

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFET DE LA TEMPÉRATURE SUR LE DÉVELOPPEMENT
CHEZ *ARABIDOPSIS THALIANA*

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

MARLÈNE ANTOUN

AVRIL 2013

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 pour son soutien essentiel à la réalisation de ce mémoire.

Merci au Dr. Bertrand Fournier et au Prof. David Bird pour le service de consultation en analyse des données.

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
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	vii
RÉSUMÉ	viii
CHAPITRE I	
REVUE DE LITTÉRATURE	1
1.1 Introduction	1
1.2 Développement	2
1.2.1 Les différentes phases de développement chez <i>Arabidopsis</i>	4
1.2.2 Dormance et architecture de la plante	6
1.3 Croissance et gènes de régulation.....	7
1.3.1 Auxines.....	8
1.3.2 Cytokinines.....	10
1.3.3 Strigolactones	11
1.3.4 Gibbérellines et brassinostéroïdes	12
1.3.5 Gènes de régulation	13
1.4 Stress abiotiques : la température	18
1.5 Agronomie.....	21
1.6 L'étude présente.....	23
CHAPITRE II	
ARTICLE SCIENTIFIQUE: « GROWTH TEMPERATURE AFFECTS INFLORESCENCE ARCHITECTURE IN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> »	24
2.1 Abstract	26
2.2 Introduction	27
2.3 Materials and methods	31
2.4 Results	33

2.5 Discussion.....	39
2.6 Acknowledgments	43
2.7 Figure captions.....	43
2.8 Figures	49
CONCLUSION	60
RÉFÉRENCES	63

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Structure de la plante <i>Arabidopsis</i>	5
1.2 Transport polarisé de l'auxine	9
1.3 Voie de synthèse des strigolactones	15
1.4 Régulation du développement des bourgeons axillaires chez <i>Arabidopsis</i>	16
2.1 Growth regimes used in this study.....	49
2.2 Schematic representation of <i>Arabidopsis</i> architecture, shoot branches and shoot internode nomenclature	50
2.3 Effect of a continuous growth temperature on the elongation of shoot internodes and primary branches of cauline leaves of <i>Arabidopsis</i> plants treated from their vegetative stage.....	51
2.4 Effect of a continuous growth temperature on the elongation of shoot internodes and primary branches of cauline leaves of <i>Arabidopsis</i> plants treated from their reproductive stage.....	52
2.5 Effect of a transient exposure to various temperatures on the elongation of shoot internodes and primary branches of cauline leaves of <i>Arabidopsis</i> plants treated from their vegetative stage.....	53
2.6 Effect of a transient exposure to various temperatures on the elongation of shoot internodes and primary branches of cauline leaves of <i>Arabidopsis</i> plants treated from their reproductive stage	54
2.7 Effect of a continuous growth temperature on branching and flowering of <i>Arabidopsis</i> plants treated from their vegetative stage	55
2.8 Effect of a continuous growth temperature on branching and flowering of <i>Arabidopsis</i> plants treated from their reproductive stage.....	56
2.9 One-way ANOVA analysis of the effect of various growth regimes on internode (IN) length and total stem length in <i>Arabidopsis</i>	57
2.10 One-way ANOVA analysis of the effect of various growth regimes on the length of primary branches of cauline leaves (CI) in <i>Arabidopsis</i>	58

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
2.1 Length of internodes and primary branches of cauline leaves of Arabidopsis plants at t=30 days.....	59

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AM	méristème apical
BR	brassinostéroïde
CI	branche primaire des feuilles caulinaires
CII	branche secondaire des feuilles caulinaires
CK	cytokinine
IAA	"indoleacetic acid", acide indoleacétique
IN	"internode", entrenoeud
GA	gibbérelline
RI	branche primaire d'une feuille de la rosette
RII	branche secondaire d'une feuille de la rosette
SL	strigolactone
WT	"wild-type plants", plantes de souche sauvage

RÉSUMÉ

En réponse aux conditions environnementales sous- et supra-optimales, les plantes manifestent des variations au niveau de leur croissance et de leur développement. Ces conditions non-optimales de croissance peuvent toutefois affecter la biomasse et le rendement des cultures. La température est l'un des facteurs environnementaux qui affectent le plus la croissance. Dans ce travail, nous avons effectué une analyse détaillée sur le développement (nombre et longueur des branches de la rosette et caulinaires, fleurs et bourgeons) de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* sous différentes conditions non-optimales de température et à différents stades de développement (Végétatif ou Reproductif). Les plantes témoins ont été cultivées à la température optimale de 22°C. Les résultats ont montré que des températures inférieures (12, 17°C) ou supérieures (27, 32°C) affectent le branchement et la floraison. L'allongement des entrenœuds et des branches caulinaires primaires est réduit à des températures plus basses et augmenté à des températures supérieures. Des résultats semblables ont été obtenus chez les plantes avant ou après l'initiation du développement de l'inflorescence principale. Nos données indiquent que les plantes qui sont passées au stade reproductif avant le traitement sont légèrement moins affectées par les variations de température que les plantes qui sont au stade végétatif. Nos résultats suggèrent aussi que les plantes doivent atteindre une taille maximale (longueur des entrenœuds) avant de former des méristèmes floraux, et que cette taille maximale dépend de la température de croissance. Les plantes à 17°C montrent un branchement légèrement inférieur alors que celles à 27°C montrent un branchement supérieur. Ceci suggère que la dominance apicale est un phénomène qui dépend de la température. Ce travail présente à notre connaissance la première étude élaborée de l'effet de la température sur le développement des inflorescences chez *Arabidopsis*.

Mots clés: *Arabidopsis thaliana*, branches, bourgeons axillaires, croissance, développement, entre-nœuds, stade reproductif, stade végétatif, température

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Introduction

Les plantes produisent la majorité de l'énergie qu'on consomme, que ce soit la nourriture ou les ressources énergétiques, et elles sont les sources de plusieurs produits chimiques et médicaux, de fibres et du bois. Ces produits économiques importants sont heureusement pour la plupart des produits bio-renouvelables. Les plantes établissent un équilibre écologique et environnemental important. Grâce à la photosynthèse, les plantes produisent l'oxygène qui est un élément essentiel pour la survie de tous les organismes vivants, animaux et végétaux. Toutes ces raisons poussent les chercheurs à mieux comprendre les étapes de développement au cours de la croissance, et les voies de régulation qui permettent aux plantes de mieux résister et s'adapter à tout changement perçu dans leur environnement. Ces changements peuvent être des stress biotiques ou abiotiques. Une résistance des plantes à ces stress peut permettre leur survie et donc assurer leur croissance et prolifération.

L'agriculture végétale est directement influencée par les facteurs abiotiques tels que la température, la photopériode, la disponibilité en eau et en nutriments, etc. La température est un facteur environnemental qui agit sur la vitesse de croissance et sur le développement des plantes, incluant la transition de la phase végétative à la phase reproductive. Il est connu que les variations de température affectent l'ensemble des réactions biochimiques qui déclenchent ou stimulent la levée de la dormance des graines et des bourgeons axillaires. Par contre, il n'y a aucune étude publiée rapportant une caractérisation détaillée des mécanismes moléculaires de l'interaction entre la température et le développement des branches latérales. Concernant les hormones, l'auxine et la strigolactone sont les hormones qui inhibent le

développement des bourgeons dormants, ce qui réduit le branchement. À l'opposé, la cytokinine est une hormone qui favorise leur développement. Le ratio entre les différentes hormones va déterminer l'activation ou l'inhibition du développement des bourgeons dormants. Ces éléments sont décrits plus en détails dans une section ultérieure.

L'identification des événements reliant les facteurs environnementaux et les facteurs endogènes pour influencer le branchement va nous permettre de mieux sélectionner les variétés les mieux adaptées pour la croissance dans des régions géographiques particulières. Ceci permettra d'améliorer le rendement des cultures, ce qui aura un impact économique important.

1.2 Développement

On parle du développement végétal lorsque les plantes croissent et se différencient au cours du temps tout en manifestant des structures et des organisations leur permettant de survivre et de s'adapter à leur milieu. Le développement comporte donc deux phénomènes : 1) la croissance, qui dépend de la division des cellules du méristème primaire (qui donne naissance à des cellules filles totipotentes) et de l'élongation ou accroissement cellulaire (qui permet aux cellules filles de s'allonger); et 2) la différenciation cellulaire, qui comporte l'identification et la spécification que prennent les cellules filles. En fait, les nouvelles cellules résultant des mitoses se spécialisent en différentes catégories cellulaires selon leur localisation et les fonctions à assurer dans l'organisme. Par exemple, a) les cellules filles des méristèmes apicaux racinaires donnent naissance aux racines qui grâce à leurs poils absorbants assurent l'absorption de l'eau et des sels minéraux à partir du sol; b) les primordia foliaires se transforment en feuilles chlorophylliennes qui captent l'énergie solaire nécessaire à la photosynthèse; et 3) la différenciation du méristème végétatif en méristème

reproductif va permettre la production des fleurs qui seront sources des nouvelles graines. Au cours de leur développement, les plantes forment deux systèmes principaux : le système racinaire qui comprend l'ensemble des racines (structures généralement souterraines), et le système caulinaire qui comprend les tiges, les feuilles et les organes reproductifs (structures généralement aériennes). On appelle "pousse" une plante comprenant une tige et ses feuilles ainsi que toutes les structures reproductrices. Une pousse qui possède des feuilles mais pas des structures reproductrices tel que les fleurs est appelée une pousse végétative.

Il est intéressant de noter que le développement chez les plantes diffère de façon importante de celui chez les animaux. Chez ces derniers, les organes sont pratiquement complètement formés dans l'embryon avant la naissance. Chez les plantes, cette différenciation est de nature indéterminée, c'est-à-dire que les différents organes ne sont pas formés lors de l'embryogenèse mais plutôt tout au long de leur vie. Les plantes se développent à partir d'une cellule unique, le zygote, issu de la fertilisation de l'ovule par un grain de pollen. Ce zygote va générer l'embryon, et l'embryogenèse cesse peu après la mise en place de deux groupes de cellules souches : les racinaires, qui produiront après germination et de manière fréquentative les racines; et les caulinaires, qui produiront éventuellement les tiges, feuilles et les méristèmes axillaires. La croissance en longueur des racines et des tiges est dite croissance primaire et est assurée par les méristèmes primaires situés à l'apex de chaque organe. Ces cellules méristématiques sont organisées en méristème apical caulinaire pour la partie aérienne et méristème apical racinaire pour la partie souterraine. Les feuilles vont quant à elles se développer à partir de primordia dérivés du méristème apical caulinaire. Chaque feuille adulte est attachée par un pétiole à une structure appelée nœud sur la tige. Au niveau de chaque nœud et à l'aisselle du pétiole se situe un bourgeon axillaire. Les entrenœuds correspondent aux parties de tige situées entre deux nœuds. Les méristèmes secondaires sont les méristèmes

latéraux qui permettent la croissance en épaisseur des racines et des tiges. Ils produisent des tissus vers l'intérieur et vers l'extérieur des organes permettant ainsi une augmentation de leur diamètre. Cette croissance est appelée croissance secondaire.

La plante *Arabidopsis* est caractérisée par un méristème apical qui est le plus petit parmi les angiospermes. C'est à partir de ce très petit amas de cellules méristématiques apicales caulinaires que les parties aériennes de la plante prennent naissance. Ce fait donne un important rôle de contrôle à ces cellules dans la perception, la génération et la régulation des signaux impliqués dans le développement. En fait, le méristème apical a la capacité d'initier les organes et les tissus, d'envoyer et de recevoir des signaux, et de se maintenir en bon état (Steeves et Sussex, 1989).

1.2.1 Les différentes phases de développement chez *Arabidopsis*

Après l'embryogenèse et la germination, la phase de développement végétatif prend naissance et forme une rosette au niveau du sol suite à une succession d'actions répétées d'initiation et de différenciation des cellules méristématiques. Tout d'abord, on a le stade juvénile durant lequel les paires de feuilles primordiales se forment et se différencient successivement sur les flancs du méristème végétatif apical. La transition du stade juvénile au stade adulte est caractérisée par le changement de la phyllotaxie des feuilles de la rosette, qui deviennent organisées d'une façon spirale. Durant cette phase végétative, le méristème apical forme des unités appelées phytomères constituées d'un méristème axillaire, d'une feuille caulinaire, d'un nœud et d'un entrenœud (Furner et Pumfrey, 1992; Irish et Sussex, 1992).

À la transition du stade adulte végétatif au stade reproductif (inflorescence), le méristème apical cesse de produire des feuilles de la rosette et produit des feuilles caulinaires, puis la tige florale se développe (Figure 1.1). Durant le stade reproductif, les feuilles caulinaires se différencient, les entrenœuds s'allongent et les méristèmes axillaires prennent place à l'aisselle des feuilles caulinaires (Jacqmard et al., 2003). Pour que le processus du développement reproductif soit complet, la plante doit élaborer des fleurs primordiales à l'apex de la plante, un phénomène qu'on appelle floraison. Le passage au stade reproductif et la floraison requièrent des conditions environnementales spécifiques de lumière, de photopériode et de température. La plante *Arabidopsis* est considérée comme une plante facultative à jour long (éclairage de 16h/jour), c'est-à-dire que sa transition de la phase végétative à la phase reproductrice est déclenchée ou retardée par différents facteurs environnementaux mais des conditions minimales ou maximales particulières de photopériode ne sont pas obligatoires (Napp-Zinn, 1985).

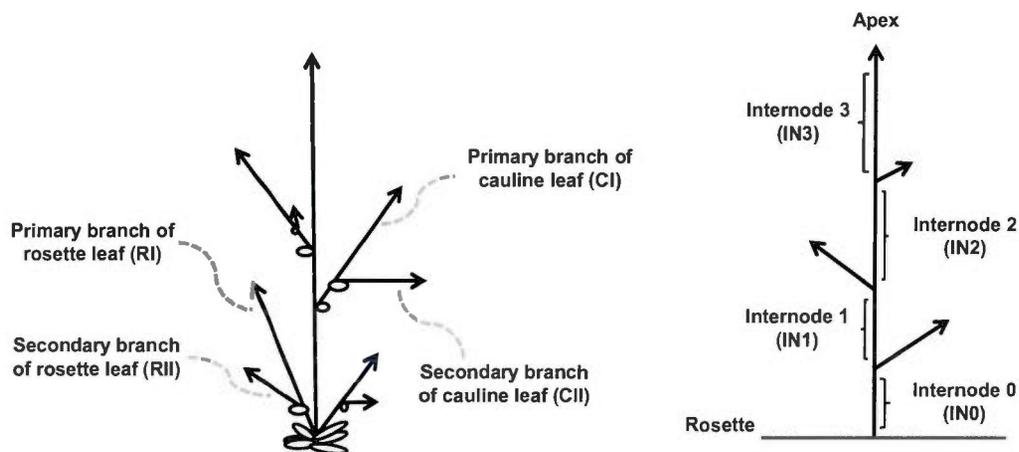


Figure 1.1 Structure de la plante *Arabidopsis*.

1.2.2 Dormance et architecture de la plante

Chez *Arabidopsis*, il y a deux types de méristèmes axillaires. L'un est responsable du développement des branches latérales qui portent à leur tour des bourgeons, et l'autre correspond au développement des fleurs. Ces deux types de méristèmes ont le même potentiel de développement que le méristème primaire responsable de la croissance apicale (McSteen et Leyser, 2005).

Chez *Arabidopsis*, les méristèmes axillaires situés à l'aisselle des feuilles caulinaires donnent naissance aux bourgeons axillaires qui demeurent souvent dormants et ne se développent pas en branches. Ceci indique que la fonction des cellules méristématiques est suspendue soit au niveau de leur division soit au niveau de leur différenciation. Le niveau de dormance des bourgeons varie selon sa position tout au long de la tige principale de la plante, avec un gradient décroissant de l'apex à la base de la tige. Sous les conditions appropriées, le développement des bourgeons sera induit permettant la croissance des branches latérales. Le développement des bourgeons en branches est un phénomène important puisqu'il détermine l'architecture des plantes d'une part et provoque l'augmentation de la biomasse, le nombre des fleurs et des grains d'autre part. Les méristèmes axillaires ont la possibilité de se développer en bourgeons, en inflorescences indéterminées ou en fleurs. Jusqu'à date, il n'y a pas d'études claires montrant les interactions entre les changements environnementaux et les gènes qui déclenchent le développement des bourgeons.

1.3 Croissance et gènes de régulation

La croissance des plantes nécessite des substances de régulation appelées phytohormones ou hormones végétales. Elles sont des messagers qui coordonnent les fonctions cellulaires en régulant des activités tel que la division, l'élongation et la différenciation. Elles interviennent tout au long du cycle de vie de la plante, durant l'organogenèse, la croissance, le branchement, la reproduction, et de plus elles interviennent dans les réponses aux stress environnementaux abiotiques ainsi que biotiques. Les principales classes de phytohormones sont les auxines, les cytokinines, les gibbérellines, l'éthylène, l'acide abscissique, les brassinostéroïdes et l'acide jasmonique (Gray, 2004). Les hormones sont transportées d'une partie à l'autre de la plante, généralement par les tissus vasculaires (xylème et phloème). Les mouvements entre les cellules s'effectuent grâce à des transporteurs protéiques ou par simple diffusion des ions ou des molécules. Certaines interagissent entre elles d'une façon synergique ou d'une façon antagoniste, et leur accumulation et leurs effets sont modulés par les facteurs environnementaux et développementaux.

En fait, dans plusieurs cas, les facteurs environnementaux et développementaux contrôlent l'effet des phytohormones en régulant les changements au niveau de l'expression des gènes responsables de leur biosynthèse, leur transport, leur biodégradation, leur transduction du signal, ou par la coordination entre les différentes voies de réponses. Tout ceci peut mener à une modulation de la croissance cellulaire et à une modification de la morphologie et de l'architecture de la plante. Il est bien connu que les gènes contrôlent toutes les activités de la plante, y compris la croissance, le développement et les réponses aux stimuli environnementaux. La régulation de leur expression est effectuée par l'intermédiaire des facteurs de transcription, qui provoquent une augmentation ou une diminution des niveaux de

transcription des gènes spécifiques permettant à la plante de croître et de s'adapter à son milieu (Wolters et Jurgens, 2009).

1.3.1 Auxines

L'auxine, représentée principalement par l'acide indole-acétique (IAA), est une hormone de nature acide faible et sa molécule est lipophile. Elle est synthétisée principalement dans l'apex de la tige mais aussi dans les embryons, les méristèmes, les bourgeons et les jeunes feuilles. Elle est transportée dans les cellules du phloème dans le sens basipétal de l'apex vers la base de la plante. Sa biosynthèse est contrôlée par la famille des gènes *YUCCA* (*YUC*), les gènes *TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS1/ TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE RELATED (TAA1/TAR)* et les gènes *CYTOCHROME P450 79B2/B3 (CYP79B2/B3)* (Stepanova et al., 2011). Le transport de l'IAA est hautement régulé au niveau cellulaire et est médié par l'activité des transporteurs de la membrane plasmique PIN, PGP/ABCB et AUX1/LAX (Moubayidin et al., 2009). La conduction de l'auxine est polarisée en raison d'une différence de pH entre l'espace pariétal cellulaire et le cytoplasme, ce qui permet de maintenir le gradient de concentration de l'IAAH et donc d'entretenir son transport dans la cellule. Tout d'abord dans le milieu extracellulaire (pH 5,5), l'IAA est sous sa forme protonée (IAAH) et peut diffuser passivement à travers la membrane plasmique dans la cellule. Cet afflux peut aussi être facilité par l'action des transporteurs d'auxine AUX1/LAX. Dans l'environnement plus basique du cytoplasme (pH 7,0), l'auxine se dissocie et s'accumule dans la cellule sous sa forme ionisée IAA^- , et ne traverse que difficilement la membrane cellulaire. Son passage nécessite donc des transporteurs d'efflux PIN et PGP/ABCB (Figure 1.2) (Robert et Friml, 2009).

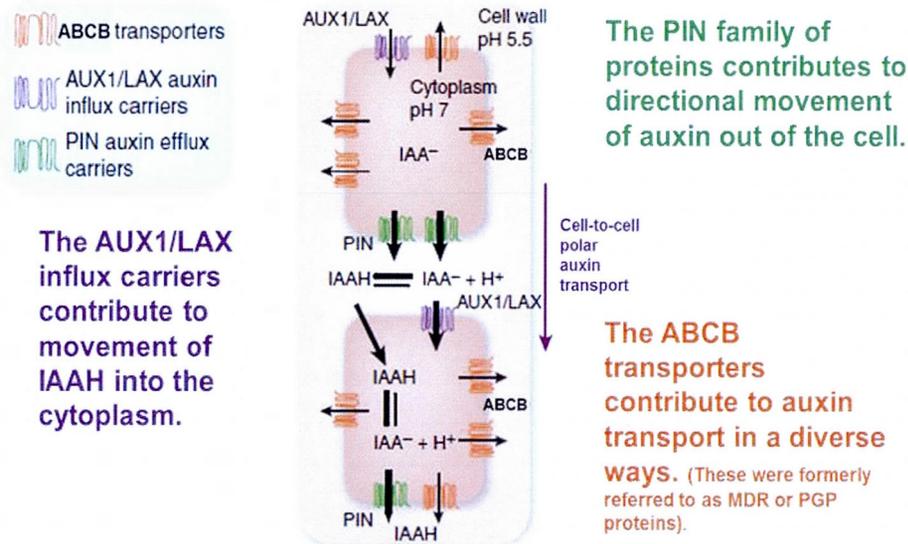


Figure 1.2 Transport polarisé de l'auxine. (Robert et Friml, 2009)

Le mouvement de l'auxine est réglementé et est essentiel pour le phototropisme, le gravitropisme, la formation de structures embryonnaires et l'organogenèse. Les transporteurs d'auxines sont identifiés, mais les facteurs qui contrôlent la position de ces transporteurs et leurs activités ne sont pas encore bien connus. Arabidopsis a 6 AUX/LAX comme transporteurs d'afflux, et 21 PGP/ABCB et 8 PIN comme transporteurs d'efflux.

Les exportateurs membranaires PIN déterminent la direction du transport de l'auxine et contribuent à la détermination de son gradient de concentration, et cela par le biais de leur localisation et distribution au niveau cellulaire. En fait les protéines PIN ont la capacité de s'orienter différemment au niveau cellulaire et elles changent rapidement leur position dans la cellule. Dans la tige, les transporteurs PIN1 sont localisés sur la surface basale des cellules du phloème et sont responsables du flux de l'auxine de l'apex vers la base de la plante. Les transporteurs PIN2 sont localisés sur la surface basale des cellules du cortex des racines et sur la surface supérieure des cellules de

l'épiderme. De ce fait ces transporteurs (PIN2) fonctionnent dans la distribution de l'auxine durant le gravitropisme des racines. Les transporteurs PIN3 changent de polarité en réponse au changement du vecteur de gravité, et sont responsables de l'orientation latérale de l'auxine durant le phototropisme et le gravitropisme.

Une autre classe de transporteurs membranaires est impliquée dans le transport d'auxine, soit les phosphoglycoprotéines (PGP). Ces PGP sont des membres de type B-ATP-binding cassette (ABCB). Cette famille de transporteurs montre des capacités d'interaction avec les transporteurs d'efflux PIN. Ces deux types d'exportateurs d'auxine agissent de façon synergique ou antagoniste dans les différents processus de développement. Les transporteurs membranaires PIN et PGP fonctionnent probablement selon deux mécanismes d'efflux d'auxine différents. Tout d'abord du côté polaire de la cellule, les protéines PGP et PIN colocalisent et interagissent. En fait, il semble que les PGP agissent d'une façon synergique avec les PIN possiblement en régulant la stabilité des PIN au niveau de la membrane plasmique. En plus, les PGP peuvent aussi agir au niveau apolaire indépendamment des PIN, pour contrôler la quantité d'auxine disponible dans les cellules.

Le transport basipétal de l'auxine du haut vers le bas de la plante permet l'élongation de la tige et l'inhibition du développement des bourgeons axillaires qui restent dormants, un phénomène qu'on appelle dominance apicale.

1.3.2 Cytokinines

Les cytokinines (CK), représentées principalement par la zéatine, sont synthétisées au niveau des racines, des graines, des fruits et des feuilles, puis transportées d'une façon acropétale par le xylème vers les autres organes de la plante. Leur biosynthèse est contrôlée par la famille des gènes *CYTOKININE OXIDASE (CKX)* et les gènes

(*AtIPT*), mais le mécanisme de transport n'est pas encore bien connu (Moubayidin et al., 2009).

Les cytokinines jouent un rôle dans la croissance des méristèmes apicaux de la tige et elles contribuent à la différenciation des cellules apicales des racines. La concentration élevée en CK dans ces cellules méristématiques apicales est maintenue grâce aux facteurs de transcription *WUSCHEL (WUS)* et *AUXIN RESPONSE FACTOR5/MONOPTEROUS (ARF5/MP)* (Durbak et al., 2012). Un taux élevé en IAA au niveau du méristème apical permet l'initiation des organes tels les primordia de feuilles. Les CK impactent l'organogenèse au niveau apical en modulant le transport de l'auxine. Au niveau des racines, un taux élevé en CK limite la signalisation de l'auxine et permet aux cellules de se différencier. Tel que mentionné plus haut, l'auxine est transportée de façon basipétale et inhibe le développement des bourgeons axillaires. La cytokinine quant à elle est transportée dans la tige de façon acropétale et a une action antagoniste à celle de l'auxine puisqu'elle permet la levée de la dormance et donc le développement des méristèmes axillaires, ce qui mène à l'élongation des branches latérales (Durbak et al., 2012). Au niveau cellulaire, l'auxine stimule l'élongation des cellules tandis que la cytokinine stimule principalement la division cellulaire. Ces phytohormones, auxines et cytokinines, jouent donc un rôle important dans le développement et la croissance des plantes.

1.3.3 Strigolactones

Les strigolactones (SL) sont des hormones dérivées des caroténoïdes nouvellement découvertes (Matusova et al., 2005). Leur biosynthèse est contrôlée par les gènes *MORE AXILLARY GROWTH (MAX)* chez *Arabidopsis* (Umehara et al., 2008), mais le mécanisme complet de biosynthèse n'est pas encore bien connu. Les SL jouent un rôle de messenger important impliqué dans l'inhibition du développement des

branches latérales. Les bourgeons de mutants *max* montrent une résistance à l'effet inhibiteur de l'auxine apicale (Sorefan et al., 2003) et montrent plus de branchements et de ramifications latérales. Des greffes entre des plantes mutantes *max3* et des plantes WT, où les parties aériennes de *max3* ont été greffées sur les racines de WT, ont montré que ces plantes ont des phénotypes normaux pareils au type sauvage. Ceci indique que les strigolactones sont synthétisées principalement dans les racines et qu'elles peuvent se déplacer de la racine vers les tissus (Booker et al., 2005).

Comme l'auxine n'est pas présente en grande quantité dans les bourgeons axillaires, il a été suggéré que l'inhibition de leur croissance chez les plantes WT résulte de la modulation d'un autre messager qui sont probablement les SL. Celles-ci jouent un rôle important dans le transport basipétal de l'auxine et cela en atténuant son passage parce qu'elles restreignent l'accumulation des protéines PIN1 du côté basal des cellules de xylème (Crawford et al., 2010). Ceci inhibe le développement des bourgeons axillaires. Quand le niveau de SL diminue, la concentration de PIN1 augmente et induit un transport plus rapide de l'auxine, et il y a développement des bourgeons axillaires.

1.3.4 Gibbérellines et brassinostéroïdes

Les gibbérellines, représentées principalement par la GA₃, sont synthétisées au niveau des embryons des jeunes feuilles et des méristèmes. Leur biosynthèse est contrôlée par la famille des gènes *GA dioxygenase (GAox)* (Olszewski et al., 2002). Elles jouent un rôle dans la croissance des bourgeons, l'élongation des tiges et stimulent la floraison. Les gibbérellines peuvent accroître la concentration en auxine, ce qui facilite le mouvement des expansines, enzymes stimulées par l'auxine et permettant le relâchement des parois cellulaires (Cosgrove, 1998). Cette implication de l'auxine avec la GA₃ pour favoriser l'élongation dépend de la dégradation de la protéine

DELLA, un facteur de régulation appartenant à la sous-famille de protéines GRAS et connu pour son effet inhibiteur sur la réponse à la GA₃ (Weiss et Ori, 2007). Plusieurs études ont montré que les basses températures diminuent le niveau de GA₃ et augmentent le niveau de protéines DELLA, ce qui d'une part inhibe la croissance et d'autre part permet à la plante de survivre dans des conditions non favorables.

Les brassinostéroïdes (BR) sont des hormones stéroïdes qui contribuent à l'accroissement cellulaire et donc à la croissance de la plante, et elles jouent un rôle dans la différenciation vasculaire, la germination du pollen et de la graine, la maturité du fruit, et dans la réponse aux stress. Ce sont donc des hormones importantes au niveau de l'agriculture puisqu'elles contribuent à l'augmentation de la productivité et à la résistance au stress. De plus, leurs effets sont additifs à ceux de l'auxine pour ce qui est de l'induction des gènes contrôlant la croissance et l'élongation (Hardtke, 2007). Les mécanismes moléculaires de cette interaction sont toutefois très peu connus.

1.3.5 Gènes de régulation

Plusieurs gènes ont été associés aux différentes étapes de la formation et de l'élongation des bourgeons axillaires.

Les gènes *LAS* et *RAX*

L'initiation des méristèmes axillaires et le maintien de leur potentiel de développement sont contrôlés indépendamment au niveau génétique par différents gènes, dont les gènes *LATERAL SUPPRESSOR (LAS)* et *REGULATOR OF AXILLARY MERISTEM (RAX)*. Les gènes *LAS* codent pour des régulateurs transcriptionnels putatifs appartenant à la famille de protéines GRAS. Ces protéines

ont un rôle fonctionnel dans la maintenance du méristème, la régulation des hormones et la transduction du signal lumineux. De plus, ils agissent négativement sur la régulation la transduction du signal de l'hormone gibbérelline (GA). Les gènes *LAS* sont impliqués dans l'initiation des méristèmes axillaires pendant les deux phases de croissance végétative et reproductive. Ils fonctionnent en amont des gènes *REVOLUTA (REV)* et *AUXIN RESISTANT 1 (AXRI)* dans la régulation du branchement. Les gènes *RAX* appartiennent à la famille des gènes *R2R3-MYB* et codent pour des protéines MYB. Les protéines MYB sont des facteurs de transcription qui jouent un rôle important d'une part dans les réactions de défense et de réponse aux facteurs environnementaux chez les plantes, et d'autre part dans la régulation des processus de développement incluant la formation des méristèmes axillaires. En fait les études ont montré que les gènes *RAX* sont nécessaires pour le développement du méristème apical et module la durée de la phase végétative en contrôlant les niveaux de GA. Le gène *RAX1* régule l'expression du gène *CUC2*, fait qui détermine éventuellement la position du méristème apical en générant un environnement propice à la création des tissus du méristème (Keller et al., 2006).

Les gènes *MAX1*, *MAX2*, *MAX3* et *MAX4*

Tel que mentionné, l'auxine et les SL ont un rôle important dans le développement des branches latérales. Comme le métabolisme des SL implique les produits des gènes *MORE AXILLARY GROWTH (MAX)*, il est important de se pencher sur les quatre membres de cette famille. Tous les gènes *MAX* d'*Arabidopsis* ont été clonés, et trois d'entre eux sont impliqués dans la biosynthèse (Figures 1.3 et 1.4). Les gènes *MAX3* et *MAX4* codent pour les "caroténoïde cleavage dioxygenase" 7 (CCD7) et 8 (CCD8) respectivement (Booker et al., 2004). Ces deux CCDs catalysent les réactions de clivage des substrats de caroténoïdes (Schwartz et al., 2004). Le gène *MAX1* code pour une cytochrome P450 monooxygénase qui est nécessaire pour la dernière étape

dans la synthèse des SL. En conditions normales de croissance, le gène *MAX1* est exprimé presque partout dans la plante tel que le carpelle, les feuilles caulinaires, les cotylédons, les fleurs, l'hypocotyle, les méristèmes floraux, les feuilles apicales, les pétales, les pétioles, l'embryon, le pollen, les racines, les sépales, les étamines, la tige, et le système vasculaire. Le gène *MAX3* est exprimé au niveau des feuilles caulinaires, des cotylédons, des fleurs, des fruits, de l'hypocotyle, des méristèmes d'inflorescences, des feuilles de l'apex, des pétioles, de l'embryon, du pollen, des racines, des graines, des sépales, de la tige, et des tissus vasculaires des feuilles. *MAX4* est exprimé au niveau des fleurs, des fruits, de l'hypocotyle, des pétioles, du tube du pollen, des racines, de l'apex des racines, de la tige, des nœuds et des canaux vasculaire des feuilles.

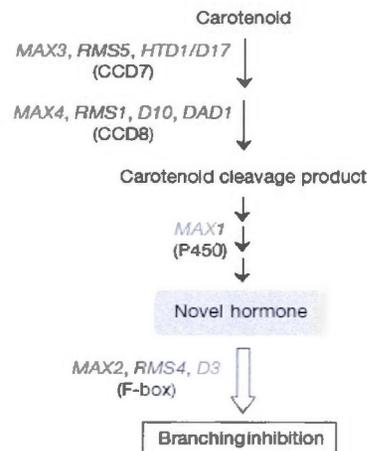


Figure 1.3 Voie de synthèse des strigolactones. (Umehara et al., 2008)

De son côté, *MAX2* appartient à la famille des protéines F-box leucine-rich repeat (LRR). La protéine agit probablement comme sous-unité de reconnaissance du substrat par le complexe SCF ubiquitin E3 ligase dont elle fait partie. Ce complexe catalyse la polyubiquitination des protéines ciblées, qui ne sont pas encore identifiées. *MAX2* jouerait donc un rôle dans la transmission de signal (Booker et al., 2005). Il a été suggéré que *MAX2* pourrait coder pour un récepteur de strigolactone (Johnson et

al., 2006). En conditions normales de croissance, le gène *MAX2* est exprimé au niveau des bourgeons, des méristèmes floraux, du carpelle, des feuilles caulinaires, des cotylédons, des fleurs, des fruits, de l'hypocotyle, des pétales, des pétioles, de l'embryon, du pollen, des portions du tissu vasculaire, des racines, des feuilles de la rosette, des graines, de la tige et des étamines.

Les mutants *max* montrent une augmentation de la capacité du transport d'auxine dans la tige par la modulation de *PIN-FORMED 1* (*PIN1*; protéine transporteur d'auxine) (Bennett et al., 2006), impliquant que les bourgeons dormants ont une capacité accrue à exporter l'auxine et peuvent alors poursuivre leur développement. La capacité du transport d'auxine dans la tige de haut vers le bas est donc régulée par la voie *MAX* (Figure 1.4).

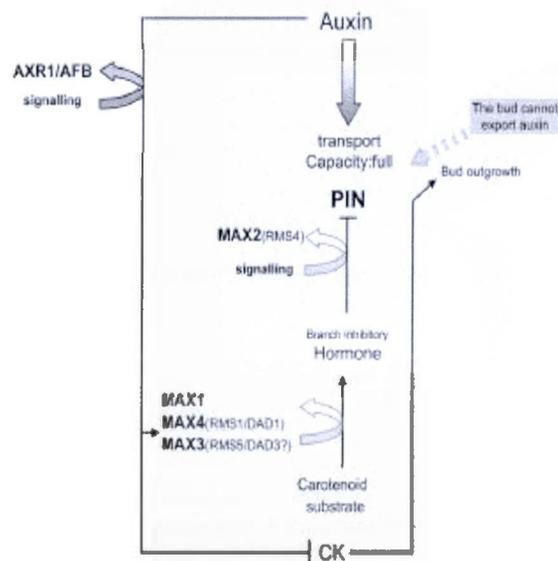


Figure 1.4 Régulation du développement des bourgeons axillaires chez *Arabidopsis*. MAX1, MAX3, et MAX4 sont impliquées dans la synthèse d'une hormone, la strigolactone, qui sera transportée vers le haut à travers la plante. MAX2 est nécessaire pour la signalisation et contribuerait à restreindre l'accumulation des protéines d'exportation d'auxine PIN. Ceci maintient un flux d'auxine normal qui

inhibe le développement du bourgeon. Parallèlement, l'auxine réduit le niveau de cytokinine dans le bourgeon fait qui bloque son développement. Lorsque le signal des strigolactones diminue, il y a une augmentation de PIN et augmentation de la capacité de transport de l'auxine. Ceci cause un appel qui favorise la sortie de l'auxine du bourgeon et la cytokinine peut ainsi favoriser son développement. (Bennett et al., 2006)

Le gène *BRC1*

Un autre gène, nommé *BRANCHED1 (BRC1)*, est impliqué dans l'arrêt du développement des bourgeons. Le gène *BRC1* répond aux stimuli environnementaux et développementaux. Son action est en aval de celle de la voie *MAX* et nécessite l'auxine apicale (Aguilar-Martinez et al., 2007). La protéine *BRC1* agirait dans les bourgeons en intégrant les signaux qui contrôlent le développement des bourgeons pour les traduire en une réponse d'arrêt de la croissance. Elle agit donc comme un intégrateur de la filière génétique qui contrôle le développement des branches latérales. Elle retarde la progression du développement des bourgeons et prévient la croissance des feuilles (division et accroissement cellulaire). En conditions normales de croissance, le gène *BRC1* est exprimé seulement dans les méristèmes des bourgeons axillaires de la plante.

Les gènes *AXR1* et *AFB*, *AUX/IAA*, *ARF* et *TIR1*

La concentration d'auxine dans la plante est contrôlée par les gènes *AUXIN RESISTANT 1 (AXR1)* et *AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEIN (AFB)*. Le gène *AXR1* est impliqué dans le transport polaire de l'auxine de haut vers le bas dans le parenchyme de xylème de la plante (Booker et al., 2004). L'augmentation de la concentration en auxines au niveau des racines agit négativement sur la synthèse des cytokinines, ce qui limite les niveaux de ces dernières au niveau des bourgeons. Le

ratio élevé auxines/cytokinines provoque l'inhibition du développement des bourgeons axillaires.

L'expression des gènes régulés par les auxines est contrôlée par les facteurs de transcription *AUXINE/INDOLE-3-ACETIC ACID (AUX/IAA)* et *AUXINE RESPONSE FACTOR (ARF)*. Les protéines ARF se lient à une séquence d'ADN (AuxRE; auxin-response element) des gènes et activent (ou répriment dans le cas de quelques ARFs) leur transcription. Les protéines AUX/IAA se lient aux protéines ARF, ce qui bloque leur effet sur cette transcription. Par la médiation du *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1 (TIR1)*, l'auxine permet la dégradation des protéines AUX/IAA et réactive l'activité des ARF (del Pozo et al., 2002). Le lien précis entre ces différentes protéines et le développement des branches latérales n'est pas connu.

1.4 Stress abiotique : la température

Les stress abiotiques sont des conditions environnementales (physiques ou chimiques) qui influencent de façon défavorable le développement de la plante. Ils regroupent la sécheresse, les températures extrêmes (froid et chaleur), la salinité et le stress oxydatif. Les conditions de stress abiotiques nuisent à la croissance des plantes et au rendement des cultures. Contrairement aux animaux, les plantes ne peuvent se déplacer et doivent donc subir des conditions adverses de croissance. Plusieurs plantes ont donc développé des capacités plus ou moins étendues à tolérer des épisodes climatiques extrêmes, comme par exemple de larges écarts de température. La température optimale pour la croissance de plusieurs plantes se situe dans les 20°C mais certaines peuvent tolérer des expositions de 0°C à 45°C. Les plantes peuvent légèrement contrôler leur température grâce à des structures anatomiques, comme des poils sur les feuilles, et par des ajustements mécaniques, en changeant l'orientation

des feuilles, mais leur température est en grande partie dépendante de la température ambiante. Certaines espèces végétales sont capables de continuer à croître et se reproduire dans des conditions physiques loin des conditions optimales de croissance. D'autres espèces végétales restreignent leur cycle de vie dans une gamme de paramètres moins étendue; on dit qu'elles sont adaptées à un milieu particulier.

Pour beaucoup de plantes cultivées, l'optimum thermique au début de leur développement est notablement plus élevé qu'ultérieurement. La température dans la période qui suit immédiatement la mise en terre affecte le mode de développement ultérieur de la plante. Lorsque la température du sol se maintient au-dessous de 6°C au début de la végétation, la montée à graines se trouve favorisée. Dans d'autres cas, les réponses au froid sont toutes autres. C'est ainsi que les céréales d'hiver ensemencées au printemps ne produisent pas d'épis; on dit qu'elles ne montent pas. Si à la germination la température est supérieure à 5°C, on n'observe qu'un développement végétatif. Par contre, si au cours de la croissance la température s'abaisse à 0°C pendant un temps suffisant, par exemple à l'automne, l'épiaison se produit au printemps suivant. On parle du processus de vernalisation. Les variétés dites alternatives peuvent être semées au printemps, mais leur épiaison est plus précoce si la germination s'effectue à basse température. Quant aux variétés de printemps, elles ne sont pas influencées par la température de germination.

L'accomplissement de chaque phase du cycle végétatif d'une plante donnée a ses exigences particulières, particulièrement pour ce qui est de la température. Une chose certaine est que seules les plantes pouvant développer une tolérance au gel pourront survivre à l'hiver. La gelée peut entraîner des dommages par traumatisme. La formation de cristaux de glace aux dépens de l'eau libre intra ou extracellulaire s'accompagne de lésions mécaniques pouvant entraîner la mort des tissus. Beaucoup de plantes tropicales ne résistent pas à des températures basses mais supérieures au

point de congélation. Les céréales peuvent, au contraire, présenter une haute résistance aux gelées d'hiver. A côté des conditions atmosphériques, il faut prendre en considération la plante elle-même. Selon le cas le gel des tissus se produit à une température extérieure supérieure ou inférieure à celle du point de congélation. L'accroissement de la résistance au gel survient par l'acclimatation de la plante au cours d'une période de baisse de la température au voisinage de 0°C, qui assure une déshydratation progressive des tissus. D'une manière générale, la résistance de la plante au froid, comme d'ailleurs à la sécheresse, est fonction de l'énergie de rétention de l'eau dans les tissus. Elle est maximale pendant la période d'arrêt de croissance dans les tissus matures. Au contraire, les tissus jeunes, riches en eau et les organes floraux sont particulièrement sensibles, de là le danger des gelées de printemps pour les cultures fruitières (Demelon, 1956; Luttge et al., 2002).

La croissance des végétaux à une température supérieure à 32°C inhibe la biogenèse des chloroplastes, et une température entre 30 et 32°C réduit l'activité photoréductrice des chloroplastes. Il y a une perturbation d'interaction lipides-protéines provoquant une désorientation de la structure des membranes thylakoïdales, et un changement au niveau de la distribution de l'énergie d'excitation entre le photosystème I et II. Plusieurs enzymes ont une capacité limitée à une température supérieure à 40°C, alors qu'à cette température les feuilles diminuent leur capacité photosynthétique et inhibe la formation d'amidon dans les feuilles et les fruits (Mohanty et al., 2002).

L'étude des réponses aux stress abiotiques présente donc un intérêt fondamental et un intérêt agronomique. En effet, les stress abiotiques constituent une cause majeure de perte de rendement, pour tous types de culture. Améliorer l'adaptation des plantes à leurs espaces de culture est par conséquent un enjeu majeur de l'agriculture du XXIème siècle. Les mécanismes de contrôle moléculaire de la tolérance aux stress

abiotiques sont basés sur l'activation et la régulation des gènes associés aux stress. Ces gènes sont impliqués dans les différents événements de la réponse au stress, tel que la signalisation, le contrôle transcriptionnel, la protection des membranes et des protéines et les composés radicaux libres toxiques. La réponse des plantes aux stress abiotiques est complexe, et implique de nombreux gènes et mécanismes moléculaires biochimiques. Les techniques scientifiques mises en œuvre dans le but d'améliorer les plantes et les produits d'origines végétales sont connues sous le nom de biotechnologies végétales. Elles incluent le génie génétique, soit les méthodes d'amélioration des plantes utilisant des gènes modifiés et leur transfert de plante à plante. Les plantes génétiquement modifiées sont sources de nutrition et de vaccins par exemple, et certaines sont résistantes aux maladies, aux ions toxiques et aux herbicides. Les biotechnologies végétales peuvent mener au développement d'outils permettant de sélectionner plus facilement les variétés les mieux adaptées à des conditions particulières de croissance.

1.5 Agronomie

L'agronomie est définie comme l'ensemble des sciences exactes, naturelles, économiques et sociales, et des techniques associées à la pratique et la compréhension de l'agriculture (Wikipedia). De nos jours, l'émergence des questions d'environnement, des ressources, de la pollution et des impacts des activités agricoles fait en sorte que les agriculteurs s'appuient maintenant sur les études écologiques, les biotechnologies, et les sciences de l'atmosphère. Il y a donc une ouverture de l'agronomie aux approches de la théorie des systèmes. L'objectif est de concevoir une gestion des ressources naturelles renouvelables en se basant sur les méthodes et concepts de l'agronomie, de l'écologie et des sciences sociales pour pouvoir maintenir et augmenter les rendements agricoles, à partir des techniques moins polluantes et moins dangereuses pour les travailleurs agricoles, la flore et la faune, et

qui sont moins coûteuses.

En plus des produits évidents comme la nourriture et les fibres, la société moderne fabrique de plus en plus des carburants liquides à partir de produits agricoles pour remplacer un pétrole de plus en plus cher et de plus en plus rare. Les contraintes agronomiques, le froid et la sécheresse en particulier, limitent la production et le rendement des cultures. La solution pour l'agriculture végétale revient au choix de cultures résistantes aux contraintes (Bernard, 2010).

D'autre part, les biotechnologies et la sélection assistée de marqueurs permettent de créer ou sélectionner des organismes nouveaux qui sont capables de tolérer des conditions non-optimales. Plusieurs études moléculaires ont été réalisées dans les 20 dernières années afin d'identifier des gènes intervenant dans les réponses d'adaptation et de défense des plantes aux conditions de stress abiotiques et biotiques. Ces études ont mené à mieux comprendre les réseaux de perception et de signalisation des réponses aux stress et à mieux comprendre les mécanismes et réactions du métabolisme des plantes dans ces conditions. Ces études vont sûrement mener au développement de plantes ou cultivars résistants aux conditions défavorables de croissance qui pourront être utilisés dans les champs tout en tenant compte des risques et de la sécurité écologique. L'élaboration de solutions aux problèmes liés au développement de l'agriculture demande une démarche multidisciplinaire intégrant des contraintes agronomiques, économiques et sociales (Gechev et Hille, 2012).

Si on prend l'exemple de variétés transgéniques tolérantes à des herbicides, les études ont abordé la question des risques et des moyens pour les maîtriser. Les protocoles spécifiques incluent un suivi des flux de gènes, la dispersion à longue distance, les croisements interspécifiques, un suivi de l'apparition éventuelle de tolérance, et le devenir des résidus d'herbicides. L'emploi de semences transgéniques résistantes aux

herbicides à large spectre ne simplifie pas forcément les stratégies de désherbage, outre qu'il devient nécessaire de tenir compte de l'historique de l'emploi des transgènes dans les parcelles. Il faut aussi veiller à l'entretien des bordures de champs et tenir compte de l'agencement des parcelles et variétés dans l'espace. Des repousses résistantes peuvent surgir dans la parcelle, mais aussi les bordures de champs et de chemins, ainsi que dans les parcelles voisines. La dispersion des transgènes peut survenir par le pollen vers d'autres parcelles et par hybridation avec des espèces sauvages génétiquement voisines. L'introduction de gènes de résistance aux insectes constitue également un risque, en augmentant la pression de sélection sur les populations d'insectes, favorisant ainsi l'apparition d'insectes résistants (Papy, 2004).

1.6 L'étude présente

Différentes études ont suggéré que la température influence le développement de la plante et qu'elle interagit probablement avec différentes hormones pour mener à des réponses d'activation ou d'inhibition du développement et de la croissance. Cet effet de la température sur le développement est un concept généralement admis mais pour lequel aucune étude détaillée n'est encore publiée. Afin de déterminer l'influence de la température sur le développement et la croissance chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, j'ai effectué des analyses phénotypiques pour montrer comment l'allongement des entrenœuds, des branches caulinaires et autres parties de la plante est influencé par la température de croissance.

CHAPITRE II
ARTICLE SCIENTIFIQUE

SUB- AND SUPRA-OPTIMAL GROWTH TEMPERATURES AFFECT THE
DEVELOPMENT OF *ARABIDOPSIS THALIANA*

Marlène Antoun et François Ouellet

Manuscrit no. cjb-2013-0011 accepté avec modifications mineures par la revue
Botany

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 et complété la rédaction du manuscrit.

GROWTH TEMPERATURE AFFECTS INFLORESCENCE ARCHITECTURE
IN *ARABIDOPSIS THALIANA*

Marlène Antoun* and François Ouellet

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

E-mail addresses: MA: marlene.antoun@usherbrooke.ca
FO: ouellet.francois@uqam.ca

* Current address Université de Sherbrooke
Département de Biologie
2500 boulevard de l'Université
Sherbrooke Québec J1K 2R1
Canada

Corresponding author: François Ouellet
Université du Québec à Montréal
Département des Sciences biologiques
Case Postale 8888, Succursale Centre-ville
Montréal Québec H3C 3P8
Canada
E-mail: ouellet.francois@uqam.ca
Phone: 1-514-987-3000, ext. 8402
Fax: 1-514-987-4647

2.1 Abstract

Plants adjust their growth and development to ensure survival under adverse environmental conditions. Non-optimal growth temperatures can have a major impact on biomass and crop yield. A detailed phenotypic analysis (number and length of rosette and cauline branches, flowers and buds) in *Arabidopsis thaliana* revealed that growth temperatures below (12, 17°C) and above (27, 32°C) the control 22°C affect branching and flowering. The elongation of internodes on the main stem and of primary branches at cauline leaves is reduced at lower temperatures and increased at higher temperatures. Similar results are observed in plants treated before or after bolting. Our data therefore indicate that plants that have transitioned to the reproductive stage before treatment are slightly less affected by temperature variations than plants that are in their vegetative stage. Our results also suggest that plants need to reach a maximum height (internodes length) before they begin forming floral meristems, and that this "maximum height" is dependent on the growth temperature. Plants grown at 17°C show a slightly reduced branching while those at 27°C show increased branching. This suggests that apical dominance is a temperature-dependent phenomenon. This is to our knowledge the first extensive analysis of the effect of temperature on *Arabidopsis* inflorescence development.

Key words: *Arabidopsis*, axillary buds, branching, growth, temperature

2.2 Introduction

Plant architecture is largely determined by the regulation of the size, ramification and organisation of lateral organs, a process called shoot branching (Reinhardt et Kuhlemeier, 2002; Bennett et Leyser, 2006). The degree of branching is important because it affects the biomass and number of flowers (hence seeds), and in cultivated species it ultimately affects crop yield. In many cases, the growth of a higher number of lateral buds will produce more branches and generate a higher overall plant biomass. Architecture therefore depends on the development of axillary meristems, their expansion and their implementation.

The shoot apical meristem (SAM) is responsible for primary shoot growth (height), whereas lateral branching is initiated by the development of axillary meristems (width). During germination of *Arabidopsis*, the SAM formed in the embryo produces a modular structure, the phytomer, consisting of a leaf, a node, an axillary meristem and an internode subtending the leaf, resulting in a basal rosette of leaves (Furner et Pumfrey, 1992; Irish et Sussex, 1992). When the meristem switches from the juvenile to the adult stage, its shape switches from a rectangular to a rounded form and the plant is still considered as being in its vegetative stage of development (Medford et al., 1992; Barton et Poethig, 1993). The SAM can eventually convert from the vegetative to the inflorescence stage, leading to the development of floral

meristems. Activation of the latter leads to the initial bolting of the plant, which marks the end of the vegetative development and the beginning of the reproductive stage (Jacqmard et al., 2003). This transition is the result of the acquisition by the SAM of reproductive competence, and the capacity to generate floral stimuli as a consequence of appropriate environmental conditions, mainly temperature and photoperiod (Schultz et Haughn, 1991). Once the vegetative meristem is transformed into an inflorescence meristem, the production of vegetative phytomeres ceases and the first three lateral buds are initiated. Shortly after initiation, these buds become dormant for a period and there is a rapid elongation of the first inflorescence (bolt). When conditions are appropriate, the lateral buds can potentially develop into lateral branches (Greb et al., 2003). Subsequent lateral buds develop at nodes lacking cauline leaves and eventually develop strictly into floral organs (Schultz et Haughn, 1991). *Arabidopsis* follows an indeterminate growth pattern (Benlloch et al., 2007). After bolting, the plant continues its development either by growing (cell expansion, along the axis of the plant) or by differentiation, by which the plant can acquire new structures and abilities such as the generation of flower meristems on the inflorescence. Stem elongation is mainly a function of internode elongation, which depends on two important classes of growth regulators, auxins and gibberellins (Vanderhoef et Dute, 1981).

Shoot branches are usually formed in two developmental steps: initiation of axillary shoot meristems, then outgrowth of axillary buds. Axillary meristems are groups of stem cells located at the axils of leaves, and they show the same developmental potential as the SAM. However, after axillary meristem initiation, the SAM usually maintains its role as the primary site of growth by a process known as apical dominance (Ongaro et Leyser, 2008). Auxins, the main positive regulators of apical dominance, are synthesized mostly in the SAM (Mashiguchi et al., 2011). The gradient established by the basipetal transport of auxins in the stem inhibits lateral bud outgrowth. In contrast, cytokinins synthesized in the roots travel up the stem and act to promote the growth of these buds. It is the ratio between auxins and cytokinins that will determine bud outgrowth and therefore the overall plant architecture. A third class of growth regulators, called strigolactones, is also synthesized in the roots and is required for the auxin effect (Domagalska et Leyser, 2011). Environmental conditions influence branching because they likely affect the levels of the different growth regulators. Temperature variations are one of the most important environmental factors that influence physiological and molecular responses (Thingnaes et al., 2003; Thomashow, 2010).

The impact of environmental factors on branching has been studied from an agronomical point of view in ornamental and crop plants. In the last decade or so, the research focus has shifted to the identification of the molecular events involved in

branching control. Several genes associated with the synthesis and signal transduction of the various growth regulators have been identified (Durbak et al., 2012). However, the links between environmental cues and molecular responses leading to shoot branching have not yet been established. In addition, most of the studies aimed at determining the effects of environmental stresses on plants have been performed under what can be called "acute stresses" (e.g. 4°C for cold treatment and 42°C for heat shock). However, few studies have focused on physiologically relevant conditions that only mildly affect plants, even though the resulting impact on biomass and yield can be dramatic. Our long-term goal is to determine the underlying molecular mechanisms by which environmental factors influence the growth regulator-dependent signal transduction pathways that regulate shoot branching in *Arabidopsis*. As a first step, we have performed a detailed phenotypic analysis of plant architecture under different temperature regimes. We have determined how variations in physiologically relevant temperatures affect the inflorescence development (growth and differentiation) of *Arabidopsis* compared to the 22°C commonly used control growth temperature. We also compared the effect of temperature at two developmental stages: vegetative and reproductive.

2.3 Materials and methods

Plant material and growth conditions

Seeds of *Arabidopsis thaliana* (Col-0) were stratified in darkness at 4°C for 3 days in 2x2 inch pots filled with a moist 1:1:1 mixture (v/v/v) of vermiculite, black earth and Pro-Mix. Pots (1 plant each) were transferred for germination at 22°C with a 70% relative humidity, under an irradiance of 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a long day photoperiod (16h day/8h night). After 14 days (before the appearance of the first floral buds in the middle of rosette; still in vegetative stage) or 18 days (bolt emergence; reproductive stage), plants were either kept under these conditions or transferred to the various growth regimes indicated in Fig. 2.1, under the same humidity, light and photoperiod conditions.

Growth measurements

Various plant parts were measured to assess the effect of the growth regimes on plant inflorescence development, as summarized in Fig. 2.2. This includes the number and/or length of primary and secondary branches developing on the rosette, primary and secondary branches developing on the cauline leaves, nodes and internodes, main stem, and buds. A Traceable Digital Caliper (FisherBrand) was used for length

measurements, and all measurements were made on fifteen plants for each treatment. The internodes and primary branches of cauline leaves were measured every day starting at $t=0$ (14 days of germination). The number of buds, flowers, primary and secondary branches of rosette leaves, and secondary branches of cauline leaves were counted at $t=30$.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed with the JMP version 9 software (SAS Institute). For the length measurements, a one-way ANOVA analysis was used (after root square transformation) to first determine that the means of the data obtained at $t=30$ were not equal.. The Dunnett's post-hoc test was then used to compare the group means, where all groups (various growth regimes) were pitted against the V22 plants reference group. Its goal was to identify groups whose means are significantly different ($P<0.05$) from the mean of the reference V22 group. For the number of primary (RI) and secondary (RII) branches at rosette level, buds and flowers at rosette level, buds and flowers at RI, secondary branches at cauline leaves level (CII), and flowers and buds at the CI, standard errors of the means were determined. The Student's T test was used to show statistical differences ($P<0.05$) to the V22 group.

2.4 Results

Under our growth conditions (optimal 22°C and long-day photoperiod of 16 h), wild-type *Arabidopsis* Col-0 plants germinate rapidly and form a rosette that will, at maturity, bear about 8-9 leaves (vegetative stage). The plant transitions to the reproductive stage (bolt emergence) around 16 days after germination. Cauline leaves (usually 3) and associated axillary flower buds develop at the nodes (usually 3) on the rapidly elongating bolt. Once formed, these buds become dormant then will eventually develop into secondary branches. These secondary branches can also develop 1-2 nodes with cauline leaves and buds. Additional bolts will emerge from the rosette and follow a similar differentiation pattern.

To determine the effect of temperature on the inflorescence development of *Arabidopsis*, we have used plants at two stages of development (vegetative and reproductive), and exposed them to different temperature regimes: continuous exposure or transient exposure followed by transfer to optimal temperature. A schematic representation of the growth regimes used is presented in Fig. 2.1. Many plant parts were measured or counted (described in Fig. 2.2) to provide an overview of the plant's responses to the various growth regimes.

Temperature affects elongation of internodes and primary branches of cauline leaves of plants in the vegetative stage

In a first series of experiments, 14 day-old plants (7-8 rosette leaves, 1-2 days before bolting) were exposed to 5 temperatures and monitored for a period of 30 days (completion of flowering and seed maturation). The 22°C was considered as the optimal growth temperature, and plants were treated at 22° ± 5 or 10°C. For plants of all treatments, measurements were taken for the elongation of four internodes (IN0 to 3) and three primary branches of cauline leaves (CI1 to 3), and most of our analysis is based on the values at t=30 (Fig. 2.3; see also Table 2.1 for numerical data).

Results in Fig. 2.3 A-D show that elongation of IN0, IN1 and IN2 of plants grown at 22°C has reached its maximum around t=11 and a length of 16.97, 34.15 and 25.82 mm at t=30. In contrast, IN3 continues to grow during the full period, likely due to the action of the SAM, to reach 210.81 mm at t=30. Elongation of CI1, CI2, and CI3 was also followed over a 30-day period of exposure to various temperatures (Fig. 2.3 E-G). At 22°C, these branches measured 39.20, 89.78 and 107.22 mm. Plants grown under the other conditions tested in this study were compared to the values obtained for V22 control plants.

In the 12 to 32°C range, our results show that internode elongation is associated with the growth temperature: the lower the temperature, the shorter the internodes and vice-versa (Fig. 2.3 A-D). The development of CIs is also strongly affected by the growth temperature (Fig. 2.3 E-G). When grown at 12°C (V12), all INs and CIs are significantly shorter than those of control plants. This was expected since lower temperatures slow the growth of most plant species. While elongation of CI1 and CI2 is not affected at 17°C, CI3 branches are significantly shorter. In contrast, when grown at temperatures higher than 22°C, responses vary. At 27°C, plants develop significantly longer CIs (Fig. 2.3 E to G) and IN0 is significantly longer in plants at 32°C (Fig. 2.3 A).

Plants in the reproductive stage are less affected by temperature than plants in the vegetative stage

To determine if the transition from the vegetative stage to the reproductive stage affects the responses to sub- and supra-optimal temperatures, we have also treated 18 day-old plants (bolt emergence). As observed for V plants, IN and CI elongation is also affected by a continuous exposure to sub- and supraoptimal temperatures (Fig. 2.4). Like V12 plants, R12 plants have shorter INs and CIs compared to those of V22. Interestingly, the IN0 of R17 plants is much longer than V22 plants. This is in

contrast with the V17 plants, which showed no difference to V22. This peculiar effect of temperature on IN0 length will require further investigation.

A short exposure to sub- or supra-optimal temperatures leads to various responses in V and R plants

We also wanted to determine the capacity of plants to recover from a transient exposure to non-optimal temperatures followed by growth at the optimal temperature (VT-22 and RT-22 plants). This part of our study was designed to mimic the temperature variations that plants suffer when they grow in natural conditions. Results indicate that a 7-day exposure at 12 or 32°C has very little impact on IN elongation of V plants (Fig. 2.5 A-D; see V12-22 and V32-22). However, a transient exposure at 12°C significantly reduces the elongation of CIs (Fig. 2.5 E-G). This effect is not observed in V32-22 plants, which overall show no significant differences compared to V22 plants for all INs and CIs. V17-22 and V27-22 plants show longer IN0 and shorter IN1 and IN2 when returned to 22°C. IN3 is much longer for plants exposed at 17°C but shorter at 27°C. As mentioned before, rapid elongation likely results from a response to the perceived temperature stress.

In R12-22 plants, IN1, IN2 and IN3 are significantly shorter than in V22 plants but IN0 is not affected (Fig. 2.6 A-D). In contrast, R27-22 plants show the opposite:

longer IN0 and shorter IN1, IN2 and IN3. Almost all VT-22 and RT-22 plants show longer IN0. The most interesting difference between VT-22 and RT-22 plants is that the elongation of CIs in R plants is not affected by a transient exposure to non-optimal temperature (except for R32-22), compared to V22 plants (compare Fig. 2.5 E-G and Fig. 2.6 E-G). The absence of effect on the elongation of CIs was also observed for R17 and R27 plants.

When looking at the elongation rate, as determined by the slope between each time points on the growth curves in Figs 2.3 to 2.6, it's quite clear that lowering the temperature shifts the growth rate to a later date, and vice-versa, for the INs of V and VT-22 plants (Figs 2.3 and 2.5). This response is not as obvious for R and RT-22 plants (Figs 2.4 and 2.6). In contrast, the elongation rate of CIs is quite stable, regardless of growth temperature and growth regime (V vs R, V22 vs VT-22, V22 vs RT-22; Figs 2.3 to 2.6).

Effect of non-optimal growth temperatures on shoot branching and flowering

To determine the effect of sub- and supra-optimal growth temperature on branching and flowering, we have counted the number of branches stemming from the rosette and from cauline leaves, and buds and flowers on the various branches (Figs 2.7 and 2.8).

Compared to the V22 control plants, V plants grown at 17°C show a striking increase in the number of buds at the rosette level (Fig. 2.7A), on primary branches of rosette leaves (Fig. 2.7D), and on primary branches of cauline leaves (Fig. 2.7G). There is no change in the number of flowers (Figs 2.7B, E, H). There are fewer secondary branches at cauline leaves (Fig. 2.7I) but no difference in the number of primary and secondary branches at the rosette (Fig. 2.7C, F), indicating a specific response for the reduction in branching. The responses observed for V17 are also observed when plants that have transitioned to the reproductive stage are treated at 17°C (Fig. 2.8), suggesting that the developmental stage has no influence on the sensitivity of the plant to a moderate sub-optimal growth temperature. At a lower temperature (12°C), several responses are different from the V17 and R17 plants. There is a reduction or no difference in the number of most of the structures compared to V22 plants. The only increase observed, for both V12 and R12 plants, is the increase in the number of buds at the rosette (Figs 2.7A and 2.8A) as was observed for V17 plants. These results for V12 and R12 plants indicate a stronger impact of this sub-optimal temperature on development.

When V plants are exposed at higher temperatures (27 and 32°C), the only response for buds is a reduction at the primary branches of cauline leaves (Figs 2.7G and 2.8G). There are more flowers at primary branches of both rosette and cauline leaves

(Figs 2.7E, H and 2.8E, H). Interestingly, these plants develop more primary and secondary branches on the rosette (Figs 2.7C, F and 2.8C, F). While the responses of R plants grown at 27°C are similar to those of V plants, there are important differences in plants grown at 32°C. R plants do not show the increase in flowers at the primary branches of rosette and cauline leaves seen in V32 plants (Fig. 2.8E, H). While, as for V32 plants, R32 show an increase in primary branches on the rosette, R32 plants do not show an increase in secondary branches on the primary branches stemming from the rosette. Overall, higher growth temperatures clearly promote the maturation of buds into rosette branches and flowers, which suggests that apical dominance is reduced.

2.5 Discussion

It has often been stated that temperature affects the growth of plants. However, for *Arabidopsis*, there are to our knowledge only few published studies that briefly describe some aspects of temperature response with regards to architecture (Thingnaes et al., 2003; Pyl et al., 2012). Plants that are exposed to non-optimal conditions most often display stress responses (Mouradov et al., 2002). In *Arabidopsis*, the germination and development pattern varies according to temperature and photoperiod. Although the true optimal growth temperature for *Arabidopsis* is in the 23-25°C range, it is recommended to grow the plants between

21-23°C (Rivero-Lepinckas et al., 2006). Based on this, and because 22°C the commonly used temperature, we here refer to it as the optimal growth temperature.

Our data indicate that sub- and supra-optimal growth temperatures affect branching in *Arabidopsis*. The elongation rate of the internodes of V plants depends on the growth temperature. This rate is significantly slower at sub-optimal temperatures while it is faster at supra-optimal temperatures. Plants exposed at supra-optimal temperatures also show significantly longer branches and a longer lower internode (IN0). Together with the observation that INs reach their full length extremely rapidly at 27°C (within 3 days of exposure), we showed that a 5°C increase results in a typical stress response. Overall, our results suggest that plants need to reach their maximum length of internodes 0, 1 and 2 before they begin forming floral meristems, and that the "maximum length" is dependent on the growth temperature. This might be required to achieve a certain height that will ensure the plants' competitiveness in nature. A higher height will likely lead to a wider dispersal of seeds when the siliques dehisce.

It is generally assumed that plants that have transitioned from the vegetative to the reproductive stage are more sensitive to detrimental growth conditions, including non-optimal temperatures. In the present study, the most striking difference between V plants and R plants grown continuously at either of the five temperatures is that for each internode and primary branch of cauline leaves, the difference between the

longest and shortest structure measured is much narrower in R plants (compare Fig. 2.3 and Fig. 2.4). Similar data were observed for plants that were transiently exposed to the non-optimal temperatures. Our INs and CIs data therefore suggest that R plants are less affected by the growth temperature than V plants. One hypothesis is that it is the transition from the vegetative to the reproductive stage itself that is the most responsive and sensitive to temperature variations, not the developmental programs leading to floral initiation.

The higher branching phenotype seen when V plants are exposed at 27 and 32°C, in addition to the observed longer IN₀, is reminiscent of the phenotype observed for *max2* mutant plants (Booker et al., 2005). MAX2 encodes a protein required in the strigolactone pathway. This growth regulator negatively controls branching, therefore lowering its effect results in increased branching. It is possible that high growth temperatures affect MAX2 gene expression levels, but this remains to be determined. Our data are in agreement with published work reporting that once flowering is initiated, the strength of apical dominance is reduced (Soppe et al., 1999). This suggests that a signal likely exists between the two physiological phenomena. Branching, the development of dormant buds, is controlled by environmental (e.g. temperature and photoperiod) and endogenous (growth regulators) factors. A relationship between environmental cues and developmental stages exists, for both the processes of growth and differentiation (Okada et al., 1991). It involves a

complex molecular network that starts with the perception of environmental signals (temperature, light quality and quantity, water availability) (Leyser, 2009). At the hormonal level, auxins and strigolactones are negative regulators of bud outgrowth whereas cytokinins are positive regulators. Brassinosteroids and gibberellins are other growth regulators that participate in most developmental processes (Durbak et al., 2012). The various signal transduction events ultimately have a major impact on gene expression and other molecular events that are required for metabolic adjustments that lead to developmental changes (Benlloch et al., 2007). The use of the many hormone-deficient or hormone insensitive mutants available will be instrumental in determining which growth regulators are involved in temperature-dependent inflorescence development.

The nature of the signal between temperature response and branching is unknown. One possibility is that the process might occur in an indirect fashion, for example via the regulation of the expression of flowering-associated genes. A modified expression of such genes could affect the expression of downstream target genes, some of which could be involved in auxin and/or strigolactone biosynthesis or transport. Our previous results showed that this could be the case since an AP1-like protein can bind an element in the *MAX4* promoter (Adam et al., 2007). A second possibility that we cannot rule out for now is that some flowering-associated genes are directly involved in hormonal regulation. We have initiated the expression analyses needed to

determine which genes involved in plant architecture are regulated by temperature. The knowledge gained from these molecular studies will contribute to our understanding of plant growth determinants, both under optimal and non-optimal temperatures. This should allow establishing a link between environmental signals and the molecular responses regulating shoot lateral branching.

2.6 Acknowledgements

We would like to thank Bertrand Fournier and Prof. David Bird (UQAM) for help with the statistical analyses. We also thank the reviewers and Editor for excellent suggestions that helped improve the manuscript. This work was funded by a Discovery Grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (FO).

2.7 Figure captions

Figure 2.1 Growth regimes used in this study. *Arabidopsis thaliana* wild-type Columbia plants (Col-0) were germinated at 22°C for 14 days (vegetative stage, V) or 18 days (reproductive stage, R) before transfer to various temperatures (T). The 22°C temperature was considered as the optimal growth condition. For the first series of experiments, exposure was continuous for treatments at 12, 17, 22, 27 and 32°C (VT

and RT). In a second series of experiments, plants were treated transiently for 7 days (12, 17, 27 and 32°C), before being returned to the optimal 22°C (VT-22 and RT-22) for the remainder of the 30-day period. Photoperiod, relative humidity and light conditions were the same for all treatments. The $t=0$ and $t=4$ time points refer to the days V and R plants were transferred to the T temperature, respectively. The $t=30$ time point represents the last day of measurement.

Figure 2.2 Schematic representation of Arabidopsis architecture, shoot branches and shoot internode nomenclature.

Figure 2.3 Effect of a continuous growth temperature on the elongation of shoot internodes and primary branches of cauline leaves of Arabidopsis plants treated from their vegetative stage. Treatment conditions are described in Fig. 2.1, and IN and CI nomenclature is described in Fig. 2.2. A-D, length of internodes 0, 1, 2 and 3, respectively. E-G, length of primary branches of cauline leaves 1, 2 and 3, respectively. A minimum of 15 plants were measured with a digital caliper, for each time point. For clarity, error bars are not indicated. One-way ANOVA analyses are presented in Figs 2.9 and 2.10, and a summary is presented in Table 2.1.

Figure 2.4 Effect of a continuous growth temperature on the elongation of shoot internodes and primary branches of cauline leaves of Arabidopsis plants treated from

their reproductive stage. Treatment conditions are described in Fig. 2.1, and IN and CI nomenclature is described in Fig. 2.2. A-D, length of internodes 0, 1, 2 and 3, respectively. E-G, length of primary branches of cauline leaves 1, 2 and 3, respectively. A minimum of 15 plants were measured with a digital caliper, for each time point. For clarity, error bars are not indicated. One-way ANOVA analyses are presented in Figs 2.9 and 2.10, and a summary is presented in Table 2.1.

Figure 2.5 Effect of a transient exposure to various temperatures on the elongation of shoot internodes and primary branches of cauline leaves of Arabidopsis plants treated from their vegetative stage. Treatment conditions are described in Fig. 2.1, and IN and CI nomenclature is described in Fig. 2.2. A-D, length of internodes 0, 1, 2 and 3, respectively. E-G, length of primary branches of cauline leaves 1, 2 and 3, respectively. A minimum of 15 plants were measured with a digital caliper, for each time point. For clarity, error bars are not indicated. One-way ANOVA analyses are presented in Figs 2.9 and 2.10, and a summary is presented in Table 2.1.

Figure 2.6 Effect of a transient exposure to various temperatures on the elongation of shoot internodes and primary branches of cauline leaves of Arabidopsis plants treated from their reproductive stage. Treatment conditions are described in Fig. 2.1, and IN and CI nomenclature is described in Fig. 2.2. A-D, length of internodes 0, 1, 2 and 3, respectively. E-G, length of primary branches of cauline leaves 1, 2 and 3,

respectively. A minimum of 15 plants were measured with a digital caliper, for each time point. For clarity, error bars are not indicated. One-way ANOVA analyses are presented in Figs 2.9 and 2.10, and a summary is presented in Table 2.1.

Figure 2.7 Effect of a continuous growth temperature on branching and flowering of *Arabidopsis* plants treated from their vegetative stage. Treatment conditions are described in Fig. 2.1, and IN and CI nomenclature is described in Fig. 2.2. The mean number of buds at rosette level (A), flowers at rosette level (B), primary branches at rosette (RI; C), buds at RI (D), flowers at RI (E), secondary branches at rosette (RII; F), buds at primary branches of cauline leaves (CI; G), flowers at CI (H), and secondary branches at cauline leaves (CII; I) is shown \pm SEM. Asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$) to the V22 control group. Fifteen 15 plants were used for each measurement.

Figure 2.8 Effect of a continuous growth temperature on branching and flowering of *Arabidopsis* plants treated from their reproductive stage. Treatment conditions are described in Fig. 2.1, and IN and CI nomenclature is described in Fig. 2.2. The mean number of buds at rosette level (A), flowers at rosette level (B), primary branches at rosette (RI; C), buds at RI (D), flowers at RI (E), secondary branches at rosette (RII; F), buds at primary branches of cauline leaves (CI; G), flowers at CI (H), and secondary branches at cauline leaves (CII; I) is shown \pm SEM. Asterisks indicate

significant differences ($P<0.05$) to the V22 control group. Fifteen plants were used for each measurement.

Figure 2.9 One-way ANOVA analysis of the effect of various growth regimes on internode (IN) length and total stem length in Arabidopsis. Treatment conditions are described in Figure 2.1, and IN nomenclature is described in Figure 2.2. A to D, length of internodes 0, 1, 2, and 3, respectively, at 30 days. E, total length of the stem at 30 days. Group means are indicated by horizontal lines. Asterisks represent plants showing significant differences of responses compared to the V22 control plants, as determined by the Dunnett's test ($P<0.05$ confidence level).

Figure 2.10 One-way ANOVA analysis of the effect of various growth regimes on the length of primary branches of cauline leaves (CI) in Arabidopsis. Treatment conditions are described in Figure 2.1, and CI nomenclature is described in Figure 2.2. A to C, length of primary branch of cauline leaves 1, 2, and 3, respectively, at 30 days. Group means are indicated by horizontal lines. Asterisks represent plants showing significant differences of responses compared to the V22 control plants, as determined by the Dunnett's test ($P<0.05$ confidence level).

Table 2.1. Length of internodes and primary branches of cauline leaves of Arabidopsis plants at $t=30$ days. Treatment conditions are described in Figure 2.1,

and IN and CI nomenclature is described in Figure 2.2. A minimum of 15 plants were used for measurements performed with a digital caliper. All values are in mm. Values in color (red and green, for reduced and increased length) indicate statistical differences ($P < 0.05$) to the values at 22°C, as determined by the Dunnett test performed after the one-way ANOVA analyses presented in Figures 2.9 and 2.10.

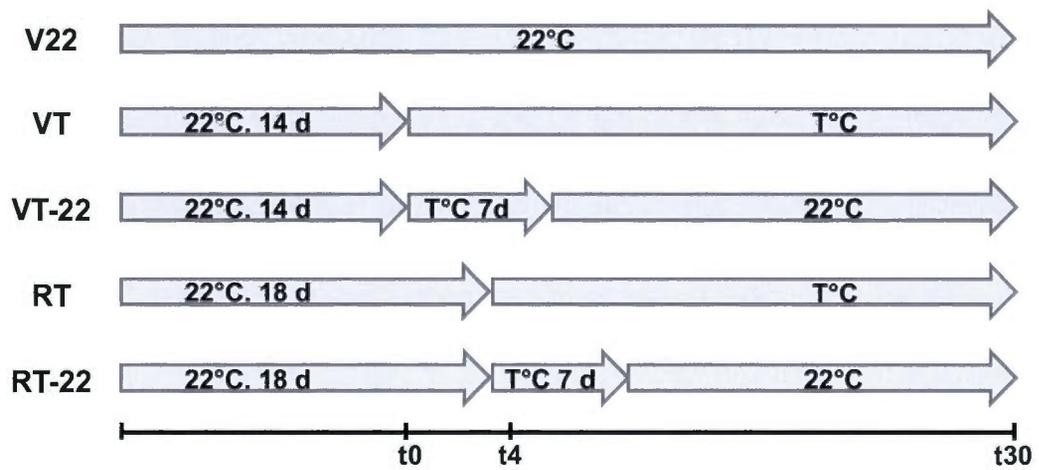


FIGURE 2.1

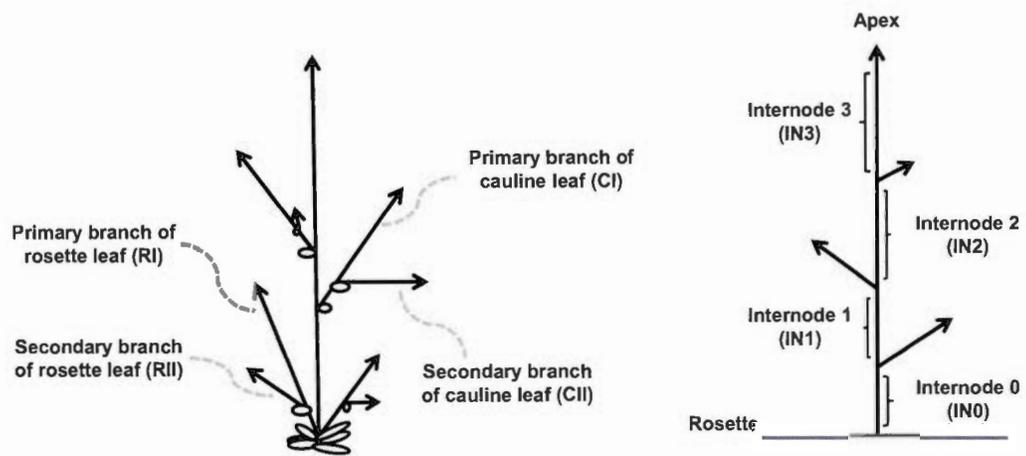


FIGURE 2.2

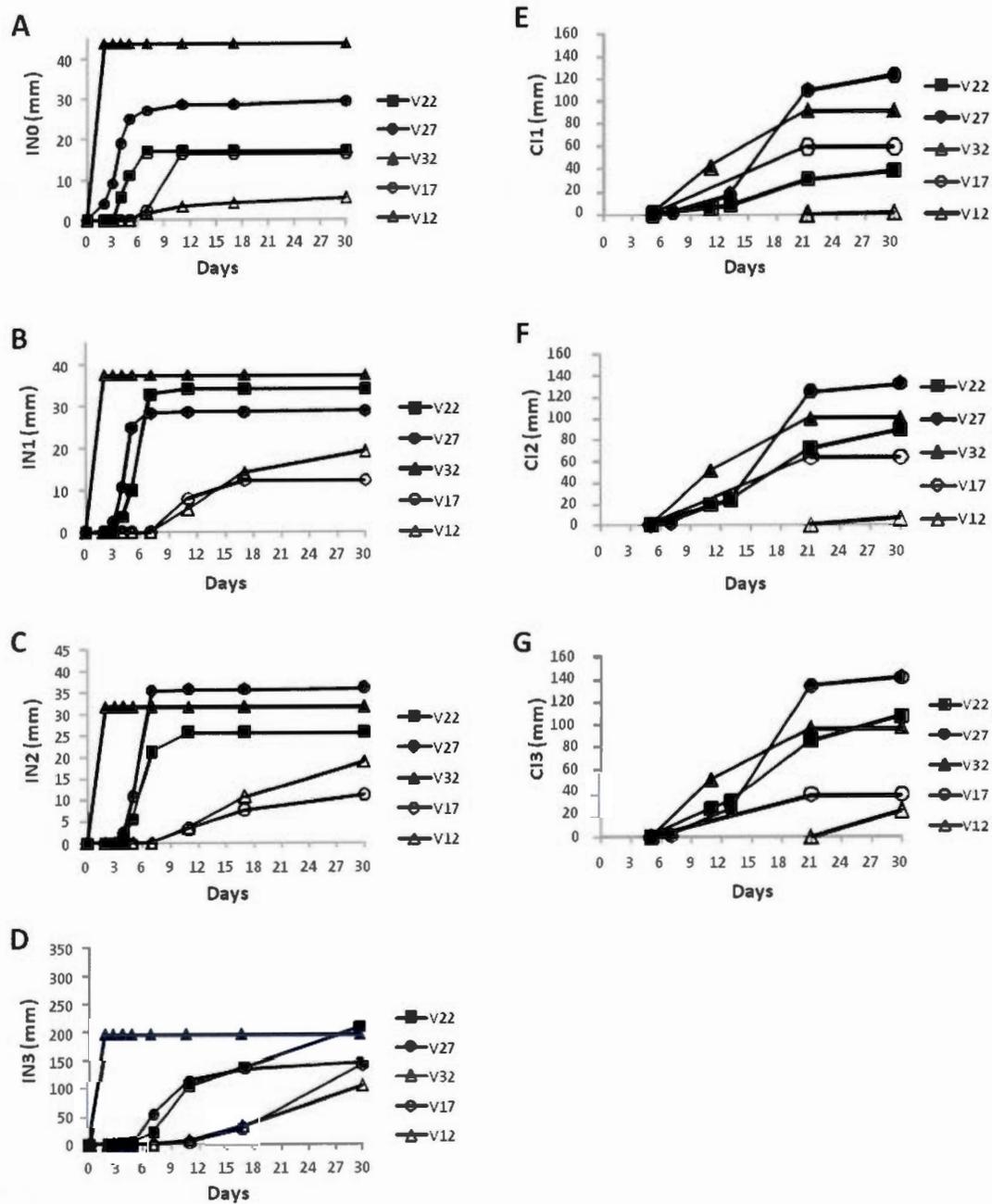


FIGURE 2.3

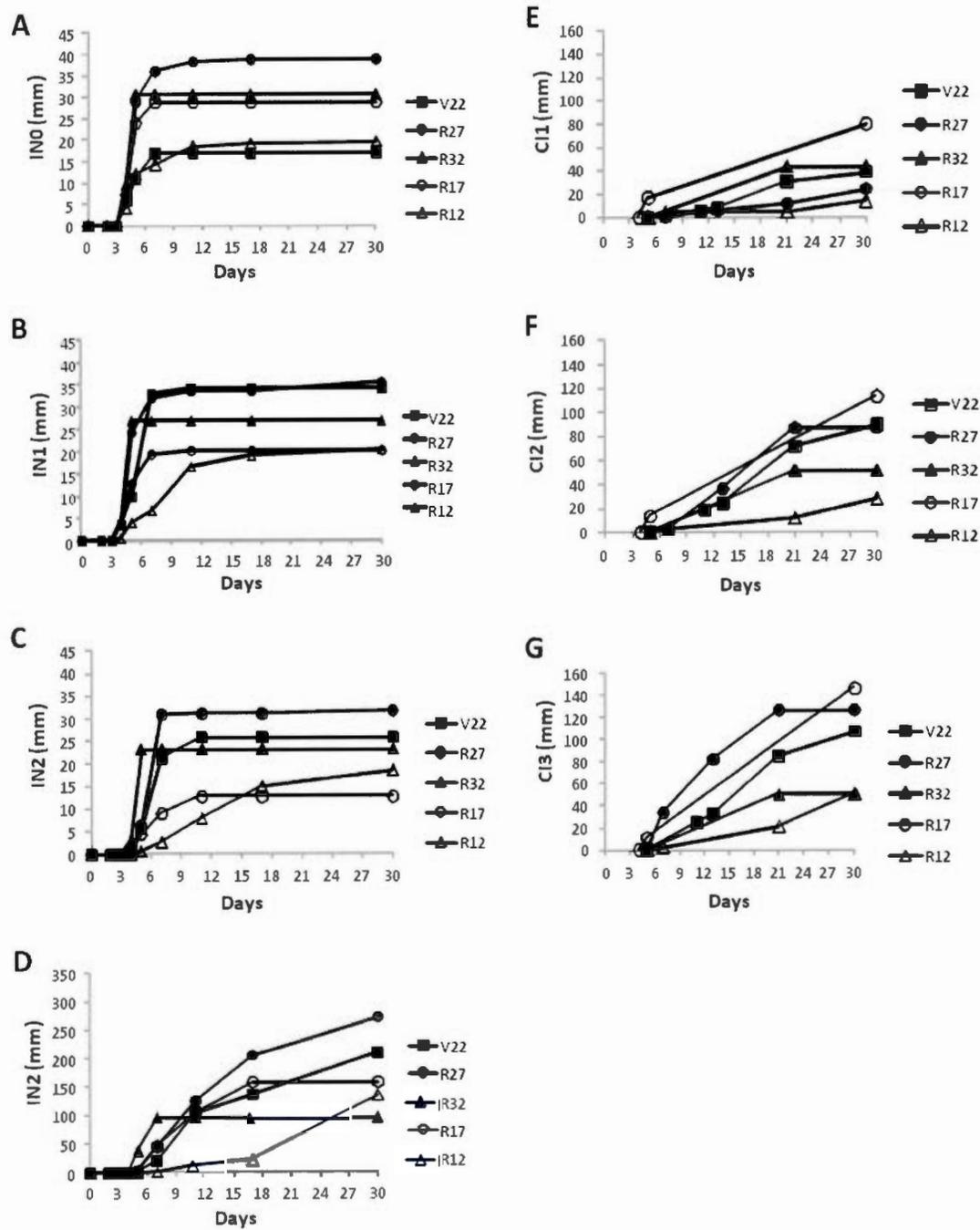


FIGURE 2.4

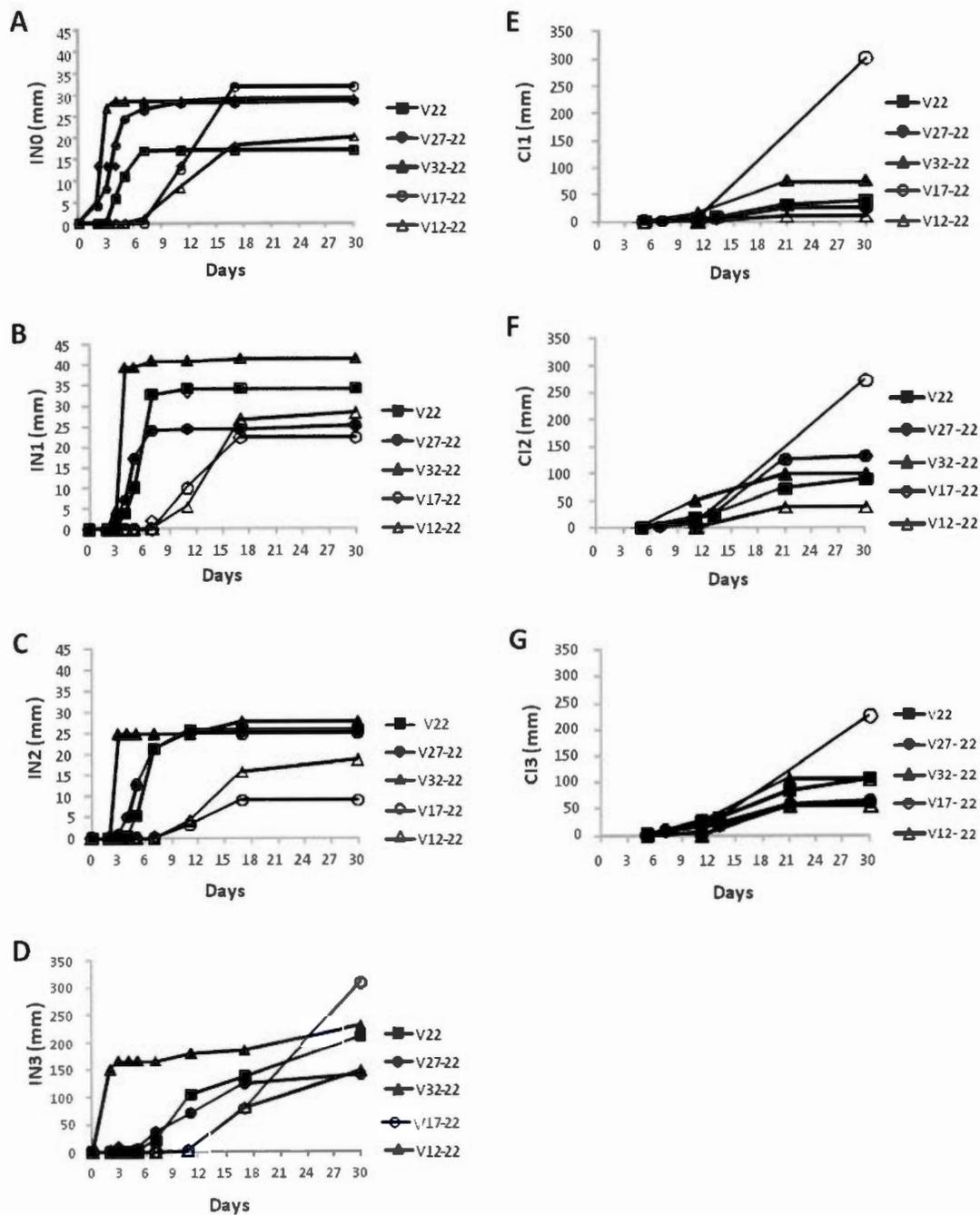


FIGURE 2.5

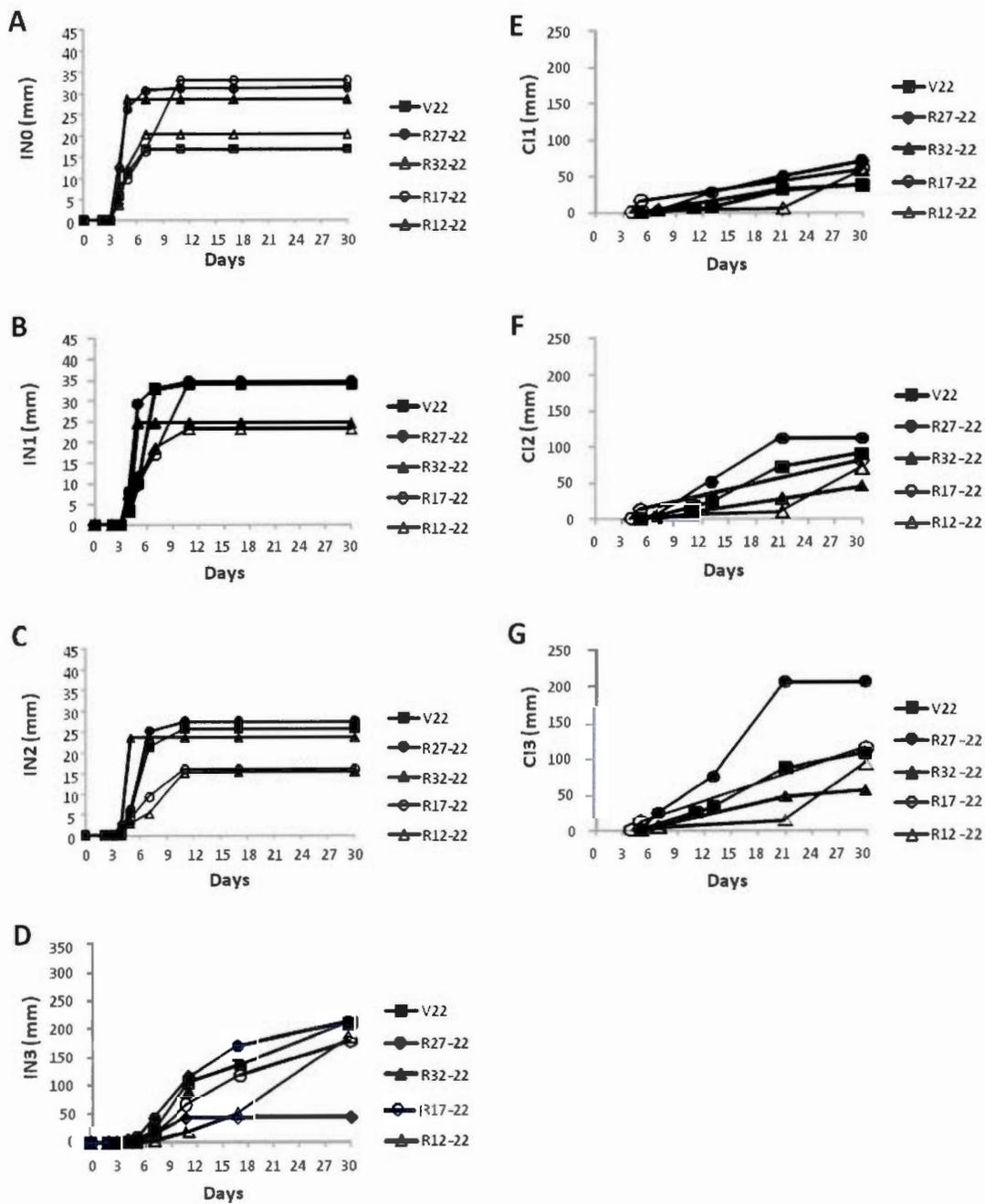


FIGURE 2.6

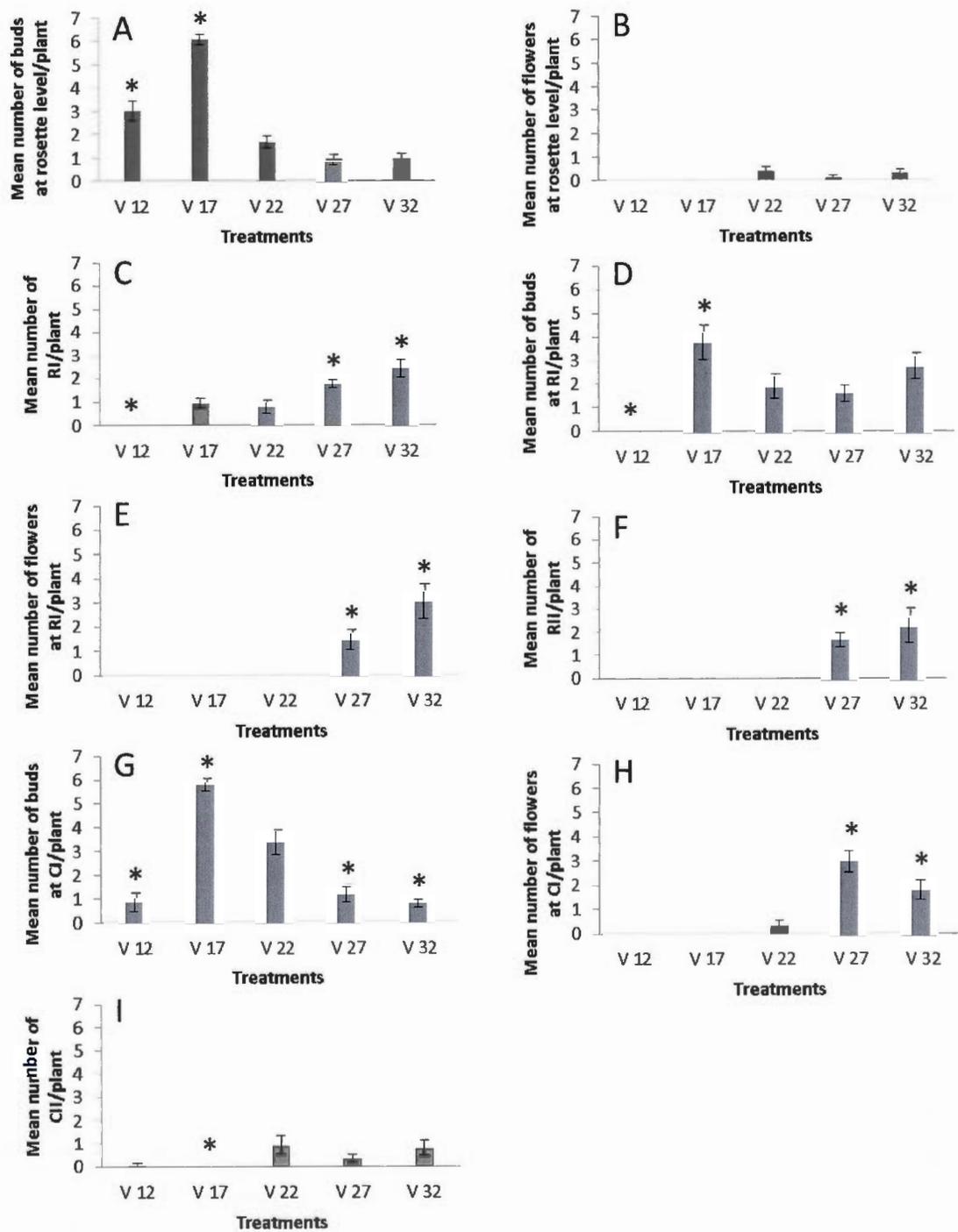


FIGURE 2.7

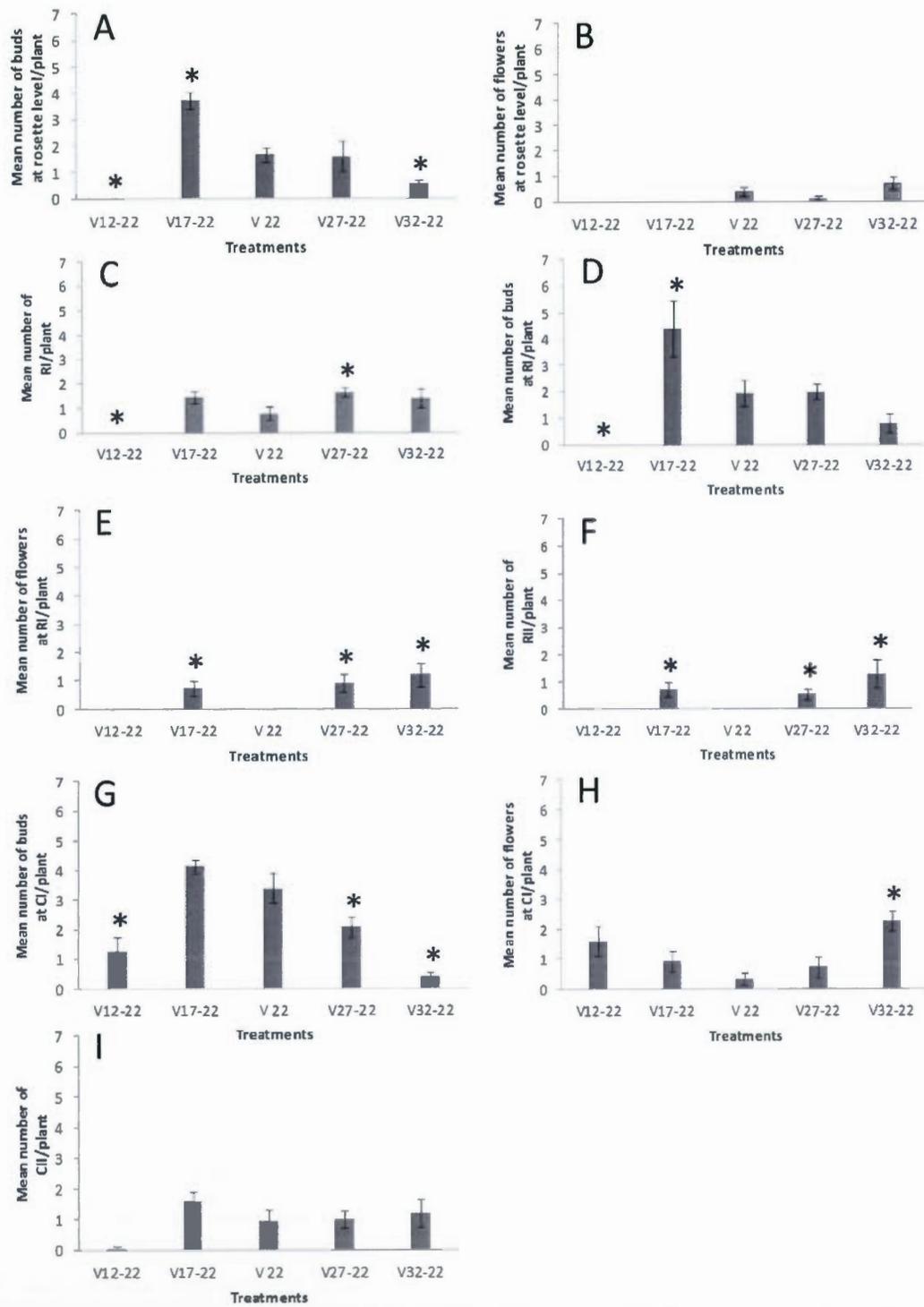


FIGURE 2.8

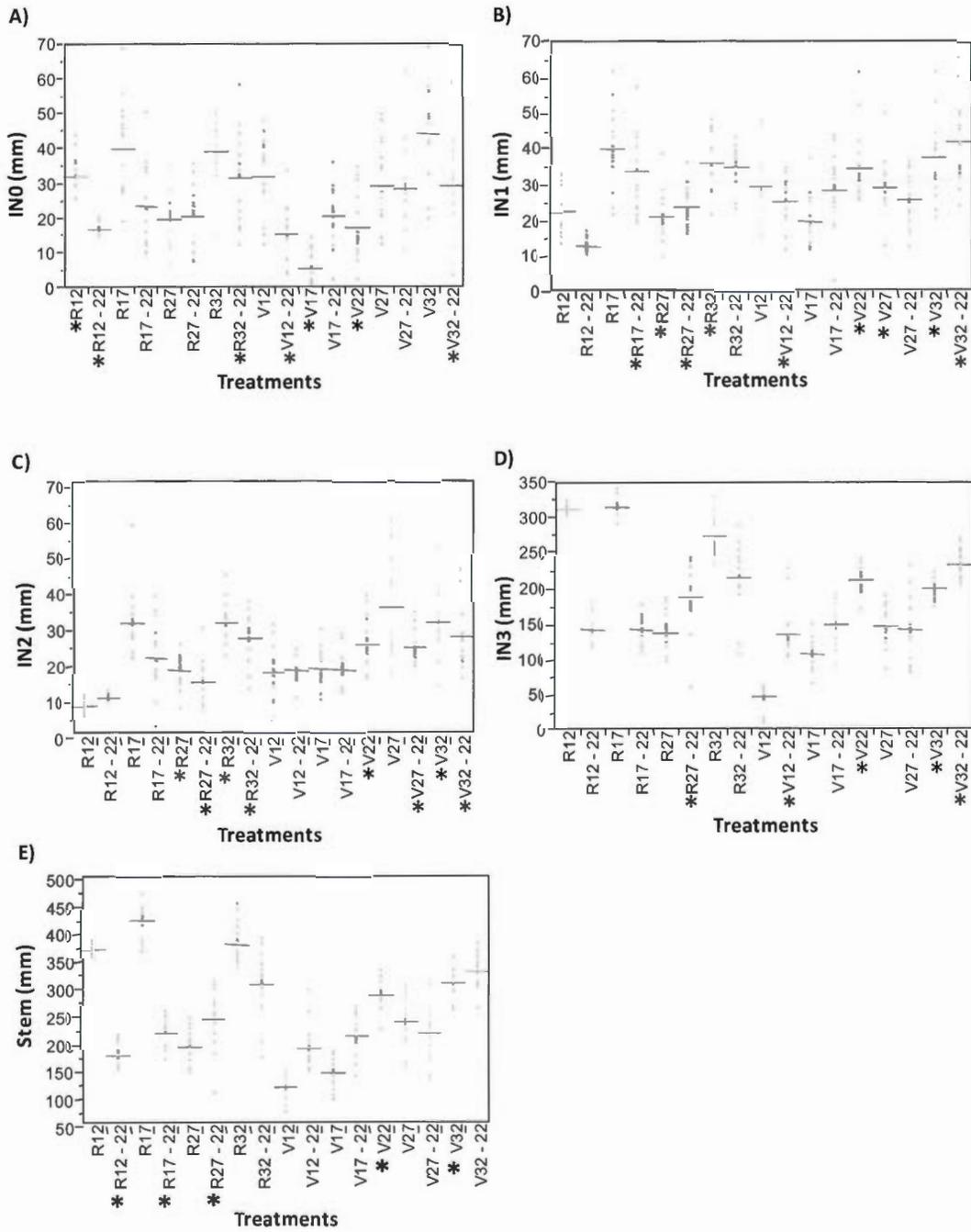


FIGURE 2.9

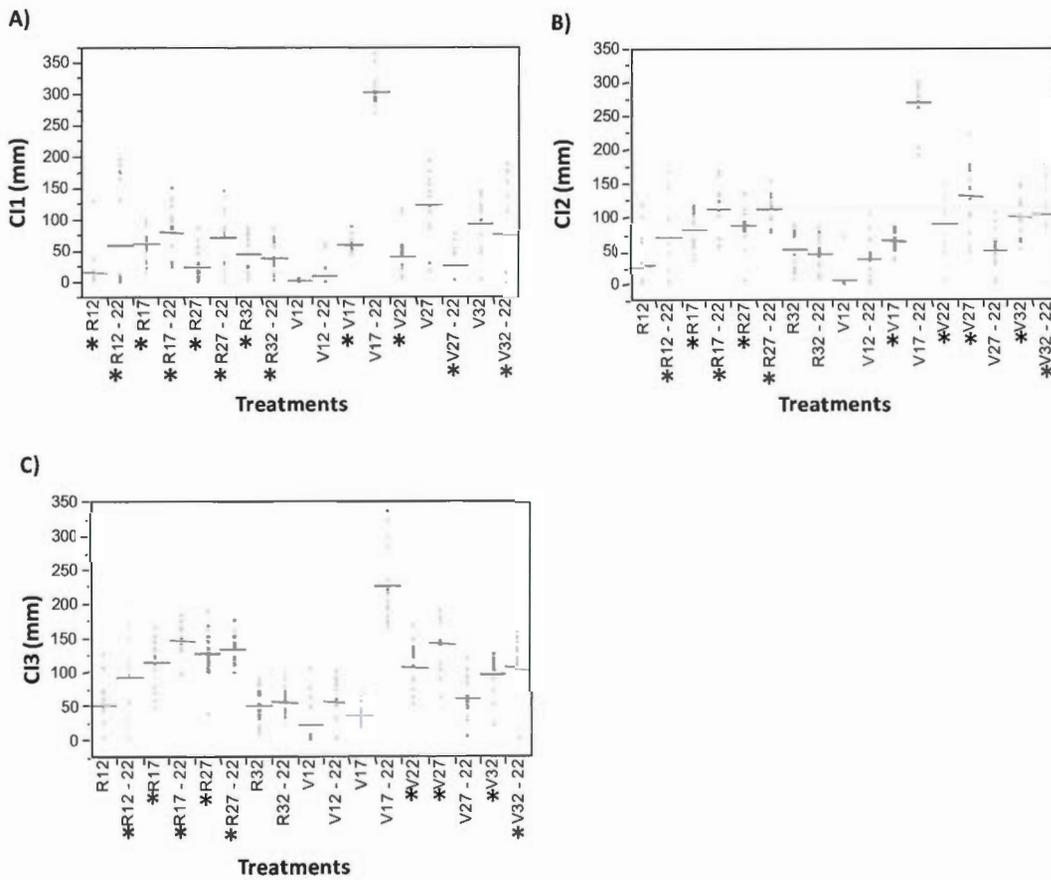


FIGURE 2.10

	V22	V12	V17	V27	V32	R12	R17	R27	R32
IN0	16.97	5.55	16.61	29.37	43.84	19.62	28.83	38.78	30.62
IN1	34.15	19.37	12.45	28.97	37.44	20.53	20.35	35.61	26.92
IN2	25.82	18.95	11.16	36.21	31.75	18.54	12.68	31.74	23.06
IN3	210.81	104.75	140.88	145.80	197.60	136.09	158.90	273.23	96.77
CI1	39.20	1.12	60.04	123.64	92.61	14.21	79.86	24.79	43.79
CI2	89.78	6.25	63.97	132.27	99.59	28.02	112.92	87.29	51.44
CI3	107.22	23.61	37.90	141.64	96.90	50.12	146.52	126.78	50.23

	V22	V12-22	V17-22	V27-22	V32-22	R12-22	R17-22	R27-22	R32-22
IN0	16.97	20.12	31.77	28.50	29.04	20.32	33.13	31.37	28.60
IN1	34.15	28.21	22.27	25.42	41.47	23.28	34.41	34.66	24.76
IN2	25.82	18.71	8.98	25.06	27.93	15.40	16.09	27.52	23.58
IN3	210.81	147.62	308.31	140.91	232.06	186.67	179.59	213.59	88.09
CI1	39.20	9.42	301.08	25.50	75.31	58.73	61.00	70.97	37.52
CI2	89.78	38.53	271.45	51.00	103.27	70.83	81.57	112.13	45.31
CI3	107.22	55.71	225.51	62.93	106.77	92.25	114.22	133.37	55.81

TABLE 2.1

CONCLUSION

Comme c'est déjà connu dans la littérature, le développement et la croissance des plantes sont des phénomènes importants dans leur cycle de vie. Ces phénomènes sont modulés par des facteurs intrinsèques (hormones, gènes, etc.) et des facteurs extrinsèques (facteurs environnementaux comme la température et la photopériode). Les résultats de notre étude ont montré les modifications d'architecture que la plante modèle *Arabidopsis thaliana* peut manifester afin de survivre sous des conditions non optimales de température. Ces modifications sont manifestées au niveau de plusieurs éléments anatomiques en fonction des différents stades de développement (stade végétatif V et stade reproductif R).

Les principaux résultats obtenus dans la présente étude permettent de conclure que l'allongement des entrenœuds (IN) est directement associé à la température de croissance. Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que les plantes ont besoin d'atteindre une certaine taille maximale avant de commencer à former leurs méristèmes floraux, et que cette taille dépend de la température de croissance. Une taille supérieure assurera la compétitivité de la plante dans la nature. Les plantes R sont un peu moins affectées par les variations de température que les plantes V, ce qui est contraire à ce qui est généralement admis.

Afin de mieux comprendre les événements moléculaires associés à ces modifications phénotypiques, particulièrement l'élongation des branches latérales, il serait intéressant de vérifier dans un premier temps le niveau d'expression de certains gènes liés à ce phénomène tel que les gènes *MAX* et *BRC1*. Pour ce faire, j'ai récolté des échantillons des différentes parties de la plante (des nœuds et des entrenœuds), et cela pour les différentes conditions de traitement et à différents stades de développement.

Il faut maintenant extraire les ARNs de ces tissus pour les études subséquentes. Comme déjà mentionné dans la revue de littérature de ce mémoire, les gènes *MAX* et *BRC1* ont été identifiés chez *Arabidopsis*. Les gènes *MAX* codent pour des protéines impliquées dans la synthèse et la régulation de l'activité d'hormones (les strigolactones) agissant négativement sur le développement des branches latérales, et le gène *BRC1* code pour un facteur de transcription agissant aussi négativement sur ce développement. Le tableau ci-dessous représente les oligos des gènes *MAX1*, *MAX2*, *MAX3*, *MAX4* et *BRC1* que j'ai désignés et fait synthétiser pour réaliser les études d'expression génétique par la méthode de transcriptase inverse et PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR). Deux paires d'oligos ont été préparées pour chaque gène. En cas d'échec de la première paire d'oligo la deuxième paire serait utilisée:

Gène	Oligo 5'	Oligo 3'
<i>MAX1</i>	CCCTATTTTCAGATTTTCAGATGGG	CTCTTGCCCTGGTGAAGAAGAGG
<i>MAX1</i>	CCTCGATCAGGTCATTAAAGAGGC	CCCATGTCCCCTTTGGGAG
<i>MAX2</i>	TGTTTCCCTTTCGTCGAGTC	TCTGAGAAGCTCGTTGATGC
<i>MAX2</i>	GGCTTTATGTGGAGGATTGCAG	AGCCACCAAACCCATATCAGTC
<i>MAX3</i>	ACACTCCGAAACGCTTATG	TCGGTAAGAACAAGCGGAAG
<i>MAX3</i>	CGTGGTCGAGTATGCGGTTTCG	CACTTTGTTTACACTCGACACGACCG
<i>MAX4</i>	ATGGTCACGACGTTTTACCC	GATGCTGCACATATCCATCG
<i>MAX4</i>	GCTCTCTCCAAGGTTGATATTGTGG	CGATATCACCCTCCATCATCC
<i>BRC1</i>	GTCTCATATCCGACCGGTGTTAGG	CTTGTTTCGGTCGTGTTAGTATTGC
<i>BRC1</i>	GTCTCATATCCGACCGGTGTTAGG	GTTTCGGTCGTGTTAGTATTGCTGCC

Cette étude moléculaire va permettre de déterminer si la température a un effet sur l'architecture de la plante par l'intermédiaire des gènes *MAX* et *BRC1*. Ceci nous permettra de mieux comprendre les mécanismes fondamentaux permettant entre autre

la croissance en longueur, et l'adaptabilité de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* à son environnement en conditions non-optimales de température. Ceci permettra d'établir un lien entre les signaux environnementaux et les réponses moléculaires associées à la régulation du développement des branches latérales. Ce travail, ainsi que les analyses imminentes de qPCR, contribuera à l'accroissement des connaissances des processus biologiques impliqués. Cela permettra éventuellement de développer de nouvelles approches en sciences et en technologie qui pourraient mener à la sélection de plantes présentant de meilleures caractéristiques en termes de productivité et de rendement.

RÉFÉRENCES

- Adam H, Ouellet F, Kane NA, Agharbaoui Z, Major G, Tominaga Y et Sarhan F. 2007. «Overexpression of TaVRN1 in *Arabidopsis* promotes early flowering and alters development». *Plant and Cell Physiology* 48: 1192-1206.
- 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.
- Barton MK et Poethig RS. 1993. «Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana* - an analysis of development in the wild-type and in the *shoot meristemless* mutant». *Development* 119: 823-831.
- Benlloch R, Berbel A, Serrano-Mislata A et Madueño F. 2007. «Floral initiation and inflorescence architecture: a comparative view». *Annals of Botany* 100: 659-676.
- Bennett T et Leyser O. 2006. «Something on the side: axillary meristems and plant development». *Plant Molecular Biology* 60: 843-854.
- 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.
- Bernard H. 2010. «L'agronomie, science de l'agriculture ?». *Le Mouvement Social* 4: 143-157.
- 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.
- Cosgrove DJ. 1998. «Cell wall loosening by expansins». *Plant Physiology* 118: 333-339.

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.

Demelon A. 1956. «Croissance des végétaux cultivés». Dunod, Paris.

Domagalska MA et Leyser O. 2011. «Signal integration in the control of shoot branching». *Nature Reviews in Molecular and Cellular Biology* 12: 211-221.

Durbak A, Yao H et McSteen P. 2012. «Hormone signaling in plant development». *Current Opinion in Plant Biology* 15: 92-96.

Furner IJ et Pumfrey JE. 1992. «Cell fate in the shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana*». *Development* 115: 755-764.

Gechev TS et Hille J. 2012. «Molecular basis of plant stress». *Cellular and Molecular Life Sciences* 69: 3161-3163.

Gray WM. 2004. «Hormonal regulation of plant growth and development». *PLoS Biology* 2: E311.

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.

Hardtke CS. 2007. «Transcriptional auxin-brassinosteroid crosstalk: who's talking?». *Bioessays* 29: 1115-1123.

Irish VF et Sussex IM. 1992. «A fate map of the *Arabidopsis* embryonic shoot apical meristem». *Development* 115: 745-753.

Jacqumard A, Gadisseur I et Bernier G. 2003. «Cell division and morphological changes in the shoot apex of *Arabidopsis thaliana* during floral transition». *Annals of Botany* 91: 571-576.

Johnson X, Breich 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.

Keller T, Abbott J, Moritz T et Doerner P. 2006. «*Arabidopsis* REGULATOR OF AXILLARY MERISTEMS1 controls a leaf axil stem cell niche and modulates vegetative development». *The Plant Cell* 18: 598-611.

Leyser O. 2009. «The control of shoot branching: an example of plant information processing». *Plant Cell & Environment* 32: 694-703.

Luttge U, Kluge M et Bauer G. 2002. «Botanique». Lavoisier, New York.

Mashiguchi K, Tanaka K, Sakai T, Sugawara S, Kawaide H, Natsume M, Hanada A, Yaeno T, Shirasu K, Yao H, McSteen P, Zhao Y, Hayashi K, Kamiya Y et Kasahara H. 2011. «The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*». *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 108: 18512-18517.

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

McSteen P et Leyser O. 2005. «Shoot branching». *Annual Review of Plant Biology* 56: 353-374.

Medford JI, Behringer FJ, Callos JD et Feldmann KA. 1992. «Normal and abnormal development in the *Arabidopsis* vegetative shoot apex». *The Plant Cell* 4: 631-643.

Mohanty P, Vani B et Prakash JS. 2002. «Elevated temperature treatment induced alteration in thylakoid membrane organization and energy distribution between the two photosystems in *Pisum sativum*». *Zeitschrift fur Naturforschung C, Journal of biosciences* 57: 836-842.

Moubayidin L, Di Mambro R et Sabatini S. 2009. «Cytokinin-auxin crosstalk». *Trends in Plant Science* 14: 557-562.

Mouradov A, Cremer F et Coupland G. 2002. «Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity». *The Plant Cell* 14 Suppl: S111-130.

Napp-Zinn K. 1985. «*Arabidopsis thaliana*». In Handbook of flowering. Halevy AH, ed. pp 492-503. Boca Raton, USA. CRC Press.

- 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.
- Olszewski N, Sun TP et Gubler F. 2002. «Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways». *The Plant Cell* 14 Suppl: S61-80.
- Ongaro V et Leyser O. 2008. «Hormonal control of shoot branching». *Journal of Experimental Botany* 59: 67-74.
- Papy F. 2004. «Les essais au champs de plantes transgéniques: un bilan». *Natures Sciences Sociétés* 339-342.
- Pyl ET, Piques M, Ivakov A, Schulze W, Ishihara H, Stitt M et Sulpice R. 2012. «Metabolism and growth in *Arabidopsis* depend on the daytime temperature but are temperature-compensated against cool nights». *The Plant Cell* 24: 2443-2469.
- Reinhardt D et Kuhlemeier C. 2002. «Plant architecture». *EMBO Reports* 3: 846-851.
- Rivero-Lepinckas L, Crist D et Scholl R. 2006. «Growth of plants and preservation of seeds». *Methods in Molecular Biology* 323: 3-12.
- Robert HS et Friml J. 2009. «Auxin and other signals on the move in plants». *Nature Chemical Biology* 5: 325-332.
- Schultz EA et Haughn GW. 1991. «Leafy, a homeotic gene that regulates inflorescence development in *Arabidopsis*». *The Plant Cell* 3: 771-781.
- 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». *Journal of Biological Chemistry* 279: 46940-46945.
- Soppe WJ, Bentsink L et Koornneef M. 1999. «The early-flowering mutant *efs* is involved in the autonomous promotion pathway of *Arabidopsis thaliana*». *Development* 126: 4763-4770.
- 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.

Steeves TA et Sussex IM. 1989. «Patterns in plant development». Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Stepanova AN, Yun J, Robles LM, Novak O, He W, Guo H, Ljung K et Alonso JM. 2011. «The *Arabidopsis* YUCCA1 flavin monooxygenase functions in the indole-3-pyruvic acid branch of auxin biosynthesis». *The Plant Cell* 23: 3961-3973.

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.

Thomashow MF. 2010. «Molecular basis of plant cold acclimation: insights gained from studying the CBF cold response pathway». *Plant Physiology* 154: 571-577.

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.

Vanderhoef LN et Dute RR. 1981. «Auxin-regulated wall loosening and sustained growth in elongation». *Plant Physiology* 67: 146-149.

Weiss D et Ori N. 2007. «Mechanisms of cross talk between gibberellin and other hormones». *Plant Physiol* 144: 1240-1246.

Wolters H et Jurgens G. 2009. «Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development». *Nature Reviews Genetics* 10: 305-317.