*, au cours de la germination. Si la structure des graines d'*Arabidopsis* est considérablement différente de celle des céréales (qui possèdent un large endosperme et une à plusieurs couches d'aleurone), elle comprend néanmoins un endosperme qui est composé d'une seule couche cellulaire de type aleurone (Yan et al., 2014). Et de manière similaire aux céréales, les GA sont essentielles pour induire l'expression d'enzymes hydrolytiques (Cell Wall Remodeling Enzymes, CWRE) dans l'endosperme (région du micropyle), impliquées dans le relâchement de la paroi cellulaire, un prérequis pour la protrusion de la radicule et donc de l'accomplissement de la germination (Sánchez-Montesino et al., 2019).

Pour évaluer l'importance des GA pour la rupture de l'endosperme et des téguments de la graine en général, nous avons réalisé des tests de germination avec des graines déficientes en GA. Comme précédemment rapporté, les graines de mutants de biosynthèse

de GA (dans notre étude, les mutants *ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3* et *ga3ox1 ga3ox2*) ne peuvent germer sans apport exogène de GA, mais sont capables de le faire lorsque l'endosperme et les testa sont retirés (Figure 48 ; Peng et Harberd, 2002). La rupture de l'endosperme induite par les GA constitue donc un mécanisme clé de la germination, même s'il ne faut pas occulter le rôle important qu'exercent les GA sur l'élongation de la radicule, qui génère une force mécanique nécessaire pour rompre l'enveloppe de la graine (Sánchez-Montesino et al., 2019; Carrera-Castaño et al., 2020).

Dans un deuxième temps, nous avons étudié où les GA sont produites dans les graines d'*Arabidopsis*, pendant la germination. Des colorations histochimiques réalisées avec des lignées rapportrices GUS ont révélé que les *GA3ox*, qui catalysent la conversion de GA inactives (GA₉) en GA bioactives (GA₄), sont essentiellement exprimés dans l'embryon (hypocotyle et radicule) au moment de la rupture des enveloppes (18h après imbibition ; Figure 49). En accord avec les tests de germination, *GA3ox1* et *GA3ox2* sont les acteurs principaux pour la synthèse de GA bioactives dans la graine (Hu et al., 2008). En effet, *GA3ox3* et *GA3ox4* ne sont pas exprimés dans la graine. En ce qui concerne les *GA2Oox* (qui catalysent l'étape précédente en formant du GA₉), les analyses histochimiques GUS ont révélé que *GA20ox1* et *GA20ox2* sont exprimés exclusivement dans l'embryon, alors que *GA20ox3* est exprimé à la fois dans l'embryon et l'endosperme. Ces résultats ont été confirmés par RT-qPCR sur des graines disséquées (où l'embryon et l'endosperme ont été séparés avant analyse), à l'exception de *GA3ox1* qui montre une expression dans l'endosperme au moment de la protrusion de la radicule (Figure 50B). Pris dans leur ensemble, ces résultats indiquent que si des intermédiaires de biosynthèse de GA peuvent être produits à la fois dans l'embryon et l'endosperme, les formes actives sont essentiellement produites dans l'embryon, en accord avec de précédentes études réalisées chez les céréales (Woodger et al., 2010). Il est important de noter que, si des transcrits *GA3ox1* sont détectés dans l'endosperme de graines disséquées après 18h d'imbibition, cette expression ne peut être responsable à elle seule de la rupture des enveloppes, puisque les graines du simple mutant *ga3ox1* germent normalement (au contraire du double mutant *ga3ox1 ga3ox2* ; Hu et al., 2008). Ce résultat démontre que *GA3ox2* (qui est exprimé uniquement dans l'embryon ; Figures 49 et 50B) peut compenser l'absence de *GA3ox1*.

Si l'embryon est la principale source de production de GA bioactives dans les graines en germination, ces dernières doivent être nécessairement transportées dans l'endosperme pour induire l'expression des CWRE. Pour visualiser indirectement le transport de GA de l'embryon à l'endosperme, nous avons utilisé une stratégie similaire à celle employée chez les céréales qui consistait à suivre l'induction de la production d' α -amylase dans les cellules d'aleurone (Atzorn et Weiler, 1983). Chez *Arabidopsis*, il a été démontré que l'*EXPANSIN 2* (*EXPA2*), qui code pour une CWRE spécifiquement accumulée dans l'endosperme, est induite par les GA (Sánchez-Montesino et al., 2019). Ainsi, pour étudier le transport de GA dans l'endosperme, nous avons suivi le patron d'expression spatio-temporel de *EXPA2* au moyen de la lignée *pEXPA2:GUS*, dans une série d'expériences. Par une approche dite d'« embryo bedding assay » et par application exogène de GA₄ sur des enveloppes de graines décortiquées, nous avons en premier lieu confirmé que la GA₄ est bien transportée de l'embryon à l'endosperme chez *Arabidopsis* (Figures 53 et 54). Nous ne pouvons pas exclure cependant, que d'autres formes de GA sont également transportées, comme c'est le cas pour la GA₉ dans la fleur ou la GA₁₂ sur de longues distances (Pimenta Lange et Lange, 2016; Regnault et al., 2015). Cependant, étant donné que les *GA3ox* sont peu exprimés dans l'endosperme, le transport éventuel d'intermédiaires de biosynthèse de GA aura peu de conséquences sur l'induction des CWRE. Ceci a été confirmé dans notre étude, l'application de GA₉ sur des enveloppes de graines décortiquées, ne permet pas d'induire l'expression d'*EXPA2* dans l'endosperme (Figures 54). Nous avons ensuite déterminé, au cours d'une cinétique d'induction *EXPA2-GUS*, que le transport de GA₄ de l'embryon vers l'endosperme débute entre 9 et 12h après imbibition des graines, donc avant la protrusion de la racine qui intervient 18h après imbibition (Figure 55). Ce résultat concorde avec les données obtenues sur la cinétique d'expression des gènes *GA3ox1* et *GA3ox2*, qui sont exprimés dès le début de l'imbibition (Figure 51).

Pour approfondir nos connaissances sur le transport de GA₄ dans l'endosperme, nous avons étudié son mécanisme en recherchant le ou les transporteurs impliqués. Si les GA sont des acides faibles qui peuvent en théorie diffuser et entrer librement dans les cellules, plusieurs études récentes ont identifié des transporteurs de GA qui orientent le flux de GA des sites de production vers les sites d'action (Binenbaum et al., 2018). Par exemple, NPF3.1 est

un transporteur de GA qui concentre les GA produites dans la racine, dans l'endoderme dans la zone d'élongation de la racine (Tal et al., 2016). Les transporteurs de GA précédemment identifiés font partie de deux larges familles, les SWEET et les NPF (Binenbaum et al., 2018). Pour identifier ceux impliqués dans l'acheminement de GA₄ de l'embryon vers l'endosperme, nous avons étudié les patrons d'expression des différents transporteurs de GA déjà caractérisés, dans la graine. Les résultats obtenus avec des lignées rapportrices GUS ou par RT-qPCR ont révélé que NPF4.1 est le seul transporteur qui montre une expression spécifique dans l'endosperme, au niveau du micropyle (zone de fragilisation où intervient la rupture). Parmi les autres transporteurs exprimés dans la graine (à la fois dans l'embryon et l'endosperme), sont retrouvés *NPF3.1*, *NPF2.13*, *SWEET13* et *SWEET14* (Figures 56 et 57). De manière intéressante, de précédentes études ont déjà révélé la fonction de ces transporteurs au cours de la germination, à l'exception de NPF2.13 qui n'a pas été étudié dans ce contexte (David et al., 2016; Kanno et al., 2012, 2016). Autre point important à noter, NPF3.1, NPF4.1 et NPF2.13 sont des transporteurs de GA et d'ABA. Étant donné que ces deux hormones exercent un rôle antagoniste sur la germination, la régulation de leur activité envers le transport de GA et d'ABA doit être finement contrôlée. Ceci est le cas pour NPF4.1, où il a été démontré que les GA et l'ABA entraînent en compétition pour leur transport. L'augmentation de la concentration de GA diminue l'activité de transport d'ABA de NPF4.1 (Kanno et al., 2013).

L'étude de la cinétique d'expression des gènes *NPF3.1*, *NPF4.1*, *NPF2.13*, *SWEET13* et *SWEET14*, au cours de la germination, a révélé que ces transporteurs étaient présents dès les premières heures d'imbibition des graines (Figure 58). Cela signifie que leur expression est concomitante à la synthèse de GA₄ dans l'embryon, ils sont donc directement disponibles pour le transport de GA₄.

Pour étayer davantage la fonction biologique de ces transporteurs, nous avons analysé la capacité germinative de graines mutées pour chaque transporteur. Pour atténuer l'effet de l'ABA, les tests de germination ont été effectués sur des lots de graines stratifiées. Ces tests ont montré que les mutants *npf3.1*, *npf4.1* et *npf2.13* sont hypersensibles au PAC, et que l'ajout de GA permet de restaurer une capacité germinative identique à celle de graines contrôles (Figure 63), confirmant pour *npf3.1*, les résultats d'une précédente étude (David et al., 2016). Si ces trois transporteurs de GA exercent bien un rôle pendant la germination, ils

sont impliqués à des niveaux différents. En effet, le mutant *npf4.1* est plus sensible au PAC que les mutants *npf3.1* et *npf2.13*. Il est intéressant de noter que la surexpression de *NPF4.1* accentue également la sensibilité des graines au PAC (Figure 65). Ce phénomène est vraisemblablement causé par une séquestration des GA dans toutes les cellules, diminuant le pool de GA disponibles dans les cellules de l'endosperme au niveau du micropyle, pour induire l'expression des CWRE. Une réponse similaire a été observée chez des plantules qui surexpriment *NPF3.1*, ces dernières présentant un retard de croissance global causé par la séquestration des GA (Tal et al., 2016). Nous avons également remarqué que la double mutation *npf3.1 npf4.1* n'augmente pas la sensibilité des graines au PAC (par rapport aux simples mutants respectifs), mettant ainsi en évidence que ces deux transporteurs sont probablement impliqués dans des processus différents. Au vu de leurs patrons d'expression dans la graine, nous pouvons émettre l'hypothèse que *NPF3.1* serait préférentiellement impliqué dans la croissance de l'embryon, alors que, *NPF4.1* serait impliqué dans la rupture de l'endosperme en concentrant les GA au niveau du micropyle. Pour conforter cette hypothèse, les mutants *npf3.1* et *npf4.1* ont été croisés avec la lignée *pEXPA2 :GUS*, pour visualiser l'effet des mutations sur l'induction de *EXPA2-GUS* dans l'endosperme (expérience en cours). De plus, un double mutant *npf4.1 npf2.13* et un triple mutant *npf3.1 npf4.1 npf2.13* sont en cours de génération, pour étudier la potentielle synergie d'action entre les différents transporteurs au cours de la germination. Par ailleurs, il est tout à fait concevable que d'autres transporteurs, pas encore identifiés, soient impliqués dans le transport de GA dans l'embryon ou l'endosperme, de manière redondante ou non à *NPF3.1*, *NPF4.1* et *NPF2.13*.

L'autre famille de transporteurs de GA présente dans la graine correspond aux SWEET (*SWEET13* et *SWEET14*). Il a été rapporté dans une précédente étude que les graines du double mutant *sweet13 sweet14* étaient plus résistantes au PAC que des graines contrôles, dans des tests de germination (Kanno et al., 2016). Les auteurs ont proposé que l'absence de *SWEET13* et *SWEET14* suractivait les réponses induites par les GA dans la graine. Dans nos conditions expérimentales, le double mutant *sweet13 sweet14* est très légèrement plus résistant au PAC, 48h après imbibition, par rapport aux graines contrôles (Figure 64). Avant et après le point 48h, aucune différence significative n'a été observée entre le mutant *sweet13 sweet14* et le contrôle. Cet écart dans l'amplitude des réponses observées entre les deux études peut être expliqué par différents facteurs, tels que la différence de concentration de

PAC utilisée, l'âge des graines ou encore le mode de calcul (protrusion de la radicule dans notre étude, verdissement des cotylédons dans l'étude publiée).

En se basant sur l'ensemble de nos résultats, nous pouvons établir le modèle suivant. Quelques heures après imbibition des graines, les enzymes GA3ox1 et GA3ox2 vont rapidement produire des GA bioactives (GA₄) dans l'embryon, essentiellement au niveau de l'hypocotyle et de la radicule. Les transporteurs NPF3.1 et NPF2.13, et NPF4.1, accumulés très tôt dans l'embryon et la région du micropyle, de l'endosperme, respectivement, vont contribuer au transport de GA₄ dans ces tissus pour promouvoir l'élongation de la radicule et la fragilisation concomitante de l'endosperme (via induction des CWRE dont *EXPA2*). Pour conforter ce modèle, il sera important de confirmer *in planta* la capacité de transport de GA de NPF4.1. En effet, bien que son activité ait été démontrée dans des systèmes hétérologues (Kanno et al., 2012; Wulff et al., 2019), nous n'avons pas réussi à le confirmer par des tests d'imports de GA₃-FI dans des racines qui surexpriment *NPF4.1* (Figure 61). Ces tests seront réitérés dans la racine, ainsi que, dans un système protoplaste. Alternativement, nous proposons de compléter le mutant *npf3.1* avec la construction *pNPF3.1:NPF4.1* et de reproduire les tests d'import de GA₃-FI dans la racine. Nous projetons aussi, de quantifier et comparer les contenus en GA₄ dans les embryons et les enveloppes de graines contrôles et mutées *npf4.1*, quelques heures après imbibition, afin de confirmer que les GA₄ sont essentiellement synthétisées dans l'embryon, et 18h après imbibition, pour vérifier que NPF4.1 contribue bien au transport de GA₄ de l'embryon à l'endosperme. Ce résultat sera également étayé par les analyses histochimiques EXPA2-GUS réalisées chez le mutant *npf4.1* (*npf4.1 pEXPA2:GUS*), comme précédemment indiqué.

Chapitre 2 :
Caractérisation de
transporteurs de GA
impliqués dans le
développement racinaire



Figure 66 : Morphologie d'une racine d'*Arabidopsis*

Phénotype représentatif d'une racine d'une plantule sauvage (Col-0) d'*Arabidopsis*, âgée de 14 jours, cultivée sur un milieu MS standard. *Arabidopsis thaliana* présente un système racinaire de type racine pivotante, caractérisé par la présence d'une racine principale, de laquelle émergent des racines secondaires.

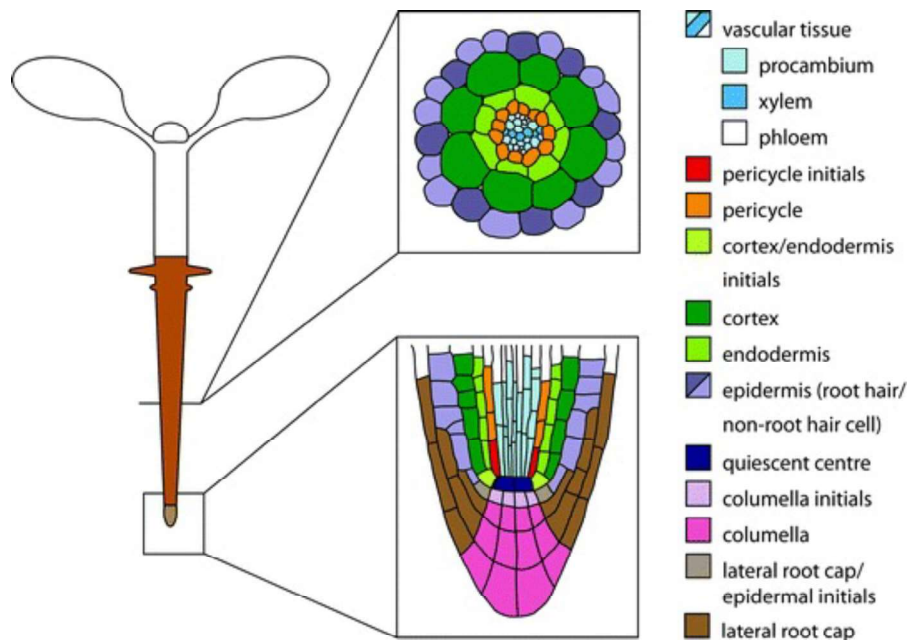


Figure 67 : Anatomie du méristème apical racinaire d'*Arabidopsis*

Représentation schématique de l'organisation du méristème apical racinaire et de la stèle d'une racine d'*Arabidopsis thaliana*. Les différents tissus sont représentés selon un code couleur.

(Jansen et al, 2010)

1 Introduction

1.1 Le système racinaire

Le système racinaire est un organe clé des plantes qui permet de fixer, absorber et transporter l'eau et les nutriments présents dans le sol. Il établit par ailleurs, des coopérations positives avec des bactéries et des champignons du sol (relations symbiotiques; Raven et Edwards, 2001), et constitue la première barrière contre les microorganismes nuisibles. Le système racinaire est principalement composé d'une racine primaire, de racines latérales et adventives. La racine primaire est formée durant l'embryogénèse et est la première à émerger hors de la graine suite à la germination. Chez *Arabidopsis* comme beaucoup de dicotylédones, le système racinaire adopte une architecture de type « racine pivotante », caractérisée par une racine principale qui s'enfonce verticalement dans le sol et sur laquelle se forment des racines latérales, dont la morphologie diffère selon les espèces et les conditions environnementales (Figure 66).

1.1.1 Développement racinaire

La racine se forme très tôt au cours du développement de la plante, dès le début de la germination. Après protrusion, la radicule s'allonge pour former la racine principale grâce à l'activité du méristème apical racinaire, où des cellules spécifiques non différenciées (totipotentes) vont se diviser, puis se différencier en tissus spécifiques. (Scheres, 2007). L'établissement du méristème apical racinaire commence durant l'embryogénèse au stade globulaire. La croissance de la racine primaire débute après une division asymétrique de l'hypophyse qui formera une petite cellule apicale appelée le centre quiescent (CQ) et une cellule basale qui donnera naissance à la columelle (Figure 67)(Dolan et al., 1993). Le centre CQ (constitué de deux cellules) maintient les cellules environnantes à un stade indifférencié ; chaque cellule entourant le CQ donne naissance à un type cellulaire spécifique (Figure 67)(Van Den Berg et al., 1998). Les cellules centrales du méristème apical racinaire forment les tissus

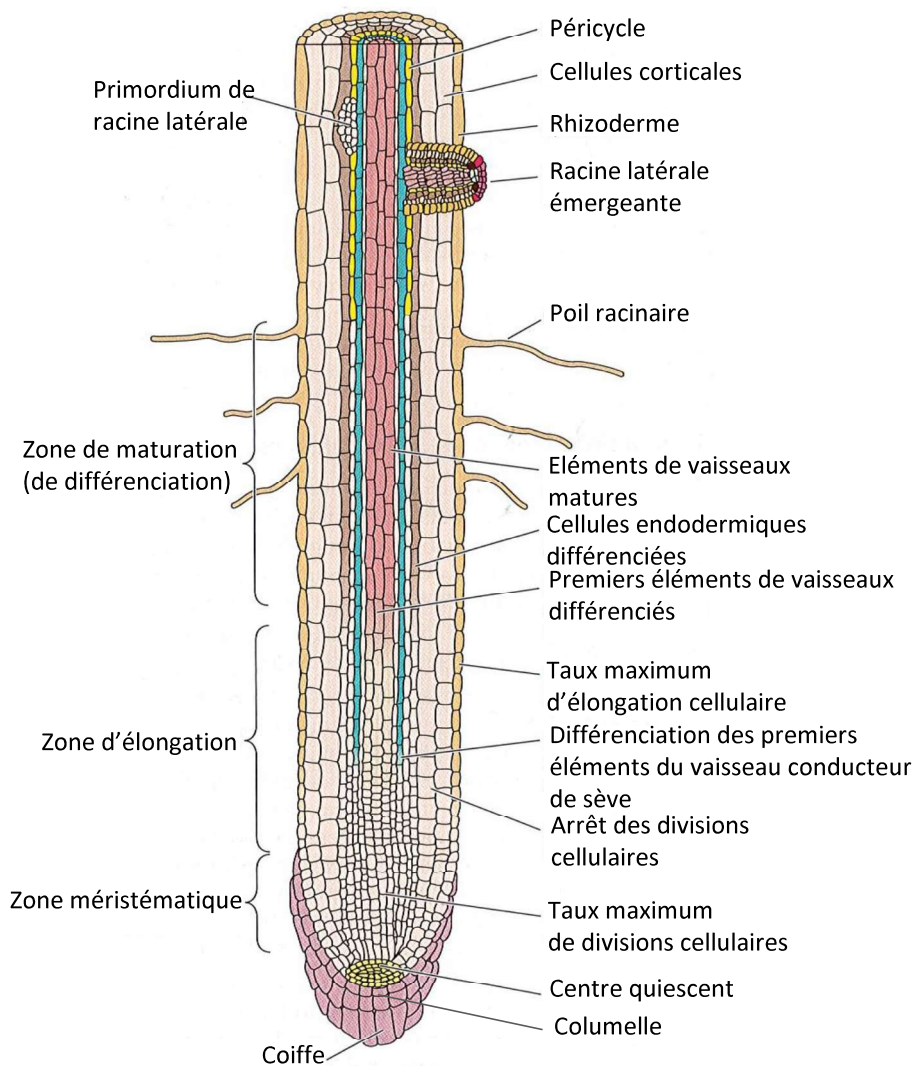


Figure 68 : Anatomie de la racine principale d'*Arabidopsis*

Représentation schématique d'une coupe longitudinale de racine présentant (à gauche) les trois grandes zones des racines. La zone méristématique qui comprend le méristème apical racinaire est la zone de division des cellules. La zone d'élongation, comme son nom l'indique est la zone où les cellules nouvellement divisées vont s'allonger. La zone de maturation se distingue de celle d'élongation, notamment par l'apparition des poils racinaires, des premiers éléments de vaisseaux différenciés, ainsi que des racines latérales.

(Adaptée de Taiz Zeiger, 2002)

vasculaires, constitués du xylème et du phloème. Les tissus vasculaires sont à leur tour, entourés successivement du péricycle, de l'endoderme, du cortex et de l'épiderme (Figure 67)(Dolan et al., 1993). A l'extrémité de la racine, le méristème apical est protégé par la coiffe racinaire formée de cellules de la columelle et de cellules de l'épiderme, aussi appelé rhizoderme (Figure 67) (Petricka et al., 2012).

Le méristème apical racinaire représente le siège de divisions multiples (zone de prolifération cellulaire), au fur et à mesure de leur éloignement de ce méristème, les cellules commencent à s'allonger, ce qui détermine la zone d'élongation, puis les différents tissus se différencient, spécifiant la zone de différenciation, caractérisée en outre, par l'apparition de poils racinaires au niveau du rhizoderme, et d'un dépôt de lignine sur les parois des cellules de vaisseaux de xylème (Figure 68). La formation de la racine primaire se complète par l'émergence des racines secondaires, au cours du développement de la plante, afin d'étendre la surface d'échange du système racinaire avec le sol.

La ramification des racines passe par la formation de racines latérales qui est initiée au niveau du péricycle et de l'endoderme des racines (Bell et McCully, 1970). Chez *Arabidopsis*, l'initiation des racines latérales se réalise à partir des cellules du péricycle au niveau du pôle du xylème (Casimiro et al., 2003). L'initiation commence avec deux cellules adjacentes du péricycle, appelées cellules fondatrices du péricycle, qui subissent des divisions anticlinales asymétriques (Casimiro et al., 2003), suite à l'accumulation spécifique d'auxine. Ces divisions génèrent deux petites cellules internes qui formeront le futur primordia et deux plus grandes cellules externes qui subiront une division asymétrique (Casimiro et al., 2001). Une série de divisions anticlinales et périclinales permettra de former une couche interne et une couche externe, jusqu'à la formation du primordium (Figure 69)(Malamy et Benfey, 1997).

1.1.2 Régulation par l'environnement

Les plantes doivent faire face, en raison de leur nature sessile, à des contraintes environnementales fortes, notamment au niveau du sol sur lequel elles se développent. Les

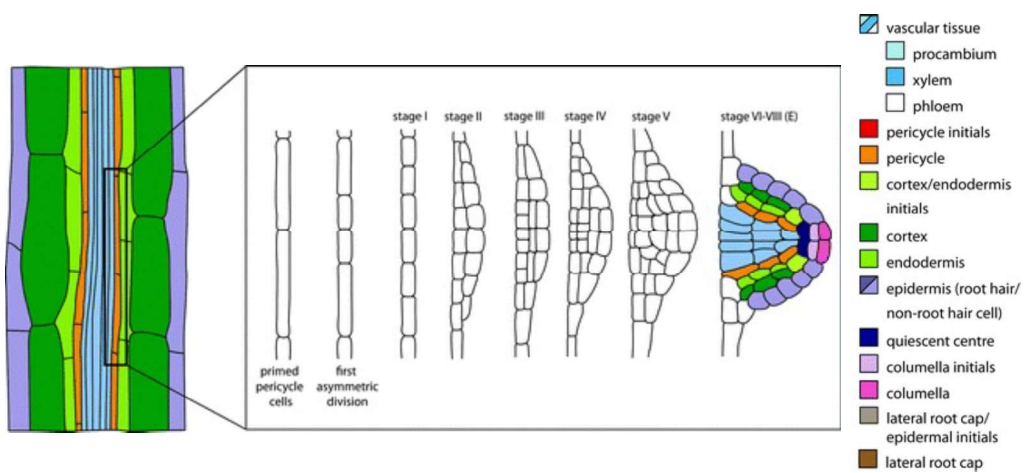


Figure 69 : Développement des racines latérales d'*Arabidopsis*

Représentation schématique du développement d'une racine latérale chez *Arabidopsis thaliana*. Les différents tissus sont représentés selon un code couleur.

(Adaptée de Jansen et al, 2010)

sols sont de nature hétérogène et peuvent comporter différentes phases (solide, liquide et gazeuse) rendant la répartition des différents nutriments, inégale. Les plantes ont développé une architecture racinaire facilement adaptable, afin de surmonter ces difficultés. Ainsi, elles pourront développer leurs racines en direction des zones les plus enrichies en nutriments et en eau. Les différents facteurs environnementaux, tels que la disponibilité des nutriments, a un impact fort sur le développement racinaire. Par exemple, dans une certaine mesure, le développement racinaire (son déploiement) est favorisé dans les sols pauvres en nutriment, alors qu'il est davantage contraint dans les sols riches en ressources (Gruber et al., 2013).

Parmi les différents nutriments influençant le développement racinaire, nous pouvons retrouver le nitrate (forme d'azote) qui module fortement la croissance racinaire. Lors d'une sévère carence en nitrate, l'élongation de la racine principale et la formation de racines latérales sont inhibées (Araya et al., 2016). Lorsque le sol présente une hétérogénéité d'accessibilité aux nitrates, une accélération de la croissance des racines est visible, ainsi qu'une augmentation du nombre de racines latérales formées en direction des sources de nitrate (Tranbarger et al., 2003). Une forte concentration de nitrate provoque une inhibition de la croissance de la racine principale, ainsi que de la formation de racines latérales (Zhang et al., 1999).

L'appauvrissement en phosphate dans le sol provoque une réduction de l'allongement de la racine primaire, et à l'inverse, induit la croissance des racines latérales et des poils absorbants (López-Bucio et al., 2002). Par ailleurs, il a été démontré que lors d'une carence en phosphate, des gènes de biosynthèse des GA sont réprimés et certains gènes du catabolisme sont induits. Ainsi, la quantité de GA bioactives diminue et le niveau d'accumulation des répresseurs DELLA augmente, modulant à la fois la croissance du système racinaire et les réponses moléculaires d'adaptation à l'appauvrissement en phosphate (Jiang et al., 2007).

Un autre exemple est celui d'une carence en fer. Lors d'un appauvrissement du sol en fer, les plantes vont mettre en place différentes réponses physiologiques et moléculaires, afin d'améliorer son absorption. Parmi ces réponses, plusieurs sont contrôlées par la signalisation GA. Lors d'une carence en fer, il a été démontré que les protéines DELLA s'accumulent dans le méristème apical racinaire et en conséquence restreignent la croissance de la racinaire primaire (Wild et al., 2016). Par ailleurs, les protéines DELLA sont spécifiquement dégradées

dans l'épiderme de la zone de différenciation des racines, diminuant ainsi, l'inhibition qu'elles exercent sur FER-like IRON DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR (FIT), un facteur de transcription qui active des gènes clés impliqués dans l'absorption de fer (Wild et al., 2016). La disponibilité en fer influe donc directement sur la distribution des GA/DELTA dans les différents tissus de la racine.

1.1.3 Régulation par les hormones

L'intégralité des phytohormones jouent un rôle plus ou moins important dans le développement des racines, à travers des actions directes, ainsi que des interconnexions au niveau de leur voie métabolique. Dans le paragraphe qui suit, je vais vous présenter les hormones principales impliquées dans la régulation du développement racinaire. Vous trouverez cependant, dans les revues suivantes des informations sur l'ensemble des régulations racinaires, promu par les hormones : Petricka et al., 2012; Vissenberg et al., 2020; Motte et al., 2019; Ubeda-Tomás et al., 2012.

La croissance de la racine principale est intimement liée à l'activité de prolifération des cellules dans le méristème et l'activité d'expansion des cellules, qui sortent du méristème et entrent dans la zone de différenciation (Ioio et al., 2008; Moubayidin et al., 2010; Liu et al., 2022). Après extrusion de la radicule en fin de germination, l'auxine qui est distribuée de façon homogène dans le méristème racinaire grâce à l'action de transporteurs PIN, active la prolifération racinaire et le méristème racinaire s'allonge. Quelques jours après germination, les CK qui activent la différenciation cellulaire en s'opposant à l'auxine, vont maintenir un équilibre entre prolifération et différenciation cellulaire, assurant ainsi, une croissance régulière de la racine principale, et un maintien de la taille du méristème racinaire (Moubayidin et al., 2010; Salvi et al., 2020). Si l'auxine et les CK sont les acteurs majeurs du contrôle de la croissance racinaire, les autres voies de signalisation hormonale (dont celle des GA) exercent également un rôle en modulant le circuit de régulation auxine/CK (Moubayidin et al., 2010; Ioio et al., 2008; Ubeda-Tomás et al., 2008). Outre sa fonction dans le méristème racinaire, l'auxine régule la formation et la croissance des racines latérales ; les CK exerçant un rôle contraire (Fukaki et al., 2002; Laplace et al., 2008).

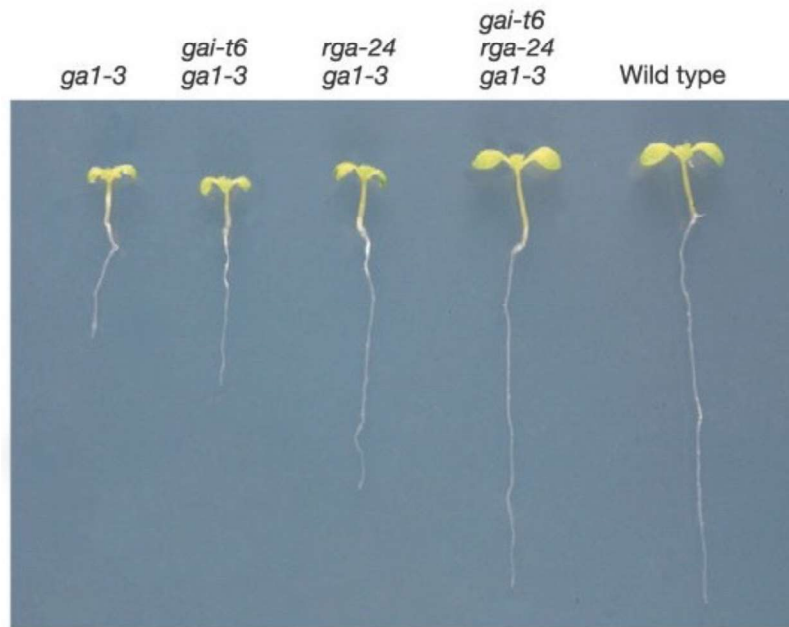


Figure 70 : Effets des mutations *gai* et *rga* sur la croissance racinaire

Photo du phénotype représentatif de plantules âgées de 5 jours, d'une lignée sauvage, du mutant simple *gai-3*, et du mutant *gai-3* croisé avec un ou deux mutants 'perte de fonction' pour les protéines DELLA, *gai-t6* et *rga-24*. La mutation d'une protéine DELLA *gai* ou *rga* permet de restaurer partiellement la croissance de la racine; alors que, les mutations simultanées des deux protéines DELLA permettent une récupération totale du phénotype sauvage.

(Fu et Harberd, 2003)

1.2 Les GA et le développement racinaire

1.2.1 Rôle des GA dans la croissance racinaire

L'importance des GA pour la croissance racinaire est connue depuis de nombreuses années. Les GA promeuvent la croissance racinaire par deux mécanismes, elles activent la division cellulaire au sein du méristème racinaire (Achard et al., 2009; Ubeda-Tomás et al., 2009) et induisent l'expansion cellulaire dans l'endoderme au niveau de la zone d'élongation de la racine (Ubeda-Tomás et al., 2008). Des études des gènes de biosynthèse de GA ont permis de mettre en évidence que les racines sont autonomes pour la production de GA et que, malgré le fait que les GA soient produites dans différents tissus, l'endoderme est le site de production majoritaire (Barker et al., 2021). L'utilisation d'inhibiteurs de production de GA restreint la croissance racinaire, et l'application exogène de GA permet de restaurer la croissance (Tanimoto, 1987). De manière consistante, le mutant de biosynthèse de GA *ga1-3* possède une racine courte, un phénotype qui est partiellement restauré chez le double mutant *della gai-t6* et *rga-24* (*ga1-3 gai-t6 rga-24*) (Figure 70) (Fu et Harberd, 2003). Par ailleurs, le phénotype racinaire du mutant *ga1-3* peut être entièrement restauré par un traitement avec des GA exogènes (Achard et al., 2009; Ubeda-Tomás et al., 2009). Pour identifier le site d'action des GA dans la racine, une étude élégante a consisté à exprimer dans chaque tissu de la racine, la protéine DELLA *gai* tronquée de son extrémité N-terminale impliquée dans l'interaction avec le récepteur GID1 (Ubeda-Tomás et al., 2008). Cette protéine insensible aux GA, s'accumule dans toutes les cellules où elle est exprimée. En utilisant cette stratégie, les auteurs ont mis en évidence que la signalisation GA/DELLA contrôle la croissance de la racine (l'élongation cellulaire) via son activité dans l'endoderme, dans la zone d'élongation de la racine (Ubeda-Tomás et al., 2008). En utilisant une approche similaire, deux autres études ont révélé que les GA activent également la prolifération cellulaire dans l'endoderme au sein du méristème apical racinaire (Ubeda-Tomás et al., 2009; Achard et al., 2009). Par ailleurs, une étude plus récente a montré que les protéines DELLA interagissent avec la protéine ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS 1 (ARR1), afin de contrôler la taille du méristème apical racinaire, probablement en modulant la balance hormonal existant entre les CK et l'Auxine (Marín-de La Rosa et al., 2015).

1.2.2 Distribution des GA dans la racine

Plusieurs études ont été réalisées, afin de caractériser la distribution des GA dans les plantes, notamment dans les racines. Une de ces études a utilisé des GA bioactives couplées avec une molécule de fluorescéine (Shani et al., 2013). Ces GA-FI sont capables d'interagir avec le récepteur des GA *GID1*, mais présentent une faible métabolisation dans les systèmes *in vivo*. Après incubation des plantules dans une solution de fluorescéine ou de GA-FI, la fluorescence émise par racines a été observée par microscopie confocale (Figure 32)(Shani et al., 2013). Alors qu'un signal fluorescent fort est observable dans tous les tissus des racines traitées avec de la fluorescéine, la fluorescence est seulement restreinte aux cellules de l'endoderme au niveau de la zone de différenciation de la racine, chez les plantules incubées avec des GA₃-FL (Figure 32)(Shani et al., 2013). Si ce résultat est en accord avec ceux illustrant le site d'action des GA dans la racine (Ubeda-Tomás et al., 2008), il met aussi en exergue l'existence d'un transport de GA de cellule à cellule, dans les racines, afin de concentrer l'hormone dans l'endoderme. Plus récemment, une autre étude a mis en avant cette corrélation entre la distribution des GA dans les racines et les sites d'action de celles-ci. A l'aide d'un Bio-senseur basé sur la technique de FRET (interaction d'une protéine DELLA avec le récepteur *GID1* en présence de GA), les auteurs ont mis en évidence que la distribution des GA dans les racines est contrôlée par un effet combiné de leur synthèse, transport et de leur dilution (Rizza et al., 2021). Ainsi, cette étude propose l'existence d'un différentiel longitudinal de biosynthèse des GA dans les racines, les GA étant de plus en plus synthétisées à mesure que l'on rentre dans la zone d'élongation de la racine (Figure 34)(Rizza et al., 2021).

1.2.3 Le transport de GA dans les racines

Les résultats précédents suggèrent l'existence d'un transport de GA dans l'endoderme. Pour caractériser le ou les transporteurs impliqué(s) dans cette relocalisation des GA dans la racine, un crible génétique a été initié à partir d'une collection de mutants de transporteurs et de GA-FI (Tal et al., 2016). Cette étude a identifié NPF3.1 comme le premier transporteur

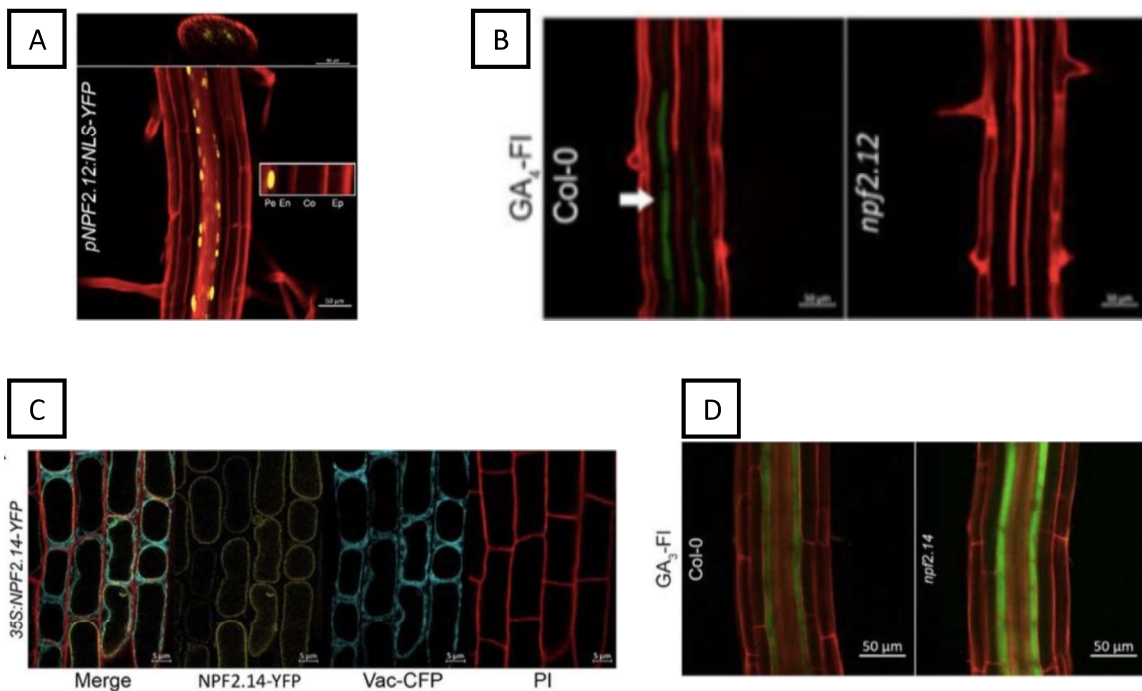


Figure 71 : Localisation et rôle des transporteurs de GA, NPF2.12 et NPF2.14, dans la racine

- A. Image représentative de la localisation tissulaire de NPF2.12 chez des plantules *pNPF2.12:NLS-YFP* âgées de 6 jours, suite à une coloration au iodure de Propidium, obtenue par microscopie confocale. Pe : Péricycle; En : Endoderme; Co : cortex; Ep : Epiderme. NPF2.12 est localisé au niveau de l'endoderme.
- B. Image représentative de plantules Col 0 et *npf2.12* âgées de 6 jours, suite à une incubation avec 5 μ M de GA₄-FI et une coloration au iodure de propidium, obtenue par microscopie confocale. La mutation de *NPF2.12* conduit à une absence de fluorescence dans l'endoderme.
- C. Image représentative de la localisation cellulaire de NPF2.14 dans l'épiderme de plantules *35S:NPF2.14-YFP* âgées de 6 jours, préalablement colorées avec du iodure de Propidium (rouge) et du marqueur de tonoplaste Vac-CFP (bleu). NPF2.14 est localisé au niveau de la vacuole des cellules.
- D. Image représentative de plantules Col 0 et *npf2.14* âgées de 6 jours, suite à une incubation avec 5 μ M de GA₃-FI, et une coloration au iodure de propidium, obtenue par microscopie confocale. La mutation de *NPF2.14* induit une forte accumulation de fluorescence dans l'endoderme.

(adaptée de Binenbaum et al, 2023)

de GA dans la racine (Tal et al., 2016). NPF3.1, localisé au niveau de la membrane plasmique est un double importeur de GA et d'ABA, appartenant à la grande famille des NITRATE TRANSPORTER1/PEPTIDE TRANSPORTER (NPF)(Tal et al., 2016; David et al., 2016). Les mutants *npf3.1* ont un phénotype similaire à celui d'une plante sauvage, au contraire, les plantes qui surexpriment *NPF3.1*, présentent une réduction de croissance significative, dûe à un défaut de distribution des GA dans la plante (Tal et al., 2016). Par ailleurs, ces plantes présentent une sensibilité accrue aux traitements avec des GA exogènes, ce transporteur est donc important pour promouvoir les réponses associées aux GA (Tal et al., 2016). De manière consistante, la mutation de *NPF3.1* entraîne une perte d'accumulation de GA-FL dans l'endoderme des racines, alors que sa surexpression induit une accumulation de GA-FL dans tous les tissus de la racine (Figure 38)(Tal et al., 2016). NPF3.1 est donc impliqué dans la relocalisation des GA dans les tissus racinaires et particulièrement dans les cellules de l'endoderme. Dans une autre étude, il a été démontré que NPF3.1 a la capacité de transporter à la fois des GA bioactives et des précurseurs et que son activité est exacerbée lorsque la disponibilité en nitrate est faible (David et al., 2016).

Des études plus récentes réalisées sur plusieurs membres de la sous-famille NPF2, en partenariat avec le laboratoire, ont permis de mettre en lumière trois nouveaux transporteurs, *NPF2.12*, *NPF2.13* et *NPF2.14*, impliqués dans la translocation de GA au niveau des racines (Binenbaum et al., 2023). Si *NPF2.12* et *NF2.13* sont essentiellement exprimés dans les cellules compagnes au niveau des vaisseaux des feuilles et sont impliqués dans le transport longue-distance de GA₁₂ des feuilles vers les racines, *NPF2.14* (et *NPF2.12*) est exprimé dans l'endoderme dans la zone différenciée de la racine (Binenbaum et al., 2023). *NPF2.12* et *NPF2.13* sont des importeurs de GA et d'ABA, localisés dans la membrane plasmique des cellules, *NPF2.14* est un exporteur de GA et d'ABA, localisé dans la membrane de la vacuole. Par des approches génétiques, biochimiques et de modélisation, il a été proposé que l'ensemble de ces transporteurs soit impliqué dans la formation de subérine dans la zone de maturation de la racine (Figure 71)(Binenbaum et al., 2023).

1.3 Objectifs

La distribution des GA dans les racines est finement régulée par leur synthèse et leur transport. Si de nombreuses études ont révélées précisément les sites de biosynthèse des GA dans les différents tissus de la racine, leur translocation des sites de synthèse vers les sites d'action commence seulement à être étudiée. Plusieurs transporteurs de GA ont été caractérisés (NPF3.1, NPF2.12, NPF2.13 et NPF2.14) et l'utilisation d'un bio-senseur de type FRET (GPS1) a permis de mettre en lumière l'existence d'un gradient de GA le long de la racine, dû en grande partie au transport de GA (Figure 34)(Rizza et Jones, 2019). Pris dans leur ensemble, ces résultats laissent supposer que le transport de GA au sein des tissus racinaires soit finement régulé, pour assurer un développement optimal en fonction des signaux internes et externes à la plante. Dans ce second chapitre de résultats, l'objectif était de caractériser de nouveaux transporteurs de GA impliqués dans la distribution de GA au sein des racines. Pour ce faire, nous nous sommes focalisés sur les transporteurs de la famille NPF, en s'appuyant essentiellement sur deux précédentes études où l'activité de transport de GA a été testée en système hétérologue, détaillées dans la partie 3.4.3.2 de l'introduction générale (Chiba et al., 2015; Wulff et al., 2019). (Tableau 1). Pour favoriser l'identification de nouveaux transporteurs de GA impliqués dans le développement racinaire, nous avons recherché parmi les transporteurs candidats (NPFs ayant la capacité de transporter des GA), ceux qui sont exprimés préférentiellement dans la racine en utilisant les banques d'expression de gènes disponibles chez *Arabidopsis*. Ces analyses *in silico* nous ont permis de sélectionner plusieurs candidats appartenant à la sous famille des NPF2 pour notre étude.

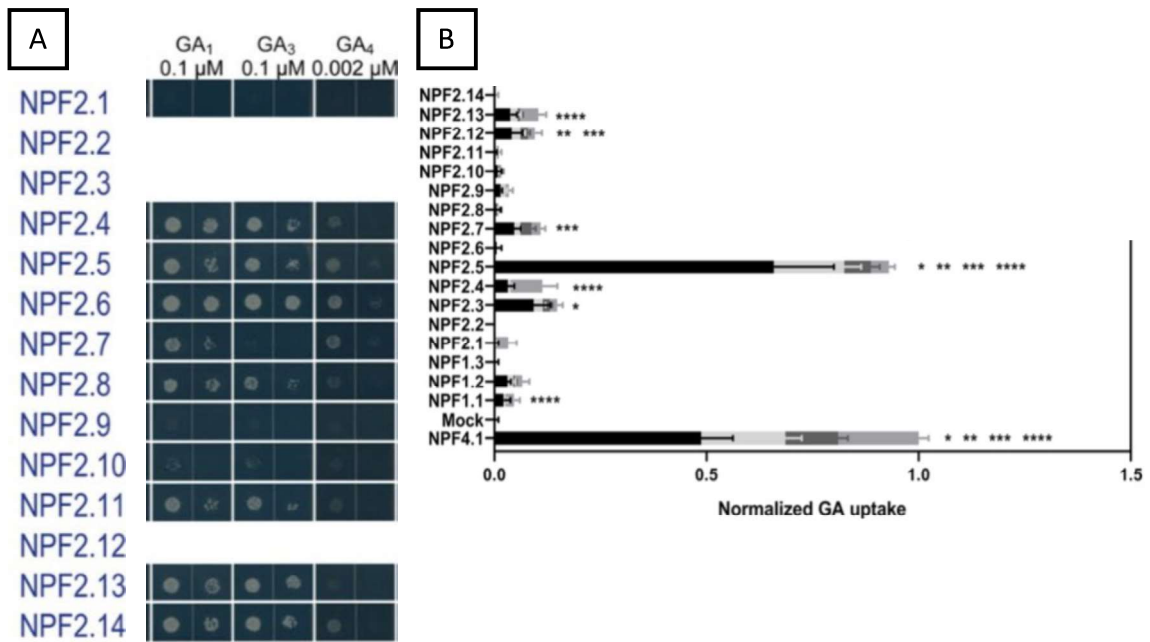


Figure 72 : Capacités d'import de GA des membres de la sous-famille NPF2 en systèmes hétérologues

Représentation des capacités d'import de différentes formes de GA, des membres de la sous-famille NPF2 (NPF2.1 à NPF2.14) testés en systèmes hétérologues.

A. Système double hybride modifié chez la levure (adaptée de Chiba et al., 2015).

B. Système d'incubation d'ovocytes de Xénope préalablement transformés et d'une analyse par LC-MS de la quantité de GA incorporées par les ovocytes (adaptée de Wulff et al., 2019).

2 Résultats

2.1 Sélection de nouveaux transporteurs de GA dans la racine

Nous avons débuté l'étude du transport de GA au sein des tissus racinaires par la sélection de transporteurs candidats. Pour ce faire, nous nous sommes appuyés sur les résultats issus de deux études qui ont testé de manière exhaustive l'activité d'import de GA par l'ensemble des NPFs, dans des systèmes hétérologues, tests qui sont précisés plus en détail dans la partie 3.4.3.2 de l'introduction générale (Chiba et al., 2015; Wulff et al., 2019). Une étude comparative des résultats obtenus par ces deux cribles montre une surreprésentation des membres de la sous-famille NPF2, quel que soit le système hétérologue utilisé (Tableau 1)(Figure 72). Nous nous sommes focalisés sur cette sous-famille qui présente deux sous-groupes pouvant être différenciés d'après leur phylogénie, le premier regroupant *NPF2.1* à *NPF2.7* et le second regroupant *NPF2.8* à *NPF2.14* (Figure 35B).

2.1.1 Recherche *in silico* de transporteurs candidats

Une analyse *in silico* des patrons d'expression a été réalisée à l'aide de l'outil eFP Browser développé par the Bio-Analytic Ressource for Plant Biology (BAR ; <http://bar.utoronto.ca>) de l'université de Toronto. Cet outil regroupe de nombreuses informations d'expressions géniques provenant de différents ensembles de données, couplées à une représentation schématique d'*Arabidopsis thaliana* (Schmid et al., 2005). L'étude des patrons d'expression des différents membres de la sous-famille NPF2 a mis en avant que l'un des deux sous-groupes composant cette sous famille, le sous-groupe *NPF2.1-NPF2.7*, présente une expression forte dans la racine. A l'exception de *NPF2.1* et *NPF2.2*, qui ne semblent pas être exprimés dans les racines, selon les données fournies par eFP Browser, tous les autres gènes de ce sous-groupe sont fortement exprimés dans la racine. Le gène

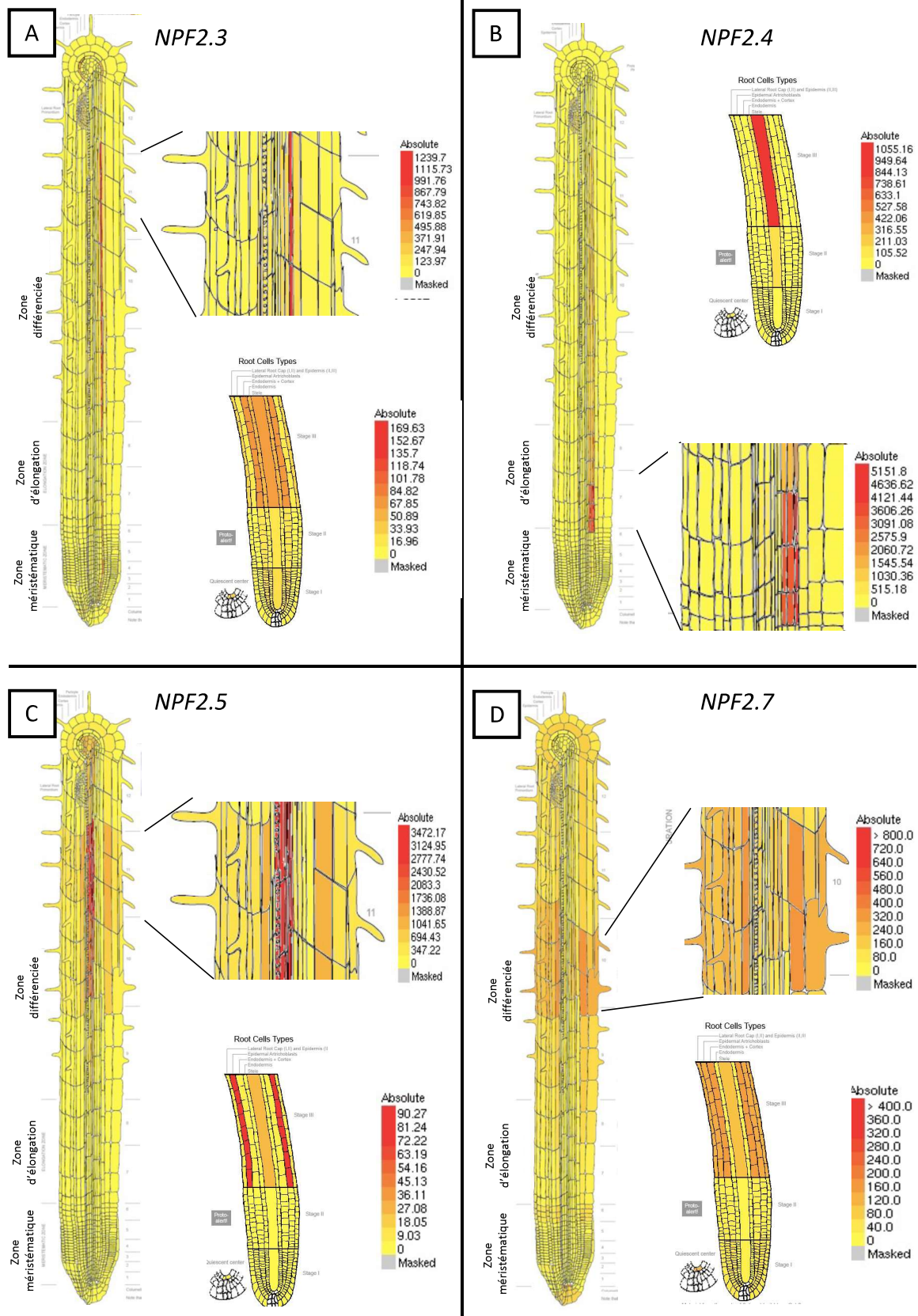


Figure 73 : Patron d'expression des NPF2 sélectionnés au sein des racines

Patrons d'expression des transporteurs *NPF2.3*, *NPF2.4*, *NPF2.5* et *NPF2.7* dans la racine entière; une vue agrandie d'une portion de la racine entière; et une vue agrandie de la partie apicale de la racine. Prédiction chez *Arabidopsis thaliana*, obtenue sur eFP Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). Supplément en Annexe 9.

NPF2.3 est largement exprimé dans les racines et les sépales, son expression racinaire est restreinte à la zone différenciée de la racine, à proximité des faisceaux vasculaires (Figure 73A; Annexe 9). Le gène *NPF2.4* est lui aussi fortement exprimé dans les racines, dans la zone différenciée, et comme *NPF2.3*, principalement autour des faisceaux vasculaires (Figure 73B ; Annexe 9). Le gène *NPF2.5* semble avoir une expression strictement racinaire, de plus, limitée à proximité des vaisseaux, et dans le cortex racinaire (Figure 73C ; Annexe 9). Le gène *NPF2.6* est un pseudo-gène, il n'est pas exprimé, et ne sera donc pas inclus dans notre étude. Pour finir, le gène *NPF2.7* montre une expression faible, néanmoins détectable dans les graines sèches et forte dans les racines, principalement dans les cellules de l'épiderme et de l'endoderme de la zone différenciée (Figure 73D ; Annexe 9). Les membres du second sous-groupe NPF2 (*NPF2.8-NPF2.14*) sont modérément exprimés dans la racine, à l'exception de *NPF2.9* qui est fortement exprimé dans la racine, selon les informations obtenues par eFP Browser. Étant donné que la fonction biologique des transporteurs de GA *NPF2.10/GTR1*, *NPF2.12*, *NPF2.13* et *NPF2.14* a déjà été étudiée, notre choix s'est porté sur les membres du premier sous-groupe de la sous-famille NPF2 (Saito et al., 2015; Binenbaum et al., 2023).

2.1.2 Recherche Bibliographique de transporteurs candidats

A la suite de l'analyse *in silico*, une recherche bibliographique a été entreprise, afin de trouver des informations sur nos différents candidats. Nous avons ainsi appris, que *NPF2.3* est un transporteur transmembranaire adressé à la membrane plasmique des cellules, surtout exprimé dans le péricycle des racines (Figure 74A)(Taochy et al., 2015). De plus, il est impliqué dans la translocation acropète du nitrate, son activité est modulée lors des stress salins, afin de maintenir la croissance des plantes (Taochy et al., 2015). Le transporteur *NPF2.4*, exprimé dans les cellules associées aux faisceaux vasculaires, est impliqué dans le transport acropète de chlorure et permet de réguler son accumulation dans les plantules, en réponse à un stress salin (Figure 74B)(Li et al., 2016). Le transporteur *NPF2.5* est exprimé dans le cortex racinaire, il permet de moduler la tolérance des plantes à la salinité en extrudant le chlorate des racines, en cas de stress salin (Figure 74C)(Li et al., 2017). Le transporteur *NPF2.7*, comme le

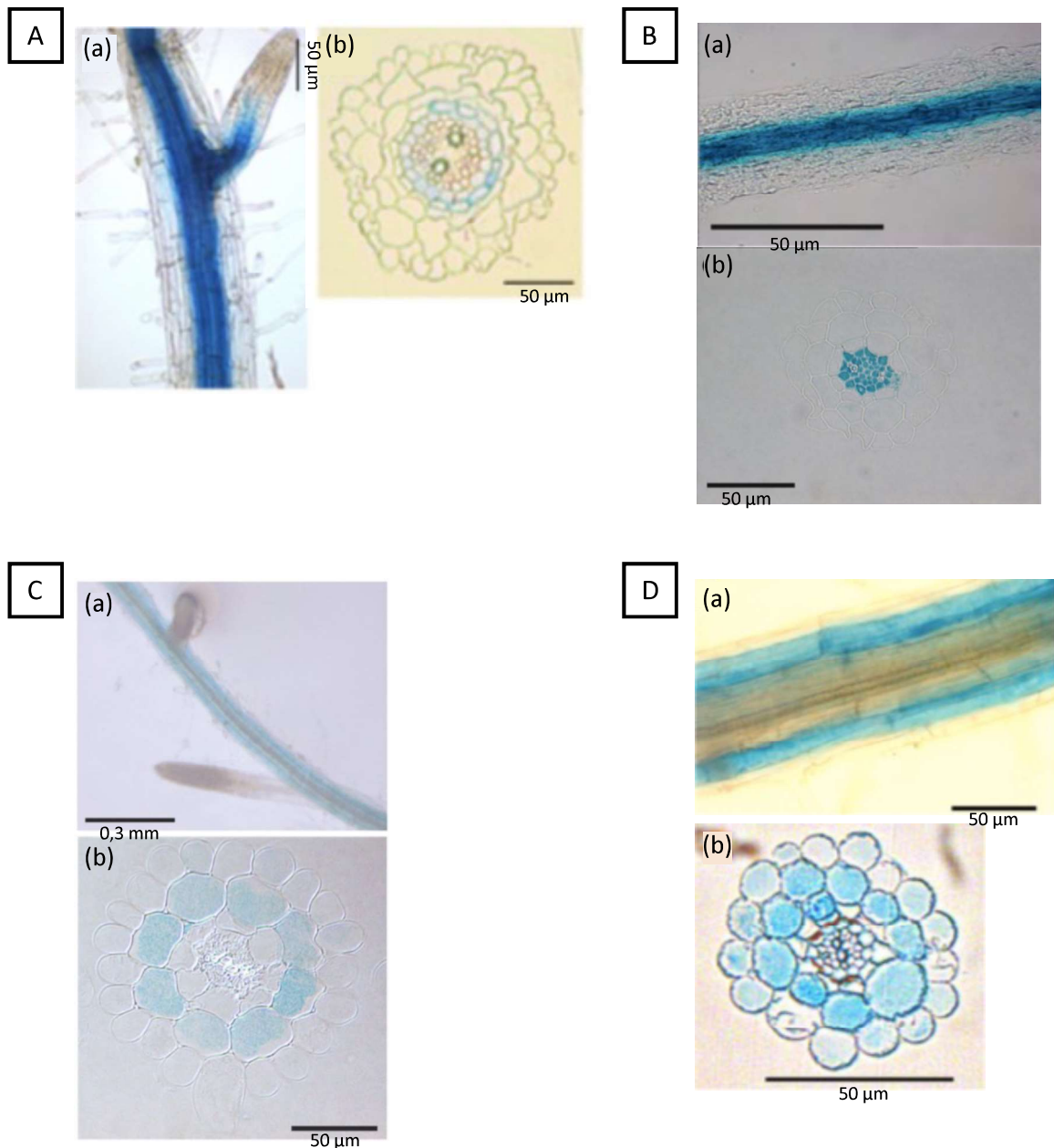


Figure 74 : Patterns d'expression (issus de la bibliographie) des *NPF2* sélectionnés au sein des racines

Localisation de l'expression des promoteurs (A) *NPF2.3*, (B) *NPF2.4*, (C) *NPF2.5* et (D) *NPF2.7* fusionnés au gène rapporteur GUS, par analyse histochimique.

- A. (a) racine primaire intacte ; (b) Coupe transversale d'une racine (Taochy et al., 2015).
- B. (a) Coloration dans la stèle de racine mature, après 1 heure d'incubation. (b) Section d'une racine âgée de 7 jours (Li et al., 2016).
- C. (a) racine âgée de 14 jours; (b) Coupe transversale d'une racine âgée de 14 jours (Li et al., 2017).
- D. (a) Racine âgée de 7 jours ; (b) Coupe transversale d'une racine âgée de 7 jours (Segonzac et al., 2007).

transporteur NPF2.5, est exprimé dans le cortex des racines (Figure 74D)(Segonzac et al., 2007). Il est impliqué dans l'efflux de NO_3^- , hors des cellules de la périphérie de la racine (Segonzac et al., 2007). Les transporteurs NPF2.1 et NPF2.2 ne semblent pas encore avoir été étudiés spécifiquement pour un rôle biologique et aucun article n'a été trouvé à ce sujet, à ce jour. Nous avons décidé de sélectionner comme candidats pour ce projet les gènes *NPF2.3*, *NPF2.4*, *NPF2.5* et *NPF2.7*.

2.2 Caractérisation des transporteurs NPF2.3, NPF2.4, NPF2.5 et NPF2.7

Avant d'étudier la fonction biologique de ces 4 gènes, candidats au transport de GA dans la racine, nous avons souhaité confirmer les données d'expression issues des analyses *in silico* et bibliographiques, en déterminant précisément leur localisation subcellulaire et leur patron d'expression dans la racine.

2.2.1 Localisation des transporteurs NPF2.3, NPF2.4, NPF2.5 et NPF2.7

Nous avons en premier lieu confirmé la localisation subcellulaire des candidats. Pour ce faire, nous avons généré des lignées transgéniques surexprimant les différents candidats fusionnés à la protéine fluorescente GFP, sous contrôle du promoteur fort et constitutif *p35S*. Ces lignées ont été cultivées *in vitro* sur un milieu gélosé standard, durant 7 jours, avant d'être étudiées par microscopie confocale. Les racines ont été préalablement colorées avec de l'Iodure de Propidium (un intercalant d'acide nucléique imperméable aux membranes cellulaires), avant observation au microscope confocal. Pour les 4 lignées exprimant les transporteurs candidats, un signal GFP est strictement détecté au niveau des membranes plasmiques des cellules (Figure 75). Aucune autre fluorescence n'est détectée dans les cellules. Ces résultats confirment ceux précédemment publiés, NPF2.3, NPF2.4, NPF2.5 et

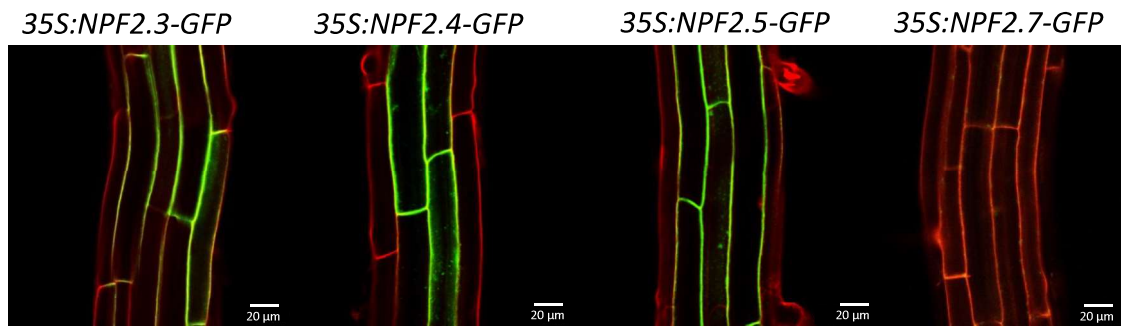


Figure 75 : Localisation subcellulaire de NPF2.3, NPF2.4, NPF2.5 et NPF2.7

Localisation des transporteurs NPF2.3, NPF2.4, NPF2.5 et NPF2.7 au sein de racines cultivées sur milieu *in vitro*, pendant 7 jours, par microscopie confocale. La fluorescence de la construction 35S:NPF2.7-GFP est faible, cependant, elle co-localise avec celle de l'Iodure de Propidium. Photos représentatives de 15 échantillons.

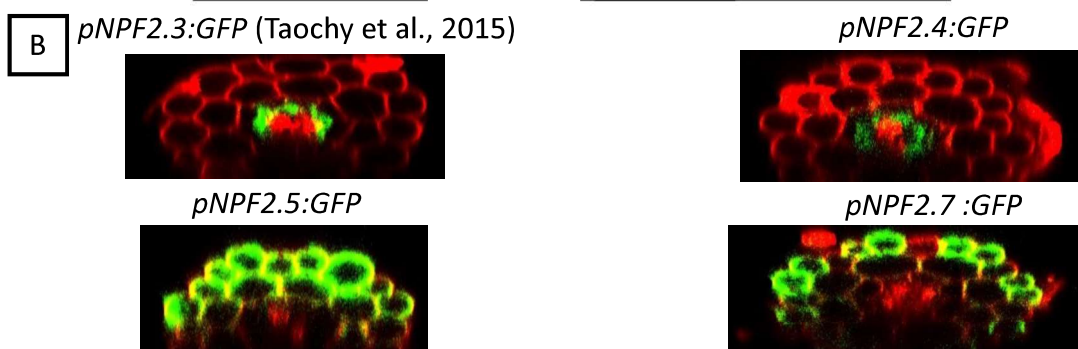
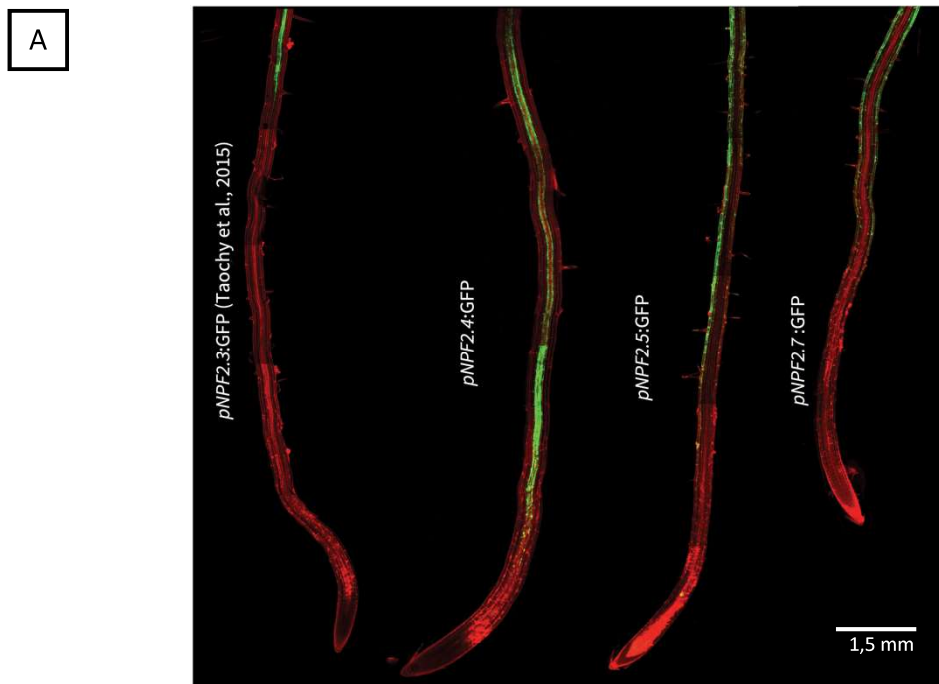


Figure 76 : Patterns d'expression des gènes NPF2.3, NPF2.4, NPF2.5 et NPF2.7 dans la racine

Localisation tissulaire des gènes NPF2.3, NPF2.4, NPF2.5 et NPF2.7 au sein de racines cultivées sur milieu *in vitro*, pendant 7 jours, par microscopie confocale. Photos représentatives de 15 racines.

A. Succession d'images prises dans le sens longitudinale de la racine, puis assemblées pour reformer la racine.

B. Images prises en section transversale de la racine, par reconstruction Z-stack.

NPF2.7 sont des transporteurs transmembranaires, impliqués dans le transport de composés, de cellule à cellule.

Par la suite, nous avons analysé le patron d'expression des gènes candidats dans l'ensemble des tissus de la racine. Pour ce faire, des lignées de fusion transcriptionnelle ont été générées, où le promoteur de chaque gène candidat exprime la *GFP*. Ces lignées ont été étudiées par microscopie confocale, de façon similaire à l'analyse précédente. Les lignées *pNPF2.3:GFP* et *pNPF2.4:GFP* présentent un signal GFP similaire à proximité du système vasculaire, dans la zone différenciée de la racine (Figure 76A). La lignée *pNPF2.3:GFP* montre une fluorescence restreinte à la partie supérieure de la racine, alors que la lignée *pNPF2.4:GFP* présente une fluorescence qui s'étend le long de la zone différenciée et s'arrête peu avant la zone d'élongation. La réalisation d'un Z-stack a permis de confirmer que ces deux transporteurs sont exprimés dans la stèle des racines, la fluorescence GFP entoure les faisceaux vasculaires (Figure 76B). A l'inverse, le signal GFP des lignées *pNPF2.5:GFP* et *pNPF2.7:GFP* se concentre au niveau des couches les plus externes de la racine, comprenant le cortex et l'épiderme (Figure 76A). La fluorescence de la lignée *pNPF2.5:GFP* descend plus bas le long de la zone différenciée que celle de *pNPF2.7:GFP* qui semble être restreinte à la partie supérieure de la zone différenciée. Les Z-stacks confirment que *NPF2.5* est exprimé dans les cellules du cortex et probablement l'épiderme (Figure 76B). *NPF2.7* semble être principalement exprimé dans les cellules de l'épiderme, à l'exception des trichoblastes (Figure 76B). Ces résultats confirment en partie les études *in silico* et bibliographiques. Nous pouvons donc conclure, que les 4 gènes sélectionnés pour l'étude sont exprimés dans la zone différenciée de la racine, sur une région plus ou moins étendue. Les transporteurs *NPF2.3* et *NPF2.4* sont exprimés autour des vaisseaux et les transporteurs *NPF2.5* et *NPF2.7* sont exprimés dans les tissus périphériques (cortex et épiderme).

2.2.2 Analyse de l'expression des transporteurs sélectionnés

Pour compléter l'analyse précédente, le niveau d'expression des gènes candidats, dans les racines, a été déterminé par RT-qPCR, à partir d'ARN totaux issus de racines de plantules

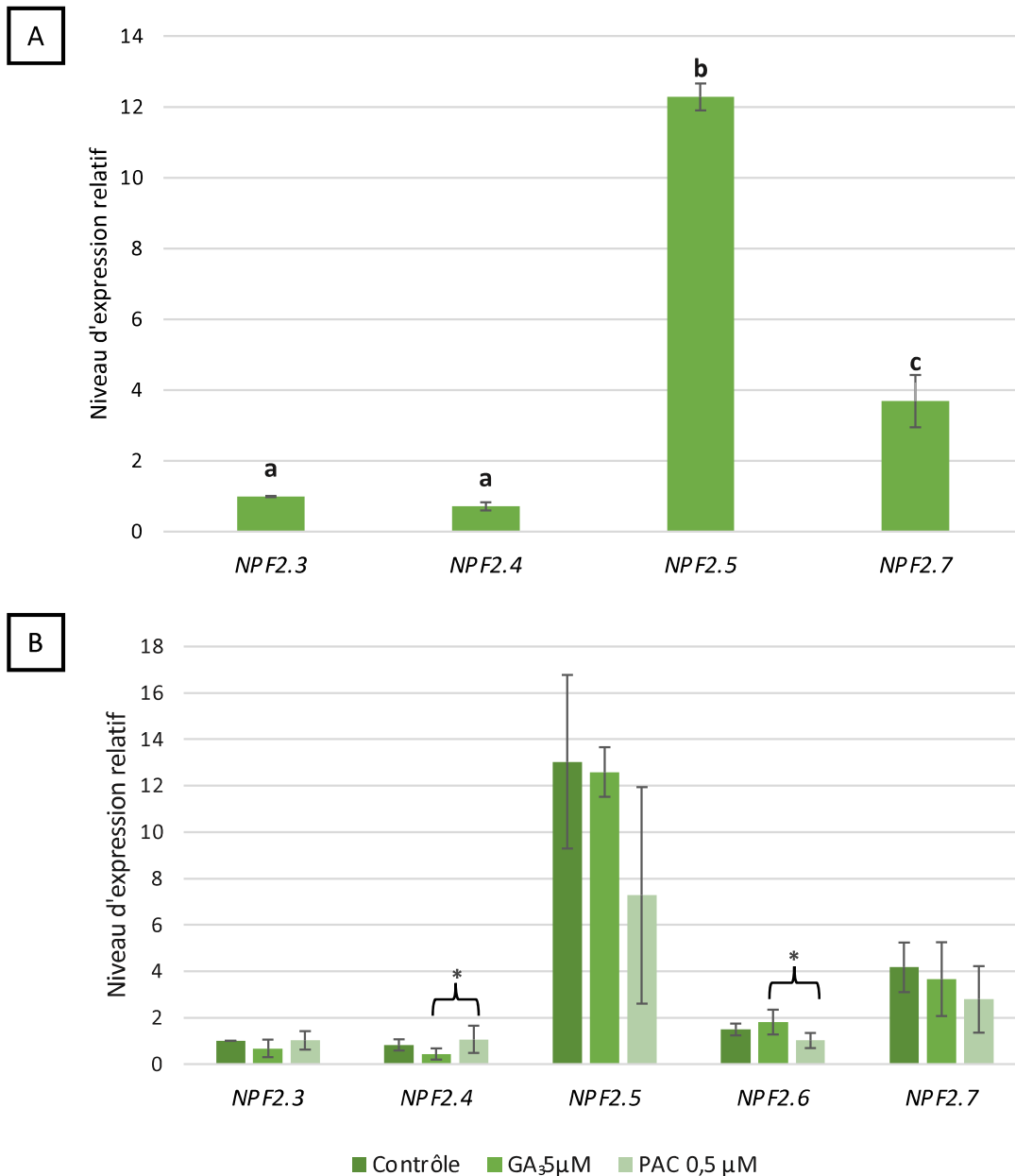


Figure 77 : Analyse de l'expression des gènes *NPF2.3*, *NPF2.4*, *NPF2.5* et *NPF2.7* dans la racine

Analyse du niveau d'expression des gènes *NPF2.3*, *NPF2.4*, *NPF2.5* et *NPF2.7* par RT-qPCR.

- A. Analyse réalisée sur des racines sauvages âgées de 10 jours. Les différentes lettres indiquent des différences significatives, suite à un test de Student ($p < 0,05$).
- B. Analyse réalisée sur des racines sauvages âgées de 7 jours. Les plantules ont été cultivées sur un milieu gélosé standard, qui a été ou non, supplémenté avec des GA₃ 5µM ou du PAC 0,5 µM. Les astérisques indiquent une différence significative suite à un test Anova à un facteur ($p < 0,05$).

Les moyennes et les barres d'erreurs ont été calculées à partir de 3 réplicas biologiques différents. L'expression relative des gènes a été calculée en fonction de l'expression du gène *NPF2.3*.

sauvages, âgées de 10 jours, cultivées sur milieu gélosé standard (Figure 77A). Les résultats ont confirmé que les gènes *NPF2.1* et *NPF2.2* sont pas ou très faiblement exprimés dans les racines, en conditions standards (pas détecté par RT-qPCR) et que *NPF2.6* est un pseudogène. Parmi les 4 autres gènes analysés, *NPF2.5* est celui qui est le plus fortement exprimé dans la racine, puis *NPF2.7*, et enfin *NPF2.3* et *NPF2.4* qui sont tous les deux faiblement exprimés (Figure 76A).

Il est admis depuis de nombreuses années, que les acteurs majeurs composant les différentes voies métaboliques et de signalisation des GA, sont régulés au niveau transcriptionnel par les GA (Hedden et Thomas, 2012). Il est donc envisageable que les gènes codant les transporteurs de GA soient également régulés par le niveau d'accumulation de GA. Afin de vérifier si cette hypothèse s'applique à nos gènes candidats, nous avons étudié comme précédemment, le niveau d'expression des gènes par RT-qPCR, dans des racines de plantules cultivées sur milieu gélosé supplémenté avec des GA bioactives (GA₃) ou du paclobutrazol (PAC, un inhibiteur de biosynthèse de GA) (Figure 77B). Les résultats indiquent que l'expression des gènes *NPF2.3* et *NPF2.4* est insensible au GA et PAC, leur niveau d'expression reste inchangé. Au contraire, les gènes *NPF2.5* et *NPF2.7* présentent une diminution significative de leur expression lors d'un traitement au PAC. Leur niveau d'expression est donc étroitement lié à celui des GA.

2.3 Étude phénotypique des mutants *npf2.3*, *npf2.4*, *npf2.5* et *npf2.7*

Afin d'étudier la potentiel implication des gènes candidats pour le transport de GA dans les racines, nous avons recherché des mutants 'perte de fonction' pour chacun des gènes. Le mutant *npf2.3* avait déjà été caractérisé et nous avons obtenu des graines (Taochy et al., 2015). Pour les candidats *NPF2.4*, *NPF2.5*, *NPF2.7*, nous avons recherché et trouvé dans les collections SALK plusieurs mutants allèles différents, qui ont été par la suite vérifiés par génotypage à partir d'ADN génomique et par RT-qPCR. Pour le gène *NPF2.4*, nous avons trouvé et vérifié 3 mutants allèles ; nous en avons éliminé deux, suite au génotypage non

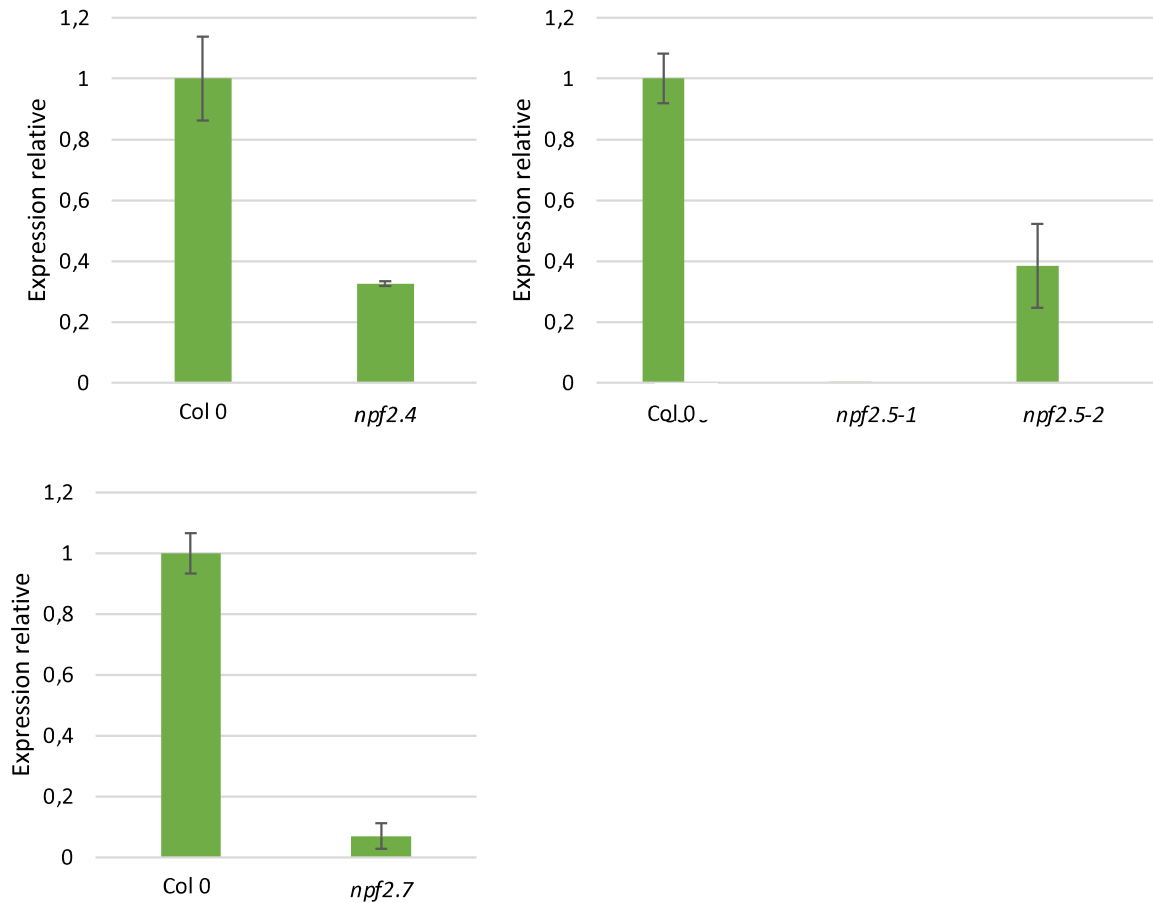


Figure 78 : Vérification du niveau d'expression des mutants *npf2.4*, *npf2.5* et *npf2.7* dans la racine

Analyse du niveau d'expression des gènes *NPF2.4*, *NPF2.5* et *NPF2.7* dans les racines des mutants simples correspondants par RT-qPCR.

Les moyennes et les barres d'erreurs ont été calculées à partir de 3 répliques techniques. L'expression relative des gènes a été calculée en fonction de l'expression du gène dans les racines des plantules sauvages.

concluant (Annexe 8)(Figure 78). Pour le candidat NPF2.5, nous avons trouvé deux mutants allèles différents, et suite à la vérification du niveau d'expression de *NPF2.5* dans les mutants respectifs, nous avons éliminé celui présentant une expression comparable à la lignée sauvage (Annexe 8)(Figure 78). Pour le gène *NPF2.7*, nous avons trouvé deux mutants allèles différents et à la suite du génotypage, nous avons éliminé celui ne présentant pas d'insertion du T-DNA (Annexe 8)(Figure 78).

Pour étudier la fonction biologique de ces transporteurs, nous avons dans un premier temps analysé la croissance de la racine principale de chacun des mutants. Étant donné que la croissance de la racine est constante pendant les 5 premiers jours qui suivent la germination, nous avons fait le choix de représenter sous forme de graphique la croissance moyenne des racines sur 24h (Figure 79A). Pour cette analyse, des plantules sauvages et mutantes pour *npf2.3*, *npf2.4*, *npf2.5* et *npf2.7* ont été cultivées sur milieu gélosé supplémenté avec du PAC à 1 μ M et/ou GA à 0,25 μ M (et contrôle sans PAC et GA). Sur le milieu contrôle, tous les mutants présentent une croissance moyenne inférieure à celle du sauvage (Col-0) (Figure 79A). *npf2.3* est le mutant qui présente une croissance racinaire la plus faible (réduction de 0,96 mm/24 h par rapport au Col-0). Les autres mutants (*npf2.4*, *npf2.5* et *npf2.7*) observent également une réduction de leur croissance racinaire (environ 0,28 mm/24 h par rapport au Col-0). Lorsque la synthèse de GA est réduite (en présence de PAC), toutes les lignées 'contrôle' et mutantes montrent une diminution importante de la croissance moyenne de leur racine. Malgré tout, la croissance racinaire des mutants *npf2.3*, *npf2.4*, *npf2.5* et *npf2.7* est plus faible d'environ 0,2 mm/24 h, que celle des plantes Col-0 avec une réduction significative pour les mutants *npf2.4* et *npf2.5* (Figure 79A). En présence de PAC et GA, la croissance moyenne des racines est restaurée à des niveaux semblables à celles obtenues sur milieu contrôle. Le mutant *npf2.3* est de nouveau celui qui présente la croissance racinaire la plus faible et significative par rapport au Col-0 (réduction de 0,55 mm/24h). Les mutants *npf2.4* et *npf2.7* montrent tous deux une diminution autour de 0,25 mm/24h et le mutant *npf2.5* montre une augmentation de la croissance moyenne d'environ 0,15 mm/24h, comparés à la lignée sauvage. Pris dans leur ensemble, même si ces résultats semblent indiquer que la croissance racinaire des mutants *npf2.4*, *npf2.5*, *npf2.7* et particulièrement *npf2.3* est moins importante que celle du Col-0, aucune différence significative n'a pu être observée lors de ces études.

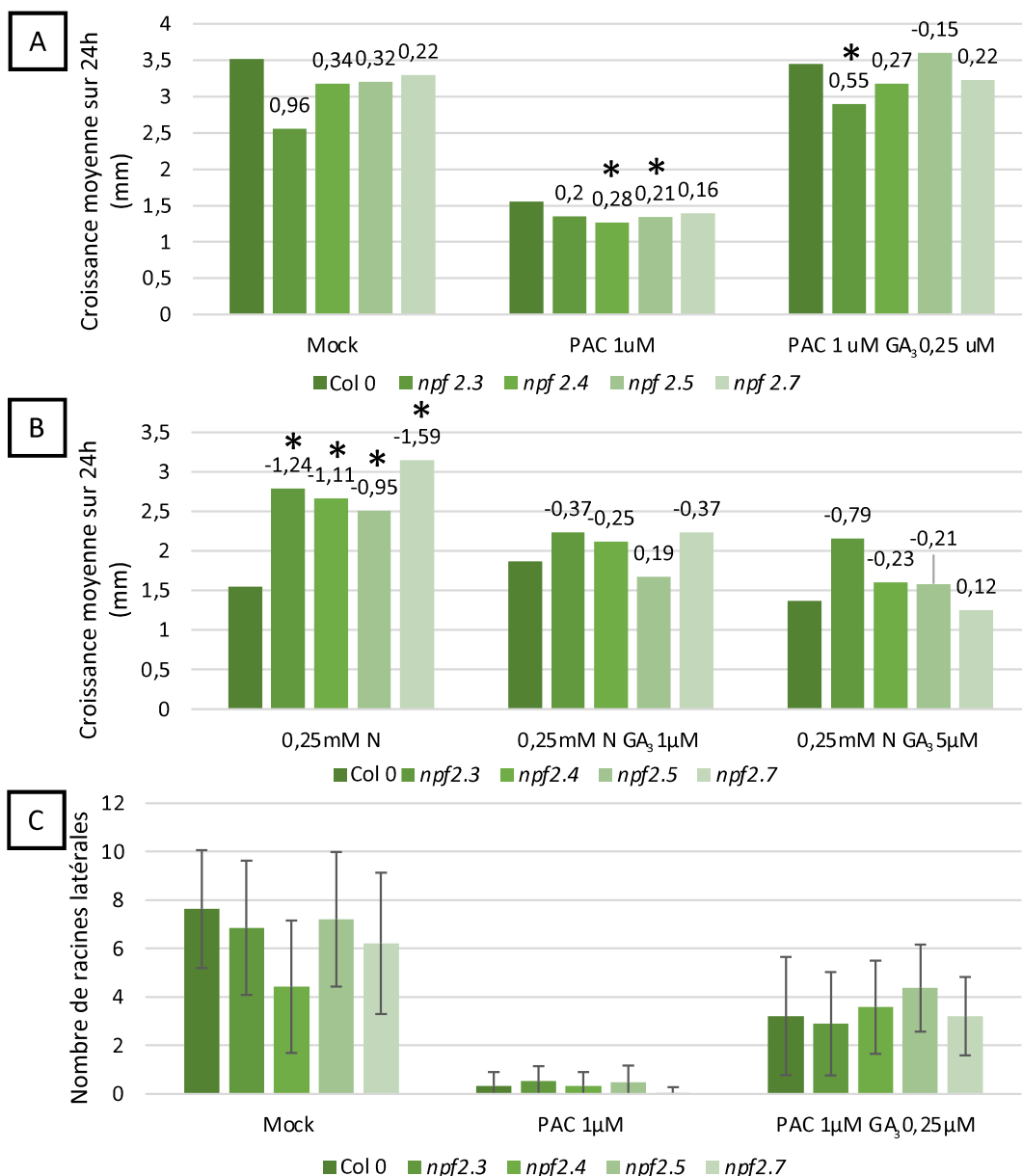


Figure 79 : Effet des mutations *npf2.3*, *npf2.4*, *npf2.5* et *npf2.7* sur le développement racinaire

Mesure de la croissance moyenne en mm sur 24h de racines de jeunes plantules sauvages ou des mutants simples, *npf2.3*, *npf2.4*, *npf2.5* et *npf2.7*, durant les 5 premiers jours de culture après germination. Les plantules ont été cultivées *in vitro*, sur un milieu gélosé standard.

(A) Les racines ont été cultivées sur un milieu gélosé standard avec ajout ou non de PAC 1μM et/ou de GA₃ 0,25 μM.

(B) Les racines ont été cultivées sur un milieu gélosé sans azote, supplémenté avec 0,25mM N avec ajout ou non de GA₃ 1μM ou de GA₃ 5μM.

Les moyennes ont été calculées à partir de $n \geq 8$ racines. Les nombres indiqués au dessus des barres correspondent au nombre de mm de différence entre la croissance moyenne du mutant et celle du sauvage, dans la même condition de culture. Les graphiques présentés sont représentatifs des différents essais réalisés (Annexe 10 et 11). Les étoiles sur le graphique indiquent des différences statistiquement significatives ($p < 0,05$), en comparaison avec la lignée Col 0, sur le même milieu lors d'un pairwise.wilcox.test.

(C) Mesure du nombre de racines latérales formées par les plantules âgées de 10 jours cultivées sur un milieu gélosé standard avec ajout ou non de PAC 1μM et/ou de GA₃ 0,25 μM. Les moyennes et les barres d'erreurs ont été calculées à partir de $n \geq 14$ racines. Un test statistique pairwise.wilcox.test a été réalisé et n'a pas mis en évidence de différence significative.

Pour étudier le phénotype racinaire des mutants à plus long terme, nous avons poursuivi la culture des plantules, jusqu'à 10 jours après germination, afin d'étudier l'impact des mutations sur le développement des racines latérales. Cette étude a révélé qu'aucune différence significative n'est constatée entre les plantules Col-0 et les mutants *npf2.3*, *npf2.4*, *npf2.5* et *npf2.7*, à la suite d'un test « pairwise.wilcox.test » ($p < 0,05$) (Figure 79C). Comme pour la croissance de la racine principale, l'application de PAC réduit considérablement le nombre de racines latérales de tous les génotypes, et l'ajout supplémentaire de GA₃ permet une récupération quasi-totale du nombre moyen de racines latérales produites par chacun des génotypes.

En conclusion, ces deux expériences tendent à montrer que les mutants *npf2.3*, *npf2.4*, *npf2.5* et *npf2.7* ont un développement de leur système racinaire qui est semblable à celui d'une plante sauvage.

L'importance du nitrate pour la croissance racinaire a été rapportée depuis de nombreuses années et a été abordée dans la partie 1.1.2 du chapitre 2. Étant donné que plusieurs membres de la sous-famille NPF2 ont la capacité de transporter du nitrate, nous avons décidé de réitérer les tests précédents sur un milieu pauvre en nitrate (Taochy et al., 2015; Segonzac et al., 2007; Almagro et al., 2009; Fan et al., 2009). Pour ce faire, des plantules Col-0, *npf2.3*, *npf2.4*, *npf2.5* et *npf2.7* ont été cultivées sur un milieu gélosé pauvre en nitrate (milieu sans azote supplémenté avec une faible concentration en nitrate : 0,25mM KNO₃⁻ (Figure 79B) ou 0,5mM KNO₃⁻ (Annexe 11). Ce milieu pauvre en nitrate a été ou non complété avec des GA₃ concentrées à 1μM, 5μM ou 10μM (Figure 79B) (Annexe 11). Les résultats obtenus indiquent que sur milieu pauvre en nitrate, les mutants *npf2.3*, *npf2.4*, *npf2.5* et *npf2.7* ont tous une croissance moyenne sur 24h qui est significativement supérieure à celle de la lignée Col-0, d'environ 1mm. Le mutant *npf2.7* est celui qui présente la plus grande différence (1,59 mm/24h), et le mutant *npf2.5* est celui qui montre la plus faible différence (0,95 mm/24h). Lorsque que des GA₃ sont ajoutées en faible quantité (1 μM GA₃) dans le milieu appauvri en nitrate, nous remarquons que la lignée sauvage présente une croissance moyenne légèrement supérieure (0,32mm/24h) à celle sur milieu sans GA₃ (Figure 79B). Par ailleurs, la différence de croissance de la racine sur 24h entre la lignée sauvage et les mutants diminue considérablement pour atteindre environ 0,3 mm/24h. Le mutant *npf2.7*

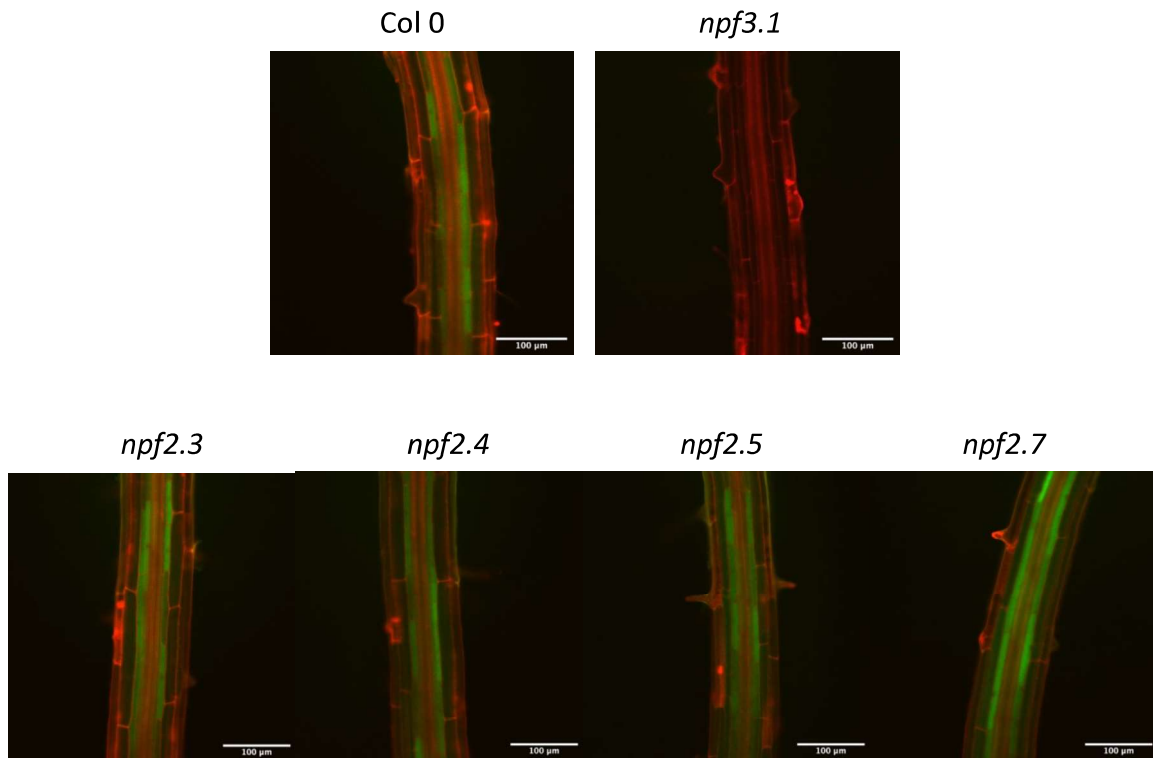


Figure 80 : Effet des mutations *npf2.3*, *npf2.4*, *npf2.5* et *npf2.7* sur la localisation tissulaire de GA₃-FI dans la racine

Des racines de plantules de génotype Col-0, *npf3.1*, *npf2.3*, *npf2.4*, *npf2.5* et *npf2.7* âgées de 5 jours ont été incubées 3h dans une solution contenant des GA₃-FI à 5μM, avant d'être colorées au Iodure de Propidium et observées à l'aide d'un microscope confocal.

Photos représentatives de 5 échantillons.

montre à nouveau la plus grande différence avec la lignée sauvage (0,37 mm/24h), cette fois-ci accompagné du mutant *npf2.3*. Le mutant *npf2.5* présente, cette fois-ci, une croissance moyenne inférieure à celle du Col-0, avec une différence de 0,19 mm/24h. Lorsque les GA₃ sont ajoutées en plus grande quantité (5 μM GA₃), nous constatons que la croissance moyenne sur 24h de la racine du Col-0 diminue par rapport à celle mesurée sur milieu sans ou avec peu de GA₃, respectivement de 0,17 mm/24h et 0,49 mm/24h. (Figure 79B). Le mutant *npf2.3* montre la croissance moyenne la plus élevée, comparée à celle du Col-0 (0,79 mm/24h), et à l'inverse le mutant *npf2.7* montre une croissance moyenne inférieure à celle du Col-0 (0,12 mm/24h). En conclusion, lorsque nous comparons les tendances obtenues sur chaque milieu de culture, nous remarquons que l'augmentation de la concentration de GA₃ semble agir négativement sur la croissance moyenne des racines, et cet effet est plus marqué chez les mutants. Par ailleurs, étant donné que la croissance racinaire du Col-0 sur milieu appauvri en nitrate (sans ajout de GA) est plus affectée que celle des mutants, l'ensemble de ces résultats suggèrent fortement l'existence d'une compétition entre le transport de GA et de nitrate.

Nous avons poursuivi notre étude de l'implication des transporteurs candidats par des tests d'imports de GA₃-Fl, avec chacun des mutants. Pour ce faire, les racines de plantules sauvages (Col-0), du mutant *npf3.1* (utilisé ici comme contrôle ; [Tal et al., 2016](#)) et des mutants *npf2.3*, *npf2.4*, *npf2.5* et *npf2.7*, ont été incubées dans une solution de GA₃-Fl à 5 μM, pendant 2 heures, avant d'être colorées avec de l'Iodure de Propidium et analysées au microscope confocal. Les résultats obtenus avec la lignée sauvage et le mutant *npf3.1* sont similaires à ceux précédemment rapportés. De manière inattendue, les racines des mutants *npf2.3*, *npf2.4*, *npf2.5* et *npf2.7* présentent toutes un signal fluorescent dans les cellules de l'endoderme dans la zone d'élongation, similaire au Col-0 (Figure 80). Ce résultat pourrait être expliqué par les patrons d'expression des transporteurs *NPF2.3*, *NPF2.4*, *NPF2.5* et *NPF2.7*, qui sont tous majoritairement exprimés dans la partie haute de la zone différenciée de la racine, et non pas dans la zone d'élongation, là, où les GA s'accumulent (Figure 76A, Figure 32). Une autre explication pourrait être la redondance fonctionnelle des transporteurs. En effet, *NPF2.3* et *NPF2.4* sont exprimés dans la même zone de la racine et les mêmes tissus ; il en de même pour *NPF2.5* et *NPF2.7* (Figure 76A).

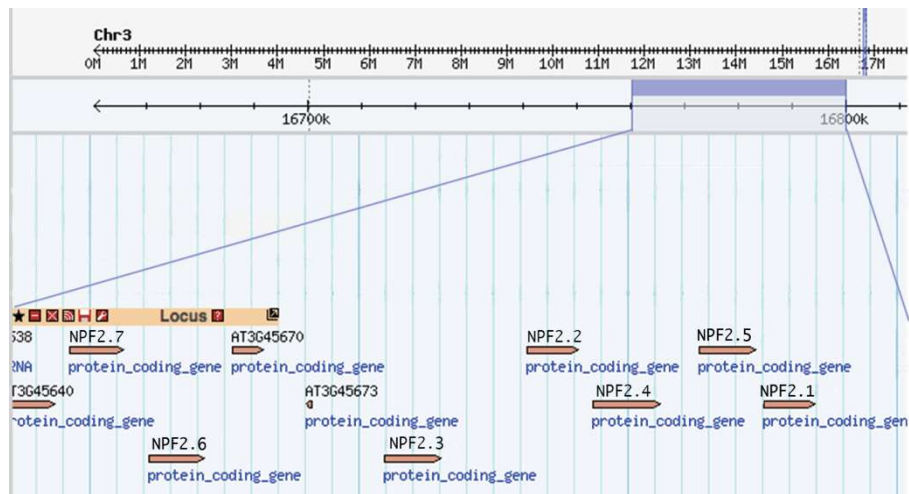


Figure 81 : Cartographie des gènes *NPF2.3*, *NPF2.4*, *NPF2.5* et *NPF2.7* sur le chromosome 3

Cartographie génétique partielle du chromosome 3 d'*Arabidopsis thaliana* présentant les différents gènes composant la sous famille *NPF2*, présents consécutivement sur le chromosome.

2.4 Étude phénotypique des multiples mutants *npf2.3 npf2.4 npf2.5 npf2.7*

L'étude précédente avec les GA₃-FI suggère l'existence d'une redondance fonctionnelle parmi les transporteurs *NPF2.3*, *NPF2.4*, *NPF2.5* et *NPF2.7*. En effet, en raison de leur séquence génique très conservée et des patrons d'expression très similaires, une redondance fonctionnelle est fort probable. Pour contourner cette éventualité, nous avons envisagé de générer des multiples mutants par croisements. Cependant, les 4 gènes sont disposés consécutivement sur le chromosome 3, rendant impossible l'obtention de multiples mutants par les techniques de génétique classique (Figure 81).

2.4.1 Obtention du quadruple mutant *npf2.3 npf2.4 npf2.5 npf2.7*

Pour obtenir un quadruple mutant *npf2.3 npf2.4 npf2.5 npf2.7*, nous avons décidé d'utiliser la stratégie des micro-ARNs artificiels (amiR), qui permet de « *silencer* » ou d'éteindre un à plusieurs gènes d'intérêts. En effet, ces amiR ont la capacité de cibler les transcrits de plusieurs gènes cibles de façon simultanée, pour induire une diminution du niveau d'accumulation de transcrits cibles par ARN interférence, et obtenir ainsi, des mutants hypomorphes (Ossowski et al., 2008). Dans le cadre de notre étude, nous avons dessiné deux séquences amiR de 21 nucléotides, ciblant de manière spécifique le plus grand nombre de gènes cibles, sans cibler d'autres gènes dans le génome. La première séquence, amiR74, cible les transcrits des 4 gènes *NPF2.3*, *NPF2.4*, *NPF2.5* et *NPF2.7*. La deuxième séquence, amiR76, cible les transcrits de 5 gènes, *NPF2.3*, *NPF2.4*, *NPF2.5*, *NPF2.7* mais aussi *NPF2.2*. Après clonage des amiR (par PCR) dans le plasmide *pRS300* (qui contient le précurseur miR319a comme matrice, Schwab et al., 2006), puis dans le plasmide *pB2GW7* pour exprimer les amiR sous promoteur constitutif *p35S* (Karimi et al., 2002), les constructions ont été introduites dans les plantes, par immersion florale. Trois lignées transgéniques indépendantes pour

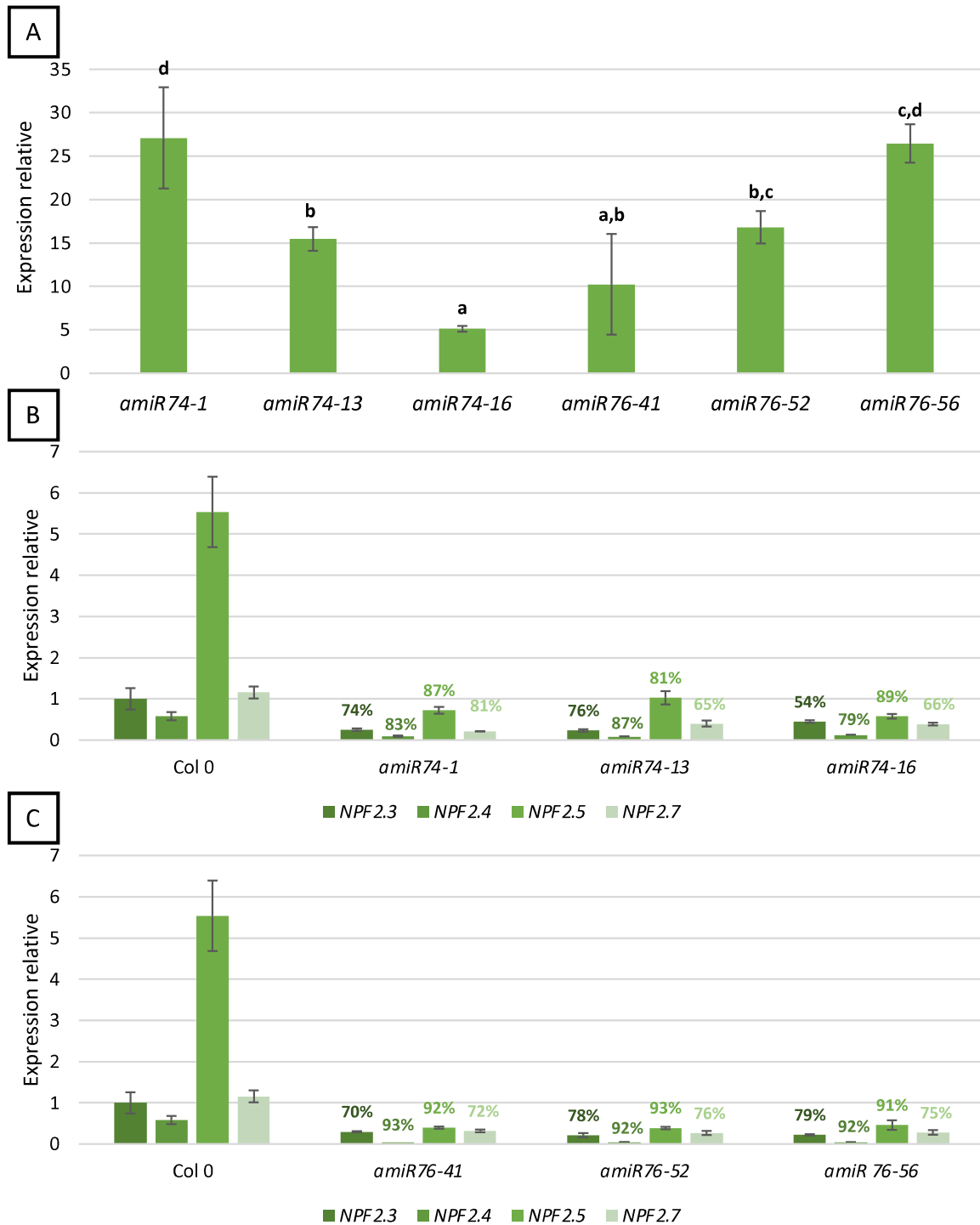


Figure 82 : Génération et analyse de multiples mutant *npf2* par stratégie amiR

- A. Analyse du niveau d'expression des amiR74 et amiR76 dans les racines de plantules transgéniques (3 lignées indépendantes), âgées de 7 jours, par RT-qPCR. Les différentes lettres indiquent des différences significatives, suite à une Anova à 1 facteur ($p < 0,05$). L'expression relative des amiRs a été calculée en fonction de l'expression du gène *Tip4.1*.
- B-C. Analyse du niveau d'expression des gènes *NPF2.3*, *NPF2.4*, *NPF2.5* et *NPF2.7* dans les racines de plantules Col-0 et exprimant les amiR74 et amiR76, âgées de 7 jours, par RT-qPCR. L'expression relative des gènes a été calculée en fonction de l'expression du gène *NPF2.3*, chez la lignée sauvage. Les nombres indiquent le pourcentage de répression des gènes cibles, dans chaque lignée comparée à leur expression chez le sauvage.

Les moyennes et les barres d'erreurs ont été calculées à partir de 3 répliques techniques.

chaque amiR ont été étudiées (amiR74-1, amiR74-13, amiR74-16 et amiR76-41, amiR76-52, amiR76-56).

Pour vérifier l'efficacité de cette méthode, nous avons en premier lieu, étudié le niveau d'expression des amiR et des gènes cibles par RT-qPCR, dans les racines de lignées amiR74 et amiR76, âgées de 7 jours (Figure 82). Dans chacune des lignées, les amiR sont tous fortement exprimés, avec toutefois une variabilité entre les différentes lignées (Figure 82A). L'étude de l'expression des gènes cibles montre que l'intégralité des gènes cibles présente une baisse de leur niveau d'expression comparée à la lignée sauvage. Leur expression est réprimée entre 54 et 93 %, selon les lignées (Figure 82B-C). Les gènes *NPF2.4* et *NPF2.5* sont les plus affectés, au niveau de leur expression, quel que soit la lignée. Les pourcentages de répression de l'expression des gènes cibles sont relativement semblables entre les lignées exprimant l'amiR74 et l'amiR76. Les deux constructions présentent donc une efficacité similaire (Figure 82B-C). De plus, nous pouvons conclure de cette étude que cette stratégie est efficace pour réprimer l'expression de nos gènes cibles simultanément. Nous avons décidé de sélectionner pour la suite de nos études, une lignée pour chaque amiR. Nous avons choisi la lignée amiR74-13 présentant une réduction de l'expression de 52% pour *NPF2.3*, de 80% pour *NPF2.4*, de 75% pour *NPF2.5* et de 58% pour *NPF2.7* (Figure 82B-C). Ainsi que, la lignée amiR76-52 qui montre une réduction de l'expression des gènes de 76% pour *NPF2.3*, de 87% pour *NPF2.4*, de 90 % pour *NPF2.5* et de 72% pour *NPF2.7* (Figure 82B-C). Ces deux lignées seront les seules utilisées pour la suite de nos travaux.

2.4.2 Rôle de *NPF2.3*, *NPF2.4*, *NPF2.5* et *NPF2.7* sur le transport local de GA

Comme précédemment avec les mutants simples perte de fonction, nous avons réalisé une analyse morphologique sur les mutants multiples hypomorphes *npf2.3 npf2.4 npf2.5 npf2.7*. Les lignées amiR74-13 et amiR76-52 (et contrôle, Col-0) ont été cultivées sur milieu gélosé standard et la longueur de la racine principale et le nombre de racines latérales ont été déterminés (Figure 83). Aucune différence significative n'a été observée pour la longueur de

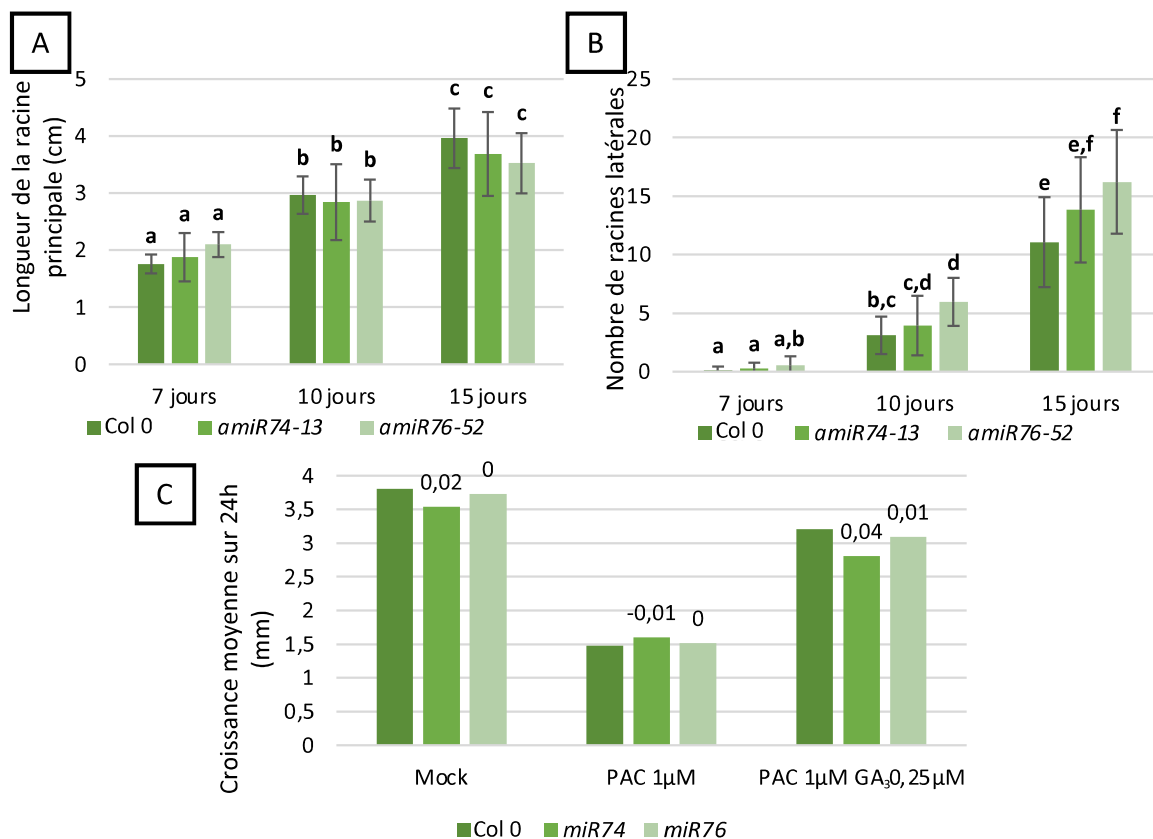


Figure 83 : Effets de l'expression des amiR74 et 76 sur le développement racinaire

Analyse phénotypique du développement racinaire de jeunes plantules sauvages (Col-0) et de lignées amiR74-13 et amiR76-52, âgées de 7, 10 et 15 jours.

- A. Analyse de la longueur de la racine principale.
- B. Analyse du nombre de racines latérales formées
- C. Mesure de la croissance moyenne en mm sur 24h, de racines de plantules cultivées sur milieu gélosé standard, avec ajout ou non de PAC 1µM et/ou de GA₃ 0,25 µM, durant les 5 premiers jours de culture après germination. Les nombres indiqués au-dessus des colonnes correspondent au nombre de mm de différence entre la croissance moyenne du mutant et celle du sauvage dans la même condition de culture. Trois réplicas biologiques ont été réalisés, pour cette étude, qui ont montré des tendances similaires. seul un réplica est présenté.

Les moyennes ont été calculées à partir de $n \geq 16$ racines. Les lettres sur chaque graphique indiquent des différences statistiquement significatives ($p < 0,05$) lors d'un test Anova à deux facteurs.

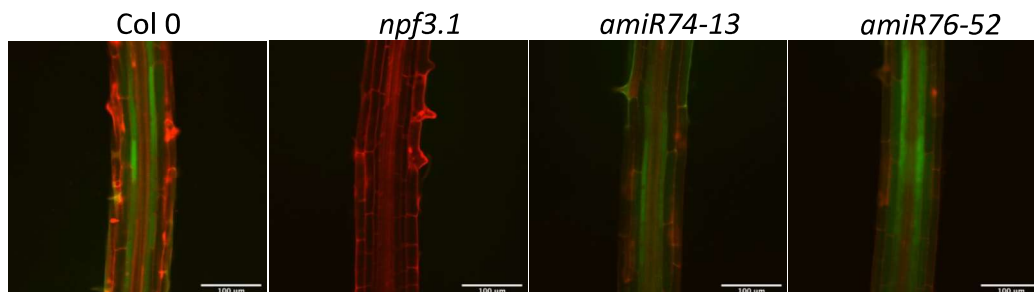


Figure 84 : Effet de l'expression des amiR74 et 76 sur la localisation tissulaire de GA₃-FI dans la racine

Des racines de plantules Col 0, *npf3.1*, *amiR74-13* et *amiR76-52*, âgées de 7 jours, ont été incubées 3h dans une solution contenant des GA₃-FI à 5µM avant d'être colorées au Iodure de Propidium et observées à l'aide d'un microscope confocal.

Photos représentatives de 15 échantillons.

la racine primaire entre les lignées amiR et la lignée sauvage (Figure 83A). Par contre, la lignée amiR76-52 forme significativement, plus de racines latérales, que la lignée sauvage après 10 jours de culture (Figure 83B). La lignée amiR74-13 semble également former plus de racines latérales que les plantules Col-0, mais la différence n'est pas significative. Pour compléter cette analyse, nous avons ensuite réalisé un test de croissance racinaire, sur le même principe que celui précédemment effectué avec les mutants simples *npf2* (Figure 83C). La croissance racinaire sur 24h des lignées amiR74-13 et amiR76-52 est identique à celle du Col-0. L'application de PAC diminue de façon similaire la croissance racinaire des lignées amiR et du Col-0, et l'ajout de GA restaure, aussi de façon similaire, la croissance racinaire des plantules (Figure 83C). Nous pouvons donc conclure de ces études, que l'expression des amiR, et donc la répression simultanée de *npf2.3*, *npf2.4*, *npf2.5* et *npf2.7*, altère peu la croissance de la racine.

L'étude du transport local de GA a été poursuivie par des tests d'import de GA₃-FI, sur le même principe que ceux réalisés avec les mutants simples *npf2*. Les résultats obtenus avec les lignées amiR montrent une certaine hétérogénéité du signal fluorescent visible dans l'endoderme, mais dans l'ensemble, les résultats tendent à mettre en évidence que les mutants hypomorphes ne présentent pas de défaut de transport des GA₃-FI, dans l'endoderme de la zone d'élongation de la racine (Figure 84). Il semblerait donc que la réduction concomitante de l'expression des transporteurs *NPF2.3*, *NPF2.4*, *NPF2.5* et *NPF2.7* n'affecte pas la distribution de GA dans cette zone de la racine. Même si ces quadruples mutants sont des mutants hypomorphes (et non perte de fonction), il est vraisemblable que ces transporteurs localisés dans la zone différenciée de la racine ne soient pas impliqués dans le transport de GA dans la zone d'élongation de la racine (dans l'endoderme).

Une étude récente réalisée au laboratoire, en collaboration avec plusieurs équipes européennes, a mis en évidence que le transport de GA dans les racines contribuait à la formation de subérine au niveau de l'endoderme dans la zone différenciée de la racine (Binenbaum et al., 2023). Dans cette étude, il a été démontré que les mutations des transporteurs *NPF2.12*, *NPF2.13* et *NPF2.14* (impliqués dans le transport de GA et d'ABA dans la racine) altéraient les dépôts de subérine dans les racines. Nous projetons de réaliser de manière analogue à cette étude, une coloration au Nile Red (un agent qui colore en rouge la

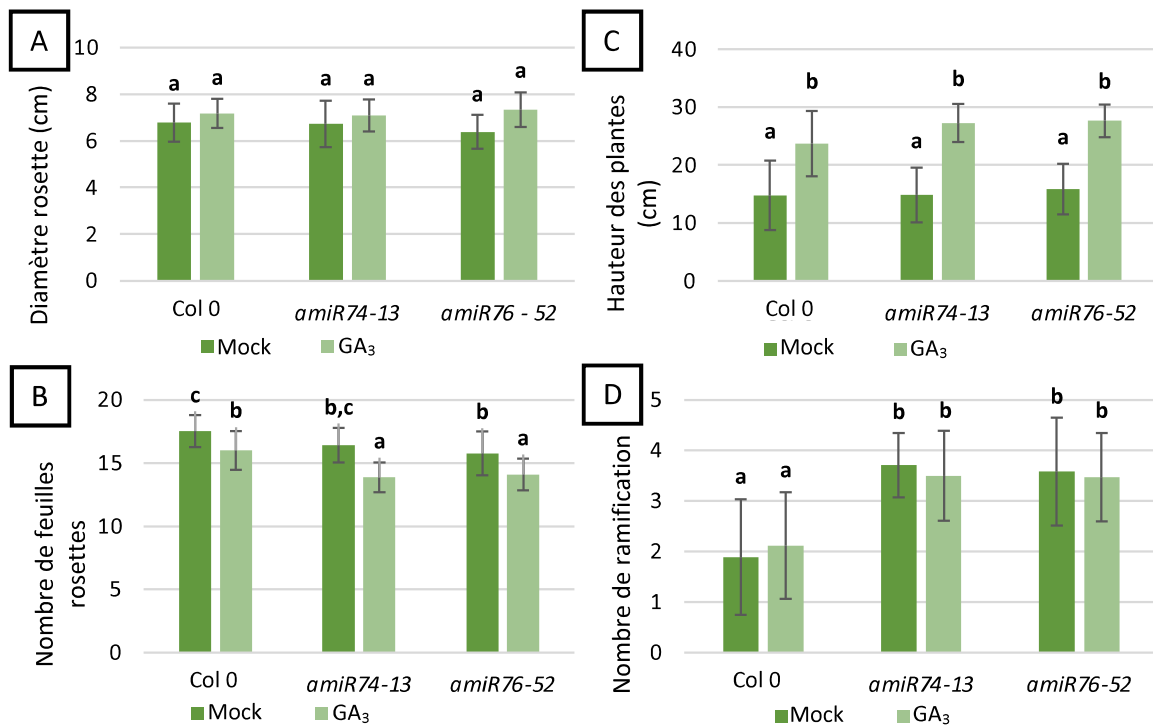


Figure 85 : Analyse morphologique des lignées *amiR74* et *76*

Analyse morphologique de plantes sauvages (Col 0), *amiR74-13* et *amiR76*, avec et sans traitement avec des GA₃ exogènes (2 pulvérisations par semaine de GA₃ à 100µM), cultivées en sol.

- A. Diamètre des rosettes de plantes âgées de 4 semaines
- B. Nombre de feuilles par rosette après floraison des plantes
- C. Hauteurs des plantes âgées de 6 semaines
- D. Nombre de ramifications axillaires à la base de la rosette, de plantes âgées de 8 semaines.

Les moyennes ont été calculées à partir de $n \geq 15$ racines. Les lettres sur chaque graphique indiquent des différences statistiquement significatives ($p < 0,05$) lors d'un test Anova à deux facteurs.

subérine) des racines de plantules Col-0 et amiR74/76, pour évaluer leur rôle dans cette fonction biologique.

2.4.3 Rôle de NPF2.3, NPF2.4, NPF2.5 et NPF2.7 sur le transport longue-distance de GA

Dans un second temps nous nous sommes intéressés à l'implication des transporteurs *NPF2.3*, *NPF2.4*, *NPF2.5* et *NPF2.7* dans le transport longue distance de GA au travers du système vasculaire des plantes. Des études distinctes ont été réalisées pour le transport acropète et basipète de GA.

2.4.3.1 Transport acropète de GA

Du fait que deux membres parmi les quatre NPF2 sélectionnés pour l'étude, sont impliqués dans le transport acropète de nitrate et de chlorate (Taochy et al., 2015; Li et al., 2016), nous avons examiné si ces transporteurs pouvaient également promouvoir la translocation de GA des racines vers les parties aériennes de la plante, en facilitant le chargement de GA dans le xylème. Afin d'étudier la potentielle implication des transporteurs *NPF2.3*, *NPF2.4*, *NPF2.5* et *NPF2.7* dans le transport acropète de GA, nous avons examiné différents paramètres morphologiques (diamètre rosette, floraison, hauteur, nombre de ramifications) de plantes sauvages (Col-0) et des lignées amiR, cultivées en terre en environnement contrôlé (en jours longs), avec ou sans traitement exogène de GA₃. La mesure du diamètre rosette, effectuée sur des plantes âgées de 4 semaines, n'a révélé aucune différence significative entre le contrôle et les lignées amiR, quel que soit le traitement (Figure 85A). Le temps de floraison a été déterminé en dénombrant le nombre de feuilles rosettes formées au moment de la transition florale. Les lignées amiR (surtout la lignée amiR76-52) tendent à fleurir plus tôt que le Col-0 ; elles forment moins de feuilles rosettes à la floraison (Figure 85B). Le traitement GA₃ diminue également le nombre de feuilles formées, aussi bien chez le Col-0 que les lignées amiR (Figure 85B). Concernant la hauteur finale des plantes à 6

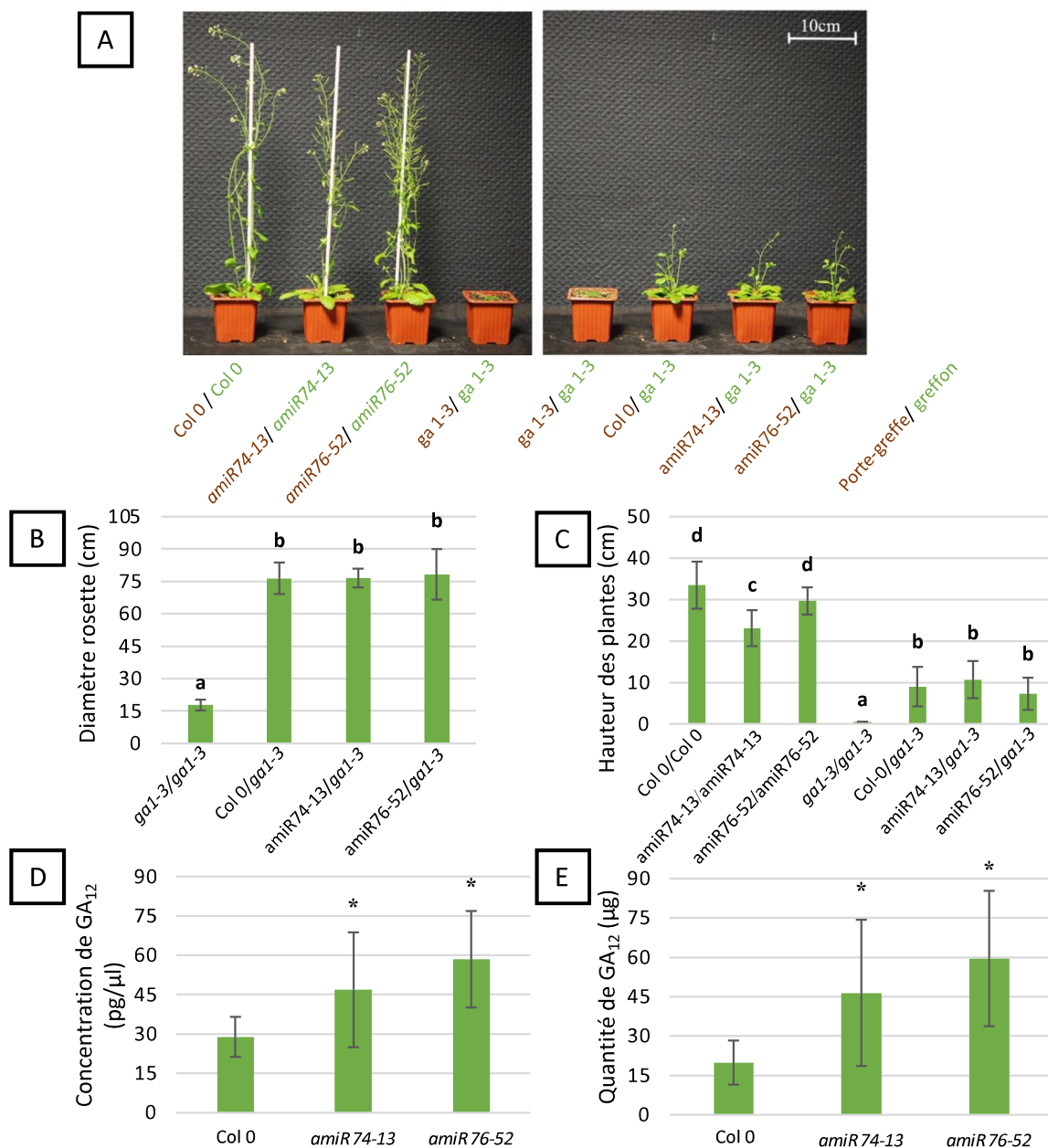


Figure 86 : Effet des mutations *npf2.3*, *npf2.4*, *npf2.5* et *npf2.7* sur le transport acropète de GA

A. Photos du phénotype représentatif de différentes combinaisons de plantes greffées âgées de 6 semaines, comprenant la lignée sauvage, les deux lignées amiRs et le mutant *gai-3*.

B. Mesure du diamètre de la rosette des plantes greffées âgées de 6 semaines.

C. Mesure de la Hauteur des plantes greffées âgées de 6 semaines.

D. Analyse de la concentration de GA₁₂ détectée dans les exsudats de xylème de plantes sauvages et des deux lignées amiRs, par spectrométrie de masse.

E. Quantification de la quantité de GA₁₂ détectée dans les exsudats de xylème sur 3 heures d'exsudation, à partir des mêmes plantes que celles utilisées en D.

B-C : Les moyennes et les barres d'erreurs ont été calculées à partir de $n \geq 6$. Les lettres sur chaque graphique indiquent des différences statistiquement significatives ($p < 0,05$) lors d'un test Anova à un facteur.

D-E : Les moyennes et les barres d'erreurs ont été calculées à partir de 3 réplicas biologiques ($n=20$ par réplicas). Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives ($p < 0,05$) par rapport à la lignée Col 0, suite à un test de Student.

semaines, les résultats montrent que le traitement GA₃ augmente la hauteur des plantes, mais aucune différence significative n'est visible entre les génotypes (Figure 85C). Enfin, pour examiner la ramification axillaire, nous avons déterminé le nombre de branches latérales formées à la base de la rosette, chez les plantes âgées de 8 semaines. Les résultats révèlent que les deux lignées amiR forment un nombre de branches latérales, qui est significativement plus élevé que les plantes contrôles (Col-0), et le traitement GA₃ n'a aucun effet (Figure 85D). Pris dans leur ensemble, ces résultats montrent que la réduction de l'expression des gènes *NPF2.3*, *NPF2.4*, *NPF2.5* et *NPF2.7* chez les lignées amiR, altère le développement des plantes. Les mutants hypomorphes fleurissent plus tôt et forment plus de branches latérales. Cependant, cet effet ne semble pas être lié à un défaut de transport acropète de GA, puisque le traitement des plantes avec des GA₃ exerce le même effet, chez les plantes Col-0 et les lignées amiR.

Pour conforter (ou pas) ces résultats, une autre stratégie a été mise en place pour directement visualiser l'effet de la réduction d'expression des 4 *NPF2* étudiés, sur le transport acropète de GA : les micro-greffes. Les micro-greffes consistent à mettre en contact, au stade plantule, au niveau de l'hypocotyle, deux génotypes différents, puis, de visualiser l'effet sur le développement de la future plante greffée. Le laboratoire a une longue expertise dans ce champ d'investigation et il a déjà démontré qu'un porte greffe sauvage (Col-0) est capable de restaurer la croissance d'un greffon nain déficient en GA (Regnault et al., 2015). Pour étudier le rôle de *NPF2.3*, *NPF2.4*, *NPF2.5* et *NPF2.7* dans le transport acropète de GA, nous avons greffé le mutant *ga1-3* (mutant nain déficient en GA ; voir introduction partie 3.1.1.1) sur un porte greffe sauvage (Col-0) ou hypomorphe *npf2.3 npf2.4 npf2.5 npf2.7* (amiR74-13 et amiR76-52). Comme attendu, les greffes contrôles Col-0/Col-0 et amiR/amiR se développent normalement, et les plantes *ga1-3/ga1-3* sont naines (Figure 86A). De même, comme précédemment rapporté, les plantes Col-0/*ga1-3* (le porte greffe est de génotype sauvage et le greffon de génotype *ga1-3*) sont plus hautes et ont un diamètre rosette plus grand que les plantes *ga1-3/ga1-3*, confirmant l'existence d'un transport de GA des racines vers les parties aériennes de la plante (Figure 86A-C). Concernant les greffes amiR/*ga1-3*, toutes les plantes sont semblables aux greffes Col-0/*ga1-3*, aucune différence significative n'est observée entre ces différentes combinaisons de greffes (Figure 86A-C). Ces résultats sont en accord avec ceux

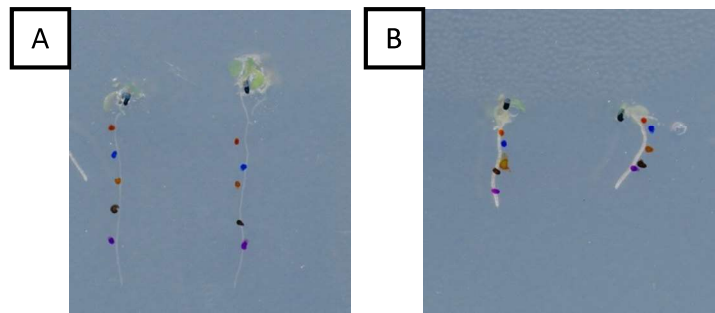
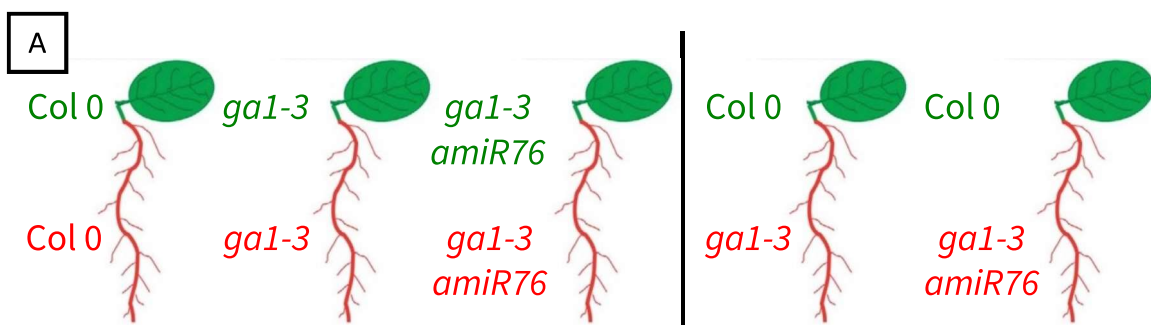


Figure 87 : Morphologie des racines de plantules *ga1-3 amiR74* et *ga1-3 amiR76*
 Photos représentatives de la morphologie des racines de plantules (A) *ga1-3 amiR76-56* et (B) *ga1-3 amiR74-13*, âgées de 7 jours. Chaque jours un point de couleur différente a été ajouté à la pointe de la racine.



Greffes contrôles

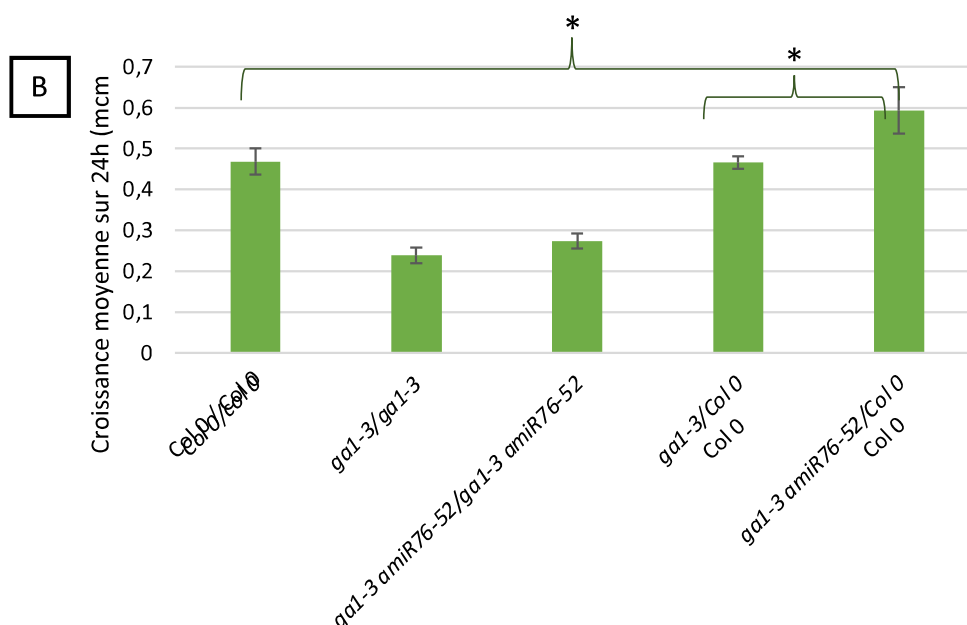


Figure 88 : Effet des mutations *npf2.3*, *npf2.4*, *npf2.5* et *npf2.7* sur le transport basipète de GA

- A. Schématisation de la stratégie de micro-greffes utilisées.
 B. Mesure de la croissance moyenne en mm sur 24h, des racines des différentes combinaisons de micro-greffes, durant les 5 premiers jours après transfert sur boîte de milieu gélosé, peu nutritif. Les moyennes et les barres d'erreurs ont été calculées à partir de $n \geq 6$. Les astérisques (*) indiquent des différences statistiquement significatives ($p < 0,05$), suite à un test de Student.

précédemment obtenus (Figure 85), la réduction de l'expression de *NPF2.3*, *NPF2.4*, *NPF2.5* et *NPF2.7* chez les lignées amiR, ne semble pas altérer le transport acropète de GA.

Le laboratoire a démontré que la principale forme de GA transportée sur de longues distances chez *Arabidopsis* est la GA₁₂, un intermédiaire de synthèse (Regnault et al., 2015 ; voir introduction générale partie 3.3). Pour poursuivre l'analyse des transporteurs *NPF2.3*, *NPF2.4*, *NPF2.5* et *NPF2.7*, nous avons déterminé la quantité et la concentration de GA₁₂ retrouvés dans des exsudats xylémiens de plantes amiR et sauvages (Col-0). Les exsudats ont été collectés durant 3 heures, puis analysés par spectrométrie de masse UHPLC-SIM. De manière inattendue, les exsudats xylémiens des deux lignées amiR (*amiR74-13* et *amiR76-52*) contiennent plus de GA₁₂ que ceux des plantes contrôles (Figure 86D et E). A ce stade de l'étude, il est difficile d'expliquer ce résultat. Des analyses complémentaires devront être réalisées. Même si ces derniers résultats restent inexplicables, l'ensemble des résultats indique que les transporteurs *NPF2.3*, *NPF2.4*, *NPF2.5* et *NPF2.7* ne sont pas impliqués dans le transport acropète de GA.

2.4.3.2 Transport basipète de GA

Au vu des patrons d'expression racinaire des gènes *NPF2.3*, *NPF2.4*, *NPF2.5* et *NPF2.7* et des résultats obtenus précédemment, nous avons émis l'hypothèse que ces transporteurs pourraient être impliqués dans un transport longue distance basipète de GA, comme cela vient d'être démontré pour les transporteurs *NPF2.12* et *NPF2.13* (Binbaum et al., 2023). Pour tester cette hypothèse, nous avons de nouveau utilisé la stratégie des micro-greffes, simplement en inversant l'orientation des génotypes. Donc pour cette analyse, nous avons greffé des greffons sauvages (qui produisent des GA) sur des porte-greffes *ga1-3*, et nous avons mesuré la croissance racinaire. Pour étudier l'implication de nos 4 transporteurs, nous avons au préalable généré des multiples mutants *ga1-3* *amiR74-13* et *ga1-3* *amiR76-52* par croisement. Dès obtention des mutants homozygotes, nous avons examiné leur développement racinaire (Figure 87). L'analyse du développement racinaire de ces lignées, dont les résultats ne sont pas présentés dans la thèse, a révélé que le mutant *ga1-3* *amiR74-13* présente un sévère défaut de croissance qui n'est pas restauré par un traitement GA (Figure

87B). Ce résultat n'a pas été observé chez le mutant *ga1-3* amiR76-52 (Figure 87A). Nous avons donc préféré écarter le mutant *ga1-3* amiR74-13 de notre étude, car son retard de croissance n'est pas causé par un défaut de distribution des GA. Les micro-greffes ont donc été réalisées avec la lignée sauvage (Col-0), mutées *ga1-3*, amiR76-52 et *ga1-3* amiR76-52 (Figure 88A). 5 jours après avoir greffé les plantes, ces dernières ont été transférées sur milieu gélosé peu nutritif (détaillé dans le matériel et méthodes section 2.1.2), et la croissance de la racine primaire sur 24h (moyenne sur les 5 premiers jours de culture) a été mesurée (Figure 88B). Les résultats montrent que les plantes greffées *ga1-3* amiR76-52/Col-0 ont une croissance racinaire moyenne significativement supérieure à celle des plantes greffées Col-0/Col-0 et *ga1-3*/Col-0 (Figure 88B). Ces résultats suggèrent que la répression de l'expression des gènes *NPF2.3*, *NPF2.4*, *NPF2.5* et *NPF2.7* dans la racine n'altère pas le transport basipète de GA, et au contraire semble le favoriser légèrement.

Comme indiqué précédemment (résultats obtenus avec les mutants simples perte de fonction *npf2.3*, *npf2.4*, *npf2.5* et *npf2.7*), nous ne pouvons pas exclure que ces transporteurs soient impliqués dans la redistribution des GA dans la zone différenciée de la racine pour induire la formation de subérine. Comme proposé précédemment avec les mutants simples, des colorations au Nile Red seront réalisés sur les lignées amiR, mais aussi sur les racines de greffes *ga1-3*/Col-0 et *ga1-3* amiR76-52/Col-0 (qui ne produisent pas de GA dans leur racine).

3 Discussion

Un axe de ma thèse a consisté à caractériser de nouveaux transporteurs de GA exerçant un rôle dans la distribution de GA au sein des tissus racinaires. Deux précédentes études mettant en œuvre des tests d'import de GA en systèmes hétérologues, en double hybride modifié chez la levure et en ovocytes de Xénope, nous ont permis de présélectionner plusieurs membres de la famille des NPFs, présentant des capacités de transport de GA (Tableau 1 ; Chiba et al., 2015; Wulff et al., 2019). Une analyse *in silico* des patrons d'expression de tous les candidats présélectionnés, nous a guidé vers la sous-famille NPF2, dont plusieurs membres présentent une expression forte dans la racine. Cette sous-famille est divisée en deux sous-groupes, le premier comprenant les membres NPF2.1 à NPF2.7 (aussi appelé sous-groupe NAXT (NITRATE EXCRETION TRANSPORTER), nom donné au premier membre caractérisé, NPF2.7/NAXT1), et le second comprenant les membres NPF2.8 à NPF2.14 (Figure 72 ; Lérant et al., 2014). Ce second sous-groupe comprend plusieurs transporteurs de GA dont les fonctions biologiques associées ont été caractérisées. Il s'agit de NPF2.10 (aussi appelé Glucosinolate transporter 1 (GTR1)) qui est impliqué dans le transport de GA des étamines vers les sépales ; NPF2.12 et NPF2.13 qui facilitent le transport basipète de GA₁₂ des feuilles vers les racines; et NPF2.14, un exporteur localisé dans la membrane de la vacuole, qui contribue avec NPF2.12 et NPF2.13 à la formation de subérine dans les racines (Saito et al., 2015; Binenbaum et al., 2023). En se basant sur les informations disponibles (capacité de transport de GA en système hétérologue, patrons d'expression racinaire, plusieurs transporteurs de GA avérés dans la famille), nous avons décidé d'orienter nos recherches sur les membres NPF2.3, NPF2.4, NPF2.5 et NPF2.7.

La première étape de caractérisation a été de déterminer précisément leur localisation subcellulaire et leurs patrons d'expression dans la racine. Pour cela des lignées de fusion transcriptionnelle et de surexpression, fusionnées à la protéine fluorescente GFP, ont été analysées par microscopie confocale. L'étude des lignées de surexpression a permis de mettre en avant la localisation subcellulaire des NPF sélectionnés, au niveau de la membrane plasmique des cellules (Figure 75A). Cette localisation indique que ces transporteurs seraient

vraisemblablement impliqués dans un transport local, de cellule à cellule, même si leur rôle dans un transport longue distance de GA n'est pas à écarter. L'étude de leur patron d'expression, à l'aide des lignées de fusion transcriptionnelle, a mis en évidence deux couples. Les gènes *NPF2.3* et *NPF2.4* sont tous deux exprimés autour des faisceaux vasculaires, dans la zone différenciée de la racine, laissant présager une potentielle redondance fonctionnelle (Figure 75). A l'inverse, les gènes *NPF2.5* et *NPF2.7* sont plutôt exprimés dans les tissus externes de la zone différenciée de la racine, dans le cortex et l'épiderme, respectivement (Figure 75). La proximité de leur patron d'expression laisse également supposer que ces deux gènes ont des fonctions similaires. Si des redondances fonctionnelles sont supposées au sein de ces deux couples, aucune n'est présagée entre les deux couples, qui ont des patrons d'expression différents. Par ailleurs, étant donné que les 4 gènes sont exprimés dans la zone différenciée de la racine (et non pas dans la zone d'élongation ou le méristème), il est peu vraisemblable que leur fonction soit impliquée dans la croissance et le développement de la racine primaire. De manière intéressante, l'étude du niveau d'expression des 4 gènes dans les racines a pu être corrélée avec leur capacité de transport de GA en système hétérologue. En effet, *NPF2.5* qui présente le plus haut niveau d'expression dans la racine, est aussi le transporteur qui présente la plus grande capacité d'import de GA en ovocytes (Figure 76 ; Wulff et al., 2019). Les gènes *NPF2.3*, *NPF2.4* et *NPF2.7* présentent tous les trois des niveaux d'expression assez bas et des capacités de transport de GA relativement similaires (Figure 76 ; Wulff et al., 2019).

Pour étudier la fonction biologique des transporteurs *NPF2.3*, *NPF2.4*, *NPF2.5* et *NPF2.7* dans la racine, une approche génétique a été entreprise à l'aide de mutants simples pour chacun des gènes. Le premier test a été une analyse phénotypique des mutants, et plus spécifiquement la croissance moyenne de la racine primaire sur 24h. Comme attendu (en se basant sur les patrons d'expression racinaire), les mutants *npf2.3*, *npf2.4*, *npf2.5* et *npf2.7* présentent des phénotypes très peu marqués, comparés à la lignée sauvage, certainement dûs à leur redondance fonctionnelle et leur localisation dans la racine. Cependant, nous avons malgré tout observé, que les racines des simples mutants ont une tendance à être légèrement plus courtes que celles de plantules sauvages, même si les différences ne sont pas significatives (Figure 78A).

Afin de confirmer *in planta* que *NPF2.3*, *NPF2.4*, *NPF2.5* et *NPF2.7* codent bien pour des transporteurs de GA, nous avons suivi la distribution de GA₃-FI appliquées sur les racines des mutants, par microscopie confocale (Figure 79). Les résultats de cette étude n'ont pas révélé de défaut de distribution des GA₃-FI dans l'endoderme de la zone d'élongation des racines, comme cela a pu être observé chez les mutants *npf3.1*, *npf2.12* et *npf2.14* (Tal et al., 2016; Binenbaum et al., 2023). Ces résultats pourraient être expliqués soit par le fait que nos candidats ne sont pas impliqués dans la croissance de la racine principale, soit par la hautement probable redondance fonctionnelle qui opère entre chaque couple de transporteurs et qui masquerait les effets des mutations simples. Comme pour le chapitre précédent, nous prévoyons de réitérer ces tests avec des GA-FI dans des protoplastes qui exprimeront individuellement chacun des transporteurs. Pour information, des tests d'imports de GA-FI ont été expérimentés sur les lignées surexprimeurs-GFP (*p35S:NPF2.x-GFP*), mais l'analyse s'est révélée infructueuse, car il nous était impossible de dissocier le signal GFP (qui est très fort) de la fluorescence de la GA-FI (résultat non montré).

Étant donné que plusieurs membres de la sous-famille NPF2 (*NPF2.3*, *NPF2.7*, *NPF2.12* et *NPF2.13*) ont la capacité de transporter du nitrate, nous avons réalisé une étude morphologique (similaire à la précédente) sur un milieu appauvri en nitrate (Taochy et al., 2015; Segonzac et al., 2007; Almagro et al., 2009; Fan et al., 2009). Cette étude a révélé que la croissance des mutants est moins altérée que celle de la lignée contrôle (Figure 78B). Les mutants des transporteurs sont donc moins sensibles à une diminution de la disponibilité en nitrate. Fait intéressant, les différences s'estompent entre les mutants et le contrôle lorsque la concentration en GA dans le milieu augmente, suggérant qu'il existe une compétition de transport entre les GA et le nitrate chez ces transporteurs (Figure 78B).

La proximité des patrons d'expression de nos couples de candidats, ainsi que les phénotypes peu marqués des mutants simples ont mis en lumière la nécessité de travailler sur de multiples mutants pour passer outre les redondances fonctionnelles. Étant donné que les 4 gènes sont disposés à proximité les uns des autres sur le chromosome 3, l'obtention de multiples mutants par croisement était impossible. Nous avons opté pour la stratégie des micro-ARNs artificiels (amiR) dont l'efficacité n'est plus à démontrer et qui est utilisée avec succès par le laboratoire. Au début du projet, l'obtention de multiples mutants par la

technique de CRISPR/Cas9, maintenant très répandue, était encore peu utilisée au sein de l'institut et le laboratoire ne possédait pas encore tous les outils nécessaires pour la mettre en œuvre. Aujourd'hui, avec du recul, et tous les outils disponibles au laboratoire, nous pouvons affirmer qu'il aurait été préférable de générer des doubles mutants perte de fonctions *npf2.3 npf2.4* et *npf2.5 npf2.7*, plutôt que de produire des mutants hypomorphes ciblant les quatre gènes simultanément. La stratégie amiR a tout de même bien fonctionné, puisque les deux quadruples mutants hypomorphes obtenus présentent une réduction drastique du niveau d'expression des gènes cibles, entre 50 et 90% (Figure 81). L'analyse phénotypique de ces mutants a montré que leur développement racinaire est semblable à celui des simples mutants, à l'exception du nombre de racines latérales qui est significativement supérieure chez les mutants hypomorphes (Figure 82). Au vu de ces résultats et des patrons d'expression des gènes *NPF2.5* et *NPF2.7* présents dans la périphérie des tissus racinaires, et notamment de *NPF2.5* qui est exprimé à proximité du péricycle (les racines latérales émergent à partir de cellules fondatrices du péricycle ; Torres-Martínez et al., 2022), il serait très intéressant d'analyser le phénotype d'un double mutant perte de fonction *npf2.5 npf2.7* (Figure 75). Bien que nous disposons peu d'informations sur l'implication des GA pour le développement des racines latérales, une étude réalisée chez le pois a montré que des plantes déficientes en GA formaient moins de racines latérales que des plantes contrôles (Ferguson et al., 2005). Nous pouvons donc supposer que l'absence de *NPF2.5* et *NPF2.7* perturberait la distribution de GA autour du péricycle, qui entrainerait une accumulation plus importante de GA dans ce tissu, qui induirait en conséquence la formation de racines latérales. A ce stade de l'étude, ce n'est qu'une hypothèse qui pourra être testée dès l'obtention d'un double mutant *npf2.5 npf2.7*, perte de fonction.

Dans deux précédentes études, il a démontré que *NPF2.3* et *NPF2.4* sont impliqués dans le transport acropète de nitrate et chlorure, des racines vers les feuilles (Taochy et al., 2015; Li et al., 2016). Étant donné que les simples mutants *npf2.3*, *npf2.4*, *npf2.5* et *npf2.7* et les quadruples mutants hypomorphes présentent peu de défauts au niveau de leur développement racinaire, nous avons supposé que ces transporteurs pourraient être plutôt impliqués dans un transport longue distance de GA (Taochy et al., 2015; Li et al., 2016). Cette idée a notamment été confortée par les patrons d'expression des gènes *NPF2.3* et *NPF2.4*, qui

sont exprimés à proximité des faisceaux vasculaires dans les racines (Figure 75). L'étude de l'implication de nos NPF candidats dans le transport acropète de GA a été investiguée par une analyse morphologique des mutants hypomorphes et par une approche de micro-greffes inspirée d'une étude précédente menée par le laboratoire (Regnault et al., 2015). L'analyse morphologique des parties aériennes des mutants hypomorphes n'a pas montré de phénotype marqué, à l'exception d'une floraison significativement plus précoce et un nombre de ramifications axillaires plus élevé chez les mutants hypomorphes, comparés à la lignée sauvage (Figure 85). De manière similaire, les plantes greffées constituées d'un porte-greffe exprimant les amiR ciblant *NPF2.3*, *NPF2.4*, *NPF2.5* et *NPF2.7* (mutants hypomorphes), et d'un greffon déficient pour la biosynthèse de GA (mutant *ga1-3*), ont un phénotype similaire aux plantes greffées contrôles (*Col-0/ga1-3*). Ces résultats ont été confortés par l'analyse des quantités de GA_{12} présentes dans les exsudats de xylème, qui ne sont pas diminuées (mais plutôt augmentées) chez les plantes *amiR/ga1-3*, par rapport aux plantes *Col-0/ga1-3* (Figure 86D et E). L'ensemble de ces résultats ne supporte pas l'implication de *NPF2.3*, *NPF2.4*, *NPF2.5* et *NPF2.7* dans le transport acropète de GA.

Une étude récente, réalisée en partie par le laboratoire, a mis en évidence que *NPF2.12* et *NPF2.13* sont impliqués dans le transport basipète de GA (Binenbaum et al., 2023). Suite à cette découverte, nous avons envisagé la possibilité que les transporteurs *NPF2.3* et *NPF2.4* (et éventuellement *NPF2.5* et *NPF2.7*) pourraient être aussi impliqués dans le transport basipète de GA, en facilitant à la fois le déchargement de GA_{12} du système vasculaire racinaire et en orientant sa distribution dans les tissus différenciés. Pour tester cette hypothèse, des greffes de combinaisons inversées aux précédentes ont été réalisées. Les mesures de croissance racinaire n'ont pu mettre en évidence une implication de ces transporteurs dans le transport basipète de GA (Figure 86B).

En conclusion de ces résultats, nous n'avons pas pu déterminer de fonctions biologiques précises associées au transport de GA assuré par *NPF2.3*, *NPF2.4*, *NPF2.5* et *NPF2.7*. Il sera important à ce stade de l'étude de confirmer *in planta* que ces NPF ont bien une activité de transport de GA par des approches décrites ci-dessus. Si c'est le cas, il sera essentiel de générer de nouveaux multiples mutants, mais cette fois-ci des mutants de perte

de fonction, par la stratégie CRISPR/Cas9. Ainsi, nous pourrions obtenir différentes combinaisons de doubles mutants et rechercher les fonctions biologiques associées au transport de GA. L'une de ces fonctions pourrait être la subérisation de l'endoderme dans la zone différenciée de la racine, comme cela pu être mis en évidence pour les transporteurs NPF2.12, NPF2.13 et NPF2.14 (Binenbaum et al., 2023). Pour cela, nous pourrions visualiser les dépôts de subérine chez les différentes combinaisons de mutants *npf2.3*, *npf2.4*, *npf2.5* et *npf2.7*, par coloration des racines au Nile Red.

Par la suite d'autres fonctions biologiques potentielles pourront être testées, notamment l'étude du développement des racines latérales. Cette étude pourra être effectuée sur les doubles mutants perte de fonction générés par CRISPR/cas9. Pour étudier le développement des racines latérales (longueur et nombre), des analyses pharmacologiques seront réalisées sur les mutants, en analysant les effets d'une diminution de GA (avec du PAC) et/ou de nitrate, ainsi que la potentielle récupération de la croissance suite à une complémentation avec des GA exogènes.

**Chapitre 3 : Recherche de
transporteurs impliqués
dans la translocation
acropète de GA₁₂**

1 Introduction

Chez les plantes, on distingue deux grands types de transport de molécules : un transport local et un transport sur de longues distances. Le transport local, aussi appelé de cellule à cellule, est un transport assurant le déplacement de molécules au sein d'un même tissu ou organe. A l'inverse, les molécules transportées entre deux organes, par exemple les sucres produits lors de la photosynthèse qui sont acheminés des feuilles vers les organes puits ou encore les nutriments du sol puisés par les racines qui sont redistribués dans l'ensemble de la plante, sont acheminés par les vaisseaux conducteurs. Ces échanges permettent à des organes distants de coopérer et coordonner leur croissance en fonction des signaux internes, développementaux, et des contraintes environnementales.

1.1 Le système vasculaire

Les faisceaux conducteurs participent activement à la vie de la plante en véhiculant à la fois diverses molécules essentielles à sa survie, telles que l'eau et les nutriments, mais aussi de nombreux autres composés contrôlant sa croissance, son développement et sa tolérance au stress. Parmi ces molécules, nous retrouvons différentes phytohormones telles que les GA, l'ABA et les CK (Lacombe et Achard, 2016). Par ailleurs, les vaisseaux apportent également un soutien mécanique à la plante (Lucas et al., 2013).

Le système vasculaire est composé des vaisseaux du xylème et du phloème, qui comprennent différents types de cellules incluant des éléments conducteurs, des cellules parenchymateuses et de sclérenchyme (Aloni, 1987). Le système vasculaire croit tout au long du développement de la plante, les nouveaux tissus vasculaires se différencient dans les zones de croissance de la plante et s'alignent aux tissus vasculaires déjà existants. Ainsi, les cellules formant les tissus vasculaires sont généralement longues et fines (Jung et al., 2008).

Le xylème achemine l'eau et les nutriments captés par les racines jusqu'aux parties aériennes de la plante. Il est composé de différentes cellules, en majorité mortes, incluant des

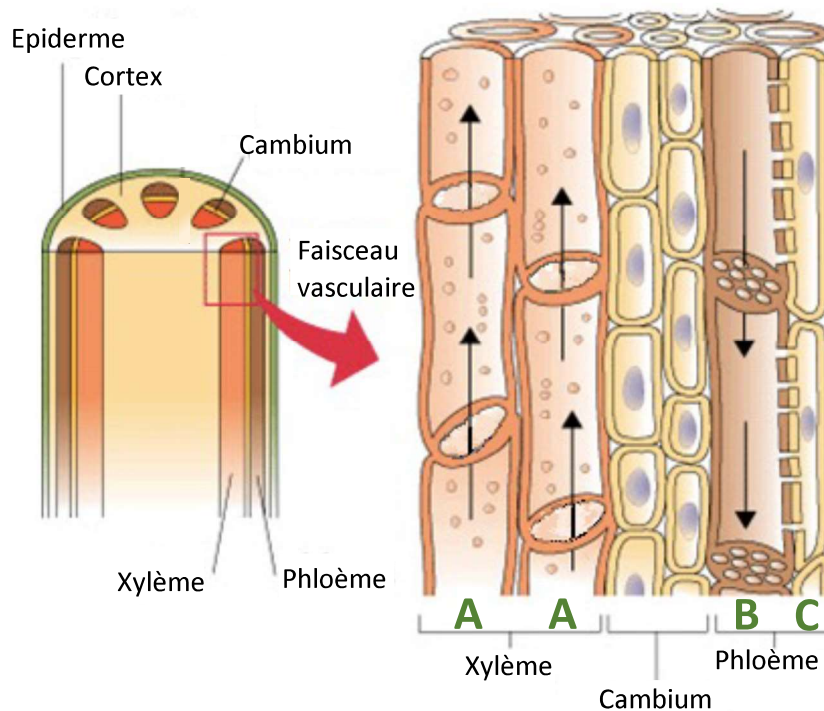


Figure 89 : Anatomie du système vasculaire d'une tige d'*Arabidopsis*

Représentation schématique de l'organisation du système vasculaire d'une tige d'*Arabidopsis thaliana*. A gauche, est représentée une coupe latérale d'une tige avec la disposition des faisceaux vasculaires comprenant le Xylème et le Phloème. A droite, l'organisation des vaisseaux est représentée de façon schématique et agrandie. Nous retrouvons pour le Xylème, des trachéides (A); et pour le Phloème, des tubes et plages criblées (B), associés à des cellules compagnes (C).

(d'après l'illustration d'Elizabeth Morales, <https://www.plantscience4u.com/2016/04/complex-tissues-in-plants-xylem-and-phloem.html>)

cellules du parenchymes (tissus de réserve), des trachéides et des éléments vasculaires (Figure 89). Les trachéides sont des cellules lignifiées en forme de fuseau, conductrices d'eau qui à maturité, se vident de leur contenu intracellulaire, entraînant la mort de la cellule, afin de former un tunnel creux (Figure 89). Les éléments de vaisseaux, plus larges que les trachéides, sont disposés en une file verticale, sont empilés et forment ce qu'on appelle le vaisseau (Jung et al., 2008).

Le phloème quant à lui, est composé principalement de cellules vivantes qui transportent les produits issus de la photosynthèse (majorité de sucre) dans l'ensemble des organes puits (racine, inflorescence). Le phloème est composé de différentes cellules incluant les cellules compagnes, les cellules du parenchyme, les fibres du phloème et les tubes criblés. Les tubes criblés sont des structures spécifiques très différenciées chez les angiospermes, composés d'éléments criblés, séparés par des plages criblées (Figure 89)(Taiz et Zeiger, 2006).

1.2 Le transport longue-distance de gibbérellines

L'étude du transport de GA a débuté durant les années 1950, où des expériences menées sur des tiges de pois ont mis en avant l'existence d'un transport non polarisé sur de longues distances de GA exogènes (Figure 30)(Kato, 1958). Depuis cette découverte, beaucoup d'autres études ont suivi et ont notamment révélé que le transport longue distance de GA est bidirectionnel (Lockard et Grunwald, 1970; Reid et al., 1983; Regnault et al., 2015). Le transport de GA est discuté plus en détail dans la partie 3.3 de l'introduction générale.

Des études réalisées chez *Arabidopsis*, par un ancien doctorant du laboratoire, Thomas Regnault, ont révélé que des GA endogènes pouvaient être transportées sur de longues distances à travers le système vasculaire des plantes, par le xylème et le phloème. Par des approches de microgreffes et de quantification de GA, Thomas a montré que la forme mobile est la GA₁₂, un précurseur inactif des formes actives (explicité dans la partie 3.3 de l'introduction générale ; Regnault et al., 2015). La GA₁₂ est transportée à la fois des racines vers les parties aériennes de la plante par la sève brute (transport acropète), et des feuilles vers les racines par la sève élaborée (transport basipète). Dans une autre étude, le laboratoire a montré que le transport de GA₁₂ des racines vers les feuilles, influait, de manière dose-

dépendante en réponse à une élévation de la température ambiante, sur la croissance de la plante (Camut et al., 2019). Par ce mécanisme de régulation, les racines ajustent perpétuellement la quantité optimale de GA accumulées dans les feuilles, en fonction de la température du sol et de l'air.

1.3 Les transporteurs impliqués dans l'acheminement de GA sur de longues distances

Une étude récente réalisée par le laboratoire, en collaboration avec les laboratoires du Dr. E. Shani (Université de Tel Aviv), Dr H.H. Nour-Eldin (Université de Copenhague) et Dr. L. Band (Université de Nottingham), a identifié les deux premiers transporteurs de GA impliqués dans un transport longue-distance. Par des approches de microgreffes, couplées à des analyses moléculaires et histochimiques, les auteurs de cette étude ont mis en évidence que *NPF2.12* et *NPF2.13*, tous deux exprimés dans les vaisseaux des feuilles au niveau des cellules compagnes du phloème, sont des transporteurs à la fois de GA et d'ABA. Importeurs, ils facilitent tous les deux le chargement de GA₁₂ dans le phloème. Ce transport, couplé à celui de l'ABA, contribuerait entre autre, à la formation de subérine dans les racines (Binenbaum et al., 2023).

1.4 Objectifs

Si le transport de GA₁₂ sur de longues distances a été bien caractérisé, le mécanisme et les transporteurs facilitant le chargement et le déchargement de GA₁₂ des vaisseaux est encore mal compris. Aujourd'hui, seuls les transporteurs *NPF2.12* et *NPF2.13* impliqués dans le transport basipète de GA₁₂ ont été identifiés. Les transporteurs impliqués dans son déchargement sont inconnus. De même, les transporteurs impliqués dans le chargement et le déchargement de GA₁₂ du xylème sont également inconnus. Dans le chapitre 3 de ma thèse, je me suis focalisée sur le transport acropète de GA, en recherchant les transporteurs

impliqués dans ces processus. Chez les plantes et notamment *Arabidopsis*, les transporteurs appartiennent à de très larges familles, dont les membres présentent souvent des activités redondantes qui compliquent leur identification par des approches génétiques classiques (Familles de transporteurs sont détaillées dans le chapitre 3.4 de l'introduction générale). Pour contourner cette difficulté, nous avons réalisé un crible génétique en utilisant le système CRISPR/Cas9, qui permet de muter avec efficacité plusieurs gènes, et une lignée transgénique créée au laboratoire, qui produit des GA₁₂ essentiellement dans les racines. Grâce à ces outils technologiques, nous avons recherché des transporteurs impliqués dans le chargement et/ou déchargement de GA₁₂ dans le xylème.



Figure 90 : Carte du plasmide pAGM5561

Représentation schématique de la cassette de clonage des ARN guides (gRNA) et comprenant la zCas9i.

Bord gauche :LB; promoteur de la nopaline synthase : pNOS; séquence codante du gène BAR : BAR; Termineur de l’octopine synthase : Ocst; Promoteur de la protéine ribosomale d’*Arabidopsis* 5a :RPS5a; signal d’adressage au noyau :N; séquence codante pour une Cas9 de *Zea mays* optimisée comprenant 13 introns: zCAS9i; Termineur de la nopaline synthase : Nost; Promoteur u6 d’*Arabidopsis* : U6p; ARN guide : gRNA; Bord droit :RB.

(d’après Grützner et al., 2021)

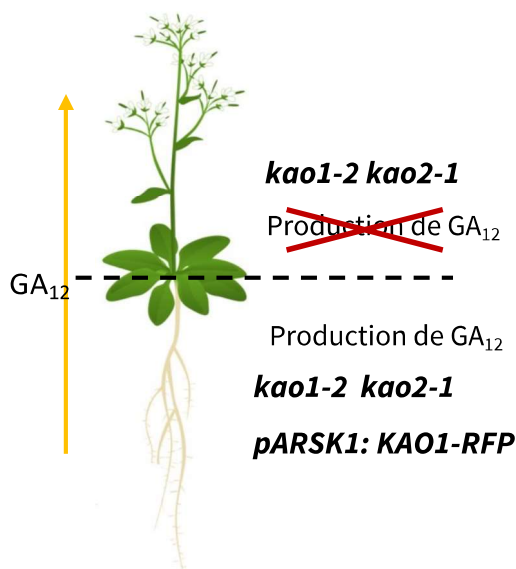


Figure 91 : Présentation schématique de la lignée *kao1-2 kao2-1 pARSK1:KOA1-RFP*

La construction *pARSK1:KAO1-RFP* est introduite chez le mutant *kao1 kao2*. Le gène *KAO1* s’exprime essentiellement dans le système racinaire grâce au promoteur *ARSK1* et restaure la production de GA_{12} . Les GA_{12} produites dans les racines sont transportées dans les parties aériennes de la plante où elles sont converties en formes actives par l’action des *GA20ox* et *GA3ox*. Le développement de la plante est ainsi sous la dépendance du transport acropète de GA_{12} .

2 Résultats

Pour réaliser notre crible génétique, nous avons utilisé une collection d'ARN guides ciblant aléatoirement tous les transporteurs existants chez *Arabidopsis thaliana*. Cette collection que nous appellerons « Transporter CRISPR Library » a été générée par le laboratoire d'Eilon Shani de l'université de Tel Aviv (Hu et al., 2023). Cette collection a été introduite dans une lignée transgénique, générée au laboratoire, qui présente la particularité de produire des GA₁₂ essentiellement dans son système racinaire, reproduisant ainsi les effets d'une plante greffée entre un porte-greffe sauvage et un greffon déficient en synthèse de GA. Ces deux outils technologiques sont détaillés ci-dessous.

2.1 Stratégie du crible génétique

2.1.1 Collection « Transporter CRISPR Library »

Depuis la découverte du système Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) / associated protein 9 (Cas9) en 2012 (par le Prof. E. Charpentier et J. Doudna, prix Nobel de chimie 2020), de nombreuses études ont permis d'étendre la fonctionnalité de cet outil d'édition du génome à un large éventail d'organismes comprenant les plantes, pour modifier ou muter de manière rapide et précis leur ADN (Jinek et al., 2012; Cong et al., 2013; Mali et al., 2013). La stratégie consiste à exprimer une construction composée du gène codant l'endonucléase Cas9 et d'une cassette exprimant un ARN guide (sgRNA) qui cible une séquence d'ADN spécifique. Une fois transformée, les cellules de plantes exprimeront les différents composants du système qui induiront un clivage du ou des gènes cibles. La réparation de l'ADN cible, à la suite à son clivage, ne pourra pas être exécuté par recombinaison homologue, ce qui augmente considérablement les chances d'obtenir une mutation par insertion ou délétion d'un ou plusieurs nucléotides (Cong et al., 2013). Les premières études réalisées chez les plantes ont montré une efficacité variable du système, allant de quelques pourcents à une efficacité totale. Cette efficacité dépend de plusieurs

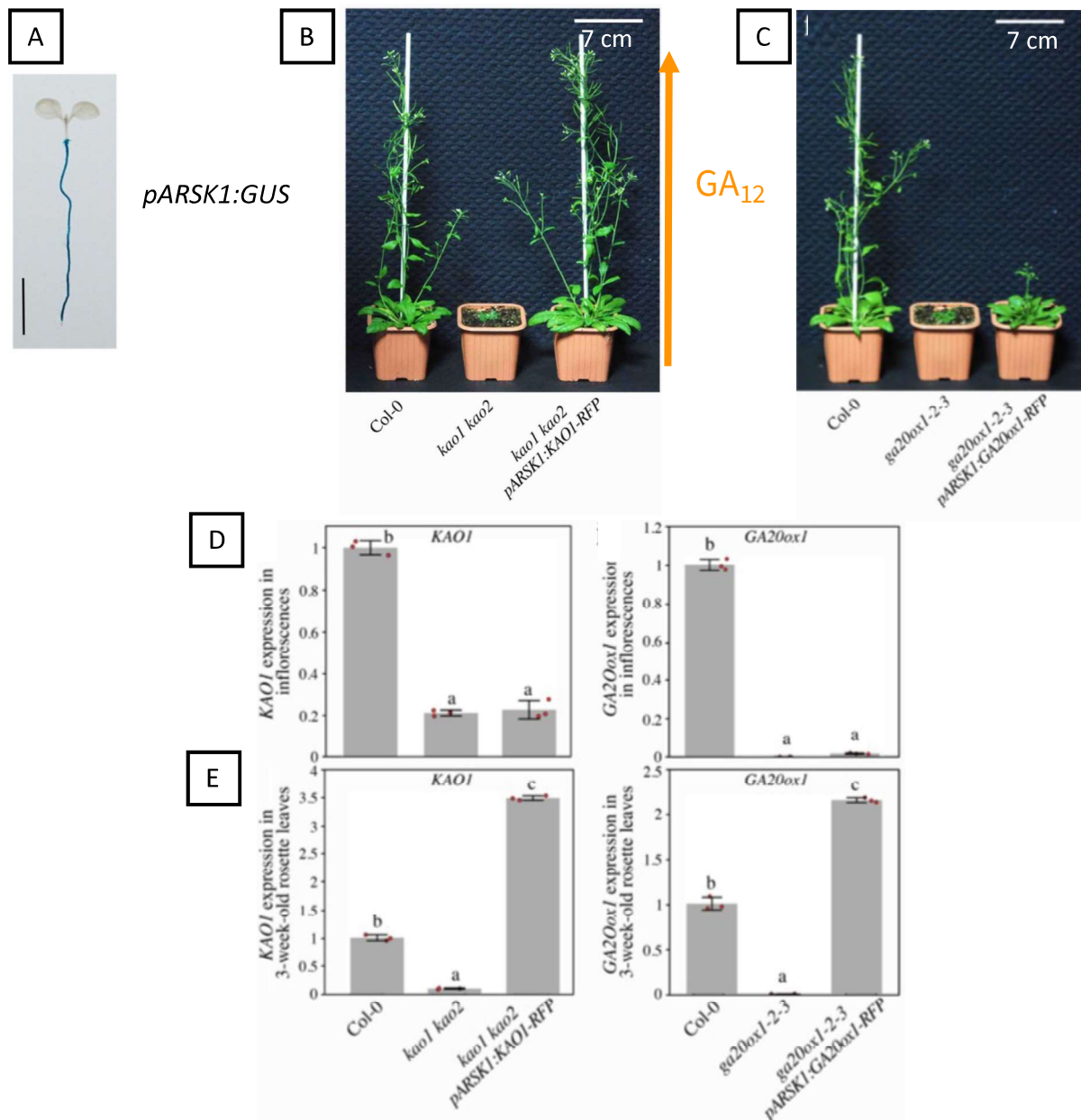


Figure 92 : Caractéristiques de la lignée transgénique *kao1-2 kao2-1 pARSK1:KOA1-RFP*

- A. Coloration GUS d'une plantule *pARSK1:GUS* âgée de 7 jours. Le promoteur *ARSK1* a une activité spécifique à la racine. (Hwang et Goodman, 1995)
- B. Phénotype représentatif d'une plante sauvage (Col-0), du mutant *kao1-2 kao2-1* et du mutant *kao1-2 kao2-1* complémenté avec la construction *pARSK1:KOA1-RFP* (*kao1-2 kao2-1 pARSK1:KOA1-RFP*). Les plantes ont été photographiées à 6 semaines. (Camut et al., 2019)
- C. Phénotype représentatif d'une plante sauvage (Col-0), du mutant *ga20ox1-2-3* et du mutant *ga20ox1-2-3* complémenté avec la construction *pARSK1:GA20ox1-RFP* (*ga20ox1-2-3 pARSK1:GA20ox1-RFP*). Les plantes ont été photographiées à 6 semaines. (Camut et al., 2019)
- D-E. Analyse par RT-qPCR de l'expression relative des gènes *KAO1* et *GA20ox1* dans les inflorescences (D) et dans les feuilles rosettes (E) de plantes Col-0, *kao1-2 kao2-1*, *kao1-2 kao2-1 pARSK1:KOA1-RFP*, *ga20ox1-2-3* et *ga20ox1-2-3 pARSK1:GA20ox1-RFP*. (Camut et al., 2019)

facteurs incluant l'ARN guide, la nature de la séquence codant pour la Cas9 ou encore la position du gène cible (Ahmad et al., 2020; Belhaj et al., 2013). Une étude très récente a montré que la composition de la séquence codant pour la Cas9, à la fois en nombre de signaux d'adressage au noyau et en nombre d'introns, jouait notablement sur l'efficacité du système (Grützner et al., 2021). C'est en se basant sur cette dernière étude que le laboratoire du Dr. Eilon Shani a choisi de cloner sa collection d'ARN guides dans le plasmide pAGM55261. Ce plasmide est principalement composé d'un site de clonage des ARN guides, d'une séquence codant la Cas9 de *Zea mays* (zCas9 ; qui a un contenu en GC, élevé), optimisée par l'ajout de 13 introns (qui augmente son efficacité), conduit par le promoteur *RPS5a* (qui maintient une forte activité à tous les stades de développement, depuis l'ovule jusqu'aux cellules méristématiques), et un gène de résistance au glufosinate (BASTA) (Figure 90)(Grützner et al., 2021). Selon les premières études, l'utilisation de ce plasmide comprenant la Cas9 optimisée permettrait d'obtenir plus de 70% de mutants (simple ou double) homozygotes parmi les transformants de 1^{ère} génération (Grützner et al., 2021).

Pour contourner le problème de redondance fonctionnelle qui entrave la caractérisation de nouveaux transporteurs, le laboratoire de E. Shani a conçu, puis fait synthétiser 5635 sgRNAs qui ciblent individuellement 2 à 3 gènes codant 1123 des 1327 transporteurs présents chez *Arabidopsis*. L'efficacité de cette collection a été récemment confirmée, l'obtention de plus de 3500 lignées indépendantes a permis la caractérisation des premiers transporteurs de CK localisés dans le tonoplaste des plantes (Hu et al., 2023).

2.1.2 Lignée *kao1-2 kao2-3 pARSK1:KAO1-RFP*

Pour le crible génétique, nous avons souhaité introduire la collection « Transporter CRISPR Library » dans une lignée qui produit des GA₁₂ (la forme de GA mobile sur de longues distances), uniquement dans les racines, de sorte à visualiser l'effet d'une altération du transport acropète de GA par une simple observation du phénotype des plantes (croissance et développement des inflorescences). Notre choix s'est porté sur la lignée *kao1-2 kao2-1 pARSK1 :KAO1-RFP*, précédemment générée par le laboratoire (Camut et al., 2019). Cette lignée est déficiente pour la synthèse de GA bioactives, à cause de la mutation des deux gènes

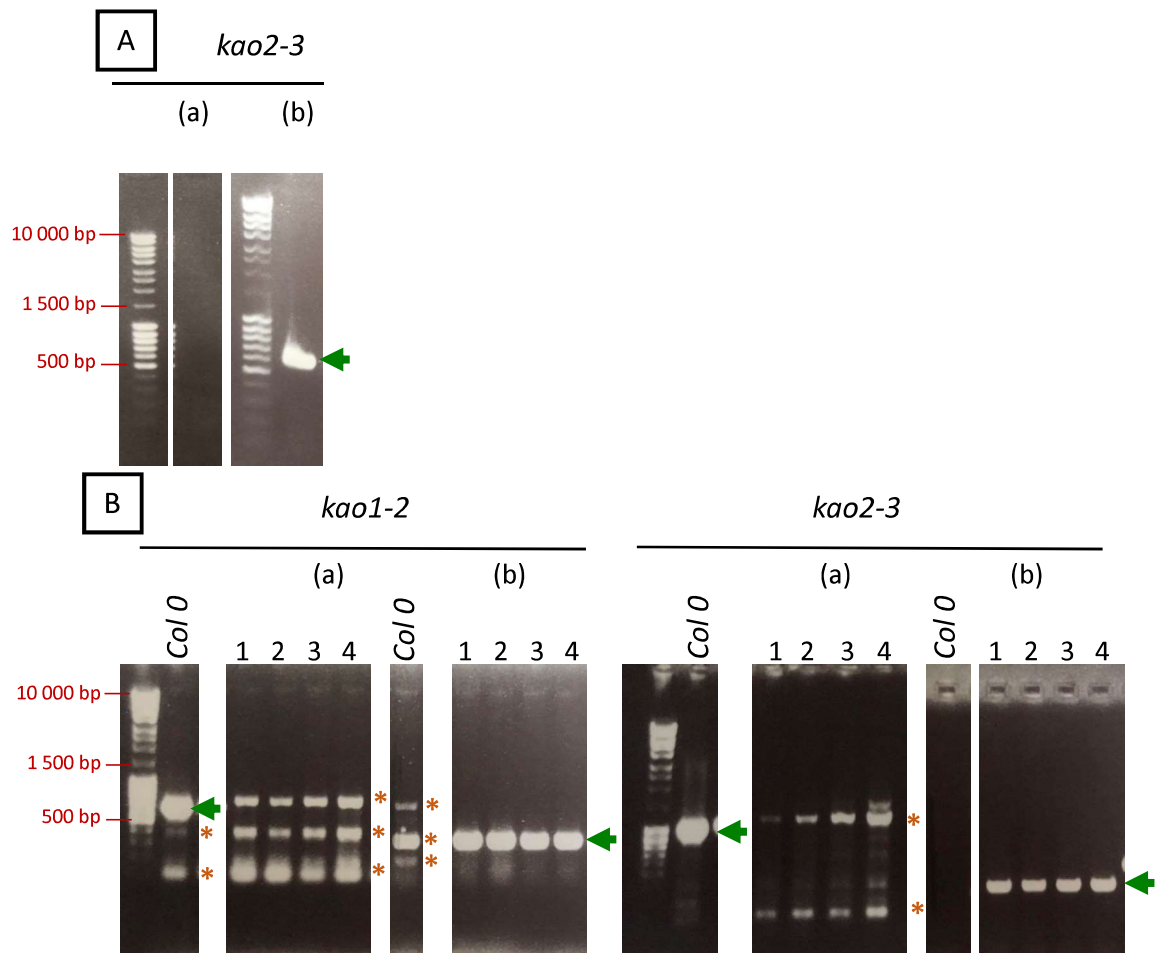


Figure 93 : Génotypage des mutants *kao2-3* et *kao1-2 kao2-3*

Résultats des génotypages : (a) vérification par PCR de la présence d'une mutation à l'état homozygote à l'aide d'amorces spécifiques. (b) vérification par PCR de la présence d'un insert T-DNA dans les gènes correspondants à l'aide d'une amorce spécifique au gène muté et une amorce spécifique au T-DNA. Les photos des gels ont été découpées pour ne laisser apparaître que les puits concernés par le génotypage. Les flèches vertes indiquent les bandes spécifiques et les astérisques rouges indiquent les bandes aspécifiques. Ces indications sont disposées à droite de la bande concernée.

A. Génotypage du mutant *kao2-3*.

B. Génotypage du double mutant *kao1-2 kao2-3* obtenu par croisement. 4 plantes indépendantes (numérotées de 1 à 4) ont été analysées.

codant pour l'enzyme KAO (qui catalyse la formation de la GA₁₂), et a été complétée par la construction *pARSK1:KAO1-RFP*, qui exprime *KAO1* spécifiquement dans les racines, grâce au promoteur « racine spécifique » *pARSK1* (Camut et al., 2019; Hwang et Goodman, 1995)(Figure 91 et 92A-B). Si le double mutant *kao1-2 kao2-1* montre un phénotype nain, causé par l'absence de GA bioactives, la complémentation du mutant par la construction *pARSK1:KAO1-RFP* permet de restaurer complètement la croissance aérienne des plantes (Camut et al., 2019). En effet, chez ces plantes, les GA₁₂ produites dans les racines seront transportées dans les feuilles et inflorescences, où elles seront converties en GA bioactives par l'action des GA20ox et GA3ox (Figure 91 et 92A-B). Il est important de noter que si le promoteur *pARSK1* est strictement actif dans la racine au stade plantule (à l'exception de la pointe racinaire ; Figure 92A), à des stades de développement plus avancés, le promoteur montre également une activité non négligeable dans les feuilles rosettes. Pour tester la spécificité du promoteur *pARSK1*, le laboratoire a généré une seconde lignée, basée sur le même principe, où le triple mutant *ga20ox1-2-3* est complété par la construction *pARSK1:GA20ox1-RFP*. Chez cette lignée, les racines sont capables de produire de la GA₁₂ et d'être transportée dans les parties aériennes de la plante, mais ces dernières sont incapables de convertir la GA₁₂ en formes actives. Si comme attendu, les plantes de cette lignée sont fortement affectées dans leur croissance (hauteur réduite), la rosette se développe presque normalement (Figure 92C ; Regnault et al., 2014). Des études d'expression par RT-qPCR ont révélé chez cette lignée que le gène *GA20ox1* est exprimé à des niveaux similaires à une plante sauvage dans les feuilles rosettes, cependant, pas dans les inflorescences (Figure 92D et E ; Camut et al., 2019). Ce résultat confirme que le promoteur *pARSK1* est également actif dans les feuilles rosettes, mais pas dans les inflorescences. Et conclusion, au stade adulte, l'effet du transport de GA₁₂ peut être évalué uniquement au niveau des inflorescences, chez la lignée *kao1-2 kao2-1 pARSK1:KAO1-RFP*.

Pour le crible génétique, nous n'avons pas pu utiliser la lignée *kao1-2 kao2-1 pARSK1:KAO1-RFP* en l'état, car la mutation *kao2-1* (qui compose notre lignée) et la collection « Transporter CRISPR Library » possèdent tous deux le même marqueur de sélection, la résistance à l'herbicide BASTA. Nous avons donc dû générer une nouvelle lignée transgénique, en remplaçant la mutation *kao2-1* par un autre mutant allèle, qui porte un agent de sélection différent. Pour cela, nous avons recherché de nouveaux mutants *kao2* dans les collections de

Nombre de lignées indépendantes	Hauteur de la plante en cm	Nombre de branches secondaires	Réduction de la fertilité
6	Plante morte	Plante morte	Plante morte
7	< 5	0	Non
1	< 5	1	Non
1	> 5 < 10	0	Non
1	> 5 < 10	1	Non
3 (Lignée 44)	> 5 < 10	1	Oui
2	> 5 < 10	2	Non
3	> 5 < 10	3	Non
11 (Lignée 24 et 61)	> 10 < 20	1	Non
1	> 10 < 20	1	Oui
6	> 10 < 20	2	Non
2	> 10 < 20	2	Oui
4	> 10 < 20	3	Non
1	> 10 < 20	4	Non
1	> 10 < 20	5	Non
8	> 20	2	Non
13	> 20	3	Non
18	> 20	> 10	Non

Tableau 2 : Phénotypes des transformants primaires *kao1-2 kao2-3 pARSK1:KOA1-RFP*

Tableau récapitulatif des principaux phénotypes observés à 7 semaines parmi les transformants primaires du crible CRISP/Cas9 effectué sur la lignée *kao1-2 kao2-3 pARSK1:KOA1-RFP*.

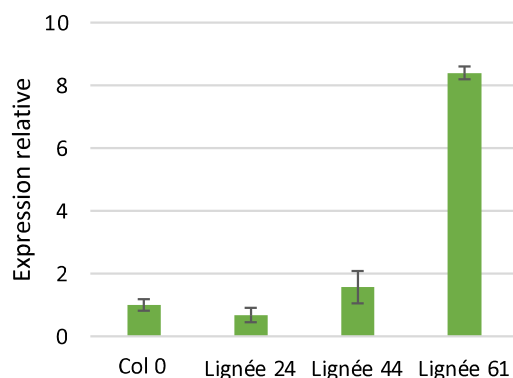


Figure 94 : Analyse de l'expression du gène *KAO1* chez 3 lignées *kao1-2 kao2-3 pARSK1:KOA1-RFP* issues du crible, sélectionnées en première génération

Analyse par RT-qPCR de l'expression relative de *KAO1* dans les feuilles rosettes de 3 transformants primaires *kao1-2 kao2-3 pARSK1:KOA1-RFP* âgés de 7 semaines (lignées 24, 44 et 61), en comparaison à celle d'une plante sauvage (Col 0). Les moyennes et les barres d'erreurs ont été calculées à partir de 3 réplicas techniques.

mutants d'insertion, et deux nouveaux allèles ont été sélectionnés : *kao2-3* et *kao2-4*. Le premier présente une résistance à la kanamycine et le second à la sulfadiazine. Après confirmation par génotypage, les deux mutants *kao2* ont été croisés avec le mutant *kao1-2* pour générer des doubles mutants *kao1 kao2* (Figure 93). Le premier double mutant caractérisé a été *kao1-2 kao2-3*, qui présente comme attendu, un phénotype nain caractéristique de la mutation *kao*. Ensuite, ce double mutant a été transformé avec la construction *pARSK1:KAO1-RFP* pour obtenir la nouvelle lignée transgénique *kao1-2 kao2-3 pARSK1:KAO1-RFP*. Des études phénotypiques ont été réalisées sur les transformants primaires de sorte à sélectionner une lignée dont le transport de GA n'est pas trop exacerbé, car cela risquerait de masquer les phénotypes de mutants altérés dans le transport acropète de GA que nous pourrions obtenir durant le crible. Pour l'étude phénotypique, nous avons analysé le temps de floraison, la hauteur finale des plantes, l'aspect de la tige principale et le nombre de ramifications secondaires. Bien que des traits phénotypiques prononcés, tels que la hauteur des plantes ou le nombre de branches secondaires, ont été observés en début de culture chez certains transformants primaires, ces mêmes traits se sont retrouvés atténués en fin de culture (Tableau 2). En seconde génération, nous avons effectué des tests de ségrégation du transgène (pour rechercher les lignées qui ont une insertion unique) et analysé le niveau d'expression de *KAO1-RFP* (Figure 94). En nous basant sur les résultats des analyses phénotypiques et moléculaires réalisées sur la première et la seconde génération de transformants, nous avons sélectionné la lignée 24 qui présente une seule insertion du transgène *pARSK1:KAO1-RFP*, un léger retard de croissance, et une faible expression de *KAO1-RFP*. Cette lignée *kao1-2 kao2-3 pARSK1:KAO1-RFP* n°24 sélectionnée a été amenée au stade homozygote à la troisième génération.

2.2 Mise en œuvre du crible génétique et les résultats

Nous avons obtenu la collection « Transporter CRISPR Library » sous forme d'agrobactéries, déjà transformées, et stockées dans du glycérol. La collection a été remise en culture sur milieu sélectif pour multiplication sur la nuit, avant introduction par immersion



Figure 95 : Sélection et repiquage de la première génération de transformants issus du crible

- A. Logette de culture contenant les transformants primaires du crible, après sélection BASTA et avant repiquage.
- B. Logette de culture contenant les transformants primaires du crible, après repiquage des 2261 plantes sélectionnées (capacité maximale de la logette).

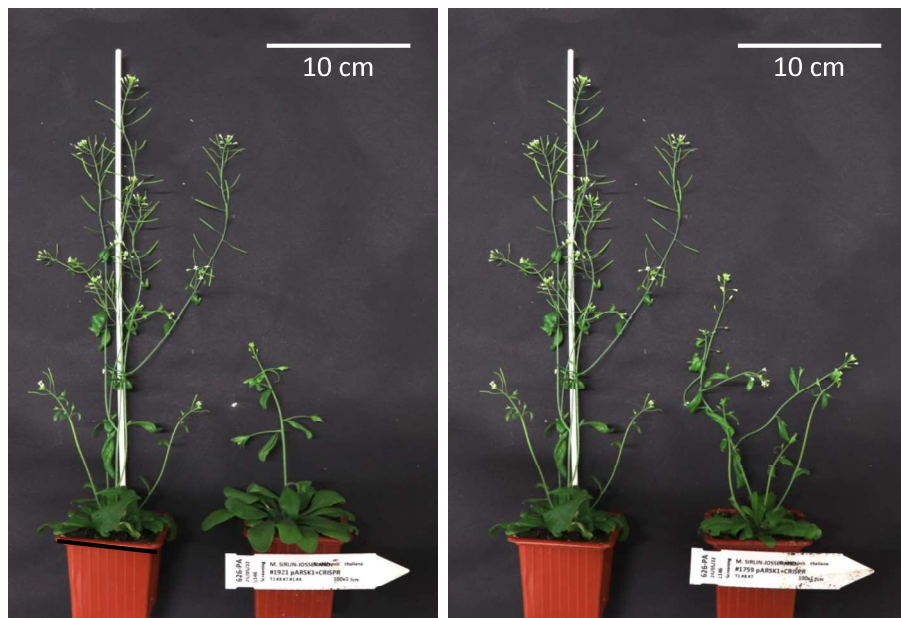


Figure 96 : Phénotype de deux transformants primaires, pris pour exemple, sélectionnés lors du crible

Photos représentant le phénotype de deux plantes parmi les 50 sélectionnées en première génération, montrant des altérations de croissance et de développement (réduction de croissance et défaut de fertilité). Pour chaque photo, la plante contrôle *kao1-2 kao2-3 pARSK1:KAO1-RFP* (non transformée) est disposée à gauche, le transformant sélectionné pour son phénotype d'intérêt est disposé à droite.

florale dans 480 plantes de la lignée *kao1-2 kao2-3 pARSK1:KAO1-RFP* n°24 nouvellement générée.

L'intégralité des graines produites par les plantes *kao1-2 kao2-3 pARSK1:KAO1-RFP* transformées avec la collection « Transporter CRISPR Library » ont été récoltées et ont servi pour le crible. Les graines ont été semées sur terre, de façon peu dense, et les transformants primaires ont été sélectionnés, suite à 3 traitements BASTA successifs, espacés d'une semaine (0,6 mg/L BASTA). Le traitement BASTA a permis de sélectionner 2261 plantes (T1) qui ont été repiquées et transférées dans des pots individuels, placés en environnement contrôlé (en jours longs) (Figure 95). Selon la littérature et la conception de notre crible, 70% des plantes transformées en T1 devraient porter deux à trois mutations homozygotes dans des transporteurs (Grützner et al., 2021). Nous avons donc réalisé une première étude phénotypique, dès la T1, sur les 2261 plantes sélectionnées, en analysant comme critères principaux la hauteur des plantes et la fertilité (les mutants déficients en GA sont très peu fertiles ; Plackett et al., 2011). En se basant sur ces deux critères morphologiques, 53 plantes indépendantes montraient une hauteur finale inférieure à celle d'une plante contrôle (lignée *kao1-2 kao2-3 pARSK1:KAO1-RFP* n°24 non transformée). Par ailleurs, certaines de ces plantes présentaient aussi des défauts de fertilité (Figure 96). Ces 53 plantes ont été cultivées sur un cycle entier, et leurs graines (T2) ont été récoltées de façon indépendante.

Les graines de deuxième génération (T2) des 53 lignées sélectionnées ont été semées individuellement dans des pots. Dans un premier temps, nous avons cherché à confirmer les phénotypes obtenus en première génération. Seules 24 lignées parmi les 53 sélectionnées en première génération ont montré un phénotype similaire et ont été conservées pour des analyses complémentaires. Dans un second temps, nous avons traité les 24 lignées conservées avec des GA bioactives (100 μ M GA₃), par pulvérisation (2 fois par semaine), afin d'évaluer si le phénotype observé (hauteur réduite et défauts de fertilité) est lié à une déficience en GA. En effet, si un défaut de transport de GA est à l'origine du phénotype, l'application exogène de GA bioactives devrait restaurer la croissance et/ou fertilité des plantes sélectionnées. Au contraire, si le phénotype n'est pas lié à un défaut de transport de GA, les plantes ne devraient pas (ou peu) répondre au traitement. A la suite de cette étude, 7 lignées indépendantes ont

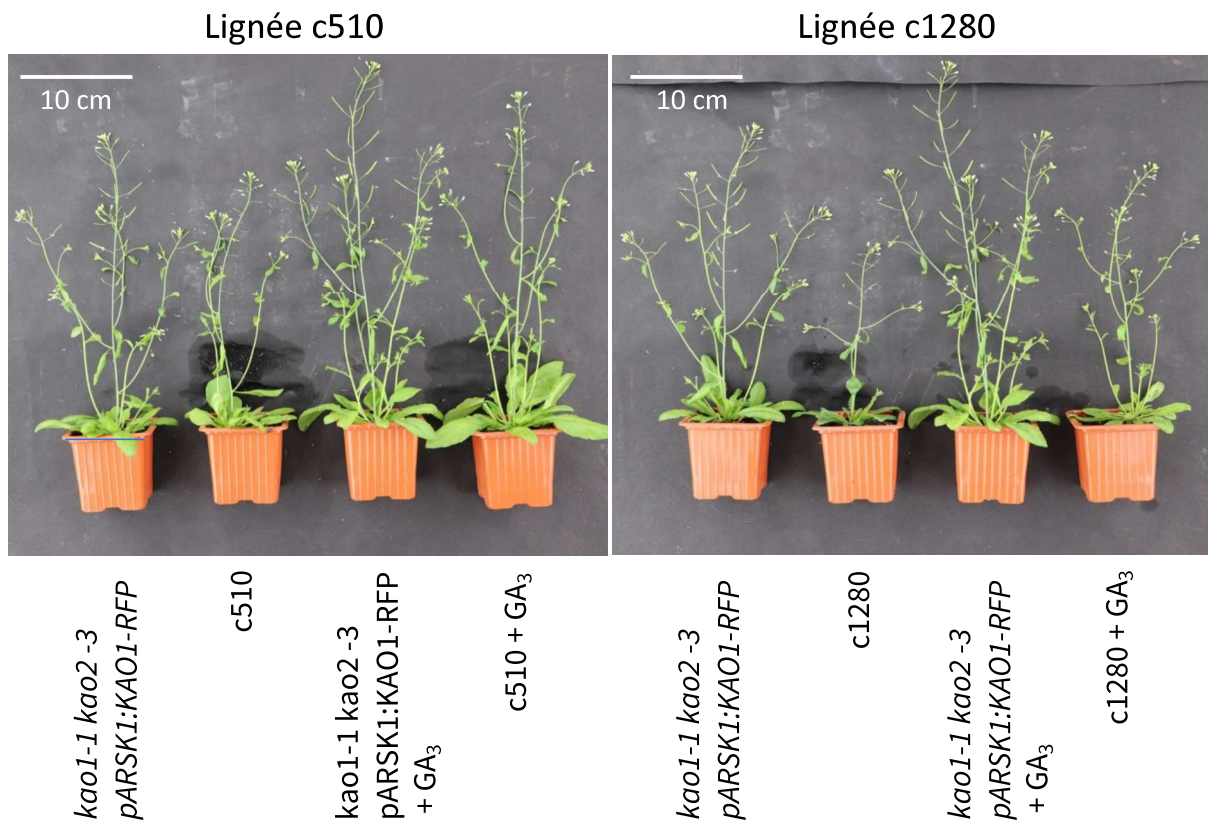


Figure 97 : Etude phénotypique des lignées c510 et c1280 sélectionnées durant le crible

Photos représentatives à 6 semaines de culture de plantes contrôles *kao1-2 kao2-3 pARSK1:KAO1-RFP* (non transformées) et des lignées c510 et c1280 sélectionnées lors du crible, traitées par pulvérisation hebdomadaire avec 100 μ M de GA_3 (et contrôle sans traitement). La croissance et fertilité des lignées c510 et c1280 sont partiellement restaurées par le traitement GA_3 .

été retenues ; leur croissance et/ou fertilité est restaurée au moins en partie par le traitement GA (Figure 97).

Des échantillons ont été prélevés pour ces 7 lignées, dans le but de séquencer et d'identifier l'ARN guide qu'elles contiennent. En effet, grâce à la séquence du sgRNA, nous pouvons remonter aux transporteurs ciblés par homologie de séquence (nous avons à notre disposition la séquence des 5635 sgRNAs qui compose la « Transporter CRISPR Library » et des 1123 transporteurs ciblés). Les résultats du séquençage ont révélé que les 7 lignées sélectionnées contiennent bien un sgRNA (tous différents) qui ciblent au total 15 transporteurs (2 à 3 transporteurs par sgRNA ; Tableau 3). Nous avons ensuite effectué une recherche bibliographique sur chacun des transporteurs candidats, pour écarter ceux qui ont peu de chance d'être impliqués dans le transport de GA. Parmi les transporteurs non retenus, sont retrouvés des Purine Perméase (PUP7 et PUP21 impliqués dans le transport de métabolites secondaires ; Liu et al., 2019), des transporteurs de boron (BOR1 et BOR2 ; Matthes et al., 2020), des transporteurs putatifs de monosaccharides (IF1/ERD6 et ESL3.03/ERD6-LIKE ; Geiger, 2020), des pompes à calcium (ACA10 ; Geisler et al., 2000) et des Tonoplast Intrinsic Protein (TIP ; Gattolin et al., 2010). Suite à cette analyse, seules deux lignées ont été retenues, les lignées c510 et c1280 (Tableau 3). Ces deux lignées ciblent des transporteurs de la sous-famille G des ATP binding cassette (ABC): ABCG17, ABCG18 et ABCG19 pour la lignée C510, et ABCG12 et ABCG15 pour la lignée C1280 (Figure 98). Il est intéressant de noter que la famille des ABCG est impliquée dans le transport de diverses molécules dont des hormones (Borghini et al., 2015; Gräfe et Schmitt, 2021; Zhang et al., 2021). En particulier, il a récemment été démontré que ABCG17 et ABCG18 sont des transporteurs d'ABA (Zhang et al., 2021), rendant ces derniers particulièrement intéressants puisque de nombreux transporteurs de GA possèdent également la capacité de transporter de l'ABA (comme NPF3.1, NPF2.12, NPF2.13 et NPF2.14 ; Tal et al., 2016; Binenbaum et al., 2023). C'est principalement pour ces différentes raisons que nous avons décidé de focaliser notre étude sur les lignées c510 et c1280 (Tableau 3)(Figure 98).

La suite de l'analyse a consisté à vérifier si les gènes ciblés étaient réellement mutés. Pour cela, nous avons séquencé les 5 gènes ABCG ciblés puis réalisé un alignement de séquences, en utilisant comme séquences de référence, celles de la lignée *kao1-2 kao2-3 pARSK1 :KAO1-RFP* n°24 (Figure 99). De manière inattendue, pour la lignée c510, aucun des

Numéro de la lignée	Séquence de l'ARN guide	Gènes ciblés
c74	AACCGATGCAAGGGTGGTGA	At4g18197 (Purine Perméase 7)
		At4g18205 (Purine Perméase 21)
c510	GTTTCTTCAACGGTGAGCAT	At3g55110 (ABCG 18)
		At3g55130 (ABCG 19)
		At3g55100 (ABCG 17)
c638	CCATTAGCAAACCTCCAGGA	At3g62270 (BOR 2)
		At2g47160 (BOR 1)
C664	TTTGATCGATATTGACGGT	At4g04750 (IF 1)
		At4g04760 (ESL3.03)
c1280	ATCAAAGGATCTGATGTAGC	At1g51500 (ABCG 12)
		At3g21090 (ABCG 15)
c1791	GTGGTAGTGGCAGTGCCTGA	At3g21280 (UBP7)
		At4g29900 (ACA 10)
c1815	ACAGCAGCCATCAATGTCTC	At1g17810 (BETA-TIP)
		At1g73190 (ALPHA-TIP)

Tableau 3 : Récapitulatif des ARN guides contenus dans les 7 lignées indépendantes retenues

Tableau récapitulatif des ARN guides incorporés dans les 7 lignées sélectionnées pour l'étude (basé sur leur phénotype et leur réponse au GA) et les transporteurs potentiellement ciblés. ABCG : ATP-Binding Cassette (ABC) superfamily G ; BOR : High Boron requiring (Exporteur de Bore); IF: Mitochondrial F1F0-ATP Synthase Inhibitor Factor; ESL : Early response to dehydration six-like family ; UBP : Ubiquitin-Specific Protease; ACA : Autoinhibited CA(2+)-ATPase; TIP: Tonoplast Intrinsic Protein.

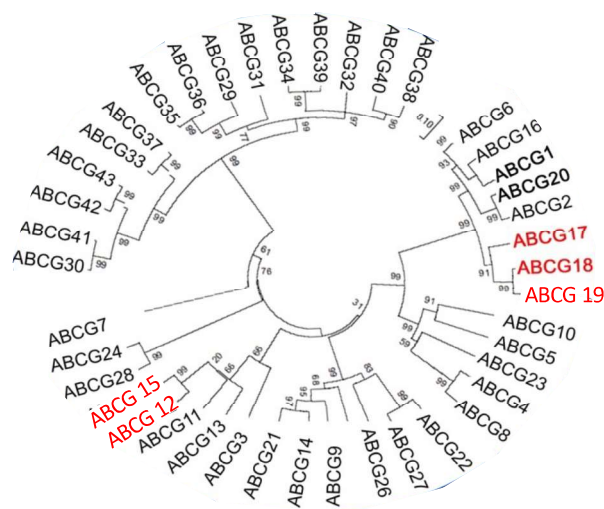


Figure 98 : Phylogénie de la sous-famille ATP-Binding Cassette (ABC) superfamily G (ABCG)

Arbre phylogénétique de la sous-famille des ABCG chez *Arabidopsis*. Les transporteurs potentiellement ciblés chez les lignées c510 et c1280 sélectionnées dans le crible sont indiqués en rouge. (adapté de Zhang et al., 2021)

trois *ABCG* ciblés (*ABCG17/18/19*) ne présentent de mutation à l'état homozygote (Figure 99). Même si nous ne pouvons pas exclure que certains de ces gènes soient mutés à l'état hétérozygote, les gènes *ABCG17/18/19* ne sont pas responsables du phénotype observé chez la lignée c510 (Figure 97). Le phénotype est probablement associé à la mutation d'un ou plusieurs autres gènes, localisés autre part dans le génome. Ils pourraient s'agir de mutations non prévues « off-target » qui ont parfois lieu avec la technologie CRISPR/Cas9. Pour la lignée c1280, nous avons identifié la présence d'une délétion de 324 nucléotides dans la séquence du gène *ABCG12* (délétion à l'état homozygote), mais aucune mutation n'a été observée pour le second gène ciblé, *ABCG15* (Figure 99). Là encore, nous ne pouvons pas exclure la présence d'une mutation à l'état hétérozygote pour le gène *ABCG15*. De précédentes études ont montré qu'*ABCG12* (aussi appelé CER5, ECERIFERUM 5) est impliqué dans l'export de lipides des cellules de l'épiderme vers la cuticule cireuse, essentielle à la protection des plantes et à leur interaction avec l'environnement (Pighin et al., 2004; McFarlane et al., 2010). Le mutant *abcg12* et les proches homologues (comme par exemple *abcg11*) présentent des défauts de croissance et une réduction de la fertilité, en raison de la modification de la composition de la cire cuticulaire (Pighin et al., 2004; Bird et al., 2007). Malgré une restauration partielle des phénotypes de la lignée c1280 par le traitement GA, il est peu probable que *ABCG12* soit un transporteur de GA. Pour valider ou infirmer cette hypothèse, il sera nécessaire de reproduire cette lignée en croisant différents mutants allèles *abcg12* (disponibles dans les collections de mutants d'insertion) avec la lignée *kao1-2 kao2-3 pARSK1:KAO1-RFP* n°24. Par ailleurs, l'activité de transport de GA d'*ABCG12* pourra être évaluée en ovocyte de xénope.

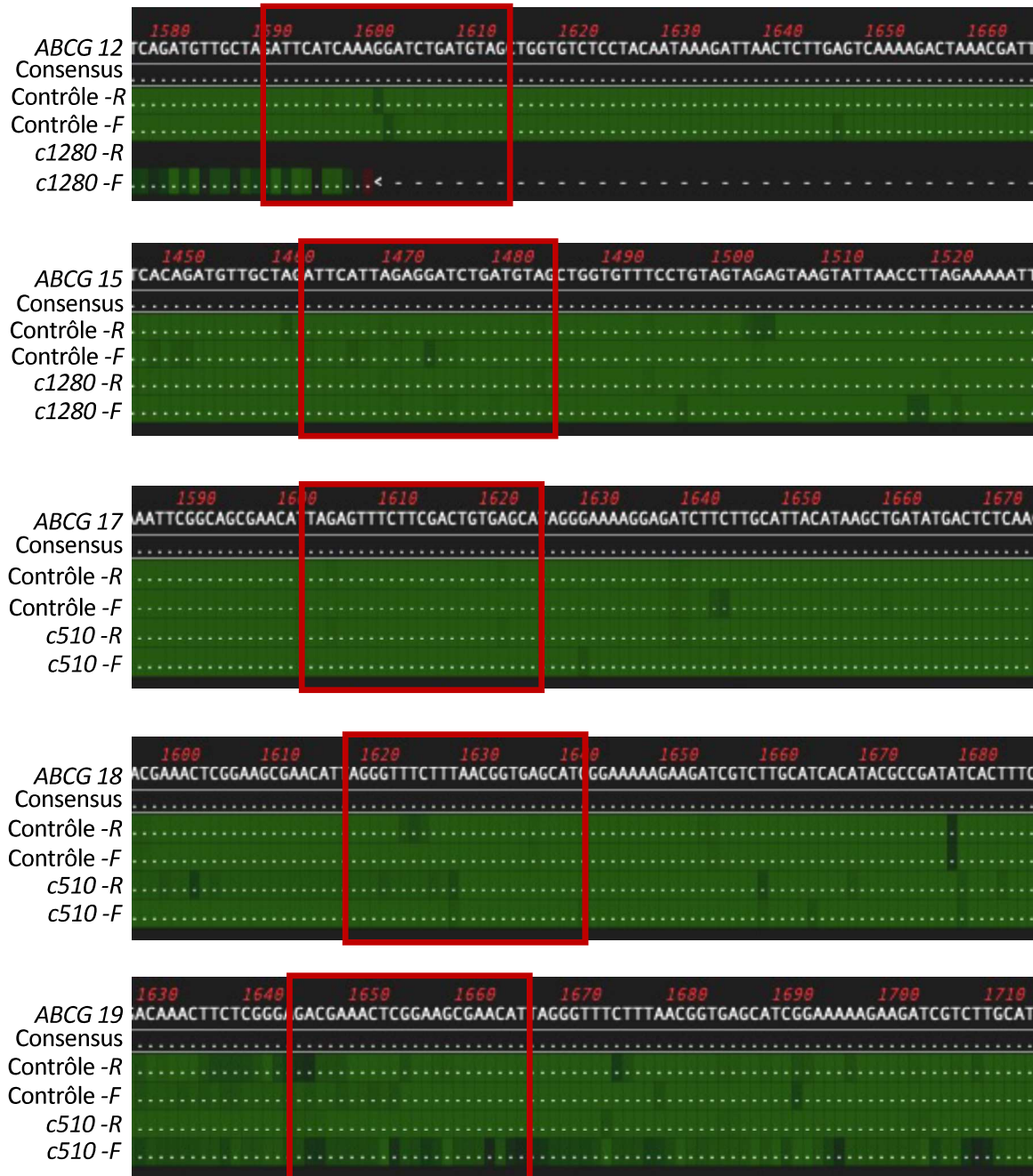


Figure 99 : Alignement de séquences des gènes codant les transporteurs ciblés chez les lignées c510 et c1280

Les gènes codant les transporteurs ABCG17, ABCG18 et ABCG19 ciblés chez la lignée c510, et les gènes codant les transporteurs ABCG12 et ABCG15 ciblés chez la lignée c1280, ont été séquencés puis alignés avec la séquence des gènes correspondants déterminée chez la lignée contrôle *kao1-2 kao2-3 pARSK1:KAO1-RFP* (Contrôle). Le cadre rouge indique la zone ciblée par l'ARN guide. Pour chaque gène, la séquence a été obtenue à partir d'un oligonucléotide sens (Forward, F) et anti-sens (Reverse, R). L'alignement de séquence confirme que le gène *ABCG12* est muté (délétion) chez la lignée c1280.

3 Discussion

Au cours des millénaires, les plantes ont continuellement évolué et se sont considérablement complexifiées, formant des tissus et organes spécialisés nécessaires à leur développement et leur adaptation à l'environnement. Cette spécialisation requière une communication fine, dite locale (entre tissus ou organes proches) ou sur de plus longues distances, assurée par le système vasculaire. De nombreuses molécules sont ainsi véhiculées au sein des vaisseaux, comme des nutriments extraits du sol, des sucres formés lors de la photosynthèse, des peptides, ou encore des phytohormones (Krapp et al., 2014; Büttner, 2007; Chen et al., 2001; Stacey et al., 2002; Lacombe et Achard, 2016). Le transport longue distance (basipète et acropète) de ces composés est impliqué dans divers processus allant du développement des plantes à la résistance aux stress biotiques et abiotiques (Turnbull, 2011; Li et al., 2021).

Il est admis depuis plusieurs années que les GA sont transportées sur de longues distances, principalement sous la forme du précurseur GA₁₂, chez *Arabidopsis* (Regnault et al., 2015). Il a été démontré que le transport basipète et acropète de GA contribuait respectivement à la formation de subérine dans l'endoderme des racines et à l'adaptation de la croissance des plantes à une élévation de la température ambiante (Regnault et al., 2015; Binenbaum et al., 2023; Camut et al., 2019). Si le transport longue distance de GA₁₂ est assuré par le système vasculaire, il requière néanmoins la présence de transporteurs qui vont faciliter son chargement et son déchargement des vaisseaux. C'est par exemple le cas pour le transport longue distance de CK, où PUP2 facilite le chargement de CK dans les vaisseaux de phloème, alors que ABCG14 promeut son chargement dans les vaisseaux de xylème (Bürkle et al., 2003; Wang et al., 2017). Un autre exemple est celui du transport d'ABA. ABCG40 est impliqué dans le chargement d'ABA dans le phloème, NPF4.6 est suspecté d'exercer une fonction similaire (Seo et Koshiba, 2011; Kanno et al., 2012). Concernant le transport de GA₁₂, une étude récente menée par le laboratoire, a démontré que les transporteurs NPF2.12 et NPF2.13 facilitaient le chargement de GA₁₂ dans le phloème des feuilles, pour l'acheminer aux racines (Binenbaum et al., 2023). Malgré cette découverte, il est vraisemblable que d'autres acteurs soient

impliqués dans le chargement et le déchargement de GA₁₂ dans les vaisseaux conducteurs, et notamment dans le xylème. C'est dans ce but que nous avons initié la caractérisation de nouveaux transporteurs de GA, impliqués dans le chargement et le déchargement de GA₁₂ dans les vaisseaux du xylème, dans le cadre d'un transport acropète de GA (des racines vers les parties aériennes).

Les transporteurs d'hormones sont généralement associés à deux grandes familles de protéines, les NPF et les ABC, parmi lesquels les membres exercent souvent des activités redondantes liées à des patrons d'expression similaires. En effet, ces redondances fonctionnelles ont été mises en évidence à maintes reprises. Nous pouvons citer pour exemple pour la famille des NPF les transporteurs NPF5.8 et NPF5.9 tous deux impliqués dans le transport acropète du fer, et des transporteurs NPF5.11, NPF5.12 et NPF5.16 impliqués dans l'efflux de nitrate hors de la vacuole (Chen et al., 2021; He et al., 2017). Pour la famille des ABC, nous pouvons avancer l'exemple des transporteurs ABCB6 et ABCB20 impliqués de manière redondante dans le transport d'auxine (Zhang et al., 2018). Cette complexité rend difficile l'identification de nouveaux transporteurs par des approches de génétiques classiques, qui permettent de muter qu'un seul gène à la fois, et dont la mutation sera le plus souvent invisible due aux redondances fonctionnelles. Pour contourner cette difficulté, nous avons utilisé l'outil CRISPR/Cas9 et initié un crible génétique à l'aide d'une collection d'ARN guides ciblant simultanément 2 à 3 gènes codants pour des transporteurs appartenant aux différentes familles. Cette collection, conçue par le laboratoire d'Eilon Shani, a permis l'identification de 3 nouveaux transporteurs de CK, PUP7 et PUP21 localisés dans la membrane de la vacuole, et PUP8 adressé à la membrane plasmique (Hu et al., 2023). Pour augmenter nos chances d'identifier des transporteurs de GA impliqués dans le transport acropète de GA₁₂, nous avons effectué cette recherche chez la lignée *kao1-2 kao2-3 pARSK1:KAO1-RFP*, qui présente la particularité de produire des GA₁₂ principalement dans les racines (Camut et al., 2019). Après transformation des plantes et sélection des transformants primaires par traitement BASTA, la recherche de candidats potentiels au transport acropète de GA₁₂ s'est effectuée en deux temps. Le premier crible consistait à sélectionner toutes les plantes exhibant une réduction de croissance et une perte partielle de la fertilité. En effet, les plantes *kao1-2 kao2-3 pARSK1:KAO1-RFP* se développent normalement grâce au transport acropète

de GA₁₂ dans les inflorescences, puis leur conversion en GA bioactives par l'action des GA20ox et GA3ox. Si une des plantes transformées est mutée pour plusieurs transporteurs impliqués dans le chargement ou le déchargement de GA₁₂ dans les vaisseaux de xylème, cette plante observera une réduction de croissance. Cependant, l'inverse n'est pas forcément vrai. Une réduction de croissance n'est pas obligatoirement associée à un défaut de transport de GA. C'est pour ce dernier point qu'un deuxième crible a été effectué et qui consistait à observer (ou pas) une restauration de la croissance et de la fertilité des plantes sélectionnées suite à un traitement exogène de GA. Suite à ces deux cibles phénotypiques, 7 plantes d'intérêts ont été retenues. Par séquençage des ARN guides, les transporteurs candidats ciblés ont été identifiés. De manière inattendue, 5 des 7 plantes retenues portaient un ARN guide qui ciblent des transporteurs de métabolites secondaires ou éléments chimiques (Tableau 3). Même si nous n'avons pas vérifié par séquençage que les transporteurs ciblés ont bien été mutés, à ce stade de l'étude, il est difficile d'expliquer pourquoi les altérations phénotypiques observées chez ces mutants ont été atténuées par le traitement GA. Les deux autres plantes retenues portaient un ARN guide qui cible des ABCG, une sous-famille de transporteurs impliqués dans le mouvement de diverses phytohormones. La lignée c510 cible les transporteurs ABCG17/18 et 19 et la lignée c1280 cible les transporteurs ABCG12 et 15 (Figure 97). Encore une fois, de manière inattendue, le séquençage des ABCG ciblés a révélé que seul le gène *ABCG12* est muté (à l'état homozygote). Pour certains gènes (par exemple *ABCG19*), la séquence (profil des pics) n'est pas propre en amont de la zone cible de l'ARN guide, suggérant potentiellement une mutation à l'état hétérozygote. Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent fortement qu'aucun transporteur de GA n'a été identifié dans notre crible. En effet, seules les mutations à l'état homozygote sont susceptibles de donner un phénotype, ce qui n'est pas le cas pour la lignée c510. Pour la lignée c1280, le gène *ABCG12* est bien muté à l'état homozygote, mais pas le gène *ABCG15* (qui est non muté). *ABCG12* pourrait être un candidat intéressant, mais il fait parti d'un groupe de gènes (comprenant *ABCG15*) impliqué dans le transport de lipides (McFarlane et al., 2010). Même si nous ne pouvons pas l'exclure, il est peu vraisemblable que *ABCG12* soit un transporteur de GA. Pour le confirmer, nous souhaitons rechercher dans les collections de mutants d'insertion des mutants *abcg12* et analyser leur phénotype en réponse à des traitements pharmacologiques (avec du PAC ou des GA), dans un fond génétique sauvage ou *kao1-2 kao2-3 pARSK1:KAO1-RFP*.

Pour le crible génétique, nous avons eu le choix d'utiliser une stratégie amiRNA ou CRISPR/Cas9 (collection d'ARN guides), permettant toutes les deux de cibler plusieurs gènes simultanément, comme alternative aux stratégies classiques (méthanesulfonate d'éthyle, rayonnements ionisants). La stratégie amiRNA, que nous avons utilisé au cours du chapitre 2, permet d'obtenir de façon efficace des multiples mutants hypomorphes. Une collection d'amiRNA ciblant l'ensemble des transporteurs d'*Arabidopsis* a été générée il y a plusieurs années par l'équipe du Dr. Julian Schroeder et a déjà permis d'identifier des transporteurs d'auxine et d'ABA aux fonctions redondantes (Hauser et al., 2013; Zhang et al., 2018, 2021). Cette stratégie, bien qu'efficace, a l'inconvénient de générer des mutants hypomorphes et non perte de fonctions créant ainsi un risque non négligeable qu'une activité résiduelle des transporteurs ciblés masque l'effet de leurs mutations. A l'inverse, la stratégie par CRISPR/Cas9 a l'avantage de générer des multiples mutants perte de fonctions, abolissant ainsi le risque que les plantes présentent une activité résiduelle de transport. Le plasmide pAGM55261 utilisé pour le crible a la particularité de posséder une Cas9 optimisée permettant d'obtenir avec une forte probabilité des multiples mutants homozygotes dès la première génération (Grützner et al., 2021). Bien que des études antérieures aient obtenus des scores de plus de 70% de simples et doubles mutants homozygotes, nous n'avons pas obtenu de tels pourcentages lors de notre étude. Sur les 2261 transformants indépendants obtenus, seuls 50 ont présenté une altération de leur phénotype. De plus, parmi les 5 transporteurs ABCG ciblés (lignées c510 et c1280), seul ABCG12 est muté à l'état homozygote. En se basant sur ces dernières observations, plusieurs questions peuvent être soulevées : (i) Avons-nous bien obtenu des multiples mutants et non pas des mutants simples ? Si nous avons obtenu une majorité de mutants simples, il est vraisemblable que les redondances fonctionnelles aient masqué les altérations phénotypiques par compensation ; (ii) Avons-nous obtenus essentiellement des multiples ou simples mutants hétérozygotes et non homozygotes ? (iii) A-t-on une bonne représentativité et stoechiométrie des ARN guides au sein de la collection ? Une surreprésentation d'un ou plusieurs ARN guides au sein de la collection nécessiterait d'augmenter considérablement le nombre de transformants primaires à analyser pour espérer avoir une plante mutée pour chaque construction. La collection « Transporter CRISPR Library » comprend plus de 5 000 constructions (ARN guides). Pour avoir une couverture complète (si la distribution de la collection est homogène), il faudrait en théorie analyser le phénotype de plus de 5 000 transformants indépendants. Bien que cela représente un nombre

conséquent de plantes, cela reste raisonnable comparé à un crible au méthanesulfonate d'éthyle (EMS), dont il est estimé que 125 000 transformants indépendants doivent être générés pour atteindre la saturation (Jander et al., 2003). La bonne représentativité des ARN guides au sein de la collection a été vérifiée en amont par séquençage par le laboratoire du Dr E. Shani. Est-il possible que la propagation des Agrobactéries qui contient la collection ait engendré une surreprésentation de certaines constructions au détriment d'autres ? Il est intéressant de noter que lors d'un précédent crible réalisé avec la même collection « Transporter CRISPR Library », 1200 transformants indépendants sur 3500 analysés ont présenté des phénotypes marqués (Hu et al., 2023). Par comparaison, même si nous avons sélectionné que les plantes présentant un déficit de croissance et une perte de fertilité, le nombre de plantes sélectionnées (50) parmi le nombre de transformants indépendants (1200) est faible (bien en deçà de l'étude par Hu et al., 2023).

Bien que la stratégie de crible par CRISPR/Cas9 de la lignée *kao1-2 kao2-3 pARSK1:KAO1-RFP* était prometteuse, nous n'avons pas atteint nos objectifs, à savoir d'identifier de nouveaux transporteurs de GA impliqués dans le transport acropète de GA₁₂. Pour être efficace, cette stratégie requière un pourcentage élevé de multiples mutants homozygotes dès la première génération, ce qui n'a pas été le cas dans nos conditions expérimentales.

Conclusion générale

Les phytohormones gibbérellines (GA) sont de petites molécules de signalisation produites à de très faibles concentrations (quelques ng/g poids sec), et qui ont la capacité de se déplacer et d'agir à distance, dans des cellules ou organes éloignés. La distribution spatio-temporelle des GA est le résultat d'un ensemble complexe de régulations adaptant synthèse et transport, aux besoins de la plante. En particulier, le mouvement de GA dans des tissus spécifiques contribue à la formation de gradients de concentration, essentiels pour la croissance des organes, le développement de la plante et son adaptation à l'environnement. Par exemple, le mouvement de GA dans l'endoderme de la racine est associé à l'élongation racinaire et à la formation de subérine (Tal et al., 2016; Binenbaum et al., 2023). Par ailleurs, le transport longue distance de GA₁₂, médié par le système vasculaire, adapte la croissance de la plante aux fluctuations de la température ambiante (Camut et al., 2019). Dans chacun de ces cas, le mouvement de GA requiert une activité de transport au travers de la membrane plasmique. Du fait de leurs propriétés physico-chimiques (les GA sont des acides faibles), les GA sont disposées à diffuser et entrer librement dans les cellules, le pH du cytosol étant plus alcalin que celui de l'apoplaste (Boursiac et al., 2013). Au contraire, les GA sont incapables de diffuser hors des cellules. Des transporteurs transmembranaires sont donc essentiels pour coordonner les mouvements de GA au sein des plantes. Au début de ma thèse, seuls quelques transporteurs de GA avaient été caractérisés (NPF3, GTR1/NPF2.10, SWEET13 et SWEET14), illustrant l'importance de ces derniers pour concentrer les GA dans les tissus où elles sont requises, et induire les réponses associées (Tal et al., 2016; David et al., 2016; Saito et al., 2015; Kanno et al., 2016). C'est dans ce contexte que mon travail de thèse a débuté avec pour objectif principal de caractériser de nouveaux transporteurs de GA.

Dans les deux premiers chapitres, je me suis attaché à étudier le transport local de GA, de cellule à cellule, dans la graine en germination et dans la racine. Pour cela, je me suis appuyé sur les résultats de deux cribles publiés (Chiba et al., 2015; Wulff et al., 2019), réalisés en système hétérologue (ovocytes de xénope et levure). Si cette stratégie de crible présente l'avantage d'identifier relativement facilement des transporteurs qui ont la capacité d'importer des GA, cela est beaucoup plus complexe et fastidieux d'identifier de manière exhaustive des exporteurs de GA. Ainsi pour l'heure, tous les transporteurs de GA identifiés sont des importeurs, à l'exception de NPF2.14 récemment caractérisé, qui est un exporteur

localisé dans la membrane de la vacuole, qui pourrait participer au stockage de GA (Binenbaum et al., 2023). Si pour l'heure NPF2.14 est une exception, pour les autres hormones, notamment l'ABA dont les propriétés physico-chimiques sont proches de celle des GA, plusieurs importeurs et exporteurs ont été identifiés et leur fonctions biologiques étudiées (Kuromori et Shinozaki, 2010; Lérain et al., 2020; Zhang et al., 2021; Shimizu et al., 2022).

Les exporteurs de GA sont essentiels pour le mouvement de GA de cellule à cellule (puisque les GA ne peuvent sortir librement des cellules), mais les importeurs ne restent pas moins essentiels, notamment pour diriger le flux de GA et générer les gradients de concentration. L'importance de ces flux dirigés peut être illustré par l'action de NPF4.1, un importeur qui concentre les GA dans la zone du micropyle de l'endosperme, essentiel pour induire la rupture des téguments lors de la germination de la graine (chapitre 1). Les transporteurs NPF2.3, NPF2.4, NPF2.5 et NPF2.7 sont également des importeurs de GA (Chiba et al., 2015; Wulff et al., 2019), qui *a priori* doivent contribuer à la distribution de GA dans les tissus racinaires (vu leurs patrons d'expressions), mais nos résultats n'ont pas permis de caractériser précisément leurs fonctions biologiques (chapitre 2).

L'un des facteurs limitant pour l'identification des transporteurs d'hormones est la redondance fonctionnelle des gènes. Ceci est particulièrement vrai pour les transporteurs de GA. Nous pouvons citer SWEET13 et SWEET14, NPF2.12 et NPF2.13, et vraisemblablement NPF2.3 et NPF2.4, et NPF2.5 et NPF2.7 (Kanno et al., 2016; Binenbaum et al., 2023) ; chapitre 2). Ce facteur limitant implique qu'il est souvent indispensable de muter plusieurs gènes redondants pour observer les conséquences sur le transport de GA. Les techniques de génétiques classiques (crible EMS ou de mutants d'insertion), bien qu'efficaces pour certains transporteurs (ceci a été le cas pour l'identification de NPF3 ; (Tal et al., 2016; David et al., 2016), sont souvent infructueuses pour l'identification de nouveaux transporteurs, puisqu'elles sont basées sur le phénotype de mutants simples. A l'inverse, les cribles génétiques faisant appel à des stratégies alternatives telles que les micro ARN artificiels ou CRISPR/Cas9 (employées aux chapitres 2 et 3) et qui sont capables de générer des mutations sur plusieurs gènes d'intérêts ont déjà mis en lumière de nouveaux transporteurs d'hormones, notamment pour l'auxine, l'ABA et les CK (Zhang et al., 2018, 2021; Hu et al., 2023). Un autre

avantage non négligeable est que ces stratégies permettent l'identification d'importeurs et d'exporteurs d'hormones, sans distinction. C'est avec l'objectif d'identifier de nouveaux transporteurs longue distance de GA, que nous avons initié un crible en utilisant la collection « Transporter CRISPR Library » en chapitre 3.

Parmi les transporteurs de GA caractérisés à ce jour, une grosse majorité fait partie de la très large famille des NPFs, comprenant 53 membres répartis en 8 sous-familles (Corratgé-Faillie et Lacombe, 2017; Saito et al., 2015; Tal et al., 2016; David et al., 2016; Binenbaum et al., 2023). Seuls SWEET13 et SWEET14 appartiennent à une autre famille (Kanno et al., 2016). Fait intéressant, la plupart des transporteurs de GA ont également la capacité de transporter de l'ABA. C'est le cas de NPF2.12, NPF2.13, NPF2.14, NPF3 et NPF4.1, mais aussi SWEET13 et SWEET14 (Binenbaum et al., 2023; Tal et al., 2016; Kanno et al., 2013, 2016). A ce stade, il est difficile d'expliquer comment un transporteur peut avoir une aussi large spécificité de substrat (Corratgé-Faillie et Lacombe, 2017). Le fait que ces transporteurs ont la double capacité de transporter des GA et de l'ABA est intéressant mais aussi surprenant car ces deux hormones exercent généralement des fonctions antagonistes. C'est le cas notamment pour la germination de la graine, la croissance de la plante ou la résistance aux stress abiotiques (Nambara et al., 2010; Koornneef et van der Veen, 1980; Lorrai et al., 2018; Liu et Hou, 2018). Même si cela n'a pas été étudié, nous pouvons supposer que ce double transport de GA et d'ABA offre à la plante un niveau supplémentaire de régulation, pour ajuster finement sa croissance et son développement en fonction des contraintes qui l'entourent. Par ailleurs, il est vraisemblable que pour certains de ces transporteurs, une compétition opère pour le transport de ces deux hormones. Ce phénomène a été démontré pour NPF4.1, où la capacité d'import d'ABA, testée en ovocyte de xénope, diminue proportionnellement à l'augmentation de la concentration de GA présente dans le milieu d'incubation (Kanno et al., 2013). Néanmoins, bien que les GA et l'ABA exercent souvent des rôles antagonistes, elles peuvent aussi avoir des fonctions synergiques. Récemment, il a été démontré que le transport de GA et d'ABA médié par NPF2.12, NPF2.13 et NPF2.14 promeut la formation de subérine dans l'endoderme de la racine (Binenbaum et al., 2023). Enfin, étant donné que la majorité des transporteurs de GA ont également pour substrat l'ABA, il est hautement probable que des transporteurs d'ABA déjà caractérisés ont aussi pour substrat des GA. Il serait intéressant d'étudier plus en détail la famille des transporteurs ABCG, dont plusieurs représentants,

comme les NPF, transportent de l'ABA et diverses autres hormones (Kuromori et Shinozaki, 2010; Lérán et al., 2020; Zhang et al., 2021; Shimizu et al., 2022). Cette idée est confortée par les résultats du crible génétique du chapitre 3, qui ont mis en lumière le transporteur ABCG12. Même si ce résultat est très préliminaire et devra être conforté par des approches complémentaires, il est fort vraisemblable que des transporteurs ABC puissent avoir pour substrat des GA.

Pour conclure, mon travail de thèse a permis d'apporter de nouveaux éléments de connaissance pour la compréhension et l'étude des transporteurs de GA, ainsi que l'importance de ce transport dans des processus développementaux, notamment au cours de la germination.

Matériels et Méthodes

1 Matériels

1.1 Matériel végétal

1.1.1 Mutants

L'ensemble des mutants provient du fond génétique Columbia-0 (Col-0).

Mutant	Origine
<i>npf2.3</i>	Taochy et al. 2015
<i>npf2.4</i>	SALK_111071 (NASC)
<i>npf2.5</i>	GK-936H04.01 (NASC)
<i>npf2.7</i>	SAIL_404_F08 (NASC)
<i>npf3.1</i>	SALK_130095 (NASC)
<i>npf4.1</i>	WiscDsLox434A10 (NASC)
<i>npf4.2</i>	SALK_092014 (NASC)
<i>npf3.1 npf4.1</i>	Laboratoire
<i>npf2.12 npf2.13</i>	Binenbaum et al. 2013
<i>sweet13 sweet14</i>	Kanno et al. 2015
<i>ga1-3</i>	Tyler et al. 2004
<i>kao1-2</i>	SALK_136249C (NASC)
<i>kao2-3</i>	SALK_135819 (NASC)
<i>amiRNA74-13</i>	Laboratoire
<i>amiRNA76-52</i>	Laboratoire
<i>ga1-3 amiRNA74 – 13</i>	Laboratoire
<i>ga1-3 amiRNA 76-52</i>	Laboratoire

1.1.2 Lignées transgéniques

L'ensemble des lignées transgéniques utilisées provient du fond Columbia-0.

<i>pNPF2.3:GFP</i>	Taochy et al. 2015
<i>pNPF2.4:GFP</i>	Laboratoire
<i>pNPF2.5:GFP</i>	Laboratoire
<i>pNPF2.7:GFP</i>	Laboratoire
<i>35S:NPF2.3-GFP</i>	Laboratoire
<i>35S:NPF2.4-GFP</i>	Laboratoire
<i>35S:NPF2.5-GFP</i>	Laboratoire
<i>35S:NPF2.7-GFP</i>	Laboratoire
<i>35S:NPF3.1-YFP</i>	Eilon Shani
<i>35S:NPF3.1-GFP</i>	Laboratoire
<i>35S:NPF4.1-GFP</i>	Laboratoire
<i>35S:NPF4.1-HA</i>	Laboratoire
<i>pNPF4.1:GUS</i>	Laboratoire
<i>pNPF2.12:GUS</i>	Eilon Shani
<i>pNPF2.13:GUS</i>	Laboratoire (Lucie Camut)
<i>pSWEET13:GUS</i>	Kanno et al. 2015
<i>pSWEET14:GUS</i>	Kanno et al. 2015
<i>pGA3ox1:GUS</i>	Hu et al. 2008
<i>pGA3ox2:GUS</i>	Hu et al. 2008
<i>pGA3ox3:GA3ox3-GUS</i>	Hu et al. 2008
<i>pGA3ox4:GUS</i>	Hu et al. 2008

<i>pGA20ox1:GUS</i>	Plackett et al. 2012
<i>pGA20ox2:GUS</i>	Plackett et al. 2012
<i>pGA20ox3:GUS</i>	Plackett et al. 2012
<i>kao1-2kao2-1 pARKS1:KAO1-RFP</i>	Laboratoire (Thomas Regnault)
<i>kao1-2kao2-3 pARKS1:KAO1-RFP</i>	Laboratoire

1.2 Souches bactériennes

1.2.1 *Escherichia coli*

Souche Top 10 (In Vitrogen) : Cette souche est utilisée pour amplifier les plasmides du système Gateway, après recombinaison.

Souche Survival et DB3.1 (In Vitrogen) : Ces souches servent pour amplifier des plasmides non-recombinés.

1.2.2 *Agrobacterium tumefaciens*

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

1.3 Librairie CRISPR/Cas 9

La collection d'ARN guides, « Transporters CRISPR Library », ciblant l'ensemble des transporteurs de plante a été développée par le laboratoire d'Eilon Shani (Université Tel Aviv ; <https://www.shanilab.sites.tau.ac.il>). Cette librairie a été clonée dans le plasmide pAGM55261 possédant une zCas9i optimisée et sous le contrôle du promoteur *RPS5A* (Grutzner et al., 2021). Cette collection est formée de 5500 constructions pour un recouvrement de 98% des transporteurs de plante. Chaque ARN guide cible aléatoirement 2 à 3 transporteurs.

2 Méthodes

2.1 Techniques relatives aux plantes

2.1.1 Condition de culture

2.1.1.1 Culture *in vitro*

Les graines non préalablement stratifiées avec une solution de GA sont stérilisées en surface à l'aide d'une solution d'EtOH 70% pendant 15 min, puis, par 3 lavages successifs d'1 min à l'éthanol 100%. Les graines sont séchées en condition stérile.

Les graines préalablement stratifiées avec une solution de GA₃ 10µM (Sigma-Aldrich) sont traitées, pendant 3 jours à 4°C et obscurité, avant d'être rincées 3 fois à l'eau. Les graines sont stérilisées avec une solution d'éthanol 70%, pendant 5 min, puis, avec une solution de Javel diluée (1:2), pendant 15 min. Les graines sont rincées 3 fois à l'eau stérile, pendant 1 min à chaque fois.

Les graines sont semées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu 1 x Murashige-Skoog (MS) standard (Duchefa biochemical), 1% sucrose et 1% d'agar (Sigma-Aldrich) ou sans agar pour les cultures en milieu MS liquide. Les milieux sont tamponnés à un pH de 5,8 avec

du KOH 1N. Pour certaines expériences, les graines sont semées sur des milieu MS modifiés sans source d'azote (Réf : 30630200 ; bioWORLD plantemedia) supplémenté avec différentes concentrations en KNO_3 , 0,5 mM NH_4 -succinate (Santa Cruz Biotechnology), 1% sucrose et 1% type A agar (Sigma-Aldrich). Si une stratification est nécessaire, les boîtes sont placées durant au minimum 48h, à 4°C, à l'obscurité. Les boîtes de Pétri sont transférées en chambre de culture (Sanyo) sous photopériode de 16h de lumière ($85 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) et 8 heures d'obscurité, à une température de 22°C, ou en logette de culture *in vitro* avec photopériode identique et une température de 21°C à la lumière, et 17°C à l'obscurité.

2.1.1.2 Culture en sol

Les plantes sont cultivées en pots de 7 cm de diamètre, remplis de terreau (LAT-Terra Standard P-Hawita-Gruppe), puis placées en logette en conditions contrôlées sous une photopériode de 16h de lumière, à 21°C et 8h d'obscurité, à 18°C.

2.1.1.3 Imbibition des graines sur Papier Whatman

Tests de Germination : Les graines sont semées, de façon homogène, sur des Boîtes de Pétri préalablement préparées avec deux disques stériles de papier Whatman 3MM et imbibés avec 3,5 ml d'eau. Les boîtes sont scellées avec du Parafilm. Les graines sont stratifiées 48 h, à 4°C, et obscurité, en veillant à ne pas superposer les boîtes les unes sur les autres. Les boîtes sont ensuite mises en culture sous une photopériode de 16h de lumière et 8h d'obscurité, à 22°C.

Cinétique d'expression des gènes : Les graines sont semées sur des boîtes préparées de la même façon que dans le paragraphe ci-dessus. La stratification et la culture des boîtes se font de la même façon que décrit dans le paragraphe ci-dessus. Les graines sont récoltées à l'aide d'une spatule, dans un tube Eppendorf de type « Safe lock », et immédiatement congelées dans de l'azote liquide, avant d'être stockées à -80°C.

Dissection pour analyse d'expression des gènes : L'ensemencement des graines, leur stratification et leur culture se font de la même façon que décrit dans le paragraphe du test de germination, ci-dessus. Après un temps variable d'imbibition (entre 3 et 6h selon l'expérience), les boîtes sont retirées de la chambre de culture et les graines sont disséquées sous loupe binoculaire. Une fois les tissus proprement séparés, ils sont immédiatement congelés dans un tube Eppendorf de type « Safe Lock » disposé dans de l'azote liquide. Une fois la dissection terminée, les échantillons sont stockés à -80°C

2.1.1.4 Imbibition des graines sur milieu MS

Tests de Germination : Les graines sont stérilisées à l'alcool avec le même protocole que celui décrit dans la section Matériels et Méthodes 2.1.1.1. Elles sont ensuite semées, de façon homogène, sur des boîtes de Pétri contenant du milieu 1 x Murashige-Skoog (MS) standard (Duchefa biochemical), 0,5% sucrose et 0,5% d'agar (Sigma-Aldrich). Les boîtes sont scellées avec du ruban Micropore (3M). Les graines sont stratifiées 48 h, à 4°C, et obscurité, en veillant à ne pas superposer les boîtes les unes sur les autres. Les boîtes sont ensuite mises en culture sous une photopériode de 16h de lumière et 8h d'obscurité, à 22°C. Dans le cas des tests de germination nécessitant une dissection des graines, la dissection est réalisée après les 6 premières heures d'imbibition en conditions stériles, et seuls les embryons sont conservés.

Cinétique d'expression des gènes : Les graines sont stérilisées et les boîtes sont préparées de la même façon que dans le paragraphe ci-dessus. Des membranes en nylon avec des mailles espacées de 38 μm (SEFAR NITEX 03-38 :22) sont ajoutées sur les boîtes. L'ensemencement des graines, leur stratification et leur culture se font de la même façon que décrit dans le paragraphe ci-dessus. Les graines sont récoltées à l'aide d'une spatule, dans un tube Eppendorf de type « Safe lock », et immédiatement congelées dans de l'azote liquide, avant d'être stockées à -80°C.

Dissection pour analyse d'expression des gènes : Les graines sont stérilisées et les boîtes sont préparées de la même façon que dans le paragraphe du test de germination, ci-

dessus. L'ensemencement des graines, leur stratification et leur culture se font de la même façon que décrit dans le paragraphe du test de germination, ci-dessus. Après un temps variable d'imbibition (entre 3 et 6h selon l'expérience), les boîtes sont retirées de la chambre de culture et les graines sont disséquées sous loupe binoculaire. Une fois les tissus proprement séparés, ils sont immédiatement congelés, dans un tube Eppendorf de type « Safe Lock » disposés dans de l'azote liquide. Une fois la dissection terminée, les échantillons sont stockés à -80°C

2.1.2 Micro-greffes d'*Arabidopsis*

Des plantules âgées de 5 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 lumière/8h obscurité, à 22 °C). Dans une boîte de Pétri, un filtre de nitrocellulose (Millipore Membrane Filter, HAWP 0,45µM) est positionné sur du papier Whatman 3MM stérile et imbibé d'une solution d'eau ou de 10mM NH₃ stérile (le filtre ne doit jamais sécher), quand les greffes sont réalisées avec les croisements *ga1-3* amiRs. Sur le filtre sont déposées les plantules à greffer et l'un des cotylédons est coupé à sa base. L'hypocotyle des plantules est sectionné d'une façon franche à 1/3 de sa base à l'aide d'un scalpel, la partie inférieure constituant un porte-greffe et la partie supérieure un greffon. Un greffon et un porte-greffe sont précisément mis en contact sous la loupe binoculaire. Une fois les micro-greffes réalisées, la papier Whatman est imbibé et la boîte est refermée hermétiquement à l'aide de parafilm. Les boîtes sont placées verticalement en chambre de culture, pour 5 jours, dans les mêmes conditions. Les plantules greffées, pour l'étude du transport basipète, sont par la suite transférées sur un milieu MS standard (0,5% sucrose, 1% agar) et la longueur de la racine est mesurée quotidiennement. Et les plantules greffées, pour le transport acropète, sont transférées en terre et mises en condition de culture standard, en jour long.

2.1.3 Analyse phénotypique

Mesure de la croissance racinaire : Les plantules analysées sont cultivées dans une armoire de culture (Sanyo ; voir section Matériels et Méthodes 2.1.1.1). Une première marque est ajoutée après 48h sur l'ensemble des graines ayant germées, celles qui ne l'ont pas sont exclues de l'étude (retard de germination). Puis, une marque est ajoutée quotidiennement au niveau de la pointe racinaire, pour une durée de 7 jours. Les plantules sont scannées et la distance entre les marques est mesurée à l'aide du logiciel Image J. Nous avons calculé la croissance moyenne jour par jour pour chaque génotype sur chaque condition durant les 5 premiers jours après germination. Une fois les moyennes obtenues, nous avons utilisées ces données pour réaliser des graphiques en nuages de points et déterminer la courbe de tendance pour chaque génotype dans chaque condition. L'équation de la courbe de tendance nous a permis de déterminer la croissance moyenne théorique par jour pour les 5 premiers jours, puis de calculer la croissance moyenne sur 24h pour chaque génotype et pour chaque condition. Les diagrammes des figures 79, 83C et 88 présentent la croissance moyenne sur 24h calculée grâce à cette méthode. Cependant les analyses statistiques réalisées pour ces expériences ont été faites sur les données brutes obtenues après mesure de la distance entre les marques mesurées pour chaque jour.

Mesure de la surface foliaire : Les rosettes sont analysées avec le logiciel Image J et à l'aide d'un script développé par Jérôme Mutterer (IBMP) et Lucas Jilli (IBMP).

Mesure de la hauteur des plantes : Les plantes âgées de 6 semaines sont mesurées à l'aide d'une règle graduée de la base de la rosette à l'extrémité de la tige principale.

2.1.4 Transformation stable

Les différents plasmides utilisés lors de l'étude ont été introduits par électroporation dans la souche d'*Agrobacterium* GV3101 (GenePulser®, Bioarad, résistance : 400 Ohms, capacité : 25 µFahrad, voltage : 2 Volts). Une fois transformées, les agrobactéries sont incubées dans un milieu LB liquide durant 2 heures à 28°C. Puis, elles sont étalées sur boîtes contenant du milieu Lysogeny Broth (LB) solide supplémenté avec plusieurs antibiotiques : Rifampicine (50 µg/mL) ; Gentamicine (50 µg/mL) ; Le ou les antibiotiques de sélection du plasmide. Les boîtes sont placées en incubation, durant 3 jours à 28°C.

Une colonie isolée est inoculée dans 20 mL de milieu LB liquide, contenant les antibiotiques nécessaires, puis incubée à 28°C, sous agitation (180 rpm), pendant 2 jours, afin de préparer une pré-culture. 4 mL de cette pré-culture sont prélevés et inoculés dans 300 mL de milieu LB, contenant les mêmes antibiotiques que la pré-culture ; la culture est incubée à 28°C, sous agitation (180 rpm) sur la nuit. La culture est centrifugée à température ambiante (vitesse : 4000 rpm) et le culot est remis en suspension dans 500 mL de tampon 50 g/L de sucrose, 500 µL/L de silwet, H₂O). Les plantes d'*Arabidopsis* sont transformées dans cette solution, par immersion florale. Les plantes transformées sont placées sous mini-serre et à l'obscurité, pendant 48h. Puis, les plantes sont mises en condition de culture standard. Les graines des plantes transformées sont sélectionnées soit *in vitro* en présence de l'antibiotique de sélection de la construction introduite, soit en terre avec un traitement au glufosinates (BASTA). Les plantes résistantes forment la première génération (T1). La seconde génération (T2) est sélectionnée *in vitro* en présence d'antibiotique sur la base d'une ségrégation $\frac{3}{4}$ résistantes, pour $\frac{1}{4}$ sensibles, signifiant la présence d'une insertion unique de la construction. La Troisième génération (T3) est sélectionnée sur la base d'une résistance totale indiquant l'homozygotie des plantes. Une fois sélectionnées, une étude de l'expression des gènes (par microscopie, coloration histochimique ou RT-qPCR) ou de l'accumulation des protéines est réalisé afin de vérifier l'expression de la construction.

2.2 Techniques relatives à l'ADN

2.2.1 Extraction d'ADN

Extraction en tube unitaire : Environ 100 mg de matériel végétal frais sont placés dans un tube Sarstedt (bouchon vissé) et sont broyés à l'aide de bille en verre (\varnothing 0,5 mm), dans le broyeur Precellys® (6500 rpm, 30 s). La poudre est homogénéisée dans 500 μ L de tampon d'extraction Edwards (200 mM Tris-HCl ; pH 7,5 ; 250 mM NaCl ; 25 mM EDTA ; 0,5% SDS). Les échantillons sont centrifugés à 21 000 g durant 5 min, puis 300 μ L de la phase supérieure sont prélevés et mélangés à 300 μ L d'isopropanol pour permettre la précipitation de l'ADN. Après une centrifugation de 15 min à 21 000 g, le culot d'ADN est rincé à l'EtOH 70% (v/v). Après évaporation de l'EtOH (10 min), le culot est re-suspendu dans 100 μ L d'eau stérile. La concentration d'ADN obtenue est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm (Nanodrop 2000/One, Thermo Scientific).

Extraction en plaque (96 puits) : Le matériel végétal est récolté dans un bloc de polypropylène de 96 puits (ABgene), une bille métallique (\varnothing 3,5 mm) est ajoutée dans chaque puits, ainsi que 500 μ L de tampon « Magic Buffer » (50 mM Tris-HCl ; pH 7,5 ; 300 mM NaCl ; 300 mM sucrose). Les puits sont fermés à l'aide de capuchon pour microtubes adaptés (Collection Microtube Caps (120 x 8), Quiagen). Les échantillons sont broyés à l'aide du TissueLyser II, à une fréquence de 30 rpm/s, pendant 1 min, l'opération est répétée en changeant le bloc d'orientation. Les blocs sont par la suite centrifugés à température ambiante, pendant 1 min, à 1000 g. Et pour finir, 100 μ L de chaque échantillon sont transférés dans une nouvelle plaque, puis, conservés à -20°C.

2.2.2 Purification de plasmides

Des bactéries sont cultivées dans du milieu LB, généralement dans 4 mL, avec antibiotique adéquat et sont incubées pendant 1 nuit, à 37°C, sous agitation (200 rpm). L'ADN

plasmidique est extrait des bactéries à la suite d'une lyse alcaline à l'aide du kit de minipréparation NucleoSpin® Plasmid EasyPure (Macherey-Nagel), selon les indications fournies par le fabricant.

2.2.3 PCR

La Polymerase Chain Reaction (PCR) permet d'amplifier un fragment d'ADN d'intérêt *in vitro* grâce à l'ADN polymérase thermostable de *Thermus aquaticus* (Taq). Les amorces utilisées sont décrites dans les annexes 1 et 2. Les PCR de contrôle et de génotypage ont été réalisées respectivement avec la Taq Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific) et une Taq produite au sein de l'institut (Home Taq). Les amplifications de fragments destinés au clonage ont été réalisées avec la Taq Phusion High-Fidelity (Thermo Scientific). Les mélanges réactionnels associés sont les suivants :

Phire Hot Start II (Volume réactionnel : 20 µL)		HomeTaq (Volume réactionnel : 15 µL)		Phusion High-Fidelity (Volume réactionnel : 50 µL)	
Matrice d'ADN	100 ng	Matrice d'ADN	1 µL	Matrice d'ADN	100 ng
Amorce sens (10µM)	0,5 µL	Tampon de l'enzyme 10X	1,5 µL	Master Mix 2X	25 µL
Amorce antisens (10µM)	0,5 µL	dNTP (10 µL)	0,3 µL	Amorce sens (10µM)	1 µL
dNTP (10µM)	0,4 µL	Amorce sens (10µM)	0,5 µL	Amorce antisens (10µM)	1 µL
Tampon de l'enzyme 5X	0,2 µL	Amorce antisens (10µM)	0,5 µL	Qsp H ₂ O	50 µL
ADN polymérase	0,2 µL	BSA (10mg/mL)	1,5 µL		
Qsp H ₂ O	20 µL	PVP (5%)	3 µL		
		Tampon de charge 10X	1,5 µL		
		ADN polymérase	0,3 µL		
		Qsp H ₂ O	15 µL		

Une première étape de dénaturation des brins d'ADN à 95 °C est suivie de la phase d'amplification comprenant 30 cycles composés : d'une étape de dénaturation à 98°C ; d'une hybridation des amorces à la matrice d'ADN à une température définie d'après la température de fusion (Tm) des deux amorces ; d'une étape d'élongation à 72°C ; et d'une étape finale de 5 min) 72°C pour terminer l'élongation des brins. Le programme de PCR varie en fonction de l'enzyme utilisée, les programmes sont les suivants :

Étape	Phire Hot Start II		HomeTaq		Phusion High-Fidelity	
Étape initiale	98°C	3 min	98°C	3 min	98°C	3 min
Dénaturation	98°C	30 sec	98°C	30 sec	98°C	30 sec
Hybridation	Tm	30 sec	Tm	30 sec	Tm	30 sec
Élongation	72°C	30 sec/ kb	72°C	1 min/ kb	72°C	30 sec/ kb
Étape finale	72°C	5 min	72°C	5 min	72°C	5 min

À la suite de la réaction de PCR, une électrophorèse sur gel d'agarose 1% (% variant selon la taille de l'amplicon ; Agarose A95539-500G, SIGMA-ALDRICH) contenant du bromure d'éthidium (BET), dans un tampon TAE (40 mM Tris-acétate, 0,1 mM EDTA) est réalisée et est révélée sous UV.

2.2.4 Purification de fragments PCR

Purification avec kit : Les fragments d'intérêts amplifiés par PCR sont purifiés à l'aide du kit NuclioSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel), selon les indications fournies par le fabricant. Dans certains cas, les fragments ont préalablement été séparés sur un gel d'Agarose 1% (SeaKem® GTG® Agarose, Lonza), puis ont été découpés sur gel (bande à la taille attendue), puis purifiés avec le kit cité préalablement.

Purification avec billes : Après amplification des fragments d'intérêts, des billes magnétiques ont été ajoutées aux réactions PCR (v/v), le mélange a été homogénéisé et laissé 5 min, à température ambiante (RT). Les tubes sont placés sur un portoir magnétique pendant 1 min, permettant la séparation des billes et de la solution. Le surnageant est évacué des tubes, les billes sont lavées avec de l'EtOH 70 % (frais) durant 30 s, à RT, puis le lavage est fait une seconde fois. A la fin du second lavage l'EtOH 70% est retiré et les billes sont séchées, pendant 10 min à RT. Les tubes sont retirés sur portoir magnétique et les billes sont mises délicatement en suspension dans 20 µL d'eau stérile, puis laissées 2 min, à RT. Les tubes sont mis à nouveau sur le portoir métallique, après 1 min d'attente, le surnageant enrichi en fragments d'ADN d'intérêt, est transféré dans un nouveau tube.

2.2.5 Clonage par système Gateway

Le système Gateway permet de transférer efficacement des fragments d'ADN entre plasmide, par l'utilisation de séquences recombinantes nommées « att ». Les fragments, une fois purifiés, sont insérés dans un vecteur d'entrée pDONR 221 ou pDONR ZEO par réaction enzymatique BP clonase II (BP, Invitrogen) sur une nuit, à 22°C, puis, la réaction est arrêtée par ajout d'1 µL de protéinase K (Invitrogen), et d'une incubation de 10 min, à 37°C. Par la suite, 3 µL de réaction BP sont ajoutés à des bactéries d'*Escherichia Coli* compétentes TOP 10 (Invitrogen), afin de réaliser un choc thermique d'1 min, à 42°C. Les bactéries ainsi transformées sont incubées durant 45 min, à 37°C, dans du milieu LB, étalées sur boîtes, puis, incubées à 37°C, sur la nuit. Les plasmides sont ensuite purifiés avec le protocole décrit dans Matériels et Méthodes section 2.2.2. Puis séquencés pour contrôler l'absence de mutation.

Après l'étape de clonage, une réaction LR Clonase II (LR, Invitrogen) est réalisée, en présence du vecteur d'entrée et du vecteur de destination, sur une nuit, à 22°C, afin d'introduire le gène d'intérêt par recombinaison homologue (via les sites attB) dans le vecteur binaire adapté. Le vecteur est ensuite amplifié dans *E. coli*, de la même façon que pour la réaction BP, puis introduit dans *Agrobacterium tumefaciens* d'après le protocole décrit en dans Matériels et Méthodes section 2.1.4.

Récapitulatif des vecteurs utilisés pour les différents clonages :

Insert	Plasmide
pDONR 221, pGWB650	pNPF2.4, pNPF2,5, pNPF2.7
pDONR 221, pGWB633	pNPF4.1
pDONR 221, pB7FWG2	NPF2.4, NPF2.5, NPF2.7, NPF3.1, NPF4.1
pDONR ZEO, pB7FWG2	NPF2.3
pDONR ZEO, pGWB14	NPF4.1

2.2.6 Génotypage de mutants d'insertion T-DNA

L'ADN génomique des différents mutants est extrait selon le protocole dans Matériels et Méthodes section 2.2.1. Par la suite une PCR est réalisée selon le protocole dans Matériels et Méthodes section 2.2.3 en utilisant un couple d'amorces spécifiques (Annexe 4) pour chaque gène, ainsi qu'une amorce spécifique au T-DNA.

2.3 Analyse de l'expression des gènes

2.3.1 Extraction d'ARN

Extraction à partir de tissus frais : 100 mg de matériel végétal est introduit dans un tube de type Sarstedt (bouchon vissé) avec des billes en verre (\varnothing 0,5 mm) et congelé dans de l'azote liquide. Le matériel est réduit en poudre à l'aide du broyeur Precellys® (6500 rpm, 30 s). Les ARN totaux sont extraits à l'aide du kit NucleoSpin® RNA Plante (Macherey Nagel), en suivant les indications du fabricant. Par la suite, la concentration en ARN est déterminée par la mesure de l'absorbance à 260 nm (Nanodrop 2000/One, Thermo Scientific).

Extraction à partir de tissus de la graine : Les graines sont introduites dans un tube Eppendorf de type « safe lock » et sont congelées dans de l'azote liquide. Les tissus de la graine sont broyés dans un mortier avec un pilon, le tout, préalablement refroidi avec de l'azote liquide. La poudre fine obtenue est placée dans un nouveau tube Eppendorf de type « safe lock » et les ARN totaux sont extraits à l'aide du kit RNeasy Plus Mini (Quiagen), incluant un traitement DNase, en suivant les indications du fabricant. Par la suite, la concentration en ARN est déterminée par la mesure de l'absorbance à 260 nm (Nanodrop 2000/One, Thermo Scientific).

2.3.2 Amplification de l'ARN

Les ARN totaux de graines ou de tissus de graines sont amplifiés à la suite de leur extraction, à l'aide du kit QuanTitect Whole Transcriptome Handbook (Quiagen), en suivant les indications du fabricant. L'étape d'incubation à 30°C, se fait pendant 2 heures. Ce protocole inclut la transcription inverse des ARN en ADNc.

2.3.3 Transcription inverse des ARN

À la suite de l'extraction des ARN totaux, l'ADN résiduel des échantillons est éliminé par un traitement avec de la DNase I (Promega), pendant 50 min, à 30°C. Une transcription inverse (RT) est réalisée, à partir d'1 ou 2 µg d'ARN, dans un volume total de 40 µL contenant : 2 µM d'oligo (dT) ; 0,5 mM de déoxynucléotide triphosphate (dNTP) ; 5 mM de dithiothréitol (DTT), 200 unités/µL de Superscript IV reverse transcriptase (Invitrogen) ; de l'eau stérile pour qsp à 40 µL. Le mélange réactionnel est incubé à 50°C, pendant 30 min, puis la réaction est inactivée à 80°C, pendant 10 min.

2.3.4 PCR quantitative

La PCR quantitative (qPCR) est réalisée avec des amorces de gènes spécifiques (Annexe 3) dans un mélange réactionnel de 10 µL de SYBR Green Master Mix (roche) à l'aide du LightCycler® (Roche). Le programme utilisé est le suivant : dénaturation pendant 5 min, à 95°C ; PCR, 45 cycles (dénaturation des amplicons de 10 sec, à 95°C ; hybridation des amorces de 15 s, à 60°C et polymérisation de 15 s, à 72°C) ; gradient de température d'1 min, de 55 à 95°C, avec une lecture continue de la fluorescence pour établir une courbe de fusion et vérifier la présence d'un seul amplicon par couple d'amorce. La valeur moyenne de trois réplicas techniques est normalisée par rapport au gène de référence *SAND* (AT2G28390), *EXP* (AT4G26410), *PP2A* (AT1G69960), *DUF106* (AT4G12590) ou encore *TIP41-LIKE* (AT4G34270) et est calculée à l'aide du logiciel LightCycler 490 1.5.0 SP3.

2.4 Étude des patrons d'expression d'un gène

2.4.1 Analyses histochimiques GUS

Le matériel végétal préalablement disséqué, séparé et placé dans des puits en Nylon (Cell stainer, 70 µm Nylon, Falcon) est infiltré sous-vide (0,8 bar) pendant 15 min, dans une solution GUS contenant : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (X-Gluc) 200/400 µg/ml ; 50 mM sodium phosphate pH, 3,6 mM Potassium ferricyanide, 1 mM potassium ferrocyanide, 10 mM EDTA, 0,01 % Triton X-100 (v/v). Après une incubation à 37°C, sur la nuit, la réaction est arrêtée par immersion des tissus dans de l'éthanol 70 % (embryon) ou une solution de fixation (EtOH 100% et acide acétique glacial (3 :1)). La solution de fixation est laissée sur la journée ou sur la nuit, avant que les téguments ne soient rincés deux fois, à l'eau. Les téguments sont décolorés avec une solution de Javel 2,4 %, jusqu'à blanchissement des tissus.

2.4.2 Technique du « Bedding assay »

Les graines sont mises en culture *in vitro* durant une heure, avant d'être disséquées, à l'aide d'une loupe binoculaire et de pinces. Un « lit » d'embryons d'un génotype donné est formé dans des puits en Nylon (Cell stainer, 70 µm Nylon, Falcon). Et des téguments de la lignée *pEXPA2:GUS* sont incubés au contact de ce lit d'embryons. Après 24 heures d'incubation, les téguments subissent une analyse histochimique dont le protocole est décrit dans Matériels et Méthodes section 2.4.1.

2.5 Microscopie confocale

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

Dans les cas des tests d'import de GA₃-FL, les racines sont préalablement incubées deux heures dans une solution de MS liquide et de GA₃-Fl à une concentration de 5 µM (fourni par le laboratoire de Roy Weinstain, Tel Aviv). Les racines sont rincées 2 fois dans une solution de MS liquide avant d'être colorées avec de l'iodure de Propidium.

2.6 Analyse des protéines

2.6.1 Extraction des protéines totales

100 mg de matériel végétal préalablement congelé dans de l'azote liquide, sont réduits en poudre par des billes en verre à l'aide du broyeur Precellys®. Les protéines sont extraites en présence d'un tampon dénaturant composé de : Tris-base 62,5 mM ; Urée 4M ; SDS 3%

(p/v) ; dithiothréitol (DTT) 100 mM ; Glycérol 10 % (v/v) ; Bleu de bromophénol 0,1 % (p/v) ; pH 6.8. Une première étape de dénaturation de 5 min, à 95°C est suivie d'une centrifugation de 15 min, à 21 000 g et pour finir, le surnageant contenant les protéines totales est collecté et conservé à - 20°C.

2.6.2 Quantification des protéines totales

La méthode colorimétrique Amido Black, qui repose sur la précipitation des protéines dans le méthanol en milieu acide et leur coloration par l'Amido Black, est utilisée, afin de déterminer la concentration des protéines totales extraites. Pour ce faire, 10 µL d'extraits protéiques sont dilués dans 190 µL d'eau et 1 mL de solution Amido Black contenant : de l'acide acétique 10 % (v/v) ; du méthanol 90 % (v/v) ; de l'Amido Black 0,05 % (p/v). Après une homogénéisation du mélange, les protéines sont précipitées par centrifugation pendant 15 min, à 15 000 rpm, puis rincées dans une solution d'acide acétique 10 % (v/v) et d'éthanol 90 % (v/v). Le culot de protéines, ainsi formé, est remis en suspension dans 1 mL de NaOH 0,2 N, et l'absorbance à 630 nm de l'extrait est mesurée. La concentration protéique de l'extrait est calculée d'après une gamme étalon préalablement réalisée avec de la BSA (Albumine de Sérum Bovin).

2.6.3 Séparation et détection des protéines par SDS-PAGE

Une migration électrophorétique dans un gel acrylamide (de 8 à 10 %) dénaturant SDS-PAGE, (préparé selon Sambrook et Russel, 2001), permet de séparer les protéines totales des échantillons (en partant avec 5 à 15 µg de protéine). Une migration de 2 h, à 110 V, dans un tampon Tris-Glycine (Tris-Base 25 mM ; Glycine 250 mM ; SDS 10 %), permet de séparer les protéines selon leur taille. Après cela, les protéines sont transférées sur une membrane en PolyFluorure de Vinydène (PVDF) Immobilon-P (Millipore) dans un système Mini trans Blot Cell (Biorad) durant 2 h à 100 V, dans un tampon de transfert composé du : 25 mM Tris-base ; 192 mM Glycine ; 15 % d'éthanol technique (v/v). À la suite du transfert, la membrane est

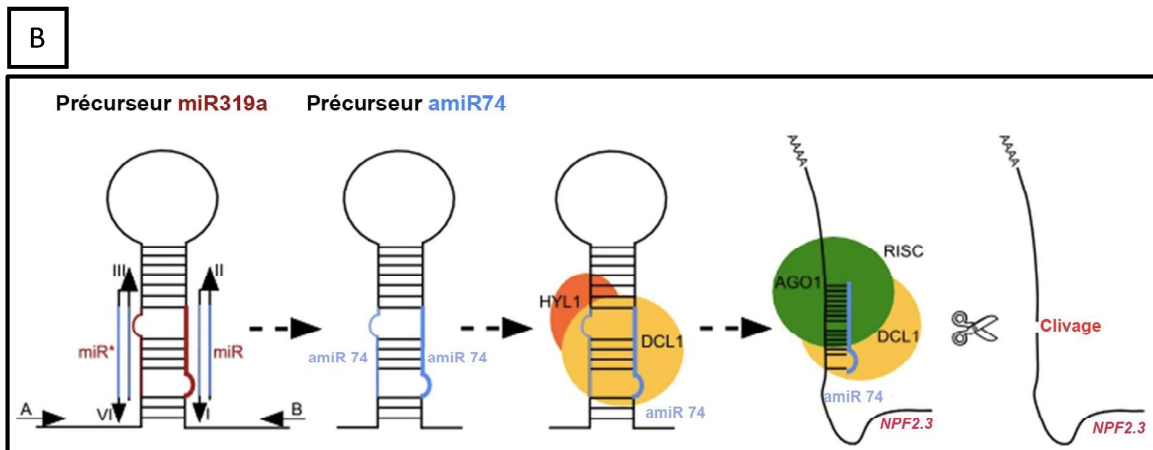
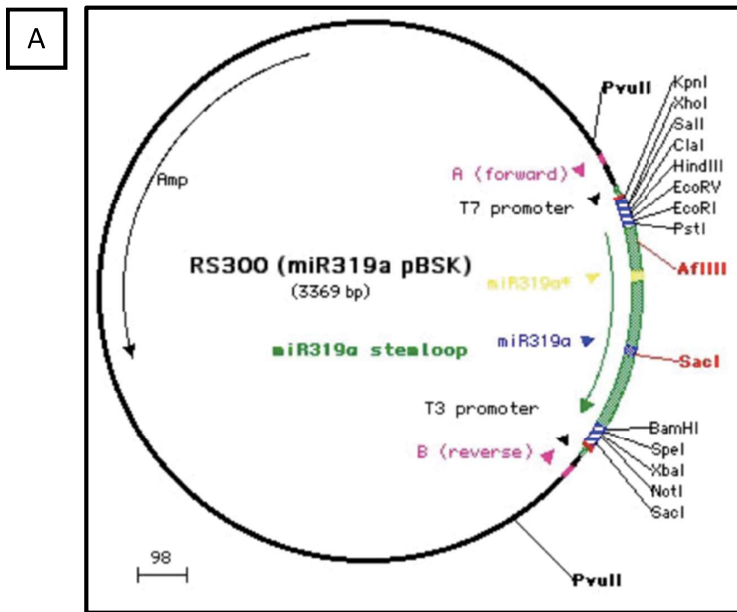


Figure 100 : Stratégie des micro-ARN artificiels (amiRNA)

- A. Carte plasmidique pRS300 ayant servi de matrice pour la construction des amiR74 et amiR76. Les 21 nucléotides du miR319a sont remplacés par les séquences amiR74 et amiR76 à la suite d'une PCR réalisée au moyen d'amorces spécifiques.
- B. Représentation schématique de la stratégie des amiRNA avec l'amiR74. Le précurseur miR319a (miR) est remplacé par la construction amiR74 par des PCR successives à l'aide d'amorces spécifiques (A, B, I, II, III et IV). Le précurseur amiR74 une fois exprimé par la plante sera reconnu par HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1) puis maturé en micro-ARN par l'action de la ribonucléase DICER LIKE1 (DCL1). L'amiR74 se liera à ses cibles, incluant *NPF2.3*, par complémentarité de séquence, puis sera reconnu par la protéine ARGONAUTE1 (AGO1) du complexe RNA-Induced Silencing Complex (RISC) qui induira le clivage.

bloquée pendant 1 h, dans du TBS-T (Tris-HCl pH 7,4 ; 150 mM NaCl ; Tween 20 0,1 % (v/v)) avec ajout de lait en poudre (5 %). Après blocage, la membrane est incubée une nuit, à 4°C, avec l'anticorps primaire, puis, lavée 3 fois au TBS-T, pendant 10 min. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps secondaire, à température ambiante, pendant 2 heures. La membrane est lavée 3 fois, durant 10 min, dans du TBS-T, avant que la révélation ne soit effectuée avec du Clarty Max™ Western ECL (Biorad). L'anticorps primaire utilisé est l'anti-HA (dilué au 1000^{ème}, BioLegend) et l'anticorps secondaire est le goat anti-mouse IgC (dilué au 10 000^{ème}, Molecular Probe), couplé à la HRP (Horseradish peroxidase). Le contrôle de charge est réalisé par coloration de la membrane au bleu de Coomassie (450 mL de méthanol, 450 mL d'H₂O, 100 mL d'acide acétique et 2,5 g de Brillant blue R250 (Sigma-Aldrich)), pendant 20 min, suivie de plusieurs lavages à l'eau distillée, puis, séchage de la membrane.

2.7 Génération des multiples mutants

2.7.1 Stratégie des micro-ARN artificiels

Nous avons suivi le protocole « Cloning of artificial microRNAs » de Rebecca Schwab, MPI for Developmental Biology Tuebingen, 2005, avec le plasmide pRS300 comme matrice, dont le précurseur est miR319a (Figure 100). Les amorces ont été dessinées à l'aide du logiciel (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>) pour les différents couples de gènes ciblés, et sont référencées dans l'annexe 6. Après clonage et vérification par séquençage, les constructions ont été intégrées à l'aide du système Gateway (décrit dans la section 2.2.5) dans le plasmide pB2GW7 (promoteur 35S). Par la suite, les plasmides ont été transférés dans *Agrobacterium*, comme décrit dans Matériels et Méthodes section 2.1.4. Et une transformation par immersion florale des plantes a été réalisée, voir Matériels et Méthodes section 2.1.4. La séquence de l'amiR74 ciblant *NPF2.3*, *NPF2.4*, *NPF2.5* et *NPF2.7* est : TCGTGGGTACCAAATGACATA. La séquence de l'amiR76 ciblant *NPF2.2*, *NPF2.3*, *NPF2.4*, *NPF2.5* et *NPF2.7* est : GTGCTTCACCAAATGACATA.

2.7.2 Stratégie CRISPR/Cas9

Pour réaliser le crible génétique, le stock glycérolé d'*Agrobacterium* de la « Transporters CRISPR Library » a été ensemencé dans du milieu LB liquide et incubé à 37°C, pendant une nuit. Puis, des plantes *kao1-2 kao2-1 pARSK1:KAO1-RFP* ont été transformées par immersion florale avec le même protocole que celui décrit dans la partie Matériels et Méthodes section 2.1.4. La première génération de transformants a été sélectionnée par un traitement au BASTA. Les générations suivantes ont été sélectionnées à la suite d'une analyse phénotypique.

2.8 Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques a été réalisé à l'aide du logiciel R (*RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>*). Différents tests statistiques ont été réalisés au cours de la thèse : Test t de Student (test t), test de Kruskal-Wallis, test Annova à 2 facteurs, suivi d'une comparaison de Tukey, test de Welch. Tous les tests ont été faits en prenant en compte un seuil de significativité α de 0,05 ($p < 0,05$).

Bibliographie

- Abel, S. and Theologis, A.** (1996). Early Genes and Auxin Action. *Plant Physiology* **111**: 9–17.
- 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. *The Plant Cell* **20**.
- Achard, P., Gusti, A., Cheminant, S., Alioua, M., Dhondt, S., Coppens, F., Beeemster, G.T.S., and Genschik, P.** (2009). Gibberellin Signaling Controls Cell Proliferation Rate in *Arabidopsis*. *Current Biology* **19**: 1188–1193.
- Adamowski, M. and Friml, J.** (2015). PIN-Dependent Auxin Transport: Action, Regulation, and Evolution. *The Plant Cell* **27**.
- Ahmad, N., Rahman, M., Mukhtar, Z., Zafar, Y., and Zhang, B.** (2020). A critical look on CRISPR-based genome editing in plants. *Journal Cellular Physiology* **235**: 666–682.
- Almagro, A., Lin, S.H., and Tsay, Y.F.** (2009). Characterization of the *Arabidopsis* Nitrate Transporter NRT1.6 Reveals a Role of Nitrate in Early Embryo Development. *The Plant Cell* **20**: 3289–3299.
- Aloni, R.** (1987). Differentiation of Vascular Tissues. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* **38**: 179–204.
- Anterola, A., Shanle, E., Mansouri, K., Schuette, S., and Renzaglia, K.** (2009). Gibberellin precursor is involved in spore germination in the moss *Physcomitrella patens*. *Planta* **229**: 1003–1007.
- Araya, T., Kubo, T., Von Wirén, N., and Takahashi, H.** (2016). Statistical modeling of nitrogen-dependent modulation of root system architecture in *Arabidopsis thaliana*: Modeling root system architecture of *Arabidopsis*. *J. Integr. Plant Biol.* **58**: 254–265.
- von Arnim, A. and Deng, X.-W.** (1996). Light control of seedling development. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **47**: 215–243.
- Atzorn, R. and Weiler, E.W.** (1983). The immunoassay of gibberellins: II. Quantitation of GA3, GA4 and GA7 by ultra-sensitive solid-phase enzyme immunoassays. *Planta* **159**: 7–11.
- Bai, B., Sikron, N., Gendler, T., Kazachkova, Y., Barak, S., Grafi, G., Khozin-Goldberg, I., and Fait, A.** (2012). Ecotypic Variability in the Metabolic Response of Seeds to Diurnal Hydration–Dehydration Cycles and its Relationship to Seed Vigor. *Plant and Cell Physiology* **53**: 38–52.
- Barker, R., Fernandez Garcia, M.N., Powers, S.J., Vaughan, S., Bennett, M.J., Phillips, A.L., Thomas, S.G., and Hedden, P.** (2021). Mapping sites of gibberellin biosynthesis in the *Arabidopsis* root tip. *New Phytologist* **229**: 1521–1534.
- Bassel, G.W., Mullen, R.T., and Bewley, J.D.** (2006). ABI3 expression ceases following, but not during, germination of tomato and *Arabidopsis* seeds. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1291–1297.

- Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S., and Nekrasov, V.** (2013). Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods* **9**: 39.
- Bell, J.K. and McCully, M.E.** (1970). A histological study of lateral root initiation and development in *Zea mays*. *Protoplasma* **70**: 179–205.
- Ben-Targem, M., Ripper, D., Bayer, M., and Ragni, L.** (2021). Auxin and gibberellin signaling cross-talk promotes hypocotyl xylem expansion and cambium homeostasis. *Journal of Experimental Botany* **72**: 3647–3660.
- Bethke, P.C., Libourel, I.G.L., Aoyama, N., Chung, Y.-Y., Still, D.W., and Jones, R.L.** (2007). The Arabidopsis Aleurone Layer Responds to Nitric Oxide, Gibberellin, and Abscisic Acid and Is Sufficient and Necessary for Seed Dormancy. *Plant Physiology* **143**: 1173–1188.
- Bewley, J.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W.M., and Nonogaki, H.** (2013). *Seeds: physiology of development, germination and dormancy* 3rd ed. (Springer: New York, NY).
- Binenbaum, J. et al.** (2023). Gibberellin and abscisic acid transporters facilitate endodermal suberin formation in Arabidopsis. *Nat. Plants* **9**: 785–802.
- Binenbaum, J., Weinstain, R., and Shani, E.** (2018). Gibberellin Localization and Transport in Plants. *Trends in Plant Science* **23**: 410–421.
- Bird, D., Beisson, F., Brigham, A., Shin, J., Greer, S., Jetter, R., Kunst, L., Wu, X., Yephremov, A., and Samuels, L.** (2007). Characterization of Arabidopsis ABCG11/WBC11, an ATP binding cassette (ABC) transporter that is required for cuticular lipid secretion†: WBC11 is required for cuticular lipid transport. *The Plant Journal* **52**: 485–498.
- Bolle, C.** (2004). The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* **218**: 683–692.
- Borghi, L., Kang, J., Ko, D., Lee, Y., and Martinoia, E.** (2015). The role of ABCG-type ABC transporters in phytohormone transport. *Biochemical Society Transactions* **43**: 924–930.
- Boursiac, Y., Léran, S., Corratgé-Faillie, C., Gojon, A., Krouk, G., and Lacombe, B.** (2013). ABA transport and transporters. *Trends in Plant Science* **18**: 325–333.
- Brewer, P.B., Koltai, H., and Beveridge, C.A.** (2013). Diverse Roles of Strigolactones in Plant Development. *Molecular Plant* **6**: 18–28.
- Briones-Moreno, A., Hernández-García, J., Vargas-Chávez, C., Blanco-Touri an, N., Phokas, A.,  rbez, C., Cerd an, P.D., Coates, J.C., Alabad ı, D., and Blázquez, M.A.** (2023). DELLA functions evolved by rewiring of associated transcriptional networks. *Nat. Plants* **9**: 535–543.
- B urkle, L., Cedzich, A., D opke, C., Stransky, H., Okumoto, S., Gillissen, B., K uhn, C., and Frommer, W.B.** (2003). Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*: *Cytokinin transporter from Arabidopsis*. *The Plant Journal* **34**: 13–26.

- Büttner, M.** (2007). The monosaccharide transporter(-like) gene family in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* **581**: 2318–2324.
- Camut, L. et al.** (2021). Nitrate signaling promotes plant growth by upregulating gibberellin biosynthesis and destabilization of DELLA proteins. *Current Biology* **31**: 4971-4982.e4.
- Camut, L., Regnault, T., Sirlin-Josserand, M., Sakvarelidze-Achard, L., Carrera, E., Zumsteg, J., Heintz, D., Leonhardt, N., Lange, M.J.P., Lange, T., Davière, J.-M., and Achard, P.** (2019). Root-derived GA12 contributes to temperature-induced shoot growth in *Arabidopsis*. *Nat. Plants* **5**: 1216–1221.
- Carrera-Castaño, G., Calleja-Cabrera, J., Pernas, M., Gómez, L., and Oñate-Sánchez, L.** (2020). An Updated Overview on the Regulation of Seed Germination. *Plants* **9**: 703.
- Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., Sandberg, G., and Bennett, M.J.** (2003). Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends in Plant Science* **8**: 165–171.
- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R.P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inzé, D., Sandberg, G., Casero, P.J., and Bennett, M.** (2001). Auxin Transport Promotes *Arabidopsis* Lateral Root Initiation. *Plant Cell* **13**: 843–852.
- Chaiwanon, J., Wang, W., Zhu, J.-Y., Oh, E., and Wang, Z.-Y.** (2016). Information Integration and Communication in Plant Growth Regulation. *Cell* **164**: 1257–1268.
- Chandra, S., Yadav, R.R., Poonia, S., Pal, Y., Rathod, D.R., Gupta, A., Lal, S.K., and Talukdar, A.** (2017). Seed Coat Permeability Studies in Wild and Cultivated Species of Soybean. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* **6**: 2358–2363.
- Chatfield, S.P., Stirnberg, P., Forde, B.G., and Leyser, O.** (2000). The hormonal regulation of axillary bud growth in *Arabidopsis*. *Plant J* **24**: 159–169.
- Chen, L.-Q. et al.** (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* **468**: 527–532.
- Chen, S., Petersen, B.L., Olsen, C.E., Schulz, A., and Halkier, B.A.** (2001). Long-Distance Phloem Transport of Glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **127**: 194–201.
- Chen, S.-Y., Gu, T.-Y., Qi, Z.-A., Yan, J., Fang, Z.-J., Lu, Y.-T., Li, H., and Gong, J.-M.** (2021). Two NPF transporters mediate iron long-distance transport and homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Communications* **2**: 100244.
- Cheng, H., Qin, L., Lee, S., Fu, X., Richards, D.E., Cao, D., Luo, D., Harberd, N.P., and Peng, J.** (2004). Gibberellin regulates *Arabidopsis* floral development via suppression of DELLA protein function. *Development* **131**: 1055–1064.
- Chiba, Y., Shimizu, T., Miyakawa, S., Kanno, Y., Koshiba, T., Kamiya, Y., and Seo, M.** (2015). Identification of *Arabidopsis thaliana* NRT1/PTR FAMILY (NPF) proteins capable of transporting plant hormones. *J Plant Res* **128**: 679–686.

- Coles, P.J., Phillips, . Coles Andrew L., Croker, S.J., García-Lepe, R., Lewis, M.J., and Hedden, P. (1999).** Modification of gibberellin production and plant development in *Arabidopsis* by sense and antisense expression of gibberellin 20-oxidase genes. *The Plant Journal* **17**: 547–556.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., and Zhang, F. (2013).** Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* **339**: 819–823.
- Cook, C.E., Whichard, L.P., Turner, B., Wall, M.E., and Egley, G.H. (1966).** Germination of Witchweed (*Striga lutea* Lour.): Isolation and Properties of a Potent Stimulant. *Science* **154**: 1189–1190.
- Csukasi, F., Osorio, S., Gutierrez, J.R., Kitamura, J., Giavalisco, P., Nakajima, M., Fernie, A.R., Rathjen, J.P., Botella, M.A., Valpuesta, V., and Medina-Escobar, N. (2011).** Gibberellin biosynthesis and signalling during development of the strawberry receptacle. *New Phytologist* **191**: 376–390.
- Curaba, J., Moritz, T., Blervaque, R., Parcy, F., Raz, V., Herzog, M., and Vachon, G. (2004).** *AtGA3ox2*, a Key Gene Responsible for Bioactive Gibberellin Biosynthesis, Is Regulated during Embryogenesis by *LEAFY COTYLEDON2* and *FUSCA3* in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **136**: 3660–3669.
- 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. (2016).** A Pivotal Role of DELLAs in Regulating Multiple Hormone Signals. *Molecular Plant* **9**.
- Davière, J.-M. and Achard, P. (2013).** Gibberellin signaling in plants. *Development* **140**.
- Davière, J.-M., De Lucas, M., and Prat, S. (2008).** Transcriptional factor interaction: a central step in DELLA function. *Current Opinion in Genetics & Development* **18**: 295–303.
- Davière, J.-M., Wild, M., Regnault, T., Baumberger, N., Eisler, H., Genschik, P., and Achard, P. (2014).** Class I TCP-DELLA Interactions in Inflorescence Shoot Apex Determine Plant Height. *Current Biology* **24**: 1923–1928.
- 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.
- Debeaujon, I. and Koornneef, M. (2000).** Gibberellin Requirement for *Arabidopsis* Seed Germination Is Determined Both by Testa Characteristics and Embryonic Abscisic Acid. *Plant Physiology* **122**: 415–424.
- Debeaujon, I., Léon-Kloosterziel, K.M., and Koornneef, M. (2000).** Influence of the Testa on Seed Dormancy, Germination, and Longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **122**: 403–414.

- Dempsey, D.A., Shah, J., and Klessig, D.F.** (1999). Salicylic Acid and Disease Resistance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **18**: 547–575.
- Desta, B. and Amare, G.** (2021). Paclobutrazol as a plant growth regulator. *Chem. Biol. Technol. Agric.* **8**: 1.
- Dill, A., Jung, H.-S., and Sun, T.** (2001). The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 14162–14167.
- 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[W]. *The Plant Cell* **16**: 1392–1405.
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., and Scheres, B.** (1993). Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* **119**: 71–84.
- Dubreucq, B., Berger, N., Vincent, E., Boisson, M., Pelletier, G., Caboche, M., and Lepiniec, L.** (2000). The Arabidopsis AtEPR1 extensin-like gene is specifically expressed in endosperm during seed germination. *Plant J* **23**: 643–652.
- Fan, S.-C., Lin, C.-S., Hsu, P.-K., Lin, S.-H., and Tsay, Y.-F.** (2009). The *Arabidopsis* Nitrate Transporter NRT1.7, Expressed in Phloem, Is Responsible for Source-to-Sink Remobilization of Nitrate. *The Plant Cell* **21**: 2750–2761.
- Feng, S. et al.** (2008). Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* **451**: 475–479.
- Ferguson, B.J., Ross, J.J., and Reid, J.B.** (2005). Nodulation Phenotypes of Gibberellin and Brassinosteroid Mutants of Pea. *Plant Physiology* **138**: 2396–2405.
- Finch-Savage, W.E. and Leubner-Metzger, G.** (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* **171**: 501–523.
- Fleet, C.M., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kawaide, H., David, C.J., Kamiya, Y., and Sun, T.** (2003). Overexpression of *AtCPS* and *AtKS* in *Arabidopsis* Confers Increased *ent*-kaurene Production But No Increase in Bioactive Gibberellins. *Plant Physiology* **132**: 830–839.
- Francoz, E., Lepiniec, L., and North, H.M.** (2018). Seed coats as an alternative molecular factory: thinking outside the box. *Plant Reprod* **31**: 327–342.
- Fredes, I., Moreno, S., Díaz, F.P., and Gutiérrez, R.A.** (2019). Nitrate signaling and the control of *Arabidopsis* growth and development. *Current Opinion in Plant Biology* **47**: 112–118.
- Frey, A., Effroy, D., Lefebvre, V., Seo, M., Perreau, F., Berger, A., Sechet, J., To, A., North, H.M., and Marion-Poll, A.** (2012). Epoxy-carotenoid cleavage by NCED5 fine-tunes ABA accumulation and affects seed dormancy and drought tolerance with other NCED family members: Functional analysis of the NCED5 gene. *The Plant Journal* **70**: 501–512.

- Frigerio, M., Alabadí, D., Pérez-Gómez, J., García-Cárcel, L., Phillips, A.L., Hedden, P., and Blázquez, M.A.** (2006). Transcriptional Regulation of Gibberellin Metabolism Genes by Auxin Signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology* **142**: 553–563.
- Friml, J. and Palme, K.** (2002). Polar auxin transport – old questions and new concepts? *Plant Molecular Biology* **49**.
- Fry, S.C.** (2004). Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytologist* **161**: 641–675.
- Fu, X. and Harberd, N.P.** (2003). Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. *Nature* **421**: 740–743.
- Fukaki, H., Tameda, S., Masuda, H., and Tasaka, M.** (2002). Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the *SOLITARY-ROOT/IAA14* gene of *Arabidopsis*: Role of *SLR/IAA14* in lateral root formation. *The Plant Journal* **29**: 153–168.
- Gattolin, S., Sorieul, M., and Frigerio, L.** (2010). Tonoplast intrinsic proteins and vacuolar identity. *Biochemical Society Transactions* **38**: 769–773.
- Geiger, D.** (2020). Plant glucose transporter structure and function. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* **472**: 1111–1128.
- Gill, R.A., Ahmar, S., Ali, B., Saleem, M.H., Khan, M.U., Zhou, W., and Liu, S.** (2021). The Role of Membrane Transporters in Plant Growth and Development, and Abiotic Stress Tolerance. *IJMS* **22**: 12792.
- Golz, J.F., Allen, P.J., Li, S.F., Parish, R.W., Jayawardana, N.U., Bacic, A., and Doblin, M.S.** (2018). Layers of regulation – Insights into the role of transcription factors controlling mucilage production in the Arabidopsis seed coat. *Plant Science* **272**: 179–192.
- Gräfe, K. and Schmitt, L.** (2021). The ABC transporter G subfamily in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **72**: 92–106.
- Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z.-L., Powers, S.J., Gong, F., Phillips, A.L., Hedden, P., Sun, T., and Thomas, S.G.** (2007). Genetic Characterization and Functional Analysis of the GID1 Gibberellin Receptors in Arabidopsis. *The Plant Cell* **18**.
- Gruber, B.D., Giehl, R.F.H., Friedel, S., and Von Wirén, N.** (2013). Plasticity of the Arabidopsis Root System under Nutrient Deficiencies. *Plant Physiol.* **163**: 161–179.
- Grützner, R., Martin, P., Horn, C., Mortensen, S., Cram, E.J., Lee-Parsons, C.W.T., Stuttmann, J., and Marillonnet, S.** (2021). High-efficiency genome editing in plants mediated by a Cas9 gene containing multiple introns. *Plant Communications* **2**: 100135.
- Gubler, F., Kalla, R., Roberts, J.K., and Jacobsen, J.V.** (1995). Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pl alpha-amylase gene promoter. *Plant Cell* **7**: 1879–1891.

- Gutierrez, L., Van Wuytswinkel, O., Castelain, M., and Bellini, C.** (2007). Combined networks regulating seed maturation. *Trends in Plant Science* **12**: 294–300.
- Harberd, N.P.** (2003). Relieving DELLA Restraint. *Science* **299**: 1853–1854.
- Hauser, F., Chen, W., Deinlein, U., Chang, K., Ossowski, S., Fitz, J., Hannon, G.J., and Schroeder, J.I.** (2013). A Genomic-Scale Artificial MicroRNA Library as a Tool to Investigate the Functionally Redundant Gene Space in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **25**: 2848–2863.
- Hauvermale, A.L., Tuttle, K.M., Takebayashi, Y., Seo, M., and Steber, C.M.** (2015). Loss of *Arabidopsis thaliana* Seed Dormancy is Associated with Increased Accumulation of the GID1 GA Hormone Receptors. *Plant Cell Physiol* **56**: 1773–1785.
- Hayashi, K., Horie, K., Hiwatashi, Y., Kawaide, H., Yamaguchi, S., Hanada, A., Nakashima, T., Nakajima, M., Mander, L.N., Yamane, H., Hasebe, M., and Nozaki, H.** (2010). Endogenous Diterpenes Derived from *ent*-Kaurene, a Common Gibberellin Precursor, Regulate Protonema Differentiation of the Moss *Physcomitrella patens*. *Plant Physiology* **153**: 1085–1097.
- He, Y.-N., Peng, J.-S., Cai, Y., Liu, D.-F., Guan, Y., Yi, H.-Y., and Gong, J.-M.** (2017). Tonoplast-localized nitrate uptake transporters involved in vacuolar nitrate efflux and reallocation in *Arabidopsis*. *Sci Rep* **7**: 6417.
- Hedden, P.** (2020). The Current Status of Research on Gibberellin Biosynthesis. *Plant and Cell Physiology* **61**: 1832–1849.
- Hedden, P.** (2003). The genes of the Green Revolution. *Trends in Genetics* **19**: 5–9.
- Hedden, P. and Sponsel, V.** (2015). A Century of Gibberellin Research. *J Plant Growth Regul* **34**: 740–760.
- Hedden, P. and Thomas, S.G.** (2012). Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochemical Journal* **444**: 11–25.
- Helliwell, C.A., Chandler, P.M., Poole, A., Dennis, E.S., and Peacock, W.J.** (2001a). The CYP88A cytochrome P450, *ent*-kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellin biosynthesis pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 2065–2070.
- Helliwell, C.A., Poole, A., James Peacock, W., and Dennis, E.S.** (1999). *Arabidopsis ent*-Kaurene Oxidase Catalyzes Three Steps of Gibberellin Biosynthesis. *Plant Physiology* **119**: 507–510.
- Helliwell, C.A., Sheldon, C.C., Olive, M.R., Walker, A.R., Zeevaart, J.A.D., Peacock, W.J., and Dennis, E.S.** (1998). Cloning of the *Arabidopsis ent*-kaurene oxidase gene *GA 3*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 9019–9024.
- Helliwell, C.A., Sullivan, J.A., Mould, R.M., Gray, J.C., Peacock, W.J., and Dennis, E.S.** (2001b). A plastid envelope location of *Arabidopsis ent*-kaurene oxidase links the plastid and endoplasmic reticulum steps of the gibberellin biosynthesis pathway: Localization of GA biosynthesis enzymes. *The Plant Journal* **28**: 201–208.

- Higgins, C.F.** (1992). ABC Transporters: From Microorganisms to Man. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **8**: 67–113.
- Hilhorst, H.W. and Koornneef, M.** (2007). Dormancy in Plants. In *eLS*, John Wiley & Sons, Ltd, ed (Wiley).
- Hirano, K., Asano, K., Tsuji, H., Kawamura, M., Mori, H., Kitano, H., Ueguchi-Tanaka, M., and Matsuoka, M.** (2010). Characterization of the Molecular Mechanism Underlying Gibberellin Perception Complex Formation in Rice. *The Plant Cell* **22**: 2680–2696.
- Holdsworth, M.J., Bentsink, L., and Soppe, W.J.J.** (2008). Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytologist* **179**: 33–54.
- Hori, S.** (1898). Some observations on “Bakanae” disease of the rice plant. *Agric.Res.stn* **12**: 110–119.
- Hu, J. et al.** (2008). Potential Sites of Bioactive Gibberellin Production during Reproductive Growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **20**: 320–336.
- Hu, Y. et al.** (2023). Multi-Knock—a multi-targeted genome-scale CRISPR toolbox to overcome functional redundancy in plants. *Nat. Plants* **9**: 572–587.
- Hwang, I. and Goodman, H.M.** (1995). An *Arabidopsis thaliana* root-specific kinase homolog is induced by dehydration, ABA, and NaCl. *Plant J* **8**: 37–43.
- Ioio, R.D., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M.T., Aoyama, T., Costantino, P., and Sabatini, S.** (2008). A Genetic Framework for the Control of Cell Division and Differentiation in the Root Meristem. *Science* **322**: 1380–1384.
- Jacobsen, J.V., Gubler, F., and Chandler, P.M.** (1995). Gibberellin Action in Germinated Cereal Grains. In *Plant Hormones*, P.J. Davies, ed (Springer Netherlands: Dordrecht), pp. 246–271.
- Jander, G., Baerson, S.R., Hudak, J.A., Gonzalez, K.A., Gruys, K.J., and Last, R.L.** (2003). Ethylmethanesulfonate Saturation Mutagenesis in *Arabidopsis* to Determine Frequency of Herbicide Resistance. *Plant Physiol.* **131**: 139–146.
- Jansen, L., De Rybel, B., Vassileva, V., and Beeckman, T.** (2010). Root Development. In *Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives*, E.C. Pua and M.R. Davey, eds (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg), pp. 71–90.
- Ji, J., Yang, L., Fang, Z., Zhang, Y., Zhuang, M., Lv, H., and Wang, Y.** (2022). Plant SWEET Family of Sugar Transporters: Structure, Evolution and Biological Functions. *Biomolecules* **12**: 205.
- 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.

- Jin, S., Kanagaraj, A., Verma, D., Lange, T., and Daniell, H.** (2011). Release of Hormones from Conjugates: Chloroplast Expression of β -Glucosidase Results in Elevated Phytohormone Levels Associated with Significant Increase in Biomass and Protection from Aphids or Whiteflies Conferred by Sucrose Esters. *Plant Physiol.* **155**: 222–235.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E.** (2012). A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* **337**: 816–821.
- Jung, J.-H., Kim, S.-G., Seo, P.J., and Park, C.-M.** (2008). Molecular Mechanisms Underlying Vascular Development. In *Advances in Botanical Research* (Elsevier), pp. 1–68.
- Kang, J., Yim, S., Choi, H., Kim, A., Lee, K.P., Lopez-Molina, L., Martinoia, E., and Lee, Y.** (2015). Abscisic acid transporters cooperate to control seed germination. *Nat Commun* **6**: 8113.
- Kanno, Y., Hanada, A., Chiba, Y., Ichikawa, T., Nakazawa, M., Matsui, M., Koshiba, T., Kamiya, Y., and 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**: 9653–9658.
- Kanno, Y., Kamiya, Y., and Seo, M.** (2013). Nitrate does not compete with abscisic acid as a substrate of AtNPF4.6/NRT1.2/AIT1 in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior* **8**: e26624.
- Kanno, Y., Oikawa, T., Chiba, Y., Ishimaru, Y., Shimizu, T., Sano, N., Koshiba, T., Kamiya, Y., Ueda, M., and Seo, M.** (2016). AtSWEET13 and AtSWEET14 regulate gibberellin-mediated physiological processes. *Nat Commun* **7**: 13245.
- Karimi, M., Inzé, D., and Depicker, A.** (2002). GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* **7**: 193–195.
- Karsen, C.M., Brinkhorst-van Der Swan, D.L.C., Breekland, A.E., and Koornneef, M.** (1983). Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies on abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* **157**: 158–165.
- Kasahara, H., Hanada, A., Kuzuyama, T., Takagi, M., Kamiya, Y., and Yamaguchi, S.** (2002). Contribution of the Mevalonate and Methylerythritol Phosphate Pathways to the Biosynthesis of Gibberellins in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 45188–45194.
- Kato, J.** (1958). Non-polar transport of gibberellin through pea stem and a method for its determination.
- Kohlen, W., Charnikhova, T., Liu, Q., Bours, R., Domagalska, M.A., Beguerie, S., Verstappen, F., Leyser, O., Bouwmeester, H., and Ruyter-Spira, C.** (2011). Strigolactones Are Transported through the Xylem and Play a Key Role in Shoot Architectural Response to Phosphate Deficiency in Nonarbuscular Mycorrhizal Host *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **155**: 974–987.
- Koornneef, M., Reuling, G., and Karsen, C.M.** (1984). The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* **61**: 377–383.

- Koornneef, M. and van der Veen, J.H.** (1980). Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) heynh. *Theoretical and Applied Genetics* **58**.
- Krapp, A., David, L.C., Chardin, C., Girin, T., Marmagne, A., Leprince, A.-S., Chaillou, S., Ferrario-Méry, S., Meyer, C., and Daniel-Vedele, F.** (2014). Nitrate transport and signalling in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **65**: 789–798.
- Kuromori, T. and Shinozaki, K.** (2010). ABA transport factors found in *Arabidopsis* ABC transporters. *Plant Signaling & Behavior* **5**: 1124–1126.
- Lacombe, B. and Achard, P.** (2016). Long-distance transport of phytohormones through the plant vascular system. *Current Opinion in Plant Biology* **34**: 1–8.
- Lange, T., Krämer, C., and Pimenta Lange, M.J.** (2020). The Class III Gibberellin 2-Oxidases AtGA2ox9 and AtGA2ox10 Contribute to Cold Stress Tolerance and Fertility. *Plant Physiol.* **184**: 478–486.
- Lantzouni, O., Alkofer, A., Falter-Braun, P., and Schwechheimer, C.** (2020). GROWTH-REGULATING FACTORS Interact with DELLAs and Regulate Growth in Cold Stress. *Plant Cell* **32**: 1018–1034.
- Laplaze, L. et al.** (2008). Cytokinins Act Directly on Lateral Root Founder Cells to Inhibit Root Initiation. *The Plant Cell* **19**: 3889–3900.
- Lee, K.P., Piskurewicz, U., Turečková, V., Strnad, M., and Lopez-Molina, L.** (2010). A seed coat bedding assay shows that RGL2-dependent release of abscisic acid by the endosperm controls embryo growth in *Arabidopsis* dormant seeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**: 19108–19113.
- Lee, S., Cheng, H., King, K.E., Wang, W., He, Y., Hussain, A., Lo, J., Harberd, N.P., and Peng, J.** (2002). Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via *RGL2*, a *GAI/RGA*-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes Dev.* **16**: 646–658.
- Lefebvre, V., North, H., Frey, A., Sotta, B., Seo, M., Okamoto, M., Nambara, E., and Marion-Poll, A.** (2006). Functional analysis of *Arabidopsis* *NCED6* and *NCED9* genes indicates that ABA synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed dormancy. *The Plant Journal* **45**: 309–319.
- Léran, S. et al.** (2014). A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. *Trends in Plant Science* **19**: 5–9.
- Léran, S., Noguero, M., Corratgé-Faillie, C., Boursiac, Y., Brachet, C., and Lacombe, B.** (2020). Functional Characterization of the *Arabidopsis* Abscisic Acid Transporters NPF4.5 and NPF4.6 in *Xenopus* Oocytes. *Front. Plant Sci.* **11**: 144.
- Leubner-Metzger, G., Frundt, C., Vogeli-Lange, R., and Meins Jr, F.** (1995). Class I [beta]-1,3-Glucanases in the Endosperm of Tobacco during Germination. *Plant Physiol.* **109**: 751–759.
- Li, B. et al.** (2016). Identification of a Stelar-Localized Transport Protein That Facilitates Root-to-Shoot Transfer of Chloride in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **170**: 1014–1029.

- Li, B., Qiu, J., Jayakannan, M., Xu, B., Li, Y., Mayo, G.M., Tester, M., Gilliam, M., and Roy, S.J.** (2017). AtNPF2.5 Modulates Chloride (Cl⁻) Efflux from Roots of *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* **7**.
- Li, H., Testerink, C., and Zhang, Y.** (2021). How roots and shoots communicate through stressful times. *Trends in Plant Science* **26**: 940–952.
- Li, Y., Han, S., and Qi, Y.** (2023). Advances in structure and function of auxin response factor in plants. *JIPB* **65**: 617–632.
- Lim, S., Park, J., Lee, N., Jeong, J., Toh, S., Watanabe, A., Kim, J., Kang, H., Kim, D.H., Kawakami, N., and Choi, G.** (2014). ABA-INSENSITIVE3, ABA-INSENSITIVE5, and DELLAs Interact to Activate the Expression of *SOMNUS* and Other High-Temperature-Inducible Genes in Imbibed Seeds in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **25**: 4863–4878.
- Liu, C.-J., Zhao, Y., and Zhang, K.** (2019). Cytokinin Transporters: Multisite Players in Cytokinin Homeostasis and Signal Distribution. *Front. Plant Sci.* **10**: 693.
- Liu, K., Li, Y., Chen, X., Li, L., Liu, K., Zhao, H., Wang, Y., and Han, S.** (2018). ERF72 interacts with ARF6 and BZR1 to regulate hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **69**: 3933–3947.
- Liu, S., Strauss, S., Adibi, M., Mosca, G., Yoshida, S., Dello Iorio, R., Runions, A., Andersen, T.G., Grossmann, G., Huijser, P., Smith, R.S., and Tsiantis, M.** (2022). Cytokinin promotes growth cessation in the *Arabidopsis* root. *Current Biology* **32**: 1974-1985.e3.
- Liu, X. and Hou, X.** (2018). Antagonistic Regulation of ABA and GA in Metabolism and Signaling Pathways. *Front. Plant Sci.* **9**: 251.
- Lockard, R.G. and Grunwald, C.** (1970). Grafting and Gibberellin Effects on the Growth of Tall and Dwarf Peas. *Plant Physiology* **45**: 160–162.
- López-Bucio, J., Hernández-Abreu, E., Sánchez-Calderón, L., Nieto-Jacobo, M.F., Simpson, J., and Herrera-Estrella, L.** (2002). Phosphate Availability Alters Architecture and Causes Changes in Hormone Sensitivity in the *Arabidopsis* Root System. *Plant Physiology* **129**: 244–256.
- Lorrai, R., Boccaccini, A., Ruta, V., Possenti, M., Costantino, P., and Paola, V.** (2018). ABA inhibits hypocotyl elongation acting on gibberellins, DELLA proteins and auxin. *AoB PLANTS*.
- Lucas, W.J. et al.** (2013). The Plant Vascular System: Evolution, Development and Functions ^F. *Journal of Integrative Plant Biology* **55**: 294–388.
- Magome, H., Nomura, T., Hanada, A., Takeda-Kamiya, N., Ohnishi, T., Shinma, Y., Katsumata, T., Kawaide, H., Kamiya, Y., and Yamaguchi, S.** (2013). *CYP714B1* and *CYP714B2* encode gibberellin 13-oxidases that reduce gibberellin activity in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**: 1947–1952.
- Malamy, J.E. and Benfey, P.N.** (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**: 33–44.

- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., and Church, G.M.** (2013). RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science* **339**: 823–826.
- 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.
- Martel, C., Blair, L.K., and Donohue, K.** (2018). PHYD prevents secondary dormancy establishment of seeds exposed to high temperature and is associated with lower PIL5 accumulation. *Journal of Experimental Botany* **69**: 3157–3169.
- Martin, DavidN., Proebsting, WilliamM., Parks, T.D., Dougherty, WilliamG., Lange, T., Lewis, MervynJ., Gaskin, P., and Hedden, P.** (1996). Feed-back regulation of gibberellin biosynthesis and gene expression in *Pisum sativum* L. *Planta* **200**.
- Martin, T., Oswald, O., and Graham, I.A.** (2002). Arabidopsis Seedling Growth, Storage Lipid Mobilization, and Photosynthetic Gene Expression Are Regulated by Carbon:Nitrogen Availability. *Plant Physiology* **128**: 472–481.
- Matakiadis, T., Alboresi, A., Jikumaru, Y., Tatematsu, K., Pichon, O., Renou, J.-P., Kamiya, Y., Nambara, E., and Truong, H.-N.** (2009). The Arabidopsis Abscisic Acid Catabolic Gene *CYP707A2* Plays a Key Role in Nitrate Control of Seed Dormancy. *Plant Physiology* **149**: 949–960.
- Matthes, M.S., Robil, J.M., and McSteen, P.** (2020). From element to development: the power of the essential micronutrient boron to shape morphological processes in plants. *Journal of Experimental Botany* **71**: 1681–1693.
- McAtee, P., Karim, S., Schaffer, R., and David, K.** (2013). A dynamic interplay between phytohormones is required for fruit development, maturation, and ripening. *Front. Plant Sci.* **4**.
- McComb, A.J.** (1964). The Stability and Movement of Gibberellic Acid in Pea Seedlings. *Annals of Botany* **28**: 669–687.
- McFarlane, H.E., Shin, J.J.H., Bird, D.A., and Samuels, A.L.** (2010). *Arabidopsis* ABCG Transporters, Which Are Required for Export of Diverse Cuticular Lipids, Dimerize in Different Combinations. *The Plant Cell* **22**: 3066–3075.
- Mitchell, J.W., Mandava, N., Worley, J.F., Plimmer, J.R., and Smith, M.V.** (1970). Brassins—a New Family of Plant Hormones from Rape Pollen. *Nature* **225**: 1065–1066.
- Mitchum, M.G., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kuwahara, A., Yoshioka, Y., Kato, T., Tabata, S., Kamiya, Y., and Sun, T.** (2006). Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in Arabidopsis development. *The Plant Journal* **45**: 804–818.
- Monna, L.** (2002). Positional Cloning of Rice Semidwarfing Gene, *sd-1*: Rice “Green Revolution Gene” Encodes a Mutant Enzyme Involved in Gibberellin Synthesis. *DNA Research* **9**: 11–17.
- Morffy, N. and Strader, L.C.** (2022). Structural Aspects of Auxin Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **14**: a039883.

- Morris, K., Linkies, A., Müller, K., Oracz, K., Wang, X., Lynn, J.R., Leubner-Metzger, G., and Finch-Savage, W.E.** (2011). Regulation of Seed Germination in the Close Arabidopsis Relative *Lepidium sativum* : A Global Tissue-Specific Transcript Analysis. *Plant Physiology* **155**: 1851–1870.
- Motte, H., Vanneste, S., and Beeckman, T.** (2019). Molecular and Environmental Regulation of Root Development. *Annu. Rev. Plant Biol.* **70**: 465–488.
- Moubayidin, L., Perilli, S., Dello Ioio, R., Di Mambro, R., Costantino, P., and Sabatini, S.** (2010). The Rate of Cell Differentiation Controls the Arabidopsis Root Meristem Growth Phase. *Current Biology* **20**: 1138–1143.
- Murase, K., Hirano, Y., Sun, T., and Hakoshima, T.** (2008). Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* **456**: 459–463.
- Nakabayashi, K., Bartsch, M., Xiang, Y., Miatton, E., Pellengahr, S., Yano, R., Seo, M., and Soppe, W.J.J.** (2012). The Time Required for Dormancy Release in *Arabidopsis* Is Determined by DELAY OF GERMINATION1 Protein Levels in Freshly Harvested Seeds. *Plant Cell* **24**: 2826–2838.
- Nakajima, M. et al.** (2006). Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors. *The Plant Journal* **46**: 880–889.
- Nambara, E., Okamoto, M., Tatematsu, K., Yano, R., Seo, M., and Kamiya, Y.** (2010). Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. *Seed Sci. Res.* **20**: 55–67.
- Nambara, E., Suzuki, M., Abrams, S., McCarty, D.R., Kamiya, Y., and McCourt, P.** (2002). A Screen for Genes That Function in Abscisic Acid Signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **161**: 1247–1255.
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lisón, P., Nemri, A., Harberd, N.P., and Jones, J.D.G.** (2008). DELLAs Control Plant Immune Responses by Modulating the Balance of Jasmonic Acid and Salicylic Acid Signaling. *Current Biology* **18**: 650–655.
- Née, G., Kramer, K., Nakabayashi, K., Yuan, B., Xiang, Y., Miatton, E., Finkemeier, I., and Soppe, W.J.J.** (2017). DELAY OF GERMINATION1 requires PP2C phosphatases of the ABA signalling pathway to control seed dormancy. *Nat Commun* **8**: 72.
- Nett, R.S., Montanares, M., Marcassa, A., Lu, X., Nagel, R., Charles, T.C., Hedden, P., Rojas, M.C., and Peters, R.J.** (2017). Elucidation of gibberellin biosynthesis in bacteria reveals convergent evolution. *Nat Chem Biol* **13**: 69–74.
- Nobusawa, T., Okushima, Y., Nagata, N., Kojima, M., Sakakibara, H., and Umeda, M.** (2013). Synthesis of Very-Long-Chain Fatty Acids in the Epidermis Controls Plant Organ Growth by Restricting Cell Proliferation. *PLoS Biol* **11**: e1001531.
- Ofori, P.A., Mizuno, A., Suzuki, M., Martinoia, E., Reuscher, S., Aoki, K., Shibata, D., Otagaki, S., Matsumoto, S., and Shiratake, K.** (2018). Genome-wide analysis of ATP binding cassette (ABC) transporters in tomato. *PLoS ONE* **13**: e0200854.

- 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. *The Plant Cell* **19**: 1192–1208.
- Olsen, O.-A.** (2001). Endosperm Development : Cellularization and Cell Fate Specification. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **52**: 233–267.
- Olszewski, N., Sun, T., and Gubler, F.** (2002). Gibberellin Signaling: Biosynthesis, Catabolism, and Response Pathways. *Plant Cell* **14**: S61–S80.
- Ossowski, S., Schwab, R., and Weigel, D.** (2008). Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs: Engineering small RNA-mediated gene silencing. *The Plant Journal* **53**: 674–690.
- Park, J., Lee, Y., Martinoia, E., and Geisler, M.** (2017a). Plant hormone transporters: what we know and what we would like to know. *BMC Biology* **15**.
- Park, J., Oh, D.-H., Dassanayake, M., Nguyen, K.T., Ogas, J., Choi, G., and Sun, T.** (2017b). Gibberellin Signaling Requires Chromatin Remodeler PICKLE to Promote Vegetative Growth and Phase Transitions. *Plant Physiol.* **173**: 1463–1474.
- Parniske, M.** (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol* **6**: 763–775.
- Peer, W.A., Hosein, F.N., Bandyopadhyay, A., Makam, S.N., Otegui, M.S., Lee, G.-J., Blakeslee, J.J., Cheng, Y., Titapiwatanakun, B., Yakubov, B., Bangari, B., and Murphy, A.S.** (2009). Mutation of the Membrane-Associated M1 Protease APM1 Results in Distinct Embryonic and Seedling Developmental Defects in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**: 1693–1721.
- Penfield, S.** (2017). Seed dormancy and germination. *Current Biology* **27**: R874–R878.
- Penfield, S., Li, Y., Gilday, A.D., Graham, S., and Graham, I.A.** (2006). *Arabidopsis* ABA INSENSITIVE4 Regulates Lipid Mobilization in the Embryo and Reveals Repression of Seed Germination by the Endosperm. *The Plant Cell* **18**: 1887–1899.
- Penfield, S., Rylott, E.L., Gilday, A.D., Graham, S., Larson, T.R., and Graham, I.A.** (2004). Reserve Mobilization in the *Arabidopsis* Endosperm Fuels Hypocotyl Elongation in the Dark, Is Independent of Abscisic Acid, and Requires *PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE1*. *Plant Cell* **16**: 2705–2718.
- Peng, J., Carol, P., Richards, D.E., King, K.E., Cowling, R.J., Murphy, G.P., and Harberd, N.P.** (1997). The *Arabidopsis* *GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev.* **11**: 3194–3205.
- Peng, J. and Harberd, N.P.** (2002). The role of GA-mediated signalling in the control of seed germination. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 376–381.
- Petricka, J.J., Winter, C.M., and Benfey, P.N.** (2012). Control of *Arabidopsis* root development. *Annu Rev Plant Biol* **63**: 563–590.

- Phillips, I.D.J. and Hartung, W.** (1974). Basipetal and acropetal transport of [3,4-3H]Gibberellin A1 in short and long segments of *Phaseolus coccineus* second internode. *Planta* **116**: 109–121.
- Phinney, B.O., West, C.A., Ritzel, M., and Neely, P.M.** (1957). Evidence for “GIBBERELLIN-LIKE” substances from flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **43**: 398–404.
- Pighin, J.A., Zheng, H., Balakshin, L.J., Goodman, I.P., Western, T.L., Jetter, R., Kunst, L., and Samuels, A.L.** (2004). Plant Cuticular Lipid Export Requires an ABC Transporter. *Science* **306**: 702–704.
- Pimenta Lange, M.J. and Lange, T.** (2016). Ovary-derived precursor gibberellin A9 is essential for female flower development in cucumber. *Development* **143**.
- Pimenta Lange, M.J. and Lange, T.** (2015). Touch-induced changes in *Arabidopsis* morphology dependent on gibberellin breakdown. *Nature Plants* **1**: 14025.
- Piskurewicz, U., Jikumaru, Y., Kinoshita, N., Nambara, E., Kamiya, Y., and Lopez-Molina, L.** (2008). The Gibberellic Acid Signaling Repressor RGL2 Inhibits *Arabidopsis* Seed Germination by Stimulating Abscisic Acid Synthesis and ABI5 Activity. *The Plant Cell* **20**: 2729–2745.
- 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., Thomas, S.G., Wilson, Z.A., and Hedden, P.** (2011). Gibberellin control of stamen development: a fertile field. *Trends in Plant Science* **16**: 568–578.
- Preston, J., Tatematsu, K., Kanno, Y., Hobo, T., Kimura, M., Jikumaru, Y., Yano, R., Kamiya, Y., and Nambara, E.** (2009). Temporal Expression Patterns of Hormone Metabolism Genes during Imbibition of *Arabidopsis thaliana* Seeds: A Comparative Study on Dormant and Non-Dormant Accessions. *Plant and Cell Physiology* **50**: 1786–1800.
- Pysh, L.D., Wysocka-Diller, J.W., Camilleri, C., Bouchez, D., and Benfey, P.N.** (1999). The GRAS gene family in *Arabidopsis*: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *The Plant Journal* **18**.
- Ragni, L., Nieminen, K., Pacheco-Villalobos, D., Sibout, R., Schwechheimer, C., and Hardtke, C.S.** (2011). Mobile Gibberellin Directly Stimulates *Arabidopsis* Hypocotyl Xylem Expansion. *The Plant Cell* **23**: 1322–1336.
- Raven, J.A. and Edwards, D.** (2001). Roots: evolutionary origins and biogeochemical significance. *Journal of Experimental Botany* **52**: 381–401.
- Regnault, T., Davière, J.-M., Heintz, D., Lange, T., and Achard, P.** (2014). The gibberellin biosynthetic genes *AtKAO1* and *AtKAO2* have overlapping roles throughout *Arabidopsis* development. *Plant J* **80**: 462–474.

- 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*. *Nature Plants* **1**.
- Reid, J.B., Murfet, I.C., and Potts, W.C.** (1983). Internode Length in *Pisum* . II. Additional Information on the Relationship and Action of Loci *Le*, *La*, *Cry*, *Na* and *Lm*. *J Exp Bot* **34**: 349–364.
- Reymond, P. and Farmer, E.E.** (1998). Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology* **1**: 404–411.
- Rieu, I., Eriksson, S., Powers, S.J., Gong, F., Griffiths, J., Woolley, L., Benlloch, R., Nilsson, O., Thomas, S.G., Hedden, P., and Phillips, A.L.** (2008). Genetic Analysis Reveals That C19-GA 2-Oxidation Is a Major Gibberellin Inactivation Pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **20**: 2420–2436.
- Rizza, A. and Jones, A.M.** (2019). The makings of a gradient: spatiotemporal distribution of gibberellins in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **47**: 9–15.
- Rizza, A., Tang, B., Stanley, C.E., Grossmann, G., Owen, M.R., Band, L.R., and Jones, A.M.** (2021). Differential biosynthesis and cellular permeability explain longitudinal gibberellin gradients in growing roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **118**: e1921960118.
- Rizza, A., Walia, A., Lanquar, V., Frommer, W.B., and Jones, A.M.** (2017). In vivo gibberellin gradients visualized in rapidly elongating tissues. *Nature Plants* **3**: 803–813.
- Rombolá-Caldentey, B., Rueda-Romero, P., Iglesias-Fernández, R., Carbonero, P., and Oñate-Sánchez, L.** (2014). *Arabidopsis* DELLA and Two HD-ZIP Transcription Factors Regulate GA Signaling in the Epidermis through the L1 Box *cis* -Element. *The Plant Cell* **26**: 2905–2919.
- Saito, H. et al.** (2015). The jasmonate-responsive GTR1 transporter is required for gibberellin-mediated stamen development in *Arabidopsis*. *Nature Communications* **6**.
- Salvi, E., Di Mambro, R., and Sabatini, S.** (2020). Dissecting mechanisms in root growth from the transition zone perspective. *Journal of Experimental Botany* **71**: 2390–2396.
- Sambrook, J. and Russell, D.W.** (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* 3rd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N.Y).
- Sánchez, R.A. and De Miguel, L.** (1997). Phytochrome promotion of mannan-degrading enzyme activities in the micropylar endosperm of *Datura ferox* seeds requires the presence of the embryo and gibberellin synthesis. *Seed Sci. Res.* **7**: 27–34.
- Sánchez-Montesino, R., Bouza-Morcillo, L., Marquez, J., Ghita, M., Duran-Nebreda, S., Gómez, L., Holdsworth, M.J., Bassel, G., and Oñate-Sánchez, L.** (2019). A Regulatory Module Controlling GA-Mediated Endosperm Cell Expansion Is Critical for Seed Germination in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* **12**: 71–85.
- Sano, N. and Marion-Poll, A.** (2021). ABA Metabolism and Homeostasis in Seed Dormancy and Germination. *IJMS* **22**: 5069.

- Sasaki, A., Itoh, H., Gomi, K., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Jeong, D.-H., An, G., Kitano, H., Ashikari, M., and Matsuoka, M.** (2003). Accumulation of Phosphorylated Repressor for Gibberellin Signaling in an F-box Mutant. *Science* **299**: 1896–1898.
- Schaller, G.E. and Kieber, J.J.** (2002). Ethylene. *The Arabidopsis Book* **1**: e0071.
- Scheler, C. et al.** (2014). Promotion of Testa Rupture during Garden Cress Germination Involves Seed Compartment-Specific Expression and Activity of Pectin Methylsterases. *Plant Physiology* **167**: 200–215.
- Scheres, B.** (2007). Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 345–354.
- Scheres, B., Wolkenfelt, H., Willemsen, V., Terlouw, M., Lawson, E., Dean, C., and Weisbeek, P.** (1994). Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development* **120**: 2475–2487.
- Schmid, M., Davison, T.S., Henz, S.R., Pape, U.J., Demar, M., Vingron, M., Schölkopf, B., Weigel, D., and Lohmann, J.U.** (2005). A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet* **37**: 501–506.
- Schneider, G. and Schliemann, W.** (1994). Gibberellin conjugates: an overview. *Plant Growth Regul* **15**: 247–260.
- Schomburg, F.M., Bizzell, C.M., Lee, D.J., Zeevaart, J.A.D., and Amasino, R.M.** (2003). Overexpression of a Novel Class of Gibberellin 2-Oxidases Decreases Gibberellin Levels and Creates Dwarf Plants. *Plant Cell* **15**: 151–163.
- Schopfer, P.** (2006). Biomechanics of Plant Growth. *American Journal of Botany* **93**: 1415–1425.
- Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., and Weigel, D.** (2006). Highly Specific Gene Silencing by Artificial MicroRNAs in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **18**: 1121–1133.
- Sechet, J., Frey, A., Effroy-Cuzzi, D., Berger, A., Perreau, F., Cueff, G., Charif, D., Rajjou, L., Mouille, G., North, H.M., and Marion-Poll, A.** (2016). Xyloglucan Metabolism Differentially Impacts the Cell Wall Characteristics of the Endosperm and Embryo during *Arabidopsis* Seed Germination. *Plant Physiol.* **170**: 1367–1380.
- Segonzac, C., Boyer, J.-C., Ipotesi, E., Szponarski, W., Tillard, P., Touraine, B., Sommerer, N., Rossignol, M., and Gibrat, R.** (2007). Nitrate Efflux at the Root Plasma Membrane: Identification of an *Arabidopsis* Excretion Transporter. *The Plant Cell* **19**: 3760–3777.
- Seo, M. and Koshiba, T.** (2011). Transport of ABA from the site of biosynthesis to the site of action. *J Plant Res* **124**: 501–507.
- Seo, M., Nambara, E., Choi, G., and Yamaguchi, S.** (2009). Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. *Plant Mol Biol* **69**: 463–472.

- Shani, E., Weinstain, R., Zhang, Y., Castillejo, C., Kaiserli, E., Chory, J., Tsien, R.Y., and Estelle, M.** (2013). Gibberellins accumulate in the elongating endodermal cells of *Arabidopsis* root. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**: 4834–4839.
- Shi, B. et al.** (2021). A quantitative gibberellin signalling biosensor reveals a role for gibberellins in internode specification at the shoot apical meristem (*Plant Biology*).
- Shimada, A., Ueguchi-Tanaka, M., Nakatsu, T., Nakajima, M., Naoe, Y., Ohmiya, H., Kato, H., and Matsuoka, M.** (2008). Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1. *Nature* **456**: 520–523.
- Shimizu, T., Kanno, Y., Watanabe, S., and Seo, M.** (2022). *Arabidopsis* NPF5.1 regulates ABA homeostasis and seed germination by mediating ABA uptake into the seed coat. *Plant Signaling & Behavior* **17**: 2095488.
- Silverstone, A.L., Chang, C., Krol, E., and Sun, T.** (1997a). Developmental regulation of the gibberellin biosynthetic gene GA1 in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **12**.
- Silverstone, A.L., Jung, H.-S., Dill, A., Kawaide, H., Kamiya, Y., and Sun, T.** (2001). Repressing a Repressor: Gibberellin-Induced Rapid Reduction of the RGA Protein in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 1555–1566.
- Silverstone, A.L., Mak, P.Y.A., Martinez, E.C., and Sun, T.** (1997b). The New *RGA* Locus Encodes a Negative Regulator of Gibberellin Response in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **146**: 1087–1099.
- Sliwinska, E., Bassel, G.W., and Bewley, J.D.** (2009). Germination of *Arabidopsis thaliana* seeds is not completed as a result of elongation of the radicle but of the adjacent transition zone and lower hypocotyl. *Journal of Experimental Botany* **60**: 3587–3594.
- Sponsel, V.M.** (2016). Signal achievements in gibberellin research: the second half-century. In *Annual Plant Reviews*, Volume 49, P. Hedden and S.G. Thomas, eds (John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK), pp. 1–36.
- Sreenivasulu, N., Harshavardhan, V.T., Govind, G., Seiler, C., and Kohli, A.** (2012). Contrapuntal role of ABA: Does it mediate stress tolerance or plant growth retardation under long-term drought stress? *Gene* **506**: 265–273.
- Stacey, G., Koh, S., Granger, C., and Becker, J.M.** (2002). Peptide transport in plants. *Trends in Plant Science* **7**: 257–263.
- Stamm, P., Topham, A.T., Mukhtar, N.K., Jackson, M.D.B., Tomé, D.F.A., Beynon, J.L., and Bassel, G.W.** (2017). The Transcription Factor ATHB5 Affects GA-Mediated Plasticity in Hypocotyl Cell Growth during Seed Germination. *Plant Physiol.* **173**: 907–917.
- Steinbrecher, T. and Leubner-Metzger, G.** (2016). The biomechanics of seed germination. *EXBOTJ*: erw428.

- Stirk, W.A., Bálint, P., Tarkowská, D., Novák, O., Strnad, M., Ördög, V., and van Staden, J.** (2013). Hormone profiles in microalgae: Gibberellins and brassinosteroids. *Plant Physiology and Biochemistry* **70**: 348–353.
- Symons, G.M. and Reid, J.B.** (2004). Brassinosteroids Do Not Undergo Long-Distance Transport in Pea. Implications for the Regulation of Endogenous Brassinosteroid Levels. *Plant Physiology* **135**: 2196–2206.
- Taiz, L. and Zeiger, E.** (2006). *Plant physiology* 4th ed. (Sinauer Associates: Sunderland, Mass).
- Tal, I. et al.** (2016). The Arabidopsis NPF3 protein is a GA transporter. *Nat Commun* **7**: 11486.
- Talon, M., Koornneef, M., and Zeevaart, J.A.D.** (1990). Accumulation of C19-gibberellins in the gibberellin-insensitive dwarf mutantgai of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *Planta* **182**: 501–505.
- Tanimoto, E.** (1987). Gibberellin-Dependent Root Elongation in Lactuca sativa: Recovery from Growth Retardant-Suppressed Elongation with Thickening by Low concentration of GA₃. *Plant and Cell Physiology*.
- Taochy, C., Gaillard, I., Ipotesi, E., Oomen, R., Leonhardt, N., Zimmermann, S., Peltier, J.-B., Szponarski, W., Simonneau, T., Sentenac, H., Gibrat, R., and Boyer, J.-C.** (2015). The Arabidopsis root stele transporter NPF2.3 contributes to nitrate translocation to shoots under salt stress. *Plant J* **83**: 466–479.
- Theodoulou, F.L.** (2000). Plant ABC transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1465**: 79–103.
- Thomas, S.G., Phillips, A.L., and Hedden, P.** (1999). Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2- oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 4698–4703.
- Torres-Martínez, H.H., Napsucialy-Mendivil, S., and Dubrovsky, J.G.** (2022). Cellular and molecular bases of lateral root initiation and morphogenesis. *Current Opinion in Plant Biology* **65**: 102115.
- Tranbarger, T.J., Al-Ghazi, Y., Muller, B., Teysseidier De La Serve, B., Dumas, P., and Touraine, B.** (2003). Transcription factor genes with expression correlated to nitrate-related root plasticity of *Arabidopsis thaliana*: Root plasticity response of *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment* **26**: 459–469.
- Tsay, Y.** (1993). The herbicide sensitivity gene CHL1 of arabidopsis encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* **72**.
- Tudzynski, B.** (2005). Gibberellin biosynthesis in fungi: genes, enzymes, evolution, and impact on biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* **66**: 597–611.
- Turnbull, C.** (2011). Long-distance regulation of flowering time. *Journal of Experimental Botany* **62**: 4399–4413.

- Tyler, L., Thomas, S.G., Hu, J., Dill, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Sun, T.** (2004). DELLA Proteins and Gibberellin-Regulated Seed Germination and Floral Development in Arabidopsis. *Plant Physiology* **135**: 1008–1019.
- Ubeda-Tomás, S., Beemster, G.T.S., and Bennett, M.J.** (2012). Hormonal regulation of root growth: integrating local activities into global behaviour. *Trends in Plant Science* **17**: 326–331.
- 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. *Current Biology* **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.
- Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T., Hsing, Y.C., Kitano, H., Yamaguchi, I., and 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., and Matsuoka, M.** (2007). Molecular Interactions of a Soluble Gibberellin Receptor, GID1, with a Rice DELLA Protein, SLR1, and Gibberellin. *The Plant Cell* **19**: 2140–2155.
- Van Den Berg, C., Weisbeek, P., and Scheres, B.** (1998). Cell fate and cell differentiation status in the Arabidopsis root. *Planta* **205**: 483–491.
- Vandenbussche, F., Fierro, A.C., Wiedemann, G., Reski, R., and Van Der Straeten, D.** (2007). Evolutionary conservation of plant gibberellin signalling pathway components. *BMC Plant Biol* **7**: 65.
- Varbanova, M. et al.** (2007). Methylation of Gibberellins by *Arabidopsis* GAMT1 and GAMT2. *The Plant Cell* **19**: 32–45.
- Verma, S., Attuluri, V.P.S., and Robert, H.S.** (2022). Transcriptional control of Arabidopsis seed development. *Planta* **255**: 90.
- Verrier, P.J. et al.** (2008). Plant ABC proteins – a unified nomenclature and updated inventory. *Trends in Plant Science* **13**: 151–159.
- Vert, G. and Chory, J.** (2011). Crosstalk in Cellular Signaling: Background Noise or the Real Thing? *Developmental Cell* **21**: 985–991.
- Vissenberg, K., Claeijs, N., Balcerowicz, D., and Schoenaers, S.** (2020). Hormonal regulation of root hair growth and responses to the environment in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **71**: 2412–2427.
- Wang, S., Wang, S., Sun, Q., Yang, L., Zhu, Y., Yuan, Y., and Hua, J.** (2017). A Role of Cytokinin Transporter in *Arabidopsis* Immunity. *MPMI* **30**: 325–333.

- Wang, Y. and Jiao, Y.** (2018). Axillary meristem initiation — a way to branch out. *Current Opinion in Plant Biology* **41**: 61–66.
- Wasternack, C. and Hause, B.** (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany* **111**: 1021–1058.
- Werner, T. and Schmülling, T.** (2009). Cytokinin action in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 527–538.
- Wild, M., Davière, J.-M., Cheminant, S., Regnault, T., Baumberger, N., Heintz, D., Baltz, R., Genschik, P., and Achard, P.** (2012). The *Arabidopsis* DELLA RGA - LIKE3 Is a Direct Target of MYC2 and Modulates Jasmonate Signaling Responses. *Plant Cell* **24**: 3307–3319.
- 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. *Developmental Cell* **37**: 190–200.
- Wilson, R.N., Heckman, J.W., and Somerville, C.R.** (1992). Gibberellin Is Required for Flowering in *Arabidopsis thaliana* under Short Days. *Plant Physiol.* **100**: 403–408.
- Woodger, F., Jacobsen, J.V., and Gubler, F.** (2010). Gibberellin Action in Germinated Cereal Grains. In *Plant Hormones*, P.J. Davies, ed (Springer Netherlands: Dordrecht), pp. 221–240.
- Wulff, N., Ernst, H.A., Jørgensen, M.E., Lambert, S., Maierhofer, T., Belew, Z.M., Crocoll, C., Motawia, M.S., Geiger, D., Jørgensen, F.S., Mirza, O., and Nour-Eldin, H.H.** (2019). An Optimized Screen Reduces the Number of GA Transporters and Provides Insights Into Nitrate Transporter 1/Peptide Transporter Family Substrate Determinants. *Front. Plant Sci.* **10**: 1106.
- Xing, S., Qin, G., Shi, Y., Ma, Z., Chen, Z., Gu, H., and Qu, L.-J.** (2007). GAMT2 Encodes a Methyltransferase of Gibberellic Acid That is Involved in Seed Maturation and Germination in Arabidopsis. *J Integrative Plant Biology* **49**: 368–381.
- Yamaguchi, S.** (2008). Gibberellin Metabolism and its Regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 225–251.
- Yamaguchi, S. and Kamiya, Y.** (2001). Gibberellins and Light-Stimulated Seed Germination. *J Plant Growth Regul* **20**: 369–376.
- Yamaguchi, S., Smith, M.W., Brown, R.G.S., Kamiya, Y., and Sun, T.** (1998). Phytochrome Regulation and Differential Expression of Gibberellin 3 β -Hydroxylase Genes in Germinating Arabidopsis Seeds. *Plant Cell* **10**: 2115–2126.
- Yamauchi, Y., Ogawa, M., Kuwahara, A., Hanada, A., Kamiya, Y., and Yamaguchi, S.** (2004). Activation of Gibberellin Biosynthesis and Response Pathways by Low Temperature during Imbibition of *Arabidopsis thaliana* Seeds[W]. *The Plant Cell* **16**: 367–378.
- Yan, D., Duermeyer, L., Leoveanu, C., and Nambara, E.** (2014). The Functions of the Endosperm During Seed Germination. *Plant and Cell Physiology* **55**: 1521–1533.

- Yano, R., Kanno, Y., Jikumaru, Y., Nakabayashi, K., Kamiya, Y., and Nambara, E.** (2009). CHOTTO1, a Putative Double APETALA2 Repeat Transcription Factor, Is Involved in Abscisic Acid-Mediated Repression of Gibberellin Biosynthesis during Seed Germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **151**: 641–654.
- Yoshida, H. et al.** (2014). DELLA protein functions as a transcriptional activator through the DNA binding of the INDETERMINATE DOMAIN family proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**: 7861–7866.
- Zentella, R., Zhang, Z.-L., Park, M., Thomas, S.G., Endo, A., Murase, K., Fleet, C.M., Jikumaru, Y., Nambara, E., Kamiya, Y., and Sun, T.** (2007). Global Analysis of DELLA Direct Targets in Early Gibberellin Signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**: 3037–3057.
- Zhang, D., Jing, Y., Jiang, Z., and 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., Jennings, A., Barlow, P.W., and Forde, B.G.** (1999). Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 6529–6534.
- Zhang, Q., Wang, J., Wang, L., Wang, J., Wang, Q., Yu, P., Bai, M., and Fan, M.** (2020). Gibberellin repression of axillary bud formation in *Arabidopsis* by modulation of DELLA-SPL9 complex activity. *J. Integr. Plant Biol.* **62**: 421–432.
- Zhang, Y. et al.** (2018). A transportome-scale amiRNA-based screen identifies redundant roles of *Arabidopsis* ABCB6 and ABCB20 in auxin transport. *Nat Commun* **9**: 4204.
- Zhang, Y. et al.** (2021). ABA homeostasis and long-distance translocation are redundantly regulated by ABCG ABA importers. *Sci. Adv.* **7**: eabf6069.
- Zhang, Y., Chen, B., Xu, Z., Shi, Z., Chen, S., Huang, X., Chen, J., and Wang, X.** (2014b). Involvement of reactive oxygen species in endosperm cap weakening and embryo elongation growth during lettuce seed germination. *Journal of Experimental Botany* **65**: 3189–3200.
- Zhong, S., Zhao, M., Shi, T., Shi, H., An, F., Zhao, Q., and Guo, H.** (2009). EIN3/EIL1 cooperate with PIF1 to prevent photo-oxidation and to promote greening of *Arabidopsis* seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**: 21431–21436.
- Zhu, Y. et al.** (2006). *ELONGATED UPPERMOST INTERNODE* Encodes a Cytochrome P450 Monooxygenase That Epoxidizes Gibberellins in a Novel Deactivation Reaction in Rice. *The Plant Cell* **18**: 442–456.

Annexes

Annexe 1 : Amorces utilisées pour le clonage des fusions transcriptionnelles

Les séquences en minuscule correspondent aux séquences des sites attB1 (amorce Forward) et attB2 (amorce Reverse).

Gène	Amorce 5' 3' F = sens et R = antisens
<i>attB2-pNPF2.4</i> -ATG-R	ggggaccactttgtacaagaaagctgggttGGCAGAGAACAAGTGGAAAGCAGGAGG
<i>attB1-pNPF2.4-F</i>	ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggcttcGGCCATTCCATGTCAGTGCTATGGC
<i>attB2-pNPF2.5</i> -ATG-R	ggggaccactttgtacaagaaagctgggttGGTAGAGAACAAGATGAACCAGGAG
<i>attB1-pNPF2.5-F</i>	ggggaccactttgtacaagaaagctgggttcTGAGTCTCTAAGGAACACAGCGAC
<i>attB2-pNPF2.7</i> -ATG-R	ggggaccactttgtacaagaaagctgggttGTCTCAAATCAAGCAGAAATCTTTCAC
<i>attB1-pNPF2.7-F</i>	ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggcttcGCTCTGAATCACCAGTACCTTGCT
<i>attB2-pNPF3.1</i> -ATG-R	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtaGATGTTTCTGATTGTTTCTTG
<i>attB1-pNPF3.1-F</i>	ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggctcaTTCAGTTTGTGATATTGTTG
<i>attB2-pNPF4.1</i> -ATG-R	ggggaccactttgtacaagaaagctgggttCTCTTCGTATTCTTAGATTAAACTATGA
<i>attB1-pNPF4.1-F</i>	ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggcttcAGTGACTGATCTTGTGTCACATTG

Annexe 2 : Amorces utilisées pour le clonage des régions codantes de gènes

Les séquences en minuscule correspondent aux séquences des sites attB1 (amorce Forward) et attB2 (amorce Reverse).

Gène	Amorce 5' 3' F = sens et R = antisens
<i>attB2-NPF2.3-ATG-R</i>	ggggaccactttgtacaagaaagctgggttCATTGTACCATCTTTGGATCTTGTCT
<i>attB1- NPF2.3-cStop-F</i>	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcCATGGCTAGTTTAGTCTCTGGTGAT
<i>attB2-NPF2.4-ATG-R</i>	ggggaccactttgtacaagaaagctgggttGTTTGTAACATCTTTAAGATCTTGTCA
<i>attB1- NPF2.4-cStop-F</i>	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcAGTACCTCCTGCTTCCACTTG
<i>attB2-NPF2.5-ATG-R</i>	ggggaccactttgtacaagaaagctgggttGGTTTTAACATCTTTAGGATCTTGTCA
<i>attB1- NPF2.5-cStop-F</i>	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcCATGGCTGATTCAAATCTGGTGACAC
<i>attB2-NPF2.7-ATG-R</i>	ggggaccactttgtacaagaaagctgggttGTGAGAGACATTTGCAGCTTGCTTATGAT
<i>attB1- NPF2.7-cStop-F</i>	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcATGGCTAGTTCAGTACTGGCGATG
<i>attB2-NPF4.1-ATG-R</i>	ggggaccactttgtacaagaaagctgggttGACTTCCACTACATGCATAGCATC
<i>attB1- NPF4.1-cStop-F</i>	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcATGCAGATTGAGATGGAAGAGAAG

Annexe 3 : Amorces utilisées pour les RT-qPCR

Gène	Amorce 5' 3' F = sens et R = antisens
<i>qNPF2.1-R</i>	ATGCTGCACGGTTCAAAA
<i>qNPF2.1-F</i>	CGGGAAGTTGAAAAAGAATCC
<i>qNPF2.2-R</i>	GATGTAATCATGGTCAATAGAATGATG
<i>qNPF2.2-F</i>	GAAACATTCCCGTCATCTCC
<i>qNPF2.3-R</i>	GTCACGGAAAGGCCTAACAA
<i>qNPF2.3-F</i>	GTCTCTGGTGATAAAGAAGCTCAA
<i>qNPF2.4-R</i>	TCCAAAGATGCAATAAGAGTCAAG
<i>qNPF2.4-F</i>	TTTTTGGGAACATTCCTGTCA
<i>qNPF2.5-R</i>	TTAAGGTCAAGAGAGAGGTTCCA
<i>qNPF2.5-F</i>	CTGTTGTTGCAGCCATCCTA
<i>qNPF2.6-R</i>	CTTGATAGCACAGAGCTACATTCC
<i>qNPF2.6-F</i>	CAGTCTTGTGGTTATCCCTCCT
<i>qNPF2.7-R</i>	TTGCGGTGCTTCTCATAGAC
<i>qNPF2.7-F</i>	GGCTCTCCCTCCTCTAGTCA
<i>qNPF2.12-R</i>	CCACTTATTTGCCGGA ACTCCT
<i>qNPF2.12-F</i>	GTTACCTCTTACTGACCAATTCAAGTTTCT
<i>qNPF2.13-R</i>	CATCGCTTTCGCCTCATT
<i>qNPF2.13-F</i>	AGGAAACGATGCTGTGAGTGT
<i>qNPF2.14-R</i>	TGTGCAGGTTCTCCACTCCTC
<i>qNPF2.14-F</i>	CTCGTACTCACTGATCAATTCAGATTCTT

<i>qNPF4.2-R</i>	TGAGCTTGGAACGTCAACAA
<i>qNPF4.2-F</i>	GGGAACATCGTTTTTACTCACTC
<i>qABI4-R</i>	GAGGGAGGAGAGGTCTTAGGG
<i>qABI4-F</i>	CCGCTTCTTCTCCTTCCAC
<i>qEXPA2-R</i>	GATCCCGTTTATCGTAAACCTT
<i>qEXPA2-F</i>	TCGTTCTGTGCGCATTGAG
<i>qMYB101-R</i>	TCTCATTGTCTGTTCTTCCAGGT
<i>qMYB101-F</i>	GATCATCATCGACCTTCCAG
<i>qPP2A-R</i>	CCACAGAATAATACCCTCGATCA
<i>qPP2A-F</i>	CACGGCCAATTTTACGATCT
<i>qRGL2-R</i>	CGCCGAGGTTGTGATGAGTG
<i>qRGL2-F</i>	TACGCTACCGGAGATGGATACAG
<i>qGA20ox1-R</i>	CATGGGTTTTCAGCCATTG
<i>qGA20ox1-F</i>	CTCTAAAGTAGTCCCCTTTTACGC
<i>qGA20ox2-R</i>	CGATCTCTCAAGCCAAGACTCG
<i>qGA20ox2-F</i>	TCGCTGACGCCATGATTG
<i>qGA20ox3-R</i>	ATGGCTCTAACGAATGGAAG
<i>qGA20ox3-F</i>	CTTTCTCTCTCGCTGTTTCCAC
<i>qGA3ox1-R</i>	ATATCGCAGTAGTTGAGGTGATGTT
<i>qGA3ox1-F</i>	TTCAATAAGCAAATGTGGTCCGAAGG
<i>qGA3ox2-R</i>	GCCACCACCTCAAATACTGTG
<i>qGA3ox2-F</i>	GGCCATTGTATGTCCTTTTC
<i>qSAND-R</i>	AACTTTATGCAGCATTTGATCCACT

<i>qSAND-F</i>	TGATTGCATATCTTTATCGCCATC
<i>qSWEET13-R</i>	AGCATAGGAGACAAAGAGGACGA
<i>qSWEET13-F</i>	GCACAGCCTTTCTTCTCATCACC
<i>qSWEET14-R</i>	AGAAGAGCCACGTAATGGCG
<i>qSWEET14-F</i>	GGTGATACGAACAAAGAGTGTGGAG
<i>qDUF106-R</i>	TGATCTGAACCTCTGAGTCAGTGG
<i>qDUF106-F</i>	CTTCTTCTCTGGATTTGTTGCAGC

Annexe 4 : Amorces utilisées pour le génotypage

Gène	N° NASC	Amorce 5' 3' F = sens et R = antisens
<i>NPF2.3</i>	N508188-R	GCTGGAAACTAGGGTTTGGTC
	N508188-F	AACATTGTCCACTCTTCCGTG
<i>NPF2.4</i>	N611071-R	ATCACTGGAACAGCTGGGAC
	N611071-F	AACCACTTGGTGGTCCTCTG
	N657477-R	CACTTCAAAGTCTCTGCTGGG
	N657477-F	G TTCACCCCTAGGGTTAAACG
<i>NPF2.5</i>	N489848-R	ATGGCTGCAACAACAGGTAAC
	N489848-F	ATGGTCCAAATTGTTTTGCTC
	N117712-R	TTTTCAGGTTCTTGAACCGTG
	N117712-F	TCATCGATTGTCATCACATGC
<i>NPF2.7</i>	N862588-R	TGACTAGAGGAGGGAAGAGCC
	N862588-F	CCTGCGAAACAGCTTCAATAC
<i>NPF3.1</i>	N663988-R	TGGTTCTAACATGTTAGGTCATCC
	N663988-F	TTCGAAGATATGATGAACCGG
<i>NPF4.1</i>	N855619-R	TTTGGTTCCATTGAACTCCTG
	N855619-F	CGCGAGAGTTTTCTGTTTGTC
<i>NPF4.2</i>	N686500-R	CGCTGATTGAAGAGTTGAAGG
	N686500-F	TTTTGAAAGTTTTGGCATATGAG
<i>KAO2</i>	N442767-R	GCATTATTGGCTAATAAATGCG
	N442767-F	GTCAAGTTTCTGCCTCATTGC

	N635819-R	TAATGCGGGTCATGAATCTTC
	N635819-F	CAATGGAAACCTGAGACGAAG

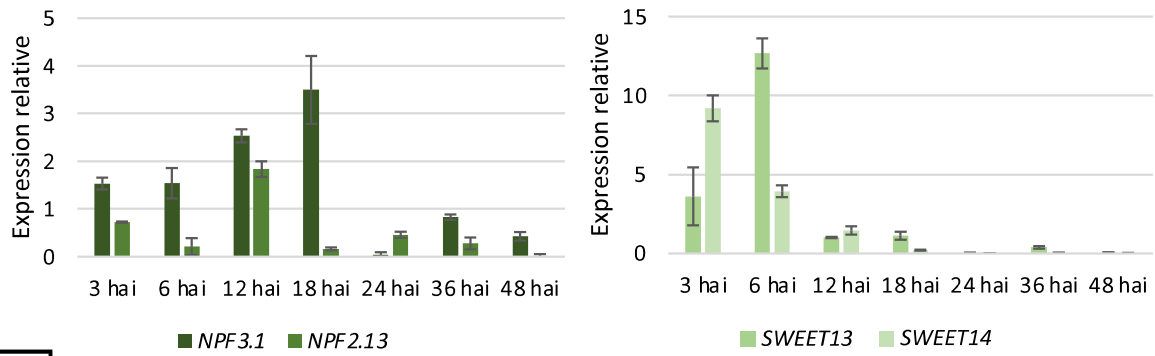
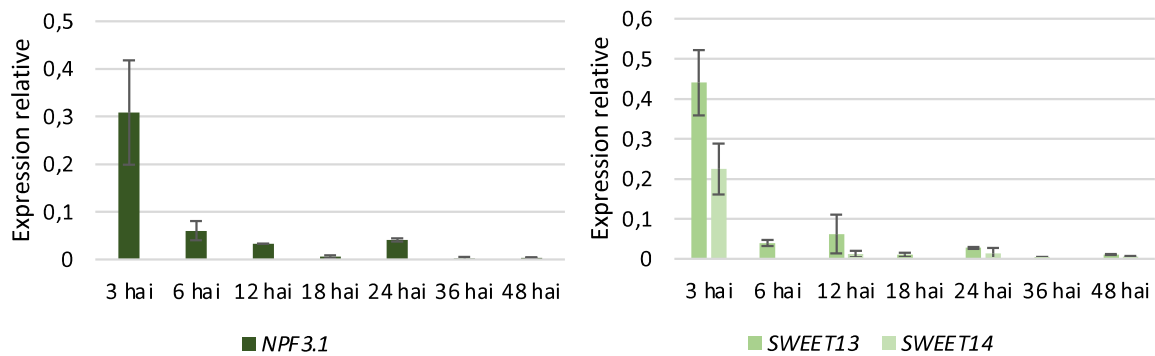
Annexe 5 : Amorces utilisées pour le séquençage

Gène	Amorce 5' 3' F = sens et R = antisens
<i>pNPF2.3-R</i>	TACTTGGAGGGAACCGGCCG
<i>pNPF2.3-F</i>	CAGTCCTATGCACACCGCCG
<i>pNPF2.4-R</i>	CTCTCGACCAATCATTGAGTCAC
<i>pNPF2.4-F</i>	CAACAACACTACATAACCACTCTC
<i>NPF2.4-OE-R</i>	GCTGTTCCAGTGATCACTAGAGC
<i>NPF2.4-OE-F</i>	GTCTCTGCTGGGTCTATGC
<i>pNPF2.5-R</i>	CGCACGATCGAATATTGTGTC
<i>pNPF2.5-F</i>	ACCTCGTTTAACCCTAGG
<i>NPF2.5-OE-R</i>	TGTAGAGACCCGGCAGAGAC
<i>NPF2.5-OE-F</i>	CTGAGCACAGCTGTTATCG
<i>pNPF2.7-R</i>	GTCAACTCTAAATTGTCAGAC
<i>pNPF2.7-F</i>	CACATACTCTTGAGTCTTCCC
<i>NPF2.7-OE-R</i>	TAGGCAAGTGGAGAGAAGTG
<i>NPF2.7-OE-F</i>	TACTATGCCAGTCTCCTTCG
<i>pNPF4.1-R</i>	CGAGGTCTCATATAGCACCTC
<i>pNPF4.1-F</i>	CGACGAGGAGGACATACTAATAG
<i>NPF4.1-OE-R</i>	AGAAGAGAGCATGCACAGTAGAGG
<i>NPF4.1-OE-F</i>	CGACTCCTCAATCAACGGTTC
<i>ABCG12-R</i>	TCCGTTTCTTCGGGCAAGGA
<i>ABCG12-F</i>	CCTTGCCCGAAGAAACGG

<i>ABCG15-R</i>	CCGACATCACGACACATG
<i>ABCG15-F</i>	CGGACTTTGATACAGTCACAGC
<i>ABCG17-R</i>	GACTTGCACCACCATGAAGGC
<i>ABCG17-F</i>	CTGAGATACCGCCCATTCCG
<i>ABCG18-R</i>	CGACACTGCCACTCTGAGC
<i>ABCG18-F</i>	CATCTTCAGCCACGCCG
<i>ABCG19-R</i>	CCAGCCCCGACGTTGG
<i>ABCG19-F</i>	CTAAACGACGCCGTCCGATG

Annexe 6 : Amorces utilisées pour obtenir les micro-ARN artificiels

Amorce	Amorce 5' 3'
miR-A	CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAA
miR-B	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACA
amiR-I	TATGTCATTTGGTACCCACGA
amiR-II	TCGTGGGTACCAAATGACATA
amiR -III	TCATGGGTACCAATTGACATT
amiR -IV	AATGTCAATTGGTACCCATGA

A**B**

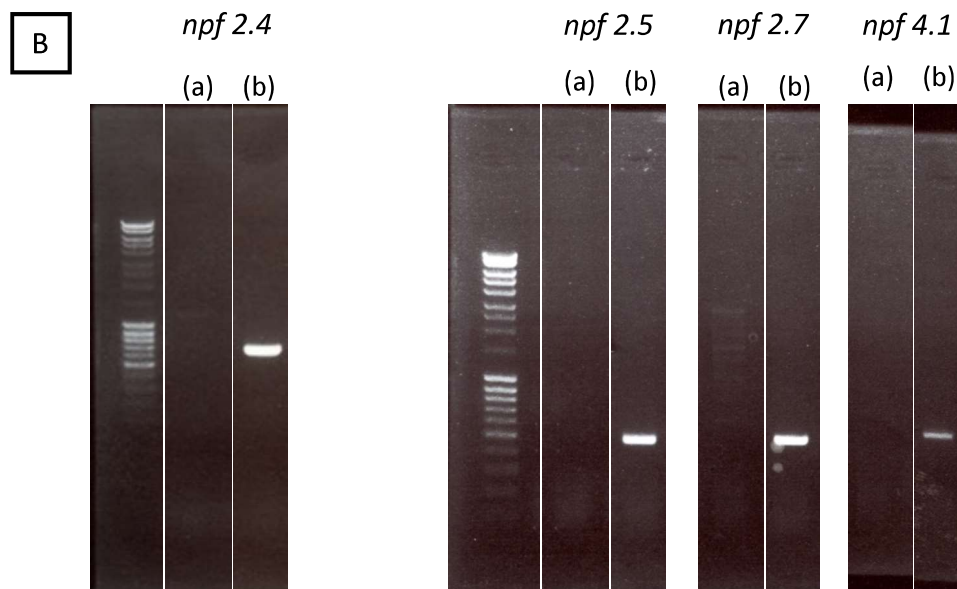
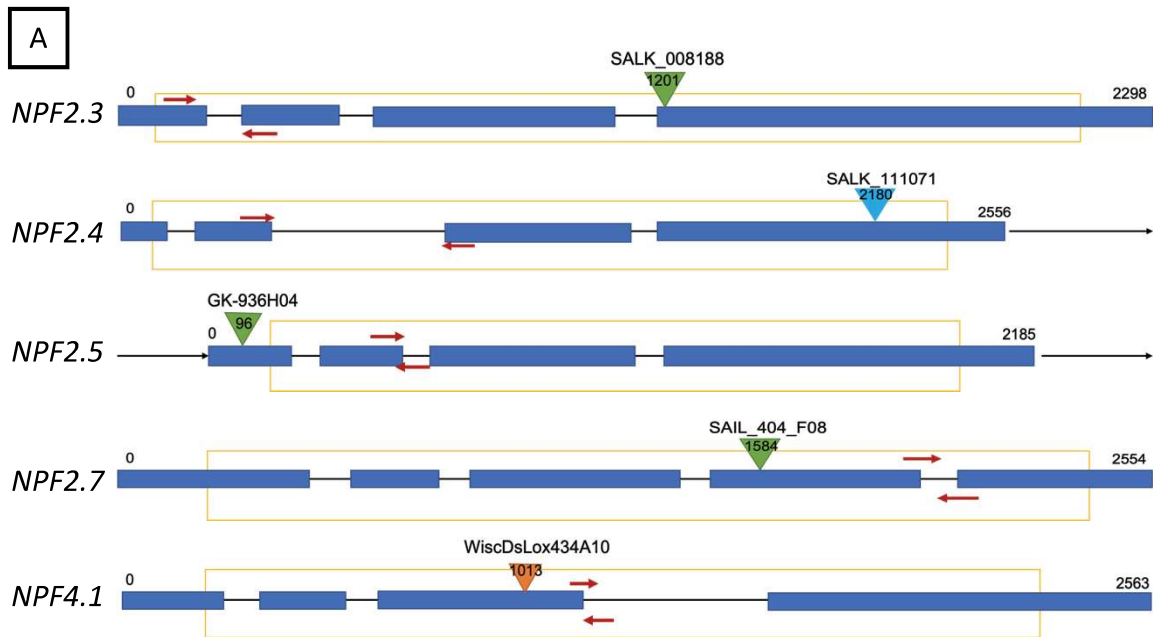
Annexe 7 : Cinétiques d'expression des gènes des transporteurs de GA, essais supplémentaires de la Figure 58

Analyse du niveau d'expression par RT-qPCR, des gènes *NPF3.1*, *NPF2.13*, *SWEET13* et *SWEET14* dans des graines entières, stratifiées ou non, après différents temps d'imbibition comme indiqué.

- A. Imbibition réalisée sur papier Whatman, sans stratification préalable
- B. Imbibition réalisée sur milieu gélosé, avec stratification préalable

L'expression relative des gènes est calculée en fonction de l'expression du gène *SAND*, au point 3h.

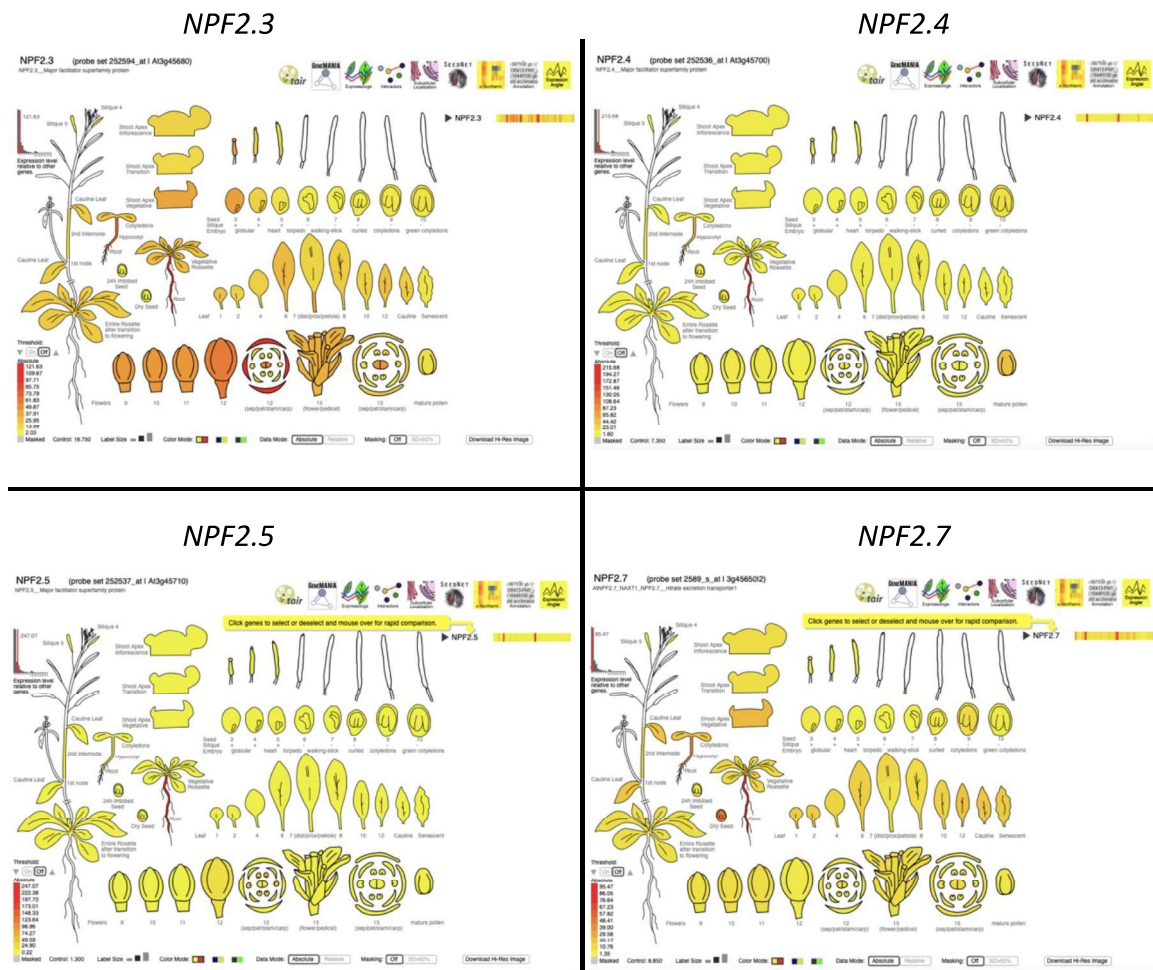
Les moyennes et écart types ont été calculés à partir de 3 réplicas techniques.



Annexe 8 : Génotypage des mutants *npf2.4*, *npf2.5*, *npf2.7* et *npf4.1*

Résumé des informations relatives au génotypage des différents mutants de la famille des NPF utilisés dans notre étude.

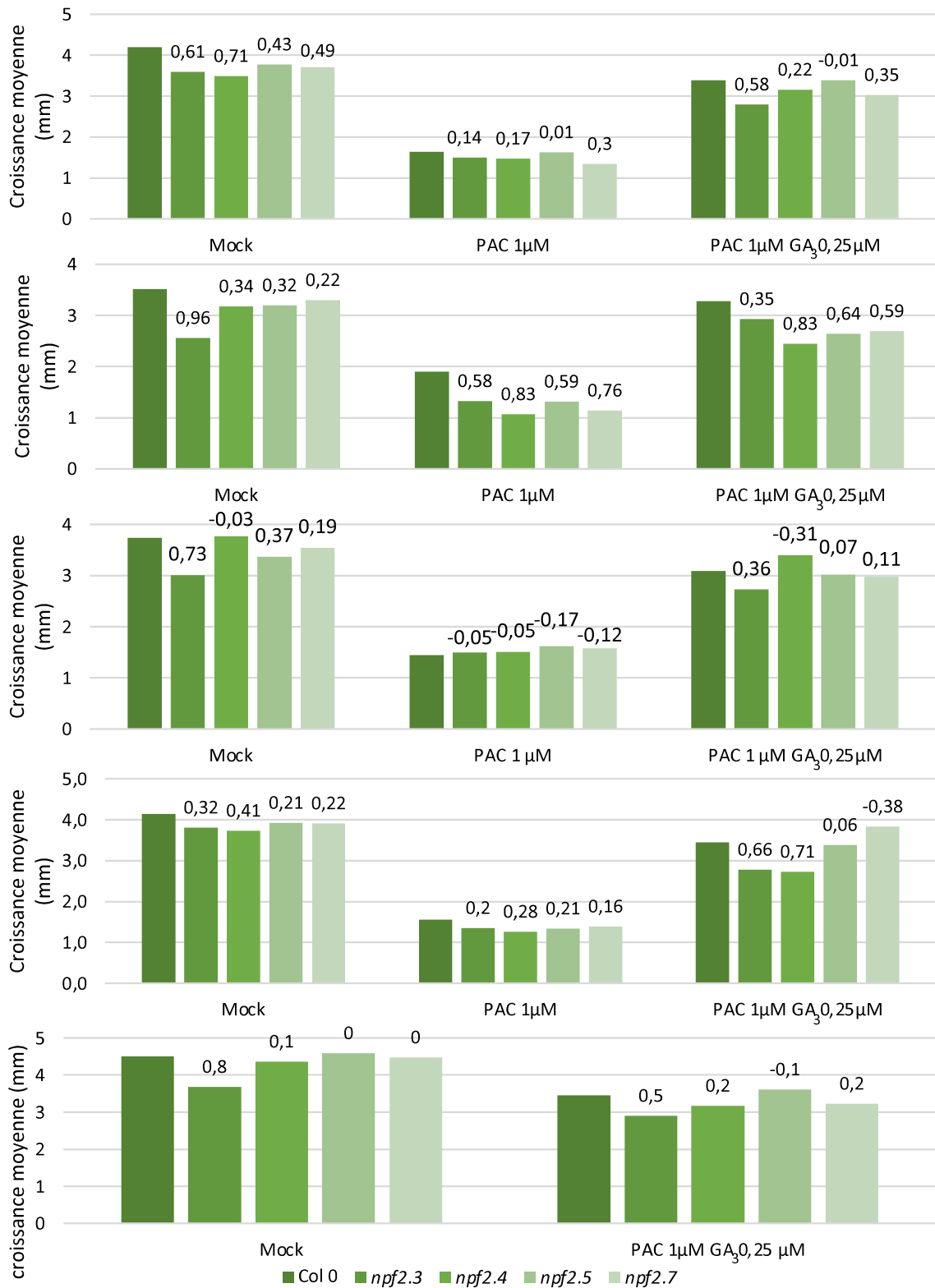
- Cartes géniques simplifiées sur lesquelles sont représentés le lieu d'insertion du T-DNA (par un triangle) des mutants d'insertions ainsi que les amorces utilisées pour les études par RT-qPCR (flèches rouges). Exon : rectangle bleu; Intron : trait noir ; cadre de lecture : rectangle jaune ; Insertion T-DNA.
- Résultats obtenus suite au génotypage des mutants d'insertion simple utilisés durant les travaux de thèse (PCR suivit d'une migration sur gel). (a) Amplification avec les amorces spécifiques au gène pour vérifier la présence de la mutation. (b) Combinaison entre une amorce spécifique du gène étudié et une amorce spécifique du T-DNA inséré (variable en fonction du T-DNA et du sens d'insertion). Les gels sont découpés pour ne faire apparaître que les pistes spécifiques au génotypage.



Annexe 9 : Patron d'expression global de NPF2.3, NPF2.4, NPF2.5 et NPF2.7

Patrons d'expression à différents stades de développement d'*Arabidopsis thaliana*, obtenus sur eFP Browser 2.0 (http://bar.utoronto.ca/efp2/Arabidopsis/Arabidopsis_eFPBrowser2.html)

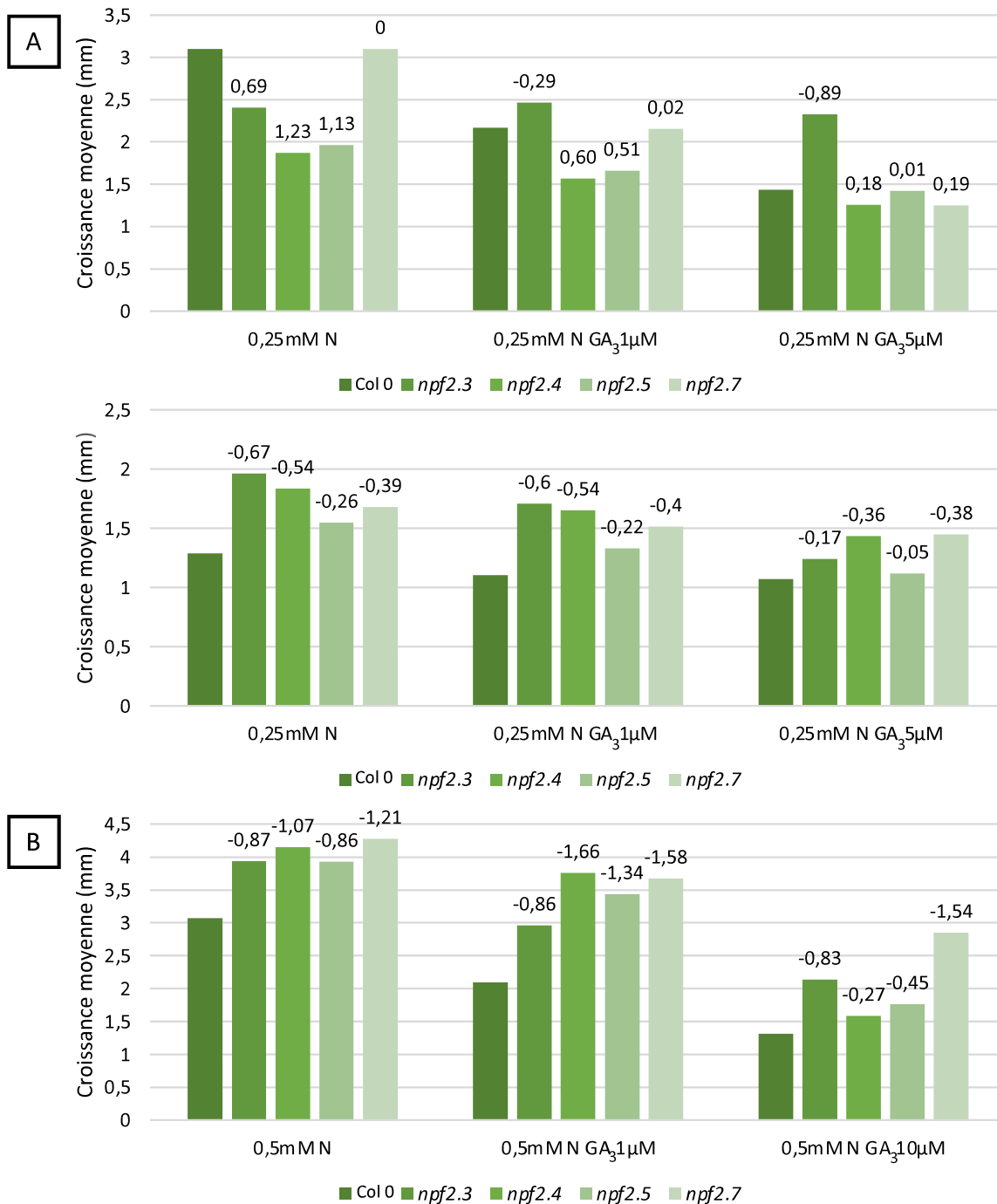
Informations complémentaires à la figure 73.



Annexe 10 : Effet d'un traitement PAC et GA sur la croissance racinaire des mutants *npf2.3*, *npf2.4*, *npf2.5* et *npf2.7*, essais supplémentaires de la figure 79

Mesure de la croissance racinaire moyenne (en mm sur 24h) de jeunes plantules sauvages ou de mutants simples *npf2.3*, *npf2.4*, *npf2.5* et *npf2.7*, durant les 5 premiers jours de culture après germination. Les plantules ont été cultivées *in vitro*, sur un milieu gélosé avec ajout ou non de PAC 1µM et/ou de GA 0,25 µM.

Les moyennes ont été calculées à partir de $n \geq 8$ racines. Les nombres indiqués au-dessus des colonnes correspondent à la différence de longueur en mm, entre la croissance racinaire moyenne du mutant et celle du sauvage, dans la même condition de culture.



Annexe 11 : Effet du nitrate et GA sur la croissance racinaire des mutants *npf2.3*, *npf2.4*, *npf2.5* et *npf2.7*, essais supplémentaires de la figure 79

Mesure de la croissance racinaire moyenne (en mm sur 24h) de jeunes plantules sauvages ou de mutants simples *npf2.3*, *npf2.4*, *npf2.5* et *npf2.7*, durant les 5 premiers jours de culture après germination. Les plantules ont été cultivées *in vitro* sur un milieu gélosé sans azote et supplémenté avec une faible concentration en azote comme indiqué.

- A. Les plantules ont été cultivées sur un milieu gélosé sans azote, supplémenté avec 0,25mM KNO₃, avec ajout ou non de GA à 1μM ou 5μM, comme indiqué.
- B. Les racines ont été cultivées sur un milieu gélosé, sans azote, supplémenté avec 0,5mM N, avec ajout ou non de GA à 1μM ou 5μM, comme indiqué.

Les moyennes ont été calculées à partir de n ≥ 8 racines. Les nombres indiqués au-dessus des colonnes correspondent à la différence de longueur en mm, entre la croissance racinaire moyenne du mutant et celle du sauvage, dans la même condition de culture.

Annexe 12 : Participation aux travaux de l'équipe

Participation aux analyses statistiques de deux articles publiés

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

Camut, L., Regnault, T., Sirlin-Josserand, M., Sakvarelidze-Achard, L., Carrera, E., Zumsteg, J., Heintz, D., Leonhardt, N., Lange, M.J.P., Lange, T., Davière, J.-M., and Achard, P. (2019). Root-derived GA₁₂ contributes to temperature-induced shoot growth in *Arabidopsis*. *Nat. Plants* 5: 1216–1221.

Abstract :

Plants are able to sense a rise in temperature of several degrees, and appropriately adapt their metabolic and growth processes. To this end, plants produce various signalling molecules that act throughout the plant body. Here, we report that root-derived GA₁₂, a precursor of the bioactive gibberellins, mediates thermo-responsive shoot growth in *Arabidopsis*. Our data suggest that root-to-shoot translocation of GA₁₂ enables a flexible growth response to ambient temperature changes.

Nitrate signaling promotes plant growth by upregulating gibberellin biosynthesis and destabilization of DELLA proteins

Camut, L., Gallova, B., Jilli, L., Sirlin-Josserand, M., Carrera, E., Sakvarelidze-Achard, L., Ruffel, S., Krouk, G., Thomas, S.G., Hedden, P., Phillips, A.L., Davière, J-M., Achard, P. (2021). Nitrate signaling promotes plant growth by upregulating gibberellin biosynthesis and destabilization of DELLA proteins. *Current Biology* **31**: 4971-4982.e4.

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. It is widely accepted that nitrate-triggered developmental programs cooperate with hormone synthesis and transport to finely adapt plant architecture to N availability. Here, we report that nitrate, acting through its signaling pathway, promotes growth in *Arabidopsis* and wheat, in part by modulating the accumulation of gibberellin (GA)-regulated DELLA growth repressors. We show that nitrate reduces the abundance of DELLAs by increasing GA contents through activation of GA metabolism gene expression. Consistently, the growth restraint conferred by nitrate deficiency is partially rescued in global-DELLA mutant that lacks all DELLAs. At the cellular level, we show that nitrate enhances both cell proliferation and elongation in a DELLA-dependent and -independent manner, respectively. Our findings establish a connection between nitrate and GA signaling pathways that allow plants to adapt their growth to nitrate availability.

Keywords: *Arabidopsis*; DELLA proteins; gibberellins; growth; hormone biosynthesis; nitrate; plant development; wheat.

Étude du mécanisme du transport des Gibbérellines chez les plantes

Résumé

Les gibbérellines (GA) sont des phytohormones jouant un rôle crucial dans de nombreux processus développementaux tels que la germination de la graine, l'élongation de la racine et des inflorescences, ou la reproduction. En conséquence, la distribution spatio-temporelle de GA est finement régulées à différents niveaux, incluant la biosynthèse et le transport. Si le métabolisme des GA est relativement bien décrit, les mécanismes moléculaires assurant le transport de GA des sites de production vers les sites d'action, commencent seulement à être élucidés. A l'aide d'approches génétiques et moléculaires, réalisées chez *Arabidopsis*, mon travail de thèse démontre que NPF4.1, faisant partie de la famille des NITRATE TRANSPORTER1/PEPTIDE TRANSPORTER FAMILY (NPF) est un acteur majeur de la germination des graines. NPF4.1, localisé dans la zone du micropyle de l'endosperme, oriente le flux de GA bioactives produites dans l'embryon vers l'endosperme, pour promouvoir sa rupture, indispensable pour la germination. Dans un deuxième temps, nous avons étudié la fonction biologique des transporteurs NPF2.3, NPF2.4, NPF2.5 et NPF2.7 pour le développement de la racine. Enfin dans le but d'identifier des transporteurs impliqués dans le mouvement longue distance de GA₁₂, un crible génétique a été initié en utilisant la stratégie CRISPR/CAS9, munie d'une collection d'ARN guide ciblant l'ensemble des transporteurs d'*Arabidopsis*.

Mots clés : Gibbérellines, *Arabidopsis*, transport, NPF, germination, croissance, racine

Abstract

Gibberellins (GA) are phytohormones playing a crucial role in many developmental processes such as seed germination, root and inflorescence elongation and reproduction. Consequently, the spatio-temporal distribution of GA is tightly regulated at various levels, including biosynthesis and transport. If the GA metabolism pathway is well described, the molecular mechanism controlling GA transport from the production sites to the action sites are only beginning to be elucidated. Using genetic and molecular approaches in *Arabidopsis*, my thesis work demonstrates that NPF4.1, a member of the NITRATE TRANSPORTER1/PEPTIDE TRANSPORTER FAMILY (NPF), is a major player for seed germination. NPF4.1, located in the micropyle zone of the endosperm, directs the flow of bioactive GAs produced in the embryo towards the endosperm, to promote its rupture, essential for the germination. Secondly, we studied the biological function of the transporters NPF2.3, NPF2.4, NPF2.5 and NPF2.7 transporters in root development. Finally, with the aim of identifying the transporters involved in the long-distance movement of GA₁₂, a genetic screen was conducted using the CRISPR/Cas9 strategy, with a collection of guide RNAs collection targeting all *Arabidopsis* transporters.

Keywords: Gibberellin, *Arabidopsis*, transport, NPF, germination, growth, root