

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFET DE LA TEMPÉRATURE SUR L'EXPRESSION DES GÈNES

MAX ET BRC1 CHEZ ARABIDOPSIS THALIANA

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

DANIELLE BILOUNGA BEKOLO

AOÛT 2014

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier le professeur François Ouellet de m'avoir acceptée comme étudiante en maîtrise et pour son soutien essentiel à la réalisation de ce mémoire.

Je remercie aussi la Faculté des sciences de l'UQAM pour son soutien financier.

Merci à mes parents et à l'équipe de laboratoire du côté végétal à l'UQAM.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vi
RÉSUMÉ	vii
CHAPITRE I	
REVUE DE LITTÉRATURE.....	1
1.1 Introduction	1
1.2 Processus de développement.....	2
1.2.1 Développement des plantes	2
1.2.2 Développement chez Arabidopsis	5
1.3 Facteurs environnementaux influençant le développement.....	7
1.3.1 Photopériode.....	7
1.3.2 Température.....	8
1.4 Déterminants moléculaires du développement.....	11
1.4.1 Auxine	11
1.4.2 Cytokinines.....	16
1.4.3 Strigolactones	17
1.4.4 Gènes de régulation : <i>LATERAL SUPPRESSOR</i> et <i>REVOLUTA</i>	23
1.4.5 La protéine BRANCHED1	24
1.5 Importance agronomique du développement des branches latérales.....	25
1.6 Objectifs de l'étude présente	27
CHAPITRE II	
ARTICLE SCIENTIFIQUE: « LA TEMPÉRATURE AFFECTE L'EXPRESSION DES GÈNES <i>MAX</i> ET <i>BRC1</i> CHEZ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> »	28
2.1 Résumé	30
2.2 Introduction	31
2.3 Matériels et méthodes	36
2.4 Résultats.....	39

2.5 Discussion.....	45
2.6 Remerciements	48
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	49
RÉFÉRENCES.....	52

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Phases de développement chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	3
1.2 Phases de croissance chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
1.3 Transport polarisé de l'auxine.....	12
1.4 Structure générale des strigolactones.....	18
1.5 Voie de synthèse et de signalisation des strigolactones	19
2.1 Expression relative de <i>MAX1</i> chez <i>Arabidopsis</i> lors de l'exposition à différentes températures	40
2.2 Expression relative de <i>MAX2</i> chez <i>Arabidopsis</i> lors de l'exposition à différentes températures	41
2.3 Expression relative de <i>MAX3</i> chez <i>Arabidopsis</i> lors de l'exposition à différentes températures	42
2.4 Expression relative de <i>MAX4</i> chez <i>Arabidopsis</i> lors de l'exposition à différentes températures	43
2.5 Expression relative de <i>BRC1</i> chez <i>Arabidopsis</i> lors de l'exposition à différentes températures	44

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
2.1 Paires d'amorces utilisées pour cette étude.....	37

RÉSUMÉ

Les régulateurs de croissance et les facteurs environnementaux contrôlent la croissance et le développement des plantes. Chez *Arabidopsis thaliana*, les gènes *MORE AXILLARY GROWTH (MAX1-MAX4)* codent pour des protéines impliquées dans la synthèse et dans la régulation des strigolactones. Ces composés interagissent avec l'auxine pour inhiber la formation de branches secondaires. Nous avons montré que des températures de croissance non optimales affectent la ramification, mais la nature des mécanismes moléculaires impliqués reste inconnue. Afin de déterminer comment la température interagit avec des signaux endogènes, nous avons étudié les variations des niveaux d'expression relative des gènes *MAX* et *BRC1* chez *Arabidopsis* de type sauvage. Après 14 jours de germination à 22°C (t=0; 22°C est la température optimale), les plantes ont été exposées à différentes températures de croissance (12, 17, 22, 27 ou 32°C) pendant 31 jours. Nos résultats de RT-PCR quantitative montrent que le gène *MAX1* est principalement exprimé à 17 et 22°C, ce qui est aussi le cas pour *MAX2* qui est par contre presque totalement inhibé à 12 et 32°C. Le niveau du messager de *MAX4* est faible à toutes les températures alors que l'expression du gène *MAX3* est la moins affectée par la température de croissance. L'expression de *BRC1* est sensible aux températures 12, 27 et 32°C. De plus, nous avons montré que des plantes qui poussent à 17°C montrent un niveau de ramification plus faible, tandis que celles qui poussent à 27 et 32°C ont un niveau de ramification plus important. Nos résultats ici indiquent qu'une diminution combinée de l'expression de *MAX1* et *MAX2* est nécessaire pour favoriser le développement des branches latérales et donc un phénotype touffu. L'ensemble de nos résultats nous permet suggérer que la température affecte la formation de branches secondaires à travers l'action des strigolactones.

Mots clés: *Arabidopsis*, bourgeons axillaires, embranchement, température, *MAX*, *BRC1*.

CHAPITRE I

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Introduction

Une connaissance de la biologie végétale fondamentale permet une meilleure compréhension des plantes et des enjeux majeurs liés à la biodiversité du milieu végétal. En plus de représenter la source d'alimentation principale des humains, les plantes présentent des enjeux dans le domaine médical et le domaine des bioénergies par exemple. Dans un monde en constante croissance et changement, les plantes représentent un des meilleurs espoirs de maintenir une source d'énergie renouvelable. Comme chez les animaux, le développement d'une plante n'est pas statique. En effet, étant un organisme eucaryote pluricellulaire et autotrophe, une plante est capable de synthétiser les éléments nécessaires à son développement et à sa survie.

Les besoins d'une plante sont relativement simples : du dioxyde de carbone, de la lumière et de l'eau pour qu'elle puisse réaliser sa photosynthèse, de l'oxygène pour la respiration, et des sels minéraux pour son équilibre nutritif. De ce fait, en fonction de l'environnement dans lequel une plante évolue et de facteurs internes, cette dernière est capable d'adapter sa morphologie. Il est acquis que les facteurs environnementaux, notamment la température, interagissent au plus haut niveau avec les différentes hormones de la plante, de sorte à contrôler la croissance de la plante. Toutefois, il existe très peu d'études publiées reliant la température de croissance avec les variations moléculaires ayant lieu dans la plante pour réguler son développement. Pouvoir comprendre et contrôler les mécanismes moléculaires et physiologiques qui interviennent au cours de la vie d'une plante demeure un intérêt économique important (Raven et al., 2000).

1.2 Processus de développement

1.2.1 Développement des plantes

Alors que les animaux forment tous leurs organes au cours de l'embryogénèse, la plante forme ses feuilles, ses tiges, ses racines et ses structures reproductives tout au long de sa vie. La croissance commence avec la mise en place de méristèmes, qui sont des zones de cellules indifférenciées, capables d'ajouter des cellules indéfiniment et qui pourront être différenciés en divers types cellulaires selon l'organe en développement.

Chez les plantes supérieures, le développement de la plante débute avec l'embryogénèse. De manière générale, la première division du zygote qui a lieu dans le sac embryonnaire va se faire selon un axe structural (de façon asymétrique et transversale par rapport au grand axe de l'ovule) et de ce fait la polarité de l'embryon est définie. On parle de proembryon. On a à ce stade un axe apical-basal : la mise en place d'un axe de division/croissance est une étape essentielle dans le développement de tous les organismes supérieurs. Par la suite, par des divisions successives et ordonnées, le zygote se développe en embryon proprement dit. Les futurs tissus de la plante, à savoir le protoderme (futur épiderme) qui se forme par des divisions parallèles à la surface dans les cellules superficielles de l'embryon, le procambium (précurseur des tissus conducteurs) qui se forme suite à des divisions verticales dans l'embryon, et enfin le méristème fondamental (futurs tissus fondamentaux, parenchyme, sclérenchyme, collenchyme) constituent les méristèmes primaires de la plante. Avec la mise en place du méristème débute la formation des différents organes, car même si l'environnement direct de la plante influence son architecture, c'est d'abord son programme génétique qui va déterminer la nature des organes et

tissus formés. À la fin de l'embryogenèse, la plantule formée possède la structure de base d'une plante.

Les plantes passent par une succession de phases transitoires de développement au cours de leur vie (Figure 1.1). En réponse à des stimuli externes, on observe le phénomène d'hétéroblastie qui veut que différentes parties d'une plante (la longueur des entre-nœuds, la production des poils absorbants, la taille des feuilles, etc.) soient à des stades de développement différents. Notamment, les phases de développement végétatif juvénile et adulte vont se dérouler en parallèle. Au cours de la phase végétative, la plante va rapidement développer ses organes tout en augmentant leur taille. Après cette phase de germination, les plantes vont progressivement passer à la phase reproductive, qui mène à la floraison.

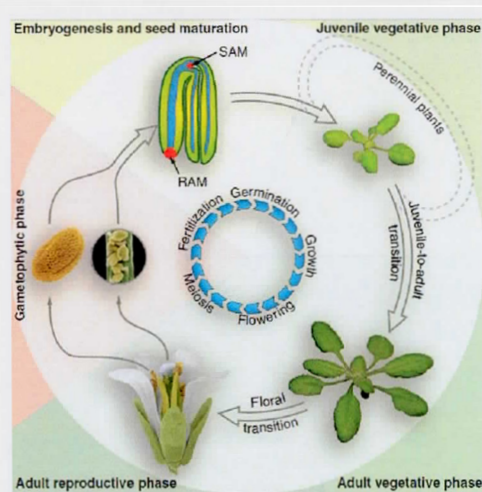


Figure 1.1 Phases de développement chez *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis* effectue un développement en cycle : après la fécondation, ont lieu l'embryogénèse et la maturation de la graine qui se développe pour donner une plante : on parle de phase végétative juvénile. La plante va croître pendant sa phase végétative adulte où les organes reproducteurs seront prêts à recommencer le cycle (Chien et Sussex, 1996). SAM (méristème apical caulinaire); RAM (méristème apical racinaire)

Les méristèmes apicaux (méristème apical caulinaire, SAM; méristème apical racinaire, RAM), vont contribuer à l'élongation de la plante. Le SAM est responsable de la formation des organes aériens primaires (feuilles, tiges, méristèmes axillaires) et le RAM forme le système racinaire (racines et poils absorbants). On parle de *croissance primaire*. Une fois les organes primaires formés, c'est la capacité totipotente des méristèmes qui va permettre à la plante de développer ses tiges et ses racines (modification de la forme et de la taille des organes).

Le SAM va produire des primordia de feuilles et de bourgeons à l'aisselle des feuilles pour aboutir à une succession d'unités répétitives appelées phytomères (segment de tige associé à une feuille et un SAM secondaire). Une fois formé, le méristème secondaire ou méristème caulinaire axillaire, ayant les mêmes propriétés que le méristème apical caulinaire, va permettre l'épaississement des tiges et des racines. Il permet aussi la formation de bourgeons axillaires, qui se développeront éventuellement en branches latérales. Plus tard, les branches formées peuvent à leur tour former d'autres branches, permettant ainsi d'atteindre des niveaux de ramification plus élevés. Toutefois, même après la formation de bourgeons axillaires, le SAM garde son rôle de site de croissance principal en maintenant la dormance des bourgeons axillaires. On parle de *dominance apicale*. En fonction de l'espèce, de l'éloignement des bourgeons par rapport à l'apex, de l'âge de la plante, du moment de la transition florale et bien sûr de l'environnement de la plante, ce phénomène de dominance apicale sera plus ou moins important. De façon générale, la formation et l'activité du méristème axillaire vont dépendre du génotype de la plante, de la phase de développement, et de l'environnement dans lequel la plante évolue. Des études rapportent que l'initiation et l'émergence des bourgeons sont sous le contrôle de différentes phytohormones (discuté plus loin). Une fois formés, ce ne sont pas tous les bourgeons qui vont se développer et donner des branches. Plusieurs bourgeons

entrent dans une phase de dormance transitoire, en fonction des stimuli internes et externes (Bennett et al., 2001).

Il existe plusieurs hypothèses par rapport à l'initiation du méristème axillaire. L'une propose que les primordia des pousses localisées à l'aisselle des feuilles contiennent une partie du SAM encapsulé, ce qui permet le développement de nouvelles branches. La deuxième hypothèse propose que le méristème axillaire soit synthétisé *de novo* à l'aisselle des feuilles.

1.2.2 Développement chez *Arabidopsis*

En tant qu'organisme modèle pour la biotechnologie agricole, l'étude des phases de développement chez *Arabidopsis* a permis d'établir une méthodologie permettant d'identifier et d'interpréter les différents phénotypes de plantes résultant de l'action combinée du patrimoine génétique de la plante et des conditions environnementales. Les études chez cette plante sont facilitées par le fait que son génome a été complètement séquencé. L'étude de mutants d'*Arabidopsis* a permis de dessiner un profil du rôle des gènes impliqués dans le développement, et de façon générale, de mieux comprendre les éléments impliqués dans le développement de l'écotype sauvage. De ce fait, *Arabidopsis* constitue un modèle de comparaison de développement pour les plantes sauvages et les mutants.

Le développement d'*Arabidopsis* s'effectue en 30 phases de croissance, se déroulant souvent en parallèle, depuis la graine jusqu'à la floraison de la plante (Figure 1.2) (Boyes et al., 2001). Ces phases ont été caractérisées dans des conditions environnementales standards de 16 heures de photopériode sur des plantes poussant sur des boîtes de Pétri et d'autres dans des pots. Entre le jour 0 et le 5,5^{ème} jour en moyenne, ce qui correspond au stade 0 (Figure 1.2 A-C), la graine va germer. Les



Figure 1.2. Phases de croissance chez *Arabidopsis thaliana*. La graine d'*Arabidopsis* passe par plusieurs phases de croissance. (A) Stade 0.1 : imbibition de la graine ; (B) Stade 0.5 : émergence du radicule ; (C) Stade 0.7 : émergence des cotylédons et de l'hypocotyle ; (D) Stade 1.0 : les cotylédons sont complètement ouverts ; (E) Stade 1.02 : il y a deux feuilles de rosette de 1 mm ; (F) Stade 1.04 : il y a quatre feuilles de rosette de 1 mm ; (G) Stade 1.10 : il y a dix feuilles de rosette de 1 mm ; (H) Stade 5.10 : les premiers bourgeons de fleurs apparaissent ; (I) Stade 6.00 : la première fleur s'ouvre ; (J) Stade 6.50 : la moitié des fleurs ont fleuri ; (K) Stade 6.90 : la floraison est complète ; (L) Stade 9.70 : sénescence de la plante et récolte des graines. De (A) à (F), les plantes ont poussé dans des boîtes de Pétri, et de (G) à (L), les plantes ont poussé dans des pots (Boyes et al., 2001).

feuilles commencent à se développer à partir du 6^{ème} jour (stade 1), et au 10^{ème} jour (stade 1), les feuilles de rosettes vont se développer. Les feuilles vont continuer cette phase de développement jusqu'au 25.5^{ème} jour de croissance (Figure 1.2 D-G). Au cours de cette phase végétative juvénile, la taille et le nombre des feuilles de rosettes vont augmenter (entre les 12,5^{ème} et 25,5^{ème} jours) et au stade 3 certaines feuilles de rosettes vont atteindre leur taille maximale vers le 30^{ème} jour. Parallèlement à cette

phase végétative juvénile a lieu l'émergence des premiers bourgeons de fleurs (vers le 26^{ème} jour; stade; Figure 1.2 H). Entre le 30^{ème} et le 49^{ème} jour, au stade 6 les fleurs vont progressivement s'ouvrir, jusqu'à ce que la floraison soit complétée (Figure 1.2 I-K). A partir du 50^{ème} jour, les siliques vont s'ouvrir et la sénescence de la plante va se compléter, jusqu'à ce que les siliques soient assez sèches pour une nouvelle récolte et le début d'un nouveau cycle (Figure 1.2 L).

1.3 Facteurs environnementaux influençant le développement

1.3.1 Photopériode

La croissance des plantes et leur distribution sont modulées par l'environnement dans lequel elles évoluent de sorte que si un des paramètres de croissance n'est pas optimal, il sera un facteur limitant. Pour qu'une plante fleurisse, elle a besoin d'acquérir une certaine maturité, et l'induction florale est contrôlée par la photopériode. La photopériode correspond au nombre d'heures de lumière, comparativement au nombre d'heures à l'obscurité, en 24 heures. Une plante doit donc être capable de coordonner ses réponses physiologiques en fonction des périodes de l'année et de l'environnement dans lequel elle évolue. Par exemple, plus on se rapproche des pôles de la Terre, plus ce rapport heures de lumière/heures à l'obscurité est critique. Il est possible dans certaines régions géographiques, à certaines périodes de l'année, d'avoir une photopériode de 24 h lumière ou 24 h de nuit.

On distingue les plantes à jour court comme les fraisiers et le café, qui sont des plantes qui fleurissent après une période d'exposition à la lumière inférieure au seuil critique. En d'autres termes, on parle d'une longue période de nuit (en moyenne entre 8 et 10 heures de lumière). Les plantes à jour long, par exemple la laitue et la pomme

de terre, doivent recevoir un nombre d'heures d'éclairage supérieur au seuil critique pour fleurir, soit entre 16 et 18 heures. On distingue enfin les plantes neutres, telles que la tomate, le concombre et le coton, qui ne sont pas affectées par la durée de photopériode. D'autres mécanismes comme la formation de tubercules, l'entrée en dormance, l'éclosion des bourgeons ou la vernalisation sont aussi contrôlées par la photopériode.

Arabidopsis est une plante facultative à jours longs, et sa floraison est retardée en condition « jours courts ». Des tests de mutations ont permis d'établir que l'expression des gènes *CO* (*CONSTANS*), *CRY2* (*CRYPTOCHROME2*), *FT* (*FLOWERING LOCUS T*), *WUS* (*WUSCHEL*), et *CLV* (*CLAVATA*) est modulée par la photopériode chez *Arabidopsis* (Jeong et Clark, 2005). Parmi ces cinq gènes, les gènes *CO* et *FT* sont impliqués dans la floraison. Le gène *CO* code pour un facteur de transcription qui va activer *FT*, et va permettre la floraison chez *Arabidopsis* (Samach et al., 2000). Des expériences de doubles mutants *co* et *ft*, ont permis de dire que ces gènes jouent des rôles dans le développement du méristème floral.

1.3.2 Température

De manière générale, la dormance, la floraison et la formation des branches par exemple, sont des mécanismes qui vont autant dépendre de la photopériode que de la température. De ce fait, l'établissement des plantes se fait en fonction de l'accès à l'eau et aux nutriments, et en fonction de la lumière et des variations de la température. De façon générale, les plantes sont capables de vivre à températures allant de 0 et 50°C (Poincelot, 1980). Pour la plupart, l'intensité des activités enzymatiques et les réactions chimiques augmentent avec la température, et il est possible de classer les plantes en fonction de leur degré de tolérance aux températures basses/élevées.

Les mécanismes de développement dépendent fortement des variations de température. Par exemple, lorsque les températures sont basses, les plantes vont limiter leurs dépenses d'énergie et stocker plus de sucre. Autre exemple, des températures élevées causent une augmentation de la respiration de la plante, ce qui peut entraîner des pertes d'énergies si la respiration devient plus importante que la photosynthèse. De la même manière, de faibles températures peuvent altérer la croissance : à une faible température, la photosynthèse ralentit, ce qui résulte en un ralentissement de la croissance, et donc de faibles récoltes.

Des études ont montré que les plantes croissent majoritairement quand la température durant la journée est plus élevée que celle de la nuit car elles maximisent ainsi la photosynthèse et la respiration durant la journée. Durant l'automne et l'hiver, le transport de l'eau dans les racines peut être altéré. Avec les basses températures, l'eau devient plus dense et le protoplasme est moins perméable, ce qui limite l'absorption de l'eau par les plantes (Devlin, 1975).

Un autre exemple est celui d'*Arabidopsis*, une plante modèle. Les travaux d'Antoun et Ouellet (2013) ont montré que des températures de croissance en-dessous (12 et 17°C) et au-dessus (27 et 32°C) de 22°C, considérée comme la température optimale de croissance, affectent la ramification et la floraison. En effet, à 17°C, les plantes présentent des ramifications réduites, alors qu'on observe des ramifications plus élevées à 27°C, toujours en comparaison avec les plantes témoins à 22°C.

En plus d'avoir un effet sur la croissance, la température a aussi un rôle dans le contrôle de la dormance. En effet, pendant les saisons sèches ou les saisons froides, qui sont non favorables pour la croissance, certaines plantes vont entrer en dormance. La dormance s'applique non seulement aux graines et aux bourgeons, mais aussi aux tubercules et aux bulbes d'une plante. Les organes dormants ont une faible teneur en

eau, ils limitent les échanges gazeux avec l'environnement (présence d'éléments protecteurs tels que des écailles sur les bourgeons et des téguments sur les graines), et ont une réserve de nutriments adéquate de sorte à avoir une croissance active quand les conditions redeviennent favorables. Les arbres feuillus par exemple vont perdre leurs feuilles et ils vont produire des bourgeons qui vont eux-mêmes rester dormants jusqu'à ce que les conditions redeviennent favorables pour la croissance. De cette manière, les conditions environnementales, notamment la température, contrôlent la mise et la levée de dormance des plantes.

Certaines graines peuvent rester dormantes pendant des décennies. Les plantes de la famille des *Fabaceae* telles que le pois ou le haricot ont des graines imperméables à l'eau et à l'oxygène, et elles sont capables de rester dormantes pendant des années. Pour d'autres plantes, les graines vont germer dès que l'eau est accessible et que les températures sont élevées. Ainsi certaines plantes ont tendance à germer pendant les périodes froides et d'autres pendant les périodes chaudes. À défaut de germer, les graines vont ultimement finir par se détériorer. Même si à la base la majorité des graines sont dormantes, la rapidité de détérioration des graines va dépendre du taux d'hydratation de la graine et de la température environnante (Roberts, 1988). La dormance des graines sèches dépend de la température : la dormance diminue avec l'augmentation de la température et dans ce cas, les graines germent plus rapidement. Pour les graines hydratées, la dormance des graines augmente et dans certains cas, elle peut même être induite par des températures élevées. Bien évidemment, même si la levée ou la mise en dormance des graines dépend de la température, la durée d'exposition à cette température est tout autant importante (Roberts, 1988). La germination des graines dépend donc de leur réponse aux températures environnementales.

Chez les plantes qui vivent dans des zones froides, une phase de dormance hivernale est nécessaire pour leur survie. Des études faites par Heide et Prestrud (2005) ont montré que pour les pommiers, les poiriers et autres espèces d'arbres de la famille des Rosacées, seule la température va contrôler l'initiation de la dormance. Ils ont en effet montré que l'induction de la dormance et l'arrêt de la croissance de ces arbres ne sont pas influencés par la photopériode, mais que ce sont les températures en-dessous de 12°C qui contrôlent ces phénomènes.

La température va aussi influencer la tolérance au froid et l'acclimatation au gel des plantes. Comme mentionné précédemment, le froid peut empêcher tant la germination, la floraison ou même la formation des fruits. Toutefois, une exposition répétée à de basses températures permet de renforcer les plantes et les dispose à mieux résister aux faibles gelées.

1.4 Déterminants moléculaires du développement

1.4.1 Auxine

L'acide indole-3-acétique est la principale auxine naturelle. Elle est principalement synthétisée à partir du tryptophane dans l'apex de la tige, dans les extrémités foliaires des jeunes feuilles, et dans les graines en développement. L'auxine est transportée du site de synthèse vers les différentes parties de la plante. Cette hormone régule le développement des organes, l'élongation, le phototropisme, le gravitropisme, et la ramification (Zazimalova et al., 2010). Il a été établi depuis longtemps que l'auxine est un acteur majeur dans la dominance apicale. Des expériences de Thimann et Skoog ont montré que lorsqu'on coupe l'apex de la tige, on observe une levée de dormance des bourgeons axillaires, et que l'application d'auxine exogène sur la

plante décapitée empêche la levée de dormance des bourgeons (Thimann et Skoog, 1933). Ils ont conclu à l'importance de l'auxine dans la dominance apicale.

De façon générale, en fonction des facteurs physiologiques et environnementaux, le transport polaire de l'auxine de cellules à cellules est unidirectionnel et se fait via des transporteurs d'efflux (Figure 1.3). Du fait de sa nature de faible acide, l'auxine se retrouve principalement sous sa forme protonée neutre dans l'apoplasme (IAAH à pH 5,5). Dans le cytoplasme, l'IAA se retrouve sous sa forme anionique (IAA⁻) et nécessite dès lors l'action de transporteurs d'efflux d'auxine pour sortir de la cellule (protéines PIN et ABCB). L'auxine protonée neutre peut entrer par diffusion passive dans les cellules. L'entrée de la forme anionique nécessite toutefois la protéine AUX1, une perméase (Bennett et al., 1996; Swarup et al., 2001). Des études de Marchant et ses collaborateurs ont montré qu'AUX1 facilite le transport basipétal de l'auxine (Marchant et al., 2002).

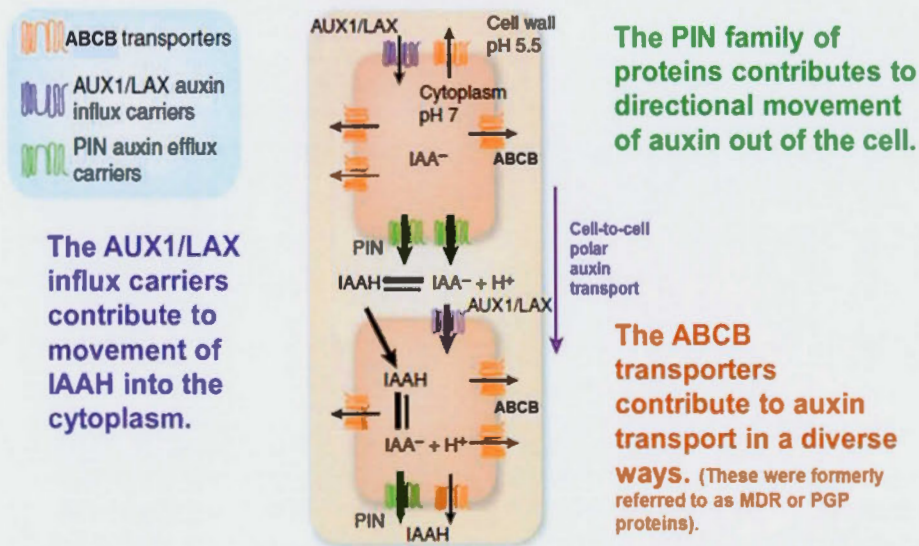


Figure 1.3. Transport polarisé de l'auxine. (Robert et Friml, 2009)

En ce qui concerne l'effet de l'auxine sur le développement des bourgeons axillaires, des tests effectués chez *Arabidopsis* ont permis d'éliminer l'hypothèse d'un transport direct de l'auxine dans les bourgeons pour les garder dormants. L'auxine agit donc indirectement sur l'inhibition des bourgeons axillaires (Del Pozo et al., 2002). En effet, il existe des transporteurs qui rendent possible l'exportation de l'IAA cytoplasmique (qui est ionisée) : les protéines PINFORMED (PIN) et les protéines "ATP Binding Cassette subfamily B" (ABCB) (Raven et al., 2000; Titapiwatanakun et Murphy, 2009; Zazimalova et al., 2010). Des études rapportent qu'au pH cytoplasmique (IAA sous forme anionique), les transporteurs ABCB et les protéines PINs (forme complète) travaillent ensemble pour permettre la sortie de l'auxine à travers la membrane plasmique. L'implication des protéines PIN a été caractérisée dans plusieurs systèmes biologiques. Elles sont exprimées dans différentes parties de la plante tout au long de son développement. Les protéines PIN sont exprimées pendant l'embryogénèse, l'organogénèse et pendant la différenciation des tissus (Mravec et al., 2008). Chez *Arabidopsis*, il existe 8 gènes codant pour les protéines PINs. Les protéines PIN1, 2, 3, 4 et 7 codent pour une forme complète. En fonction du type cellulaire, elles vont se trouver dans les régions polaire et apolaire de la membrane. Les PINs 5, 6 et 8 codent pour des formes tronquées de la protéine. Des plantes mutantes *pin-1* d'*Arabidopsis* montrent un phénotype anormal au niveau de la structure de leurs inflorescences et de leurs fleurs. Dans la majorité des cas, aucun bourgeon floral ne se forme. On obtient le même phénotype pour des plantes traitées avec des inhibiteurs de transport d'auxine : en comparaison avec le type sauvage, le transport d'IAA est diminué de 7 à 14% chez les mutants (Okada et al., 1991). Ces résultats suggèrent que les PINs sont nécessaires très tôt dans l'initiation des bourgeons floraux et que leur fonction principale est le transport polaire de l'auxine dans la plante. C'est donc le transport basipétal de l'auxine dans la tige centrale qui va agir indirectement sur le bourgeon axillaire.

Les membres de la famille des ABCB, des transporteurs d'auxine ATP-dépendant, et des PGP (phospho-glycoprotéines) travaillent en synergie avec les protéines PINs pour permettre le transport de molécules anioniques (Geisler et Murphy, 2006; Peer et Murphy, 2007; Verrier et al., 2008). Chez des mutants *pgp19* d'Arabidopsis, on observe une augmentation de la courbure de la tige sous l'influence du phototropisme. De plus PGP4 semble être impliqué dans l'élongation des poils absorbants et dans la croissance des racines, en fonction de la lumière et du sucrose (Santelia et al., 2005; Terasaka et al., 2005).

Même s'il existe de plus en plus d'études traitant du transport de l'auxine, et qu'il est aujourd'hui sûr que ces familles de transporteurs agissent de manière indépendante pour coordonner le transport de l'auxine, seule la fonction des PIN1 et des transporteurs ABCB19 a été biochimiquement validée (Bandyopadhyay et al., 2007).

Une des hypothèses prédominante suggère que l'exportation de l'auxine du bourgeon est nécessaire pour le développement des bourgeons dormants. Des expériences montrent qu'après décapitation, l'exportation de l'auxine du bourgeon est une des premières étapes d'activation chez le pois. Une hypothèse d'Alonso-Blanco propose un système de canalisations et de source d'auxine: les échanges d'auxine entre la source et les canalisations vont créer un flux d'auxine basipétal plus important, ce qui va permettre à l'auxine contenue dans l'apex des bourgeons de sortir des bourgeons (Alonso-Blanco et al., 2009). Des études récentes montrent que les bourgeons dormants ne possèdent pas de PIN1 polaire. À l'opposé, dans les bourgeons activés, la concentration des protéines PIN1 augmente et ces dernières sont localisées de sorte à connecter les voies de transport du bourgeon aux voies de transport de l'auxine dans la tige principale. Le transport de l'auxine contrôle indirectement la levée de dormance des bourgeons (Balla et al., 2011; Müller et Leyser, 2011).

L'auxine régule de nombreux aspects de la croissance et du développement chez la plante via l'action de plusieurs gènes. Il existe de ce fait, des facteurs de transcription appelés *AUXINE/INDOLE-3-ACETIC ACID (AUX/IAA)* et *AUXINE RESPONSE FACTOR (ARF)* qui sont impliqués dans la signalisation de l'IAA (Ulmasov et al., 1997a). Le gène *ARF1* code pour un facteur de transcription capable de se fixer sur un motif TGTCTC, appelé AuxRE (Auxin Response Element), qui est situé dans le promoteur des gènes de réponse à l'auxine et impliqué dans la réponse transcriptionnelle (Ballas et al., 1993; Ulmasov et al., 1997a). Le C-terminal de la protéine ARF1 contient deux motifs qui se retrouvent aussi dans les protéines Aux/IAA, et qui permettent les interactions protéine-protéine. Lorsque le niveau d'auxine n'est pas élevé, les protéines Aux/IAA et ARF dimérisent, inhibant ainsi l'activité transcriptionnelle de l'ARF. En présence d'un niveau d'auxine plus élevé, la protéine Aux/IAA va être dégradée via TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1), une protéine à domaine F-box, par ubiquitination dans le protéasome. Ceci va permettre à l'ARF de soit activer ou inhiber les gènes en réponse à l'auxine (Ulmasov et al., 1997a; Ulmasov et al., 1997b; Del Pozo et al., 2002).

L'observation de mutants résistants à l'application d'auxine exogène chez *Arabidopsis* a permis l'identification de la protéine AXR1 (Auxin Resistant 1), qui est nécessaire pour une réponse normale à l'auxine. Des études montrent que des mutants *axr1* présentent des défauts dans la voie de régulation de croissance auxine-dépendante, ainsi qu'une réduction de la réponse à l'auxine (Del Pozo et al., 2002). Les mutants *axr1* ont des défauts dans les feuilles, les fleurs, le développement du système vasculaire, l'élongation de la tige et la formation des racines latérales (Lincoln et al., 1990; Leyser et al., 1993). AXR1 a comme cible les membres de la famille Cullin, des sous-unités du complexe Skp1-Cul1/Cdc53-F-box (SCF). Ce complexe permet l'ubiquitination des molécules qui doivent être dégradées. Del Pozo et ses collaborateurs ont établi qu'AXR1 est localisé dans les zones de divisions

cellulaires et dans le système vasculaire des tissus plus âgés (Del Pozo et al., 2002). L'activité de l'auxine dépend donc d'une batterie de protéines qui interagissent dans la plante.

1.4.2 Cytokinines

L'auxine va agir en association avec une autre phytohormone, la cytokinine, et c'est principalement le ratio entre ces deux hormones qui va contrôler le développement des bourgeons axillaires. Les cytokinines sont principalement synthétisées dans les racines, puis elles sont transportées à travers la plante et entre autre dans les bourgeons axillaires, dont elles activent le développement (Sachs, 1967; Tanaka et al., 2006). Les cytokinines et les IPTs (adenosine phosphate isopentenyltransferases qui catalysent la première étape de synthèse des CK) sont synthétisées à travers la plante (tige et racines). L'isopentenyladénine, la zéatine (Z) et la dihydro-zéatine sont les principales cytokinines dans la plante (Leyser et al., 1993; Garcia-Garrido et al., 2009). La littérature rapporte que chez *Pisum sativum*, les transcrits des gènes IPT1 et IPT2 sont localisés principalement au niveau de la tige. Des expériences de décapitation chez *Arabidopsis* montrent que l'expression des gènes IPT1 et IPT2 est affectée. En effet, 3 heures après décapitation, les transcrits sont absents dans les bourgeons axillaires, et ils sont détectables seulement dans la tige (Tanaka et al., 2006). De plus, l'application d'auxine exogène réprime l'expression de gènes IPTs.

L'application de CK sur un bourgeon dormant d'*Arabidopsis* est suffisante pour lever la dormance, même en présence de l'apex (Thimann et Skoog, 1933). On observe le même effet quand on applique de la CK (kinétine à des concentrations entre 0,1 et 100 µg/mL) sur des pousses de pois âgées de 7 jours n'ayant pas de racines (Chang et Goodin, 1974). Turnbull et ses collaborateurs, qui ont effectué des tests sur le pois-chiche, rapportent que l'application de CK (200 pmol de benzyladénine) sur des

plantes de pois-chiche décapitées stimule l'initiation du développement des bourgeons axillaires 3 heures après la décapitation (Turnbull et al., 1997).

Comme dit plus haut, l'IAA et le CK vont interagir pour l'initiation et le développement des bourgeons axillaires et des branches, et l'IAA régule de façon négative le niveau de CK dans la plante. L'IAA va réguler le niveau de CK dans la tige via l'induction de la cytokinine oxidase (CKX), une enzyme qui dégrade la CK (Jones et Schreiber, 1997; Werner et al., 2001). En effet, Carabelli et ses collaborateurs ont montré que l'auxine induit l'activité de CKX pendant le développement des feuilles d'Arabidopsis, et que le niveau d'expression relative de PsCKX2 (une CKX identifiée chez le pois) est indétectable 3 à 9 heures après la décapitation du pois (Carabelli et al., 2007).

Il existe des acteurs comme les ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR (ARR), qui constituent une des premières réponses des CK chez Arabidopsis et qui régulent négativement les cytokinines (To et al., 2004). De plus, chez les plantes mutantes dont les voies de transport de l'auxine sont altérées, on observe une diminution du taux d'IAA et une augmentation du taux d'ARR (Zhao et al., 2010). Le facteur de transcription WUSCHEL réprime l'activité des ARR et de cette manière, il va permettre la synthèse de CK (Leibfried et al., 2005). Tous ces acteurs permettent la régulation de la CK synthétisée dans la tige et dans les racines.

1.4.3 Strigolactones

Au cours des deux dernières décennies, de plus en plus de mutants de ramification ont été étudiés, et ce pour plusieurs espèces de plantes. Il est apparu évident qu'en plus de l'auxine et la CK établis comme acteurs principaux, il existe un autre signal agissant à longue distance et qui intervient dans le développement des branches : les

strigolactones (SL) (Gomez-Roldan et al., 2008). Une absence de SL chez les mutants de caroténoïdes a permis de dire que les strigolactones synthétisées au niveau des racines sont un groupe de dérivés de caroténoïdes. On note aujourd'hui 15 membres identifiés. Ils ont une structure comportant 4 anneaux (A-D), dont le motif C-D est fortement conservé et semble être essentiel pour leur activité biologique (Figure 1.4).

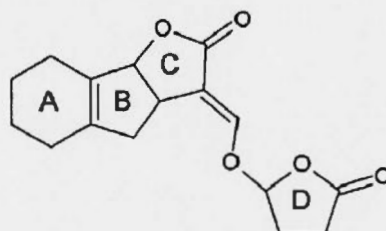


Figure 1.4. Structure générale des strigolactones.

La voie de réponse aux SL fait intervenir différents gènes impliqués soit dans la synthèse soit dans la signalisation. L'étude de plusieurs mutants de pois, pétunia, de riz et d'*Arabidopsis*, ont permis d'identifier des gènes orthologues: *MORE AXILLARY GROWTH (MAX)* chez *Arabidopsis*, *RAMOSUS* chez le pois (*RMS*), *DECREASING APICAL DOMINANCE* chez le pétunia (*DAD*), et les gènes *DWARF (D)* et *HIGHLY TILLERING DWARF (HTD)* identifiés chez le riz (Figure 1.5). Les mutants ont un phénotype avec des branches secondaires supplémentaires, comparativement au phénotype WT (Beveridge et al., 1994; Simons et al., 2007). De plus des études montrent que le phénotype sauvage peut être récupéré par application de SL synthétique (GR24) sur les mutants *max3* et *max4*, mais pas sur *max2* (Umehara et al., 2008). On en conclut que les gènes *MAX* et les différents gènes orthologues contrôlent la ramification chez les plantes. Certains de ces gènes sont nécessaires pour la synthèse des SLs alors que d'autres vont traduire le message des SLs en inhibant l'élongation des branches latérales (Ongaro et Leyser, 2008).

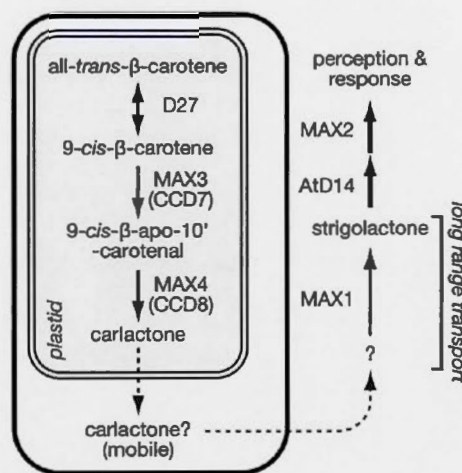


Figure 1.5. Voie de synthèse et de signalisation des strigolactones (Waters et al., 2012a). Voir le texte pour la description des éléments.

On retrouve chez le riz deux protéines qui sont localisées dans les plastes, DWARF27 (OsD27) et DWARF14 (OsD14), qui sont tout aussi nécessaires que D10 et HTD1 pour la biosynthèse et la régulation des SLs (Waters et al., 2012a; Waters et al., 2012b). Une étude phylogénétique sur des protéines avec des séquences codantes similaires à la protéine OsD27 a permis d'identifier des protéines orthologues chez quelques plantes, notamment MtD27 chez *Medicago truncatula* (Liu et al., 2011) et AtD27 (At1g03055) chez *Arabidopsis*. Les études de Waters et ses collaborateurs ont suggéré que le gène *AtD27* intervient dans le contrôle du développement des branches latérales. En effet, des mutants *d27* d'*Arabidopsis*, présentent des phénotypes touffus et l'application de SL GR24 permet de récupérer le phénotype WT (Waters et al., 2012a).

Des tests de complémentation entre différents mutants d'*Arabidopsis* (*max1*, *max3*, *max4*, *d27*) ont permis d'établir que la protéine AtD27 agit en amont de MAX1 et elle est donc nécessaire pour l'inhibition de la ramification (Waters et al., 2012a). La protéine D27 semble être une isomérase β -carotène qui convertit tous les *trans*- β -

carotène en 9-*cis*- β -carotène. Cette molécule est un substrat pour des dioxygénases de caroténoïdes NCEDs (9-*cis*-epoxy-carotenoid dioxygenases).

Il existe chez les plantes, et notamment chez *Arabidopsis*, neuf membres de la famille des NCED dont cinq sont impliqués dans la synthèse d'acide abscissique. Les quatre autres sont impliqués dans le clivage/digestion de caroténoïdes et appelés CCD (carotenoid cleavage dioxygenase) (Iuchi et al., 2001). On distingue notamment AtCCD7/MAX3 et AtCCD8/MAX4 chez *Arabidopsis*, synthétisés à travers la plante. Des mutants *max3* et *max4* ont été obtenus suite à des lésions dans les séquences codantes de *AtCCD7* et *AtCCD8* respectivement (Booker et al., 2004). Comme mentionné plus haut, les mutants présentent un phénotype touffu qui peut être restauré par greffage de racines provenant de plantes sauvages, ce qui montre que *MAX3* et *MAX4* sont nécessaires pour inhiber la ramification. Les gènes *AtCCD7* et *AtCCD8* ont été co-exprimés dans des souches d'*E. coli* qui accumulent des caroténoïdes, et le produit formé était un 13-apo-carotène (C18), la carlactone, issu d'une digestion de 10'-apo- β -carotenol (C27) par *AtCCD8* (Schwartz et al., 2004).

Des analyses de RT-PCR de plantes sauvages Col-0 âgées de 3 semaines ont montré l'accumulation majoritaire de transcrits de D27 dans les tiges, les bourgeons axillaires et moins dans les racines, tandis que les niveaux d'expression de *MAX3* et *MAX4* étaient plus abondants dans les racines et l'hypocotyle (Lin et al., 2009; Waters et al., 2012a).

Des analyses moléculaires et des expériences de complémentation ont permis d'identifier un autre acteur, le gène At2g26170, comme étant le gène *MAX1* qui appartient à la famille des cytochromes P450. En effet, l'insertion d'un fragment contenant l'ORF (Open Reading Frame) du gène At2g26170 dans la plante mutante *max1-1* a permis de restaurer le phénotype WT (Booker et al., 2005). D'après la

nomenclature propre à *Arabidopsis*, le gène *MAX1* appartient à la famille CYP711A1. Cette famille est aussi retrouvée chez le riz (CYP711) et présente de fortes ressemblances (24% de similarité avec CYP711A1) avec les TXAS (Thromboxane A₂ synthase), la famille de cytochromes P450 présente chez des mammifères. Si l'on considère que les TXAS appartiennent à la classe III P450s, alors *MAX1* fait partie de cette même classe III P450s, qui a comme particularité d'utiliser des produits de dioxygénases comme substrats. De ce fait, *MAX1* agit en aval des dioxygénases *MAX3* et *MAX4*. En effet, greffer des racines de *max1* sur une plante mutante *max3* ou *max4* permet de restaurer le phénotype sauvage d'*Arabidopsis*, mais ceci n'est réciproque (Booker et al., 2005). Ces trois gènes agissent donc dans la même voie de biosynthèse.

Le gène *MAX2* code pour une protéine F-box faisant partie d'un complexe de protéines Skp1-Cullin-F box. Celui-ci sélectionne de manière spécifique les éléments qui vont être dégradés via ubiquitination. Contrairement aux gènes *MAX1/3/4* dont les mutants présentent les mêmes phénotypes, le mutant *max2* est beaucoup plus touffu. De plus, des greffes de racines *max2* sur des parties aériennes du mutant *max3* ont permis de restaurer le phénotype sauvage. Il a donc été établi que contrairement à *MAX1/3/4*, *MAX2* n'est pas impliqué dans la synthèse des SLs mais plutôt dans des événements moléculaires en aval (Booker et al., 2005). L'identification de gènes orthologues impliqués dans la voie de régulation des SLs chez le riz, le pois et le pétunia permettent de dire que ce mécanisme est conservé chez les plantes supérieures.

Le gène At3g03990, code pour la protéine AtD14 (homologue à OsD14). Cette protéine appartient à la famille des hydrolases α/β et les mutants *Atd14* présentent un nombre accru de rosettes secondaires et ont une taille réduite (Arite et al., 2009). De plus, comme chez les mutants *max2*, l'application de GR24 sur ces mutants n'a aucun

effet sur leur morphologie. Ces résultats permettent de dire qu'AtD14 est nécessaire pour le bon fonctionnement des SLs. Contrairement à D27, les transcrits de *MAX2* et *AtD14* sont co-localisés à travers la tige, les racines et l'hypocotyle (Waters et al., 2012a). La protéine AtD14 semble donc être un récepteur de SLs, ou une enzyme qui va permettre la transformation des SLs en une autre forme active.

En plus de son implication dans la ramification, la protéine MAX2 intervient dans le processus de sénescence des feuilles (Woo et al., 2001) et dans la germination des graines lors de la réponse aux karrikines. Ces composés buténolides présents dans la fumée nécessitent chez *Arabidopsis* l'action de MAX2 et de l' α/β -hydrolase KAI2 (orthologue de DWARF14) pour permettre la levée de dormance des graines (Waters et Smith, 2013). Même si MAX2 intervient dans les deux mécanismes (la dormance des graines et la ramification), des études montrent que ces deux mécanismes n'ont rien en commun : des karrikines ne peuvent pas restaurer un phénotype sauvage sur des mutants *max3* et *max4* (Nelson et al., 2011). Il est encore aujourd'hui impossible d'expliquer comment MAX2 régule exactement l'action des SLs et celle des karrikines (Waters et al., 2011).

De manière générale, la voie de transport de l'IAA et la voie des gènes *MAX* semblent être liées (Cheng et al., 2013). Comme mentionné plus haut, l'hypothèse privilégiée propose que ce soit l'appel d'auxine de type « source-puit », qui permette l'export de l'auxine des bourgeons axillaires et qui lève la dormance de ces derniers (Sachs T, 1968). Plusieurs évidences supportent cette affirmation. Les mutants *max* ont une capacité de transport de l'auxine augmentée comparativement au WT, et ils présentent des niveaux d'expression des gènes PIN1, PIN3, PIN4 et PIN6 plus importants que les plantes sauvages (Bennett et al., 2006). Quand la concentration de SLs diminue, la concentration de PIN augmente, ce qui fait augmenter le transport d'auxine dans la tige.

Des travaux de Crawford et ses collaborateurs montrent que lorsqu'on applique l'acide N-1-naphthylphthalamic (NPA), un inhibiteur de transport de l'IAA, sur des mutants *max*, on observe une inhibition de la ramification (Ishikawa et al., 2005; Bennett et al., 2006; Crawford et al., 2010). La décapitation de l'apex chez le pois entraîne l'exportation de l'auxine des bourgeons axillaires activés via la polarisation des transporteurs PINs (Balla et al., 2011). L'application de la SL synthétique GR24, sur des mutants *max* et des plantes WT, diminue le transport de l'auxine ainsi que l'accumulation des PIN1 dans la membrane plasmique des cellules du xylème, sauf chez le mutant *max2* (Crawford et al., 2010). De plus, des simulations faites par ordinateur montrent que le flux d'auxine « source-puit » crée une compétition d'élongation entre les différents bourgeons axillaires le long de la tige principale. Les SLs inhibent donc le développement des branches latérales via les transporteurs d'auxine PINs dans le transport polaire, de manière MAX2-dépendante (Santelia et al., 2005).

1.4.4 Gènes de régulation : *LATERAL SUPPRESSOR* et *REVOLUTA*

Comme mentionné plus haut, il existe plusieurs hypothèses par rapport à l'initiation du méristème axillaire. La formation du méristème axillaire est régulée différemment en fonction des phases de développement, phénomène qui est conservé chez la tomate aussi (Greb et al., 2003). Une des hypothèses propose qu'en plus de la présence du SAM dans les primordia des plantules, il existe un gène très conservé à travers les espèces, le gène *LATERAL SUPPRESSOR* *Ls* (chez la tomate)/*LAS* (chez *Arabidopsis*)/*MOCI* (chez le riz) qui réprime la différenciation des cellules totipotentes à l'aisselle des feuilles pendant la phase végétative (Li et al., 2003; Schmitz et Theres, 2005). Des transcrits *LAS* ont été détectés au niveau des bourgeons de fleurs, des racines et dans les fleurs ouvertes. On n'en trouve pas dans les entrenœuds et les feuilles d'*Arabidopsis*. Les mutants *las* d'*Arabidopsis* sont

incapables d'initier un méristème axillaire pendant la phase de développement végétatif. Le gène *LAS* chez *Arabidopsis* est exprimé au niveau de la face interne des primordia de feuilles formées à partir du SAM (Greb et al., 2003). L'aisselle des feuilles semble avoir sa propre identité, et le gène *LAS* en serait un marqueur.

Un autre gène, le gène *REVOLUTA (REV)*, appartenant à la famille des facteurs de transcription Homeodomain-Leucine-Zipper (HDZ-III), est exprimé dans le système vasculaire des tiges d'*Arabidopsis*. Il semble contrôler l'initiation des bourgeons axillaires : en effet, chez les mutants *rev* d'*Arabidopsis*, les méristèmes axillaires ne sont pas initiés, et les fleurs ne se développent pas, mais les feuilles et les tiges sont vigoureuses. *REV* limite donc l'initiation des méristèmes axillaires chez *Arabidopsis*, mais est nécessaire pour le développement et le maintien de ces méristèmes (Talbert et al., 1995). On suppose que *REV* permet l'activation de régulateurs du méristème axillaire déjà connus tel que *WUSCHEL* (Otsuga et al., 2001). Du fait de leur co-localisation, et du fait que *REV* soit absent chez les mutants *las*, *LAS* semble agir en amont du gène *REV* (Greb et al., 2003).

1.4.5 La protéine BRANCHED1

En plus des acteurs externes et des gènes mentionnés plus haut qui contrôlent le niveau de ramification chez *Arabidopsis*, il existe un acteur qui va agir à partir du bourgeon, la protéine BRC1. En effet, les mutants *brc1* présentent un phénotype touffu donc avec plus de branches. Les orthologues ont initialement été identifiés chez des monocotylédones: le gène *TEOSINTE BRANCHED 1 (tb1)* chez le maïs, *OsTBI* chez le riz, et *SbTBI* chez le sorghum. Ces gènes codent pour un facteur de transcription de la famille TCP (*TEOSINTE BRANCHED1*, *CYCLOIDEA*, *PROLIFERATING CELL FACTOR*). Le domaine TCP correspond à une séquence de 59 acides aminés qui permet les interactions protéines-protéines, qui reconnaît des

séquences de liaison sur l'ADN, et qui serait impliquée dans la localisation nucléaire (Kosugi et Ohashi, 2002). Aguilar-Martinez a montré que les gènes *BRC1* (*TCP12*) et *BRC2* (*TCP18*) chez *Arabidopsis* sont exprimés au niveau des bourgeons axillaires pendant l'initiation de ces derniers, et la présence des protéines correspondantes maintient les bourgeons dormants. L'expression tardive de *BRC1* et *BRC2* indique que ces gènes semblent agir en aval des gènes *LAS*. Le niveau d'expression de *BRC1* diminue beaucoup au moment du développement des bourgeons (Aguilar-Martinez et al., 2007; Finlayson, 2007).

Des hypothèses proposent que l'expression de *BRC1* isole les bourgeons des signaux qui activent l'initiation des bourgeons ou encore empêche l'exportation de l'auxine du bourgeon. Bien que son mode d'action précis ne soit pas encore connu, il semble qu'il pourrait y avoir un lien avec celui des SLs provenant de la voie *MAX*. En effet, les mutants *max* et *brc1* présentent des phénotypes identiques. De plus, les doubles mutants *max (1/2/3/4)/brc1* ont le même aspect que les simples mutants, indiquant une redondance dans leur fonction.

Les auxines, les strigolactones et la protéine *BRC1* ont donc été identifiées comme des régulateurs négatifs de la ramification. Même si les hormones impliquées dans le phénomène de ramification ont été identifiées, le lien entre les conditions environnementales et les réponses moléculaires de la plante n'a pas encore été établi.

1.5 Importance agronomique du développement des branches latérales

Pour des raisons économiques certaines, il est important de pouvoir prévoir et contrôler l'influence des variations des conditions environnementales sur nos cultures. Dans un contexte climatique, démographique et énergétique incertain, la recherche s'attèle à trouver des solutions pour la disponibilité et la sécurité

alimentaire mondiale d'ici quelques dizaines d'années. Les biotechnologies visent à favoriser l'adaptation de l'agriculture et des forêts aux changements climatiques.

La température a un effet certain sur le développement des plantes. Dans un pays où l'hiver est long et dur comme au Canada, le froid peut causer des dégâts aux plantes si les températures ont été trop basses. Des dommages importants peuvent aussi survenir si ces températures basses arrivent hors saison (trop tôt à l'automne ou tard au printemps). Chez certaines plantes, de grandes variations dans les températures peuvent causer une éclosion prématurée des bourgeons dormants. Des plantations entières peuvent être perdues lorsque les températures sont trop basses pendant l'hiver.

Être capable d'identifier et de contrôler les différents gènes intervenant dans la formation de branches secondaires, c'est être capable de contrôler sa biomasse. En effet, plus de branches signifie par extension plus de feuilles, plus de fruits, plus de graines, etc. Étudier les mécanismes de défenses et d'adaptation des plantes aux températures non optimales et pouvoir contrôler la biomasse d'une plante présentent donc un intérêt agronomique non négligeable. Plus que des données phénotypiques, des changements au niveau de l'aspect, il est important de pouvoir établir un lien entre le stress causé par les changements environnementaux et les mécanismes biochimiques qui surviennent en réponse à ce stress dans la plante. Être capable de prédire les changements internes des plantes face à certaines conditions environnementales va permettre d'adapter les cultures à différents milieux de croissance. L'idée de cette étude sur le long terme est de pouvoir établir des marqueurs moléculaires pour permettre une sélection agricole assistée.

1.6 Objectifs de l'étude présente

Dans un souci d'établir des liens entre les variations de température et les modifications moléculaires qui ont lieu dans la plante sur le plan moléculaire, l'étude présente portait sur l'étude de l'effet des variations de températures sur l'expression des messagers des gènes *MAX1* à *MAX4*, et de *BRC1* qui sont impliqués dans la régulation de la ramification. Nous avons fait pousser des plantes d'*Arabidopsis* à des températures variant entre 12 et 32°C, sachant que la température optimale est de 22°C, pendant 31 jours. Ensuite, par RT-qPCR, nous avons suivi l'évolution de l'expression des gènes au cours du temps.

CHAPITRE II
ARTICLE SCIENTIFIQUE

LA TEMPÉRATURE AFFECTE L'EXPRESSION DES GÈNES *MAX* ET *BRC1*
CHEZ *ARABIDOPSIS THALIANA*

Danielle Bilounga Bekolo et François Ouellet

Manuscrit en préparation pour soumission à la revue *Biochemistry and Cell Biology*

J'ai été impliquée dans toutes les facettes des travaux associés à cet article. J'ai participé à l'élaboration du design expérimental et effectué toutes les manipulations au laboratoire ainsi que toutes les analyses. J'ai finalement rédigé la première version du manuscrit et conçu les figures. François Ouellet a participé à l'élaboration du projet et du design expérimental, et à l'interprétation des résultats. Il a de plus supervisé la rédaction du manuscrit.

LA TEMPÉRATURE AFFECTE L'EXPRESSION DES GÈNES *MAX* ET *BRC1*
CHEZ *ARABIDOPSIS THALIANA*

Danielle Bilounga Bekolo et François Ouellet

Affiliation: Université du Québec à Montréal
Département des Sciences biologiques
Case Postale 8888, Succursale Centre-ville
Montréal Québec H3C 3P8
Canada

Adresses courriel: DBB: bilounga.danielle@hotmail.ca
FO: ouellet.francois@uqam.ca

Auteur de correspondance: François Ouellet
Université du Québec à Montréal
Département des Sciences biologiques
Case Postale 8888, Succursale Centre-ville
Montréal Québec H3C 3P8
Canada
Courriel: ouellet.francois@uqam.ca
Téléphone: 1-514-987-3000, poste 8402
Télécopieur: 1-514-987-4647

2.1 Résumé

Les régulateurs de croissance et les facteurs environnementaux contrôlent la croissance et le développement des plantes. Chez *Arabidopsis thaliana*, les gènes *MORE AXILLARY GROWTH (MAX1-MAX4)* codent pour des protéines impliquées dans la synthèse et la régulation des strigolactones. Ces composés interagissent avec l'auxine pour inhiber la formation de branches secondaires. Nous avons montré que des températures de croissance non optimales affectent la ramification, mais la nature des mécanismes moléculaires impliqués reste inconnue. Afin de déterminer comment la température interagit avec des signaux endogènes, nous avons étudié les variations des niveaux d'expression relative des gènes *MAX* et *BRC1* chez *Arabidopsis* de type sauvage. Après 14 jours de germination à 22°C ($t=0$; 22°C est la température optimale), les plantes ont été exposées à différentes températures de croissance (12, 17, 22, 27 ou 32°C) pendant 31 jours. Nos résultats de RT-PCR quantitative sur la partie aérienne ont montré que le gène *MAX1* est principalement exprimé à 17 et 22°C, ce qui est aussi le cas pour *MAX2* qui est par contre presque totalement inhibé à 12 et 32°C. Le niveau du messager *MAX4* est faible à toutes les températures alors que l'expression du gène *MAX3* est la moins affectée par la température de croissance. L'expression de *BRC1* est sensible aux températures 12, 27 et 32°C. De plus, nous avons montré que des plantes qui poussent à 17°C montrent un niveau de ramification plus faible, tandis que celles qui poussent à 27 et 32°C ont un niveau de ramification plus important. Nos résultats indiquent qu'une diminution combinée de l'expression de *MAX1* et *MAX2* est nécessaire pour favoriser le développement des branches latérales à 27°C et donc un phénotype touffu. L'ensemble de nos résultats nous permet de suggérer que la température affecte la formation de branches secondaires à travers l'action des strigolactones.

Mots clés: *Arabidopsis*, bourgeons axillaires, ramification, température, *MAX*, *BRC1*.

2.2 Introduction

Au cours du développement des plantes, la mise en place des méristèmes apicaux et racinaires constitue l'étape cruciale qui va permettre la croissance primaire de la plante. En effet, le méristème apical de la tige (SAM) va permettre le développement de la partie aérienne de la plante et le méristème apical racinaire (RAM) va se développer et se différencier en système racinaire. Pendant cette croissance végétative, une partie du SAM se différencie en méristème secondaire à l'aisselle des feuilles formées et va ainsi permettre la formation et le développement de branches latérales. Coordonner ces différentes étapes peut être vital pour la plante.

Il a été établi que les conditions environnementales influencent le développement des plantes. Concrètement, une plante répond à des stimuli externes tels que la température, la photopériode, et la disponibilité des ressources nutritives. Par exemple, les plantes croissent majoritairement durant la journée, de sorte à maximiser la photosynthèse et la respiration pendant la journée. De plus, pour répondre à des températures défavorables pour la croissance, certaines plantes passent par une phase de dormance avant de pouvoir fleurir. Toutefois, les mécanismes qui relient les réponses hormonales et les réponses aux variations de températures restent pour la plupart incertains.

Certains mécanismes qui ont lieu durant la formation des branches sont connus chez *Arabidopsis*. Au centre de ces mécanismes se trouve l'auxine qui, via son transport basipétal à travers la plante, va contrôler de manière indirecte la ramification. Dans un premier temps, l'auxine va inhiber la synthèse de cytokinine, une hormone qui favorise la ramification. De plus, les strigolactones (SLs), synthétisées majoritairement dans les racines et distribuées dans toute la plante, ont été identifiées comme des hormones qui interviennent dans le développement des branches latérales

chez les plantes (Beveridge et al., 1994). Ces hormones sont dérivées de caroténoïdes. L'application de SLs sur des plantes de pois inhibe le développement des branches même après décapitation et réduit la ramification chez des plantes mutantes du transport polaire de l'auxine chez *Arabidopsis*, ce qui suggère une interaction entre la voie d'action des SLs et celle du transport polarisé de l'auxine (Brewer et al., 2009). Les SLs sont aussi impliquées dans la germination de plantes parasites qui stimulent les relations symbiotiques avec les champignons mycorhiziens arbusculaires, dans le développement des racines, et dans les réponses de la plante au phosphate (Akiyama et al., 2005).

Les gènes *MORE AXILLARY GROWTH* (*MAX1*, *MAX2*, *MAX3*, *MAX4*) identifiés chez *Arabidopsis*, et les gènes orthologues présents chez le pois (*RAMOSUS*), le riz (*DWARF* et *HIGH TILLERING DWARF*) et la pétunia (*DECREASE APICAL DOMINANCE*) contribuent à la synthèse et la régulation des SLs dans la plante. Des études précédentes ont montré que les mutants *max*, *rm1*, et *dad1* ont des aspects plus touffus que les plantes de type sauvage (Beveridge et al., 1994; Simons et al., 2007). Les SLs semblent différer des autres phytohormones de croissance dans le sens où elles inhibent la ramification de façon directe. Des études réalisées sur des plantes entières (âgées de 8 jours) et des parties spécifiques d'*Arabidopsis* (plantes matures) montrent que les gènes impliqués dans la synthèse et la signalisation des SLs sont exprimés dans les plantules.

Les gènes *MAX3* et *MAX4*, codent pour les "carotenoid cleavage dioxygenase" CCD7 et CCD8, respectivement (Sorefan et al., 2003; Snowden et al., 2005). Les gènes orthologues *RMS5/D17* et *RMS1/DAD1* appartiennent à la même famille de gènes qui clivent les caroténoïdes chez *Arabidopsis*, et ils sont impliqués dans la synthèse d'apocaroténoïdes (Auldrige et al., 2006). L'enzyme 9-*cis* epoxy-carotenoid dioxygenase (NCED) clive une néoxanthine au cours de la synthèse d'acide

abscissique (Tan et al., 2003). Le gène *MAX4* est principalement exprimé dans les plantules, les parties aériennes et les racines des plantes adultes. L'ARNm de *MAX3* est principalement présent dans les graines des plantes adultes : il semble avoir un rôle dans la germination (Mashiguchi et al., 2009). *MAX1* code pour un cytochrome P450 (CYP), appartenant à la famille des CYP711A1 et est impliqué dans la synthèse d'autres enzymes chez *Arabidopsis*. Il est exprimé dans les plantules et les plantes adultes. Des études montrent que *MAX1* agit en aval de *MAX3* et *MAX4* (Booker et al., 2005). Le gène *MAX2* est exprimé dans les plantules et dans les plantes adultes (Stirnberg et al., 2002; Mashiguchi et al., 2009). Le gène *MAX2/RMS4/D3* a été identifié comme codant pour une protéine riche en leucine (Leucine Rich-Repeat LRR) de type SKP1-CUL1-F-box appartenant au complexe SCF, semblable au complexe SCF dans lequel la protéine TIR1 (Transport Inhibitor Receptor 1) participe (Stirnberg et al., 2002; Johnson et al., 2006). Des études suggèrent que la voie de réponse aux SLs nécessite l'ubiquitination de plusieurs protéines cibles de *MAX2* et leur dégradation dans le protéasome 26S.

Le mécanisme d'action de *MAX2* n'est toujours pas clair. Il est toutefois connu qu'en plus de la régulation des SLs, le gène *MAX2* est impliqué dans la sénescence des feuilles, la photomorphogénèse, et la germination des graines (Stirnberg et al., 2002; Ishikawa et al., 2005). En effet, il régule l'activité des karrikines, qui sont des dérivés buténolides issus de la végétation brûlée. Ces substances stimulent la germination des graines à des concentrations aussi faibles que 1 nM, et augmentent la sensibilité des plantes à la lumière (Flematti et al., 2004; Nelson et al., 2011). Comprendre comment *MAX2* influence l'activité des karrikines représente un intérêt pour la restauration écologique.

Deux protéines localisées dans les plastides, AtDWARF27 (*AtD27*) et AtDWARF14 (*AtD14*), ont été identifiées chez *Arabidopsis* (Waters et al., 2012a; Waters et al.,

2012b). Ces protéines, qui sont des homologues des protéines OsD27 et OsD14 identifiées chez le riz, interviennent dans la synthèse et la régulation des SLs, respectivement (Arite et al., 2009). En effet, AtD27 agit en amont des CCDs MAX3 et MAX4 en permettant la synthèse d'un précurseur des SLs, la carlactone, alors que AtD14 participe avec MAX2 pour influencer la régulation et l'activité des SLs (Waters et al., 2012a; Waters et al., 2012b).

Le contrôle de la formation des branches secondaires implique une autre protéine, la protéine BRC1 exprimée chez *Arabidopsis*. Elle a été identifiée suite à la caractérisation des orthologues *TEOSINTE BRANCHED1 (TB1)* du maïs et *FINECULMI (FC1)* chez le riz. Ces gènes appartiennent à la famille de facteurs de transcription TCP (*TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA, PROLIFERATING CELL FACTOR*) (Kosugi et Ohashi, 2002; Aguilar-Martinez et al., 2007). La protéine TB1 supprime le développement des branches secondaires chez le maïs, et les mutants *brc1* et *brc2* d'*Arabidopsis* présentent des phénotypes touffus. *BRC1* est principalement exprimé dans le bourgeon et est sous exprimé chez les mutants *brc1* (Aguilar-Martinez et al., 2007). La protéine BRC1 s'accumule aussi dans les feuilles de rosette et les organes floraux (Poza-Carrion et al., 2007).

La morphologie des plantes supérieures est établie dès leur embryogénèse, mais change continuellement en réponse aux conditions environnementales, notamment la température. Des études précédentes de notre laboratoire ont montré que des températures de croissance en-dessous (12 et 17°C) et au-dessus (27 et 32°C) de la température optimale de 22°C affectent la floraison et la ramification chez *Arabidopsis thaliana* (Antoun et Ouellet, 2013). De plus les plantes qui sont entrées dans la phase de reproduction sont moins affectées par des températures de croissance non optimales.

Les changements climatiques actuels qui affecteront le développement des plantes font que cette étude pourrait avoir un intérêt économique important. Il est nécessaire d'identifier et caractériser les liens directs entre les variations de température et les modifications physiologiques qui affectent la ramification chez *Arabidopsis*. Afin de pouvoir établir et caractériser ces liens, on s'est proposé d'étudier l'influence des variations de température sur l'expression des gènes impliqués dans le développement des bourgeons axillaires. Le but de cette étude est de déterminer l'effet de températures de croissance non optimales sur l'expression des gènes *MAX* et le gène *BRC1* chez *Arabidopsis*.

2.3 Matériels et méthodes

Design expérimental

Les plantes d'*Arabidopsis thaliana* écotype Columbia (Col-0) de type sauvage ont été cultivées en terre sous un éclairage de 100 μ E, une photopériode de 16 h (16 h jour et 8 h nuit), une humidité relative de 60%, et à 22°C (température contrôle) pendant 14 jours (t=0). Les plantes ont ensuite été conservées à 22°C ou transférées à 12°C, 17°C, 27°C ou 32°C pour une durée de 31 jours supplémentaires. Des plantes entières ont été récoltées et congelées à -80°C à différents temps (1, 11, 21, et 31 jours) après les transferts.

Extraction de l'ARN total et synthèse des ADNc

L'ARN total a été extrait par broyage de 150 mg de plantes entières avec de l'azote liquide, puis purifié avec la trousse d'extraction RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). Le protocole de la compagnie a été légèrement modifié par l'ajout de DTT dans le tampon d'extraction RLT. Après quantification par spectrophotométrie, la qualité a été vérifiée par électrophorèse sur gel dénaturant d'agarose 1,2%, en présence de formaldéhyde et de bromure d'éthidium. Après traitement à la DNase (Roche) pour éliminer l'ADN génomique contaminant, la trousse iScript (Bio-Rad) a permis d'obtenir des ADNc à l'aide du Thermocycler T1 (BIOMETRA).

PCR quantitative en temps réel

Les échantillons utilisés pour la RT-PCR proviennent d'au moins 3 plantes entières (en fonction de la taille et de l'âge des plantes) et toutes les manipulations ont été effectuées avec trois répliques biologiques et deux répliques techniques. La RT-PCR a

été effectuée sur chacun des gènes d'intérêt (*MAX1-MAX4* et *BRC1*), ainsi que sur les deux gènes de référence *EF-1a* et *RNA18S* dans des plaques de 96 puits à l'aide d'un appareil de PCR quantitative en temps réel CFX96 (Bio-Rad). Les paires d'amorces utilisées pour l'étude sont présentées dans le Tableau 2.1. Plusieurs phases d'optimisation de température ($T_m \pm 5^\circ\text{C}$, avec intervalles de $0,5^\circ\text{C}$) et de concentration d'amorces (entre 50 et 600 nM) ont été nécessaires pour chacune des paires d'amorces. De plus, des courbes standard dont l'efficacité de PCR doit être comprise entre 95% et 105% et dont le coefficient de corrélation doit être supérieur ou égal à 0,980 ont été indispensables pour valider et confirmer les conditions de PCR. L'amplification qPCR a été faite en utilisant la trousse SsoFast de Bio-Rad (basée sur le SYBR Green). Les gènes ARNr18S et EF1- α ont été utilisés comme contrôles internes des concentrations d'ADNc pour chaque échantillon de notre expérience. Les résultats de la qPCR ont été analysés avec le logiciel CFX Manager (Bio-Rad). La qualité et la validité des amplicons ont été vérifiées sur gel d'agarose 1,2% dans du TAE.

Tableau 2.1 : Paires d'amorces utilisées pour cette étude. Plusieurs paires d'amorces différentes ont été testées mais seules les amorces retenues sont présentées. Les gènes EF1a et ARNr18S ont été utilisés comme gènes de référence.

Gène	Oligo 5'	Oligo 3'	Taille des amplicons (pb)
<i>MAX1</i>	CCTCGATCAGGTCATTAAGAGGC	CCCATGTCCCCTTTGGGA	115
<i>MAX2</i>	TGTTTCCCTTTCGTCGAGTC	TCTGAGAAGCTCGTTGATGC	126
<i>MAX3</i>	ACACTCCGGAAACGCTTATG	TCGGTAAGAACAAGCGGAAG	81
<i>MAX4</i>	ATGGTCACGACGTTTTACCC	GATGCTGCACATATCCATCG	130
<i>BRC1</i>	GTCTCATATCCGACCGGTGTTAGG	CTTGTTTCGGTTCGTGTTAGTATTGC	101
<i>EF-1a</i>	TGAGCACGCTCTTCTTGCTTTCA	GGTGGTGGCATCCATCTTGTTACA	75
<i>ARNr18S</i>	TCTGGGCCGACGCGCGCTA	ACCCGGGCCTGTCCGCAAGGT	65

Analyses statistiques

Pour comparer le niveau d'expression relative de chaque gène en fonction des différentes températures, nous avons utilisé le système d'analyse fourni par le programme CFX96 (Bio-Rad). Les valeurs obtenues sont le résultat de 3 réplicas biologiques et de 2 réplicas techniques. Les gènes *EF-1 α* et *ARNr18S* ont servi de gènes de référence (coefficient de variance <0.5 et moyenne <1). Le test T de Student a permis de comparer les moyennes obtenues pour les différents traitements.

2.4 Résultats

Plusieurs études renseignent déjà sur la localisation de l'expression des différents gènes *MAX* (Stirnberg et al., 2002; Mashiguchi et al., 2009), mais aucune étude n'a rapporté l'effet de la température sur cette expression. Les résultats présentés ici ont été obtenus suite à l'extraction d'ARNm, la conversion en ADNc et enfin la PCR quantitative sur l'appareil CFX96 de Bio-Rad. Ils permettent de suivre l'évolution des niveaux d'expression des gènes *MAX1/2/3/4* et de *BRC1*, sur 31 jours de croissance à différentes températures. Il s'agit ici de comparer les niveaux d'expression des différents gènes dans les conditions optimales de croissance, et les variations observées d'une température à une autre.

La condition optimale de croissance généralement utilisée pour la plante *Arabidopsis* est de 22°C. Les résultats obtenus à cette température sont donc considérés comme la situation contrôle. Le niveau d'expression du gène *MAX1* augmente progressivement avec l'âge de la plante sur les 31 jours de l'expérience (Figure 2.1). L'expression de *MAX2* est très faible au jour 1, mais elle augmente jusqu'au jour 21, et diminue par la suite (Figure 2.2). Pour le gène *MAX3*, on n'observe pas de différence significative pendant toute la durée de croissance à cette température (Figure 2.3). Le gène *MAX4* est faiblement exprimé au cours des 21 premiers jours de croissance, et augmente sensiblement durant la dernière phase (Figure 2.4). Finalement, le gène *BRC1* est faiblement exprimé chez les très jeunes plantes d'*Arabidopsis* Col-0, mais l'expression augmente très rapidement entre le jour 1 et le jour 11 (Figure 2.5). Tout comme *MAX2*, on note une diminution d'expression entre les jours 21 et 31.

Le gène *MAX1* est principalement exprimé à 17 et 22°C

Si on compare l'évolution au cours du temps des niveaux d'expression des gènes en fonction de la température de croissance, il est possible d'observer une tendance. En effet pour le gène *MAX1*, on observe une différence significative pour les températures 12, 27 et 32°C (Figure 2.1). Les niveaux d'expression sont plus faibles à ces températures, comparativement aux plantes qui ont poussé à 17°C. À 27°C, l'ARNm de *MAX1* diminue progressivement sur les 31 jours de traitement. *MAX1* est plus faiblement exprimé aux températures 12, 27 et 32°C, qui constituent donc un stress chez la plante.

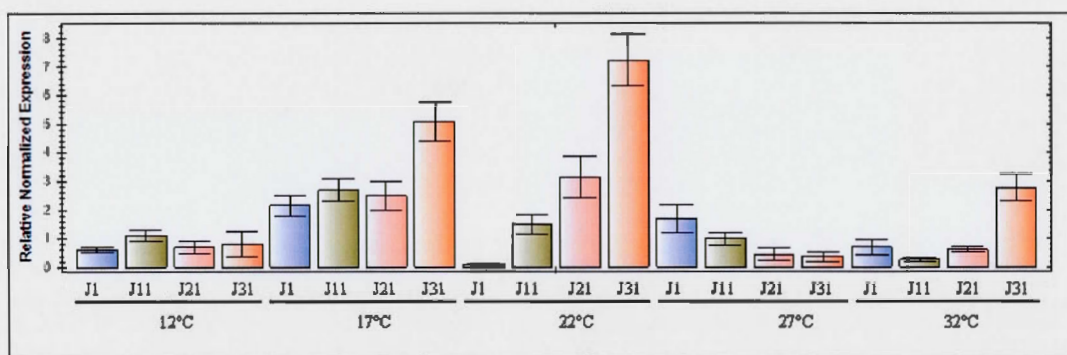


Figure 2.1 : Expression relative de *MAX1* chez *Arabidopsis* lors de l'exposition à différentes températures. Après 14 jours de germination à 22°C (t=0), les plantes *Arabidopsis thaliana* Col-0 ont été exposées aux différentes températures pour les temps indiqués, en jours. Les ARN totaux ont été extraits, convertis en ADNc, et la qPCR a été faite avec la trousse SsoFast et un appareil CFX96 (Bio-Rad). Les gènes *EF-1α* et *ARNr18S* ont servi de gènes contrôle (standards internes). Les valeurs obtenues sont des moyennes de 3 répliques biologiques et de 2 répliques expérimentaux. Les barres correspondent aux écart-types.

L'expression du gène *MAX2* est presque totalement inhibée à 12 et 32°C

L'abondance de branches latérales en élongation sur une plante est contrôlée par l'action des SLs, et *MAX2* est considéré comme un effecteur potentiel des SLs. Le profil d'expression du gène *MAX2* montre qu'à la température de 17°C, le niveau d'expression est plus faible qu'à 22°C (Figure 2.2). Par contre, on note une augmentation d'expression entre les jours 21 et 31 alors qu'on observe une diminution dans cette période à 22°C. À 27°C, les niveaux d'expression sont plus faibles qu'à 22°C. Aux températures de 12 et 32°C, *MAX2* n'est presque pas exprimé peu importe le stade de développement.

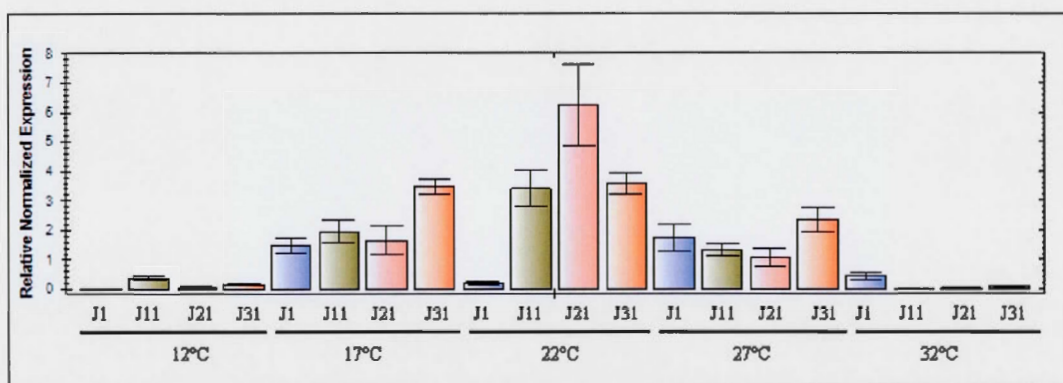


Figure 2.2 : Expression relative de *MAX2* chez *Arabidopsis* lors de l'exposition à différentes températures. Après 14 jours de germination à 22°C (t=0), les plantes *Arabidopsis thaliana* Col-0 ont été exposées aux différentes températures pour les temps indiqués, en jours. Les ARN totaux ont été extraits, convertis en ADNc, et la qPCR a été faite avec la trousse SsoFast (Bio-Rad). Les gènes EF-1alpha et rRNA18S ont servi de gènes contrôle (standard interne). Les valeurs obtenues sont des moyennes de 3 réplicas biologiques et de 2 réplicas expérimentaux. Les barres correspondent aux écart-types.

L'expression du gène *MAX3* est moins affectée par la température de croissance

Le gène *MAX3* est exprimé dans toutes les conditions de croissance, même s'il est intéressant de voir que comme *MAX2*, il est le plus faiblement exprimé à 12 et 32°C. Le niveau d'expression relative de *MAX3* à 17°C est légèrement plus élevé qu'à 22°C (Figure 2.3).

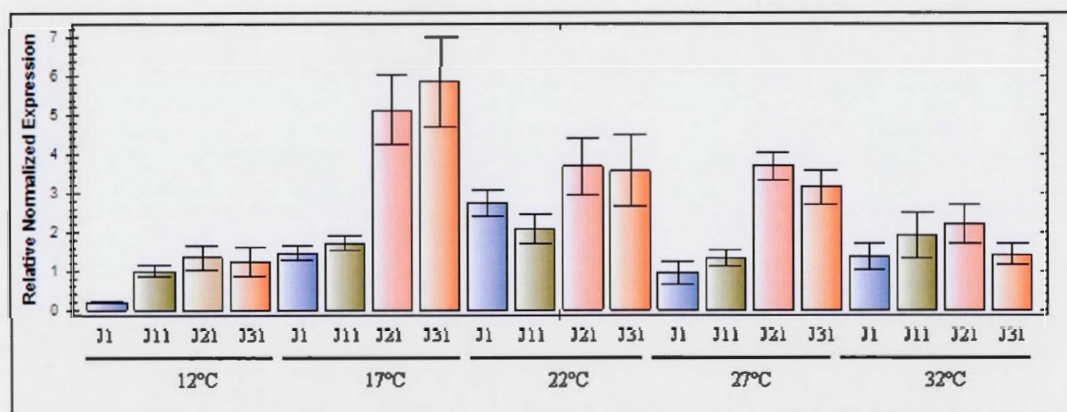


Figure 2.3 : Expression relative de *MAX3* chez *Arabidopsis* lors de l'exposition à différentes températures. Après 14 jours de germination à 22°C (t=0), les plantes *Arabidopsis thaliana* Col-0 ont été exposées aux différentes températures pour les temps indiqués, en jours. Les ARN totaux ont été extraits, convertis en ADNc, et la qPCR a été faite avec la trousse SsoFast (Bio-Rad). Les gènes EF-1alpha et rRNA18S ont servi de gènes contrôle (standard interne). Les valeurs obtenues sont des moyennes de 3 réplicas biologiques et de 2 réplicas expérimentaux. Les barres correspondent aux écart-types.

Le niveau du messager de *MAX4* est faible à toutes les températures

Contrairement au gène *MAX3*, les niveaux d'expression pour le gène *MAX4* sont faibles à toutes les températures. Il est à noter que l'échelle d'expression relative diffère de l'échelle pour les autres gènes testés. À 12, 17 et 22°C, le signal le plus fort est détecté au 31^{ème} jour, avec plus d'ARNm *MAX4* à 17°C (Figure 2.4). À 27 et

32°C, l'expression maximale est observée au 21^{ème} jour de croissance. Il est intéressant de constater que *MAX3* et *MAX4* ont des tendances complètement différentes, malgré qu'ils codent pour deux enzymes CCD semblables impliquées dans les premières étapes de synthèse des SLs.

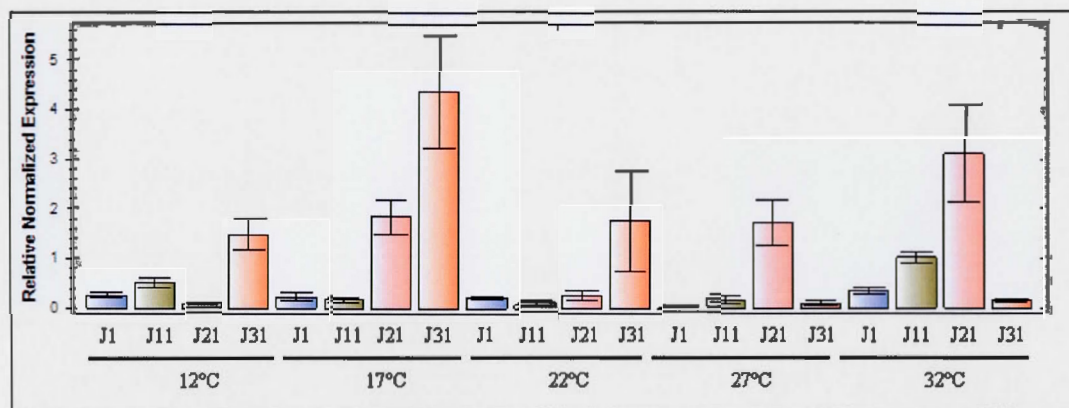


Figure 2.4 : Expression relative de *MAX4* chez *Arabidopsis* lors de l'exposition à différentes températures. Après 14 jours de germination à 22°C (t=0), les plantes *Arabidopsis thaliana* Col-0 ont été exposées aux différentes températures pour les temps indiqués, en jours. Les ARN totaux ont été extraits, convertis en ADNc, et la qPCR a été faite avec la trousse SsoFast (Bio-Rad). Les gènes *EF-1alpha* et *RNA18S* ont servi de gènes contrôle (standard interne). Les valeurs obtenues sont des moyennes de 3 répliques biologiques et de 2 répliques expérimentaux. Les barres correspondent aux écart-types.

L'expression de *BRC1* est sensible aux températures 12, 27 et 32°C

La protéine BRC1 est localisée dans le bourgeon et des études rapportent que dans des conditions de croissance optimales, l'expression du gène diminue avec le développement du bourgeon (Aguilar-Martinez et al., 2007; Finlayson, 2007). Dans notre étude, nous avons utilisé des plantes entières. Nous avons aussi observé une diminution de l'expression en fonction du temps de croissance pour les plantes d'*Arabidopsis* à 22°C (Figure 2.5). Par contre, ce n'est pas le cas pour les

températures 12, 17, 27 et 32°C. Dans ces conditions, une même tendance est observée : il y a une augmentation significative jusqu'au jour 31, bien que le signal soit beaucoup plus faible à 12°C. Ces données permettent de dire que l'expression de l'ARNm de *BRC1* est très sensible à la température.

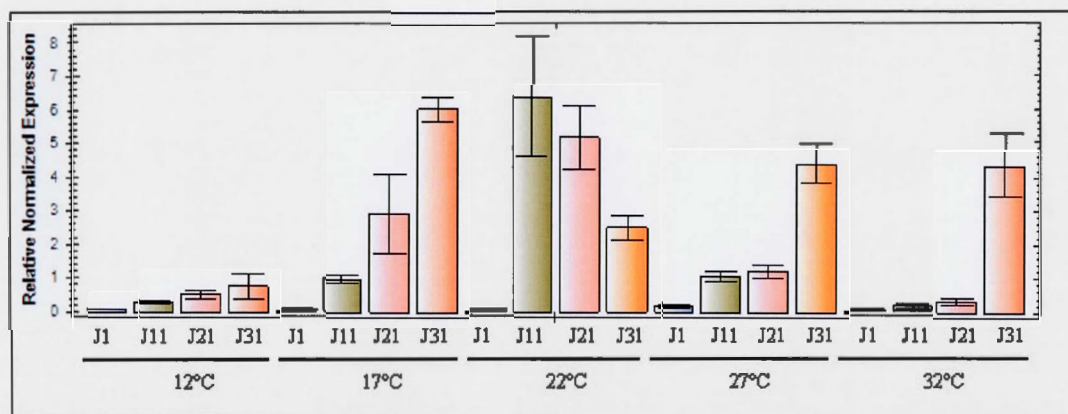


Figure 2.5: Expression relative de *BRC1* chez *Arabidopsis* lors de l'exposition à différentes températures. Après 14 jours de germination à 22°C (t=0), les plantes *Arabidopsis thaliana* Col-0 ont été exposées aux différentes températures pour les temps indiqués, en jours. Les ARN totaux ont été extraits, convertis en ADNc, et la qPCR a été faite avec la trousse SsoFast (Bio-Rad). Les gènes EF-1alpha et rRNA18S ont servi de gènes contrôle (standard interne). Les valeurs obtenues sont des moyennes de 3 répliques biologiques et de 2 répliques expérimentaux. Les barres correspondent aux écart-types.

2.5 Discussion

Dans le contrôle du développement des bourgeons axillaires, différentes hormones et différents signaux internes travaillent en parallèle pour le contrôle de la levée de dormance des bourgeons. En effet, il est établi depuis longtemps que la présence d'auxine apicale (synthétisée dans l'apex de la tige) à proximité d'un bourgeon axillaire dormant, et la présence d'auxine synthétisée à l'intérieur du bourgeon, empêchent son développement. L'auxine doit être exportée du bourgeon et entraînée dans la voie de transport de l'auxine dans la tige principale pour permettre la levée de dormance. Toutefois, l'action de l'auxine est supportée par la présence d'un signal longue distance qui part des racines, les SLs, qui vont inhiber la formation des branches (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008; Brewer et al., 2009). L'application directe de SLs sur des bourgeons inhibe leur développement.

En plus du contrôle hormonal de la plante, la température affecte la croissance et le développement des plantes (Thingnaes et al., 2003; Antoun et Ouellet, 2013), et chez *Arabidopsis*, il est recommandé de faire pousser les plantes entre 21-23°C, pour des conditions optimales. De ce fait, des températures de croissance inférieures (12 et 17°C) ou supérieures (27 et 32°C) peuvent dans certains cas constituer des situations de stress pour les plantes (Antoun et Ouellet, 2013). L'analyse des résultats qui va suivre s'est faite par comparaison aux plantes ayant poussé à 22°C.

Des études rapportent que bien que l'expression des gènes de biosynthèse des SLs survienne principalement dans les racines des plantes, il est possible de détecter ces messagers au niveau des tiges, des feuilles et de l'hypocotyle. Par exemple chez le riz, les messagers *D10* (qui code pour une CCD8) et *HTD1* (qui code pour une CCD7) ont été détectés au niveau du système vasculaire de la tige (Arite et al., 2007). Cette expression généralisée des gènes de biosynthèse des SLs dans une plante lui

permet de contrôler simultanément divers mécanismes impliquant l'action des SLs. Travailler avec des plantes entières dans notre étude permet d'avoir une vision générale des niveaux d'expression des gènes *MAX*, en fonction des températures de croissance.

Les SLs sont dérivées de la transformation de caroténoïdes, et les gènes *MAX3* et *MAX4* sont impliqués dans leur voie de synthèse (Matusova et al., 2005). Ces gènes codent pour les dioxygénases qui clivent les caroténoïdes (CCD), à savoir CCD7 (*MAX3*) et CCD8 (*MAX4*), qui sont nécessaires dès les premières étapes de la synthèse des SLs (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008). Notre étude montre que, comparé aux niveaux des messagers des autres gènes *MAX*, les messagers *MAX3* ont les niveaux les plus constants et ce, à toutes les températures. Toutefois, bien que l'ARNm de *MAX3* soit toujours détecté, l'expression est significativement plus faible à 12 et 32°C, des températures qui constituent de ce fait des situations de stress pour la plante. Le fait que CCD7 intervienne dans la première étape de synthèse expliquerait peut être qu'il soit toujours détecté, peu importe la température de croissance (Sorefan et al., 2003; Snowden et al., 2005). À la température de 22°C, les niveaux d'expression des ARNm de *MAX3* et *MAX4* sont significativement différents.

Des études précédentes menées par notre laboratoire ont montré que les plantes d'*Arabidopsis* poussant à 27 et 32°C ont les phénotypes les plus touffus (Antoun et Ouellet, 2013). Le niveau d'expression relative du messenger de *MAX2* est beaucoup plus faible à 27°C et presque inexistant à 32°C, comparativement au contrôle. Le faible niveau d'expression de *MAX2* à ces températures pourrait expliquer le phénotype touffu des plantes ayant poussé à 27 et 32°C. *MAX2* est aussi exprimé à un niveau plus faible à 17°C comparativement à 22°C, mais cette température n'affecte pas l'architecture de l'inflorescence (Antoun et Ouellet, 2013). Il est intéressant de

noter qu'à 17°C, l'expression de *MAX1* est sensiblement la même qu'à 22°C. Toutefois, l'expression de *MAX1* est grandement diminuée à 27°C. Il semble donc qu'une diminution combinée de l'expression de *MAX1* et *MAX2* soit nécessaire pour favoriser le développement des branches latérales et un phénotype touffu.

Les études de Boyes et ses collaborateurs ont indiqué qu'*Arabidopsis* est en phase végétative jusqu'au 25^e jour, et que l'émergence des premiers bourgeons de fleurs ne survient qu'à partir du 26^e jour (Boyes et al., 2001). D'autres études montrent que les plantes doivent atteindre leur taille maximale (donc avoir terminé le développement des entrenoeuds) avant de pouvoir former les bourgeons floraux, et que cette taille dépend de la température de croissance (Antoun et Ouellet, 2013). D'après nos présents résultats, les niveaux d'expression des gènes sont toujours plus faibles à la température 12°C, en comparaison avec les plantes contrôle, et ce durant toute la durée du traitement. Il est intéressant de voir que l'expression du messager *MAX2* est très affectée à 12°C (Figure 2.2). Par contre, les plantes ayant poussé à 12°C ne présentent pas plus de branches (Antoun et Ouellet, 2013). À cette température, les plantes montrent un nombre plus élevé de bourgeons au niveau de la rosette, mais un nombre plus faible de bourgeons sur les branches de la rosette et caulinaires.

Pour le messager *BRC1*, il est surprenant d'observer que seules les plantes ayant poussé à 22°C présentent un profil d'expression qui diminue au cours du temps, comme rapporté dans la littérature (Aguilar-Martinez et al., 2007; Finlayson, 2007). En effet, les ARNm de *BRC1* et *BRC2* (surtout *BRC1*) sont détectés dans le bourgeon axillaire après la floraison, puis diminuent avec l'élongation des branches de la plante dans les conditions optimales de croissance (Aguilar-Martinez et al., 2007). D'après nos résultats, et ce pour toutes les températures autres que 22°C, le niveau d'expression a tendance à augmenter sur les 31 jours de traitement, bien que les bourgeons axillaires soient déjà développés. Les températures non-optimales

semblent stimuler la synthèse ou le maintien de *BRC1* dans le temps. Il pourrait aussi s'agir de *BRC* qui sont aussi localisées dans les fleurs et les siliques (Aguilar-Martinez et al., 2007).

Nos résultats montrent que des températures non-optimales de croissance affectent l'expression relative des gènes impliqués dans la synthèse et la régulation des SLs, et du gène *BRC1*. Les travaux antérieurs de notre laboratoire ont montré qu'à des températures de croissance élevées, les plantes présentent un phénotype touffu. Cette observation est probablement liée à la diminution du niveau d'expression des gènes clés du contrôle des SLs. Tous ces éléments réunis permettent une avancée dans la compréhension de l'influence de la température sur le contrôle hormonal de la ramification chez *Arabidopsis*.

2.6 Remerciements

Nous aimerions remercier Sean Taylor, analyste chez Bio-Rad, pour son aide dans l'optimisation de la qPCR. Ce travail a été supporté par le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et Génie du Canada (FO).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Il est établi depuis longtemps que les facteurs environnementaux, notamment la température, influencent la ramification des plantes. Les strigolactones et la protéine *BRC1* ont été reconnues et établies comme des régulateurs endogènes qui sont impliqués dans l'inhibition de cette ramification. Les études précédentes faites par notre laboratoire ont permis de dire qu'en fonction des températures de croissance, *Arabidopsis* est capable de changer sa morphologie (Antoun et Ouellet, 2013). La présente étude avait pour objectif de faire le lien entre ces modifications phénotypiques et les marqueurs moléculaires *MAX1*, *MAX2*, *MAX3* et *MAX4*, des gènes impliqués dans la synthèse et la signalisation des SLs, et le gène *BRC1*. Ces gènes codent pour des protéines qui contrôlent négativement la ramification.

Les principaux résultats montrent que l'expression de certains gènes semble plus sensible que celle d'autres gènes aux variations de température. En effet, si les gènes *MAX3* et *MAX4* présentent plus ou moins les mêmes profils à toutes les températures, les gènes *MAX1*, *MAX2* et *BRC1* ont des diminutions d'expression importantes aux températures extrêmes. De plus, nous avons montré que des plantes qui poussent à 17°C montrent un niveau de ramification plus faible, tandis que celles qui poussent à 27 et 32°C ont un niveau de ramification plus important. Cette étude nous a permis d'établir un premier lien entre la sous-expression du gène *MAX2* à 27 et 32°C, et le phénotype touffu d'*Arabidopsis* à ces températures. L'ensemble de nos résultats nous permet de suggérer que la température affecte l'élongation des branches secondaires à travers l'action des strigolactones.

Il est connu que l'expression des gènes de biosynthèse des SLs survient dans toute la plante mais principalement dans les racines, où elles sont synthétisées. Utiliser la

plante entière permet d'avoir une idée globale de la réponse des différents gènes à la température de croissance. Dans le but de peaufiner nos résultats, il serait nécessaire de réaliser les études d'expression des différents gènes à partir des racines, des parties aériennes, et des noeuds de nos plantes, suivant les mêmes traitements.

Récemment, deux autres membres se sont ajoutés à la voie MAX. Des études montrent que le gène *OsD27* a aussi un orthologue chez la luzerne, *MtD27* (Liu et al., 2011) et chez *Arabidopsis* (Waters et al., 2012a). D'autre part, il a été montré que la protéine *AtD14* est localisée dans les mêmes tissus et les mêmes cellules que le messager de *MAX2*, ce qui suppose des interactions « physiques » entre les deux protéines (Chevalier et al., 2014). On pourrait dans un complément d'études effectuer une étude d'expression génétique, similaire à celle présentée dans ce travail, avec les gènes codant pour les protéines *AtD14* (At3g03990) et *AtD27* (At1g03055). Ces protéines sont aussi impliquées dans la biosynthèse et la régulation des SLs. Avec des plantes qui auraient poussé dans les mêmes conditions que celles de notre étude, il faudrait faire une extraction d'ARN suivie d'une RT-qPCR. On suggère des paires d'amorces, dessinées avec le logiciel Primer3, pour l'amplification des gènes :

Gènes	Oligo 5'	Oligo 3'
<i>AtD27</i>	TCTCTGTTCAAAGCCCGTCT	TTACGCGAAACCCTAGTTGC
<i>AtD14</i>	CGGAATCCAAAACGTGTGCTT	GAACATCAGCTCCAACAGCA

En considérant les résultats obtenus, il est possible de dire qu'augmenter la température de croissance d'*Arabidopsis* (>22°C) augmente le taux de ramification. Cependant, dans des conditions de croissance naturelles, il est impossible de contrôler les températures de croissance. Il serait intéressant de déterminer des variants naturels capables de mimer ce phénomène. Le TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes) serait une méthode alternative et naturelle de génétique inverse, n'incluant pas de modifications transgéniques (Henikoff et al., 2004). Déjà applicable chez

Arabidopsis thaliana, *Zea mays* (Till et al., 2004), *Oryza sativa* (Till et al., 2007), et la drosophile (Till et al., 2006), le TILLING permet de générer des séries d'allèles de mutations de gènes spécifiques, et ainsi créer une banque de mutants capables de mimer l'action de *MAX2* à des températures élevées.

Toujours dans un souci de complément d'étude, il faudrait pousser l'analyse au niveau moléculaire. Par exemple, on pourrait orienter les recherches au niveau des éléments de régulation des gènes *MAX* et *BRC1*. Des études faites par notre laboratoire sur les régions promotrices des gènes *MAX2*, *MAX4* et *BRC1* ont permis de dire que le gène *AtAP1* (*APETALA1*), appartenant à la famille des MADS et codant pour un facteur de transcription, reconnaît des motifs CArG des régions promotrices de *AtMAX4* et *AtBRC1* et serait capable de moduler leur expression. Il serait intéressant d'identifier les facteurs qui agissent en amont d'*AtAP1* dans la voie de réponse impliquée dans la ramification.

RÉFÉRENCES

- Aguilar-Martinez JA, Poza-Carrion C et Cubas P. 2007. «Arabidopsis BRANCHED1 acts as an integrator of branching signals within axillary buds». *The Plant Cell* 19: 458-472.
- Akiyama K, Matsuzaki K et Hayashi H. 2005. «Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi». *Nature* 435: 824-827.
- Alonso-Blanco C, Aarts MG, Bentsink L, Keurentjes JJ, Reymond M, Vreugdenhil D et Koornneef M. 2009. «What has natural variation taught us about plant development, physiology, and adaptation?». *The Plant Cell* 21: 1877-1896.
- Antoun M et Ouellet F. 2013. «Growth temperature affects inflorescence architecture in *Arabidopsis thaliana*». *Botany* 91: 642-651.
- Arite T, Iwata H, Ohshima K, Maekawa M, Nakajima M, Kojima M, Sakakibara H et Koyuzuka J. 2007. «DWARF10, an RMS1/MAX4/DAD1 ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice». *The Plant Journal* 51: 1019-1029.
- Arite T, Umehara M, Ishikawa S, Hanada A, Maekawa M, Yamaguchi S et Koyuzuka J. 2009. «*d14*, a strigolactone-insensitive mutant of rice, shows an accelerated outgrowth of tillers». *Plant and Cell Physiology* 50: 1416-1424.
- Auldrige ME, McCarty DR et Klee HJ. 2006. «Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products». *Current Opinion in Plant Biology* 9: 315-321.
- Balla J, Kalousek P, Reinohl V, Friml J et Prochazka S. 2011. «Competitive canalization of PIN-dependent auxin flow from axillary buds controls pea bud outgrowth». *The Plant Journal* 65: 571-577.
- Ballas N, Wong LM et Theologis A. 1993. «Identification of the auxin-responsive element, AuxRE, in the primary indoleacetic acid-inducible gene, PS-IAA4/5, of pea (*Pisum sativum*)». *Journal of Molecular Biology* 233: 580-596.
- Bandyopadhyay A, Blakeslee JJ, Lee OR, Mravec J, Sauer M, Titapiwatanakun B, Makam SN, Bouchard R, Geisler M, Martinoia E, Friml J, Peer WA et Murphy AS. 2007. «Interactions of PIN and PGP auxin transport mechanisms». *Biochemical Society Transactions* 35: 137-141.

- Bennett MJ, Marchant A, Green HG, May ST, Ward SP, Millner PA, Walker AR, Schulz B et Feldmann KA. 1996. «Arabidopsis AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism». *Science* 273: 948-950.
- Bennett T, Sieberer T, Willett B, Booker J, Luschnig C et Leyser O. 2006. «The Arabidopsis MAX pathway controls shoot branching by regulating auxin transport». *Current Biology* 16: 553-563.
- Bennett TA, Crawford SR, Ward SP et Leyser O. 2001. «Shoot branching and plant architecture». In eLS. John Wiley & Sons, Ltd, 10.1002/9780470015902.a0020122.
- Beveridge CA, Ross JJ et Murfet IC. 1994. «Branching mutant *rms-2* in *Pisum sativum* (grafting studies and endogenous indole-3-acetic acid levels)». *Plant Physiology* 104: 953-959.
- Booker J, Auldridge M, Wills S, McCarty D, Klee H et Leyser O. 2004. «MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule». *Current Biology* 14: 1232-1238.
- Booker J, Sieberer T, Wright W, Williamson L, Willett B, Stirnberg P, Turnbull C, Srinivasan M, Goddard P et Leyser O. 2005. «MAX1 encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of MAX3/4 to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone». *Developmental Cell* 8: 443-449.
- Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR et Görlach J. 2001. «Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants». *The Plant Cell* 13: 1499-1510.
- Brewer PB, Dun EA, Ferguson BJ, Rameau C et Beveridge CA. 2009. «Strigolactone acts downstream of auxin to regulate bud outgrowth in pea and Arabidopsis». *Plant Physiology* 150: 482-493.
- Carabelli M, Possenti M, Sessa G, Ciolfi A, Sassi M, Morelli G et Ruberti I. 2007. «Canopy shade causes a rapid and transient arrest in leaf development through auxin-induced cytokinin oxidase activity». *Genes & Development* 21: 1863-1868.
- Chang W et Goodin J. 1974. «The role of root system in lateral bud growth of pea *Pisum sativum* L., variety Alaska». *Botanical Bulletin* 15 112-122.
- Cheng X, Ruyter-Spira C et Bouwmeester H. 2013. «The interaction between strigolactones and other plant hormones in the regulation of plant development». *Frontiers in Plant Science* 4: 199.

Chevalier F, Nieminen K, Sánchez-Ferrero JC, Rodríguez ML, Chagoyen M, Hardtke CS et Cubas P. 2014. «Strigolactone promotes degradation of DWARF14, an α/β hydrolase essential for strigolactone signaling in Arabidopsis». *The Plant Cell* 26: 1134-1150.

Chien JC et Sussex IM. 1996. «Differential regulation of trichome formation on the adaxial and abaxial leaf surfaces by gibberellins and photoperiod in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh». *Plant Physiology* 111: 1321-1328.

Crawford S, Shinohara N, Sieberer T, Williamson L, George G, Hepworth J, Muller D, Domagalska MA et Leyser O. 2010. «Strigolactones enhance competition between shoot branches by dampening auxin transport». *Development* 137: 2905-2913.

Del Pozo JC, Dharmasiri S, Hellmann H, Walker L, Gray WM et Estelle M. 2002. «AXR1-ECR1-dependent conjugation of RUB1 to the Arabidopsis cullin AtCUL1 is required for auxin response». *The Plant Cell* 14: 421-433.

Devlin R. 1975. «Plant Physiology». *Plant Physiology*. D. Van Nostrand Company New York, NY USA.

Finlayson SA. 2007. «Arabidopsis TEOSINTE BRANCHED1-LIKE 1 regulates axillary bud outgrowth and is homologous to monocot TEOSINTE BRANCHED1». *Plant and Cell Physiology* 48: 667-677.

Flematti GR, Ghisalberti EL, Dixon KW et Trengove RD. 2004. «A compound from smoke that promotes seed germination». *Science* 305: 977.

Garcia-Garrido JM, Lenzemo V, Castellanos-Morales V, Steinkellner S et Vierheilig H. 2009. «Strigolactones, signals for parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi». *Mycorrhiza* 19: 449-459.

Geisler M et Murphy AS. 2006. «The ABC of auxin transport: the role of p-glycoproteins in plant development». *FEBS Letters* 580: 1094-1102.

Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pages V, Dun EA, Pillot JP, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais JC, Bouwmeester H, Becard G, Beveridge CA, Rameau C et Rochange SF. 2008. «Strigolactone inhibition of shoot branching». *Nature* 455: 189-194.

Greb T, Clarenz O, Schafer E, Muller D, Herrero R, Schmitz G et Theres K. 2003. «Molecular analysis of the *LATERAL SUPPRESSOR* gene in Arabidopsis reveals a

conserved control mechanism for axillary meristem formation». *Genes & Development* 17: 1175-1187.

Heide OM et Prestrud AK. 2005. «Low temperature, but not photoperiod, controls growth cessation and dormancy induction and release in apple and pear». *Tree Physiology* 25: 109-114.

Henikoff S, Till BJ et Comai L. 2004. «TILLING. Traditional mutagenesis meets functional genomics». *Plant Physiology* 135: 630-636.

Ishikawa S, Maekawa M, Arite T, Onishi K, Takamura I et Koyuzuka J. 2005. «Suppression of tiller bud activity in tillering dwarf mutants of rice». *Plant & Cell Physiology* 46: 79-86.

Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M, Kato T, Tabata S, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K et Shinozaki K. 2001. «Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*». *The Plant Journal* 27: 325-333.

Jeong S et Clark SE. 2005. «Photoperiod regulates flower meristem development in *Arabidopsis thaliana*». *Genetics* 169: 907-915.

Johnson X, Bricch T, Dun EA, Goussot M, Haurogne K, Beveridge CA et Rameau C. 2006. «Branching genes are conserved across species. Genes controlling a novel signal in pea are coregulated by other long-distance signals». *Plant Physiology* 142: 1014-1026.

Jones R et Schreiber BN. 1997. «Role and function of cytokinin oxidase in plants». *Plant Growth Regulation* 23: 123-134.

Kosugi S et Ohashi Y. 2002. «DNA binding and dimerization specificity and potential targets for the TCP protein family». *The Plant Journal* 30: 337-348.

Leibfried A, To JP, Busch W, Stehling S, Kehle A, Demar M, Kieber JJ et Lohmann JU. 2005. «WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators». *Nature* 438: 1172-1175.

Leyser HMO, Lincoln CA, Timpte C, Lammer D, Turner J et Estelle M. 1993. «*Arabidopsis* auxin-resistance gene *AXR1* encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1». *Nature* 364: 161-164.

Li X, Qian Q, Fu Z, Wang Y, Xiong G, Zeng D, Wang X, Liu X, Teng S, Hiroshi F, Yuan M, Luo D, Han B et Li J. 2003. «Control of tillering in rice». *Nature* 422: 618-621.

Lin H, Wang R, Qian Q, Yan M, Meng X, Fu Z, Yan C, Jiang B, Su Z, Li J et Wang Y. 2009. «DWARF27, an iron-containing protein required for the biosynthesis of strigolactones, regulates rice tiller bud outgrowth». *The Plant Cell* 21: 1512-1525.

Lincoln C, Britton JH et Estelle M. 1990. «Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*». *The Plant Cell* 2: 1071-1080.

Liu W, Kohlen W, Lillo A, Op den Camp R, Ivanov S, Hartog M, Limpens E, Jamil M, Smaczniak C, Kaufmann K, Yang WC, Hooiveld GJ, Charnikhova T, Bouwmeester HJ, Bisseling T et Geurts R. 2011. «Strigolactone biosynthesis in *Medicago truncatula* and rice requires the symbiotic GRAS-type transcription factors NSP1 and NSP2». *The Plant Cell* 23: 3853-3865.

Marchant A, Bhalerao R, Casimiro I, Eklof J, Casero PJ, Bennett M et Sandberg G. 2002. «AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling». *The Plant Cell* 14: 589-597.

Mashiguchi K, Sasaki E, Shimada Y, Nagae M, Ueno K, Nakano T, Yoneyama K, Suzuki Y et Asami T. 2009. «Feedback-regulation of strigolactone biosynthetic genes and strigolactone-regulated genes in *Arabidopsis*». *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 73: 2460-2465.

Matusova R, Rani K, Verstappen FWA, Franssen MCR, Beale MH et Bouwmeester HJ. 2005. «The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanche spp.* are derived from the carotenoid pathway». *Plant Physiology* 139: 920-934.

Mravec J, Kubes M, Bielach A, Gaykova V, Petrasek J, Skupa P, Chand S, Benkova E, Zazimalova E et Friml J. 2008. «Interaction of PIN and PGP transport mechanisms in auxin distribution-dependent development». *Development* 135: 3345-3354.

Müller D et Leyser O. 2011. «Auxin, cytokinin and the control of shoot branching». *Annals of Botany* 107: 1203-1212.

Nelson DC, Scaffidi A, Dun EA, Waters MT, Flematti GR, Dixon KW, Beveridge CA, Ghisalberti EL et Smith SM. 2011. «F-box protein MAX2 has dual roles in

- karrikin and strigolactone signaling in *Arabidopsis thaliana*». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 8897-8902.
- Okada K, Ueda J, Komaki MK, Bell CJ et Shimura Y. 1991. «Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation». *The Plant Cell* 3: 677-684.
- Ongaro V et Leyser O. 2008. «Hormonal control of shoot branching». *Journal of Experimental Botany* 59: 67-74.
- Otsuga D, DeGuzman B, Prigge MJ, Drews GN et Clark SE. 2001. «REVOLUTA regulates meristem initiation at lateral positions». *The Plant Journal* 25: 223-236.
- Peer WA et Murphy AS. 2007. «Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators?». *Trends in Plant Science* 12: 556-563.
- Poincelot RP. 1980. «Horticulture: Principles and Practices». *Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, Inc* p. 87-119.
- Poza-Carrion C, Aguilar-Martinez JA et Cubas P. 2007. «Role of TCP gene *BRANCHED1* in the control of shoot branching in *Arabidopsis*». *Plant Signaling & Behavior* 2: 551-552.
- Raven PH, Evert RF et Eichhorn SE. 2000. «Biologie végétale». De Boeck, Bruxelles, Belgique.
- Robert HS et Friml J. 2009. «Auxin and other signals on the move in plants». *Nature Chemical Biology* 5: 325-332.
- Roberts EH. 1988. «Temperature and seed germination». *Symposia of the Society for Experimental Biology* 42: 109-132.
- Sachs T. 1967. «The role of auxins and cytokinins in the release of buds from dominance». *American Journal of Botany* 4: 136-144.
- Sachs T. 1968. «On the determination of the pattern of vascular tissue in peas». *Annals of Botany* 781-790.
- Samach A, Onouchi H, Gold SE, Ditta GS, Schwarz-Sommer Z, Yanofsky MF et Coupland G. 2000. «Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of *Arabidopsis*». *Science* 288: 1613-1616.

Santelia D, Vincenzetti V, Azzarello E, Bovet L, Fukao Y, Duchtig P, Mancuso S, Martinoia E et Geisler M. 2005. «MDR-like ABC transporter AtPGP4 is involved in auxin-mediated lateral root and root hair development». *FEBS Letters* 579: 5399-5406.

Schmitz G et Theres K. 2005. «Shoot and inflorescence branching». *Current Opinion in Plant Biology* 8: 506-511.

Schwartz SH, Qin X et Loewen MC. 2004. «The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from *Arabidopsis* indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching». *The Journal of Biological Chemistry* 279: 46940-46945.

Simons JL, Napoli CA, Janssen BJ, Plummer KM et Snowden KC. 2007. «Analysis of the *DECREASED APICAL DOMINANCE* genes of petunia in the control of axillary branching». *Plant Physiology* 143: 697-706.

Snowden KC, Simkin AJ, Janssen BJ, Templeton KR, Loucas HM, Simons JL, Karunairetnam S, Gleave AP, Clark DG et Klee HJ. 2005. «The *Decreased apical dominance1/Petunia hybrida CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8* gene affects branch production and plays a role in leaf senescence, root growth, and flower development». *The Plant Cell* 17: 746-759.

Sorefan K, Booker J, Haurogne K, Goussot M, Bainbridge K, Foo E, Chatfield S, Ward S, Beveridge C, Rameau C et Leyser O. 2003. «*MAX4* and *RMS1* are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in *Arabidopsis* and pea». *Genes & Development* 17: 1469-1474.

Stirnberg P, van De Sande K et Leyser HM. 2002. «*MAX1* and *MAX2* control shoot lateral branching in *Arabidopsis*». *Development* 129: 1131-1141.

Swarup R, Friml J, Marchant A, Ljung K, Sandberg G, Palme K et Bennett M. 2001. «Localization of the auxin permease *AUX1* suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex». *Genes & Development* 15: 2648-2653.

Talbert PB, Adler HT, Parks DW et Comai L. 1995. «The *REVOLUTA* gene is necessary for apical meristem development and for limiting cell divisions in the leaves and stems of *Arabidopsis thaliana*». *Development* 121: 2723-2735.

Tan BC, Joseph LM, Deng WT, Liu L, Li QB, Cline K et McCarty DR. 2003. «Molecular characterization of the Arabidopsis 9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase gene family». *The Plant Journal* 35: 44-56.

Tanaka M, Takei K, Kojima M, Sakakibara H et Mori H. 2006. «Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance». *The Plant Journal* 45: 1028-1036.

Terasaka K, Blakeslee JJ, Titapiwatanakun B, Peer WA, Bandyopadhyay A, Makam SN, Lee OR, Richards EL, Murphy AS, Sato F et Yazaki K. 2005. «PGP4, an ATP binding cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin transport in *Arabidopsis thaliana* roots». *The Plant Cell* 17: 2922-2939.

Thimann KV et Skoog F. 1933. «Studies on the growth hormone of plants: III. The inhibiting action of the growth substance on bud development». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 19: 714-716.

Thingnaes E, Torre S, Ernstsén A et Moe R. 2003. «Day and night temperature responses in Arabidopsis: effects on gibberellin and auxin content, cell size, morphology and flowering time». *Annals of Botany* 92: 601-612.

Till BJ, Cooper J, Tai TH, Colowit P, Greene EA, Henikoff S et Comai L. 2007. «Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING». *BMC Plant Biology* 7: 19.

Till BJ, Reynolds SH, Weil C, Springer N, Burtner C, Young K, Bowers E, Codomo CA, Enns LC, Odden AR, Greene EA, Comai L et Henikoff S. 2004. «Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING». *BMC Plant Biology* 4: 12.

Till BJ, Zerr T, Comai L et Henikoff S. 2006. «A protocol for TILLING and ecotilling in plants and animals». *Nature* 1: 2465-2477.

Titapiwatanakun B et Murphy AS. 2009. «Post-transcriptional regulation of auxin transport proteins: cellular trafficking, protein phosphorylation, protein maturation, ubiquitination, and membrane composition». *Journal of Experimental Botany* 60: 1093-1107.

To JP, Haberer G, Ferreira FJ, Deruere J, Mason MG, Schaller GE, Alonso JM, Ecker JR et Kieber JJ. 2004. «Type-A Arabidopsis response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling». *The Plant Cell* 16: 658-671.

Turnbull, CGN, Raymond, MAA, Dodd, Morris Ia et SE. 1997. «Rapid increases in cytokinin concentration in lateral buds of chickpea (*Cicer arietinum* L.) during release of apical dominance». *Planta* 202: 271-276.

Ulmasov T, Hagen G et Guilfoyle TJ. 1997a. «ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements». *Science* 276: 1865-1868.

Ulmasov T, Murfett J, Hagen G et Guilfoyle TJ. 1997b. «Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements». *The Plant Cell* 9: 1963-1971.

Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, Kyoizuka J et Yamaguchi S. 2008. «Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones». *Nature* 455: 195-200.

Verrier PJ, Bird D, Burla B, Dassa E, Forestier C, Geisler M, Klein M, Kolukisaoglu U, Lee Y, Martinoia E, Murphy A, Rea PA, Samuels L, Schulz B, Spalding EJ, Yazaki K et Theodoulou FL. 2008. «Plant ABC proteins--a unified nomenclature and updated inventory». *Trends in Plant Science* 13: 151-159.

Waters MT, Brewer PB, Bussell JD, Smith SM et Beveridge CA. 2012a. «The Arabidopsis ortholog of rice DWARF27 acts upstream of MAX1 in the control of plant development by strigolactones». *Plant Physiology* 159: 1073-1085.

Waters MT, Nelson DC, Scaffidi A, Flematti GR, Sun YK, Dixon KW et Smith SM. 2012b. «Specialisation within the DWARF14 protein family confers distinct responses to karrikins and strigolactones in Arabidopsis». *Development* 139: 1285-1295.

Waters MT et Smith SM. 2013. «KAI2- and MAX2-mediated responses to karrikins and strigolactones are largely independent of HY5 in Arabidopsis seedlings». *Molecular Plant* 6: 63-75.

Waters MT, Smith SM et Nelson DC. 2011. «Smoke signals and seed dormancy: where next for MAX2?». *Plant Signaling & Behavior* 6: 1418-1422.

Werner T, Motyka V, Strnad M et Schmülling T. 2001. «Regulation of plant growth by cytokinin». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 10487-10492.

Woo HR, Chung KM, Park JH, Oh SA, Ahn T, Hong SH, Jang SK et Nam HG. 2001. «ORE9, an F-box protein that regulates leaf senescence in Arabidopsis». *The Plant Cell* 13: 1779-1790.

Zazimalova E, Murphy AS, Yang H, Hoyerova K et Hosek P. 2010. «Auxin transporters--why so many?». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2: a001552.

Zhao Z, Andersen SU, Ljung K, Dolezal K, Miotk A, Schultheiss SJ et Lohmann JU. 2010. «Hormonal control of the shoot stem-cell niche». *Nature* 465: 1089-1092.