

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG



### ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes

UPR CNRS 2357

THÈSE présentée par :

## Lucas JILLI

soutenue le : 4 octobre 2022

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg** Discipline/ Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

# Caractérisation fonctionnelle du complexe DELLA-Zinc-Finger HomeoDomain dans la régulation du développement des plantes

THÈSE dirigée par : Dr. ACHARD Patrick	DR CNRS, Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Strasbourg
THÈSE co-dirigée pa	r :
Dr. DAVIERE Jean-Michel	Maître de conférences, Université de Strasbourg
<b>RAPPORTEURS</b> :	
Dr. ARNAUD Nicolas	CR INRAE, Institut Jean-Pierre Bourgin, Versailles
Dr. ATANASSOVA Rossitza	Professeure à l'Université de Poitiers, Laboratoire d'Ecologie et Biologie des Interactions, Institut Ecologie et Environnement
<b>EXAMINATEURS</b> :	
Dr. HEITZ Thierry	DR CNRS, Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Strasbourg
Dr. FOUCHER Fabrice	DR INRAE, Institut de Recherche en Horticulture et Semences, Angers

#### Remerciements

Je voudrais avant tout remercier les membres du jury, Nicolas Arnaud, Rossitza Atanassova, Thierry Heitz et Fabrice Foucher, pour avoir accepté d'étudier et d'évaluer ces quatre années de travail.

J'aimerais ensuite remercier Patrick, de m'avoir accueilli dans son équipe pour me permettre de réaliser ces travaux de thèse. J'ai beaucoup apprécié la pédagogie dont tu fais preuve, ta grande disponibilité, ainsi que ta rigueur scientifique qui est inébranlable. Un grand merci pour tout ce que tu as fait.

Mes remerciements, qui sont tout aussi forts et sincères, vont également à Jean-Michel, mon co-directeur de thèse. Tu m'as encadré dès mon tout premier stage à l'institut, il y a plus de 5 ans, et depuis ce jour, tu m'as apporté énormément au niveau scientifique. Je n'oublierai jamais toutes ces journées, parfois difficiles mais toujours pleines de motivation, pendant lesquelles nous avons mis en place diverses expériences de biologie moléculaire (mention spéciale pour les expériences en double-hybride). Merci pour ta bonne humeur quotidienne et contagieuse, et pour tous les bons moments partagés ensemble en dehors de l'institut, que ça soit autour d'un verre, au restaurant ou bien à la montagne.

D'autre part, un grand merci à tous les membres de l'équipe Gibbérellines et adaptation à l'environnement. Ce fût un plaisir d'évoluer dans un environnement rythmé quotidiennement par la bonne humeur et l'enthousiasme scientifique.

Lali, merci pour ce voyage par procuration en Géorgie, à travers les diverses spécialités culinaires que tu m'as fait goûter (mention spéciale pour les Churchkhela), ou en me faisant découvrir certaines traditions culturelles ou religieuses. Merci pour tout ce que tu fais au niveau de la gestion du laboratoire et pour ton aide sur certaines expériences, notamment pour les nombreuses immersions florales que nous avons réalisées ensemble.

Mathilde, un grand merci pour ton aide concernant les analyses statistiques. Je te souhaite beaucoup de réussite pour ta 4<sup>ème</sup> année de thèse et ton poste ATER.

Aux anciens membres de l'équipe, Lucie et Amelia, ce fût un plaisir de travailler à vos côtés pendant plus de 2 ans, merci pour tous ces bons moments que nous avons passés ensemble au labo, mais aussi en dehors. Emilie, je te souhaite le meilleur pour la suite, tant au niveau personnel que scientifique.

J'aimerais remercier tous les membres de l'équipe de Pascal Genschik, nos voisins du 4<sup>ème</sup> étage, et plus particulièrement Marie-Claire, Esther, Sandra, Mikhail et Thomas pour leurs précieux conseils scientifiques. Durant ces 4 années, ce fût également un véritable plaisir de partager avec vous autant de moments conviviaux, autour d'un café ou bien pendant la pause déjeuner. Aleksandar, je suis certain que tu vas gérer au mieux cette fin de thèse et je te souhaite, à toi et à ta petite famille, le meilleur pour la suite.

Je remercie également les plateformes techniques, scientifiques et administratives de l'IBMP, pour leur aide et leurs précieux conseils. Merci à Malek Alioua et Sandrine Koechler de la plateforme de séquençage, Mathieu Erhardt et Jérôme Mutterer de la plateforme de microscopie, Nicolas Baumberger de la plateforme de production et purification des protéines, et Michel Kerneis, Anaïs Zehnter et Agathe Humbert de la plateforme de production végétale.

Il est maintenant temps de remercier mes amis proches, ceux avec qui j'ai partagé d'innombrables bons moments, depuis bien des années. De la manière la plus sincère qu'il soit, un grand merci à vous mes « frérots », Erwan, Quentin et Ibra. Merci également à Claire, Léa et Wassila, vous êtes vraiment formidables. Vous savez très bien à quel point je vous apprécie et je me languis déjà de tous les restaurants, et autres festivités, que nous allons partager tous ensemble, ces prochaines années.

Thomas, mon cousin, mon ami, mon frère, merci d'être toujours présent pour moi, tu es une véritable source d'inspiration. Merci également pour toutes ces séances de muscu et d'escalade, pour ces trails et pour ces nuits à la belle étoile. Tous mes vœux de réussite et de bonheur, à toi et à Solenne. PS : Tu auras toujours mon soutien, « je te kiffe ma biche ».

Merci également à Guillaume, Xavier et Pauline pour les trails que nous avons courus ensemble, en espérant évidemment qu'il y en aura d'autres, vous êtes une source de motivation !

Enfin, j'aimerais remercier toute ma famille, notamment Chantal, Stef, Olivier, Nadine, Clara et Emma, pour leur soutien. Merci également à ma grande sœur, Myriam, et à ma grand-mère, Raymonde. Pour finir, 1000 mercis à mes parents, Sylvie et Marc, merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis de réaliser ces études, ainsi que bien d'autres projets, avec un soutien toujours inconditionnel.

### Sommaire

Liste des figures et tableaux	1
Liste des figures et tableaux supplémentaires	4
Liste des annexes	5
Abréviations	7
Introduction	13
Préambule	
1. Les gibbérellines	
1 1 Découverte des GA et généralités	17
1.2 Métabolisme des GA	21
1.2.1. Généralités	21
1.2.2. Biosynthèse des GA	23
1.2.3. Catabolisme des GA	29
1.2.4. Sites de production des GA	33
1.3. Transport des GA	37
2. La voie de signalisation des GA	41
2.1. Perception des GA et formation du complexe GA-GID1	41
2.2. Les DELLA, régulateurs clés de la signalisation GA	43
2.3. Dégradation des DELLA par le protéasome	47
2.4. Régulation de l'activité et de la stabilité des DELLA par des mécanismes alterna	itits
	49
2.5. Mecanismes d'action des DELLA.	51
2.5.1. Mécanisme de transactivation	วา 53
2.6. Bôle de la voie de signalisation sur l'homéostasie des GA	55
3 Bôle des GA dans le développement des plantes	
3.1. Généralités	
3.2. Germination de la graine	
3.3. Elongation de l'hypocotyle	
3.4. Croissance racinaire	61
3.5. Hauteur de la plante	63
3.6. Initiation et développement des branches secondaires	67
3.7. Transition florale	71
3.8. Autres aspects développementaux régulés par des interactions FT-DELLA	75
4. Les facteurs de transcription à Zinc-finger Homeodomain (ZFHD)	75
4.1. Les facteurs de transcription à homéodomaine	75
4.2. Identification de la famille multigénique ZFHD et généralités	77
4.3. Dimérisation fonctionnelle et élément <i>cis</i> reconnu par les ZFHD	81
4.4. Fonctions biologiques des ZFHD	83
4.4.1. Patrons d'expression des ZFHD.	83
4.4.2. Rôle des ZFHD dans le développement des plantes	85
5. Objectifs de la these	91
Résultats	. 93
Chapitre 1 : Caractérisation de l'interaction entre les protéines DELLA et les	
facteurs de transcription ZFHD	95
1. Introduction du chapitre 1	95
2. Interactions ZFHD-DELLA en système hétérologue chez la levure	97
3. Interactions ZFHD-DELLA in planta en expression transitoire	99
4. Interaction HB30-RGA in planta chez Arabidopsis thaliana	101
5. Domaines engagés dans l'interaction ZFHD-DELLA	103

6. Dimérisation des ZFHD in planta et impact des protéines DELLA sur la formation	des
7 Discussion du chapitro 1	105
7. Discussion du chapitre 1	107
1 Introduction du chapitro 2	107
Initioduction du Chapitie 2     Détermination de l'élément de concensus reconnu par les ZELD	107
2. Determination de referient <i>cis</i> consensus reconnu par les ZFHD	.109
3. Mecanisme d'action des DELLA sur les ZFHD	.       . 
3.1. Mise en evidence du mecanisme d'activité transcriptionnelle des ZEHD	
4. Discussion du chapitro 2	110
4. Discussion du chapite 2	110
1 Introduction du chapitro 2	.119
Introduction du chapitre 3     Destile d'expression des ZEUD eu sours du développement d'Archidensis	. 119
2. Profilis d'expression des ZFHD au cours du developpement d'Arabidopsis	. 121
2.1. Analyse in silico des patrons d'expression des ZFHD.	100
2.2. Analyse de l'expression des ZFHD à divers stades de développement	105
3. Patrons d'expression et d'accumulation des ZFHD au niveau tissulaire	.125
4. Discussion du chapitre 3	.127
Chapitre 4 : Etude morphologique des mutants zind chez Arabidopsis thaliana	.129
1. Introduction du chapitre 4	.129
2. Stratégie pour obtenir un mutant multiple <i>zfhd</i>	.131
2.1. Caractérisation des mutants simples d'insertion T-DNA	. 131
2.2. Obtention de mutants multiples <i>zfhd</i>	. 133
3. Analyse morphologique des mutants <i>zfhd</i>	.135
3.1. Longueur de l'hypocotyle	. 135
3.2. Etude du systeme racinaire	. 137
3.3. Mesure de la surface foliaire	. 139
3.4. Analyse de la transition horale	. 141
3.5. Analyse detailiee ou developpement des parties aenemies	1/1
3.5.2. Etude de la ramification des parties aériennes	1/12
3.5.2. Elude de la familication des parties achemies	1/13
A Stratégies alternatives pour obtenir des mutants hypomorphes ou nuls pour les qu	. 140 ànac
HB30 of HB33	1/5
4 1 Les micro-ΔRN artificiels	145
4.2 La technique du CBISPB-Cas9	147
4.3. La fusion d'un domaine SBDX pour convertir HB30 en répresseur	. 147
5 Etude de l'impact d'une suraccumulation de HB30 sur la croissance des plantes	151
6 Discussion du chapitre 4	151
Chapitre 5 : Caractérisation du régulon ZEHD et implication de la voie de	
signalisation des GA dans sa régulation	153
1 Introduction du chapitre 5	153
2 Caractárication du régulan ZEUD par DNA sog	155
2. Caracterisation du regulon ZERD par RivA-Seq	150
2.1. Recherche de cibles candidats	162
3. Effet de l'accumulation d'une protéine DELLA pen-dégradable, dans les territeires	. 100
d'expression d'un ZEHD, sur le développement d'Archidensie	3 160
4 Discussion du chapitre 5	100
4. Discussion du chapitre 5	.105
iscussion générale	169
Partie 1. Effet des protéines DELLA sur l'activité transcriptionnelle d'une nouvel	le
famille de DIP, les Zinc-Finger Homeodomain (ZFHD).	.171
Partie 2. Rôle de l'interaction ZFHD-DELLA sur le développement des plantes	.179
onclusions générales et perspectives	189
igures supplémentaires	199

Mat	ériels et méthodes	221
1.	. Matériels	222
	1.1. Matériel végétal	222
	1.1.1. Mutants d'insertion T-DNA	222
	1.1.2. Lignées transgéniques	222
	1.2. Souches bactériennes et levures	222
	1.2.1. Escherichia coli	222
	1.2.2. Agrobacterium tumefaciens	223
	1.2.3. Saccharomyces cerevisae	223
2.	. Méthodes	223
	2.1. Techniques relatives à la culture d'Arabidopsis thaliana	223
	2.1.1. Cultures in vitro	223
	2.1.2. Culture in vitro avec induction à l'œstradiol (lignées HB30-SRDX)	224
	2.1.3. Cultures en sol.	224
	2.1.4. Transformation stable d'Arabidopsis thaliana	224
	2.2. Techniques relatives à l'ADN	225
	2.2.1. Extraction de l'ADN	225
	2.2.2. Purification de l'ADN	226
	2.2.3. Purification de plasmide	226
	2.2.4. La PCR	226
	2.2.5. Purification des produits de PCR.	228
	2.2.6. Clonage par le systeme Gateway	228
	2.2.7. Cionage par enzyme de restriction	229
	2.2.0. Genolypage des mutants d'insertion 1-DNA	201 221
	2.3.1 Extraction dos APN	201
	2.3.2 Transcription inverse des ARN	237
	2.3.3 PCB quantitative	232
	2.3.4 Analyse RNA-seg	232
	2.4 Analyse des protéines	233
	2.4.1 Extraction des protéines totales	233
	2.4.2. Quantification des protéines	233
	2.4.3. Séparation et détection des protéines par SDS-PAGE	233
	2.4.4. Observation de la fluorescence GFP et RFP par microscopie confocale	234
	2.4.5. Expression transitoire de protéines chez Nicotiana benthamiana	234
	2.5. Analyses histochimiques	235
	2.5.1. Coloration GUS	235
	2.6. Techniques relatives aux interactions protéine-protéine	235
	2.6.1. Double-hybride	235
	2.6.2. FRET-FLIM	236
	2.6.3. Co-immunoprécipitation (Co-IP)	236
	2.7. Techniques relatives aux interactions protéines-ADN	237
	2.7.1. Retard sur gel (EMSA, Electro-Mobility Shift Assay)	237
	2.7.2. Mesure de l'activité transcriptionnelle du complexe HB30-DELLA in planta à l'aid	le du
	système luciferase/renilla	237
	2.8. Clonage des lignées transgéniques	238
	2.8.1. Les micro-ARN artificiels	238
	2.8.2. Fusion d'un domaine SRDX, afin de convertir un facteur de transcription en répre	esseur
		238
	2.8.3. Stratégie CRISPR-Cas9	238
	2.9. Analyses phenotypiques chez Arabidopsis thaliana	239
	2.9.1. Cultures in vitro	239
	2.9.1.1. Mesure de la longueur des hypocotyles	239
	2.9.1.2. Mesure de la longueur des racines	239
	2.9.2. Ullures en sol.	239
	2.3.2. ו. ואופטוופ על ום טוומניל וטוומוול	240

2.9.2.2. Analyse du temps de floraison	240
2.9.2.3. Mesure de la hauteur des plantes	240
2.9.2.4. Analyse de la ramification des parties aériennes	240
2.10. Analyses statistiques	240
2.11. Autres constructions utilisées dans cette étude	241
Bibliographie	243
Annexes	265
Annexe 1. Amorces utilisées pour le clonage des régions codantes	266
Annexe 2. Amorces utilisées pour les gRT-PCR	267
Annexe 3. Amorces utilisées pour les RT-PCR (PCR sur ADNc)	267
Annexe 4. Amorces utilisées pour le génotypage des mutants zfhd	268
Annexe 5. Amorces utilisées pour le clonage des fusions transcriptionnelles et	
traductionnelles	269
Annexe 6. Oligonucléotides utilisés dans les expériences de retard sur gel	269
Annexe 7. Amorces utilisées pour le clonage des versions délétées de HB30 et	HB34
· · · · ·	269
Annexe 8. Amorces utilisées pour le clonage de l'amiR ciblant HB30	270
Annexe 9. Amorces utilisées pour le clonage des lignées SRDX	270
Annexe 10. Amorces utilisées pour le clonage des constructions nécessaires au	x tests
d'activité transcriptionnelle (système luciférase)	270
Annexe 11. Amorces diverses	270
Résultats obtenus ayant été publiés dans des articles scientifiques	271
Annexe 12. Article 1.	271
Annexe 13. Article 2.	271

#### Liste des figures et tableaux

**Figure 1.** Symptômes de la maladie bakanae observés chez le riz et causés lors d'une infection par le champignon *Gibberella fujikoroi.* (p.16)

Figure 2. Application d'acide gibbérellique sur des plantes à intérêt agronomique. (p.18)

Figure 3. Structure chimique des gibbérellines. (p.20)

Figure 4. Biosynthèse des GA, du GGDP à l'ent-kaurène. (p.22)

**Figure 5.** Phénotype des mutants *ga1-3* et *ga2* chez *Arabidopsis* dont les gènes codant pour les enzymes CPS et KS sont mutés, respectivement. (p.22)

Figure 6. Biosynthèse des GA, de l'*ent*-kaurène à la GA<sub>12</sub> (p.24)

**Figure 7.** Phénotype des mutants *ga3, kao1* et *kao2* chez *Arabidopsis,* dont les gènes codant pour les enzymes KO, KAO1 et KAO2 sont mutés, respectivement. (p.24)

**Figure 8.** Biosynthèse des GA, de la GA<sub>12</sub> aux GA bioactives. (p.26)

Figure 9. Phénotype des mutants ga20ox et ga3ox chez Arabidopsis. (p.28)

**Figure 10.** Phénotype de lignées transgéniques d'*Arabidopsis* qui surexpriment différents gènes codant pour des enzymes impliquées dans le catabolisme des GA. (p.30)

**Figure 11.** Localisation histochimique de l'activité du promoteur du gène *GA1*, chez une lignée transgénique d'*Arabidopsis* contenant la construction *pGA1-GUS*. (p.34)

**Figure 12.** Profils d'expression des gènes *GA200x* à différents stades de développement chez *Arabidopsis.* (p.34)

**Figure 13.** Localisation histochimique de l'activité du promoteur *des gènes GA3ox1* et *GA3ox2* chez des lignées transgéniques d'*Arabidopsis*. (p.34)

**Figure 14.** Analyse phénotypique des parties aériennes suite à une greffe de scions ou de porte-greffe provenant de différents mutants de biosynthèse des GA, chez *Arabidopsis*. (p.36)

Figure 15. Transporteurs de GA, identifiés à ce jour. (p.38)

Figure 16. Phénotype des mutants gid1 chez Arabidopsis. (p.40)

Figure 17. Interaction entre le complexe GA-GID1 et les DELLA. (p.40)

Figure 18. Structure d'une DELLA avec ses différents domaines. (p.42)

**Figure 19.** Phénotype du mutant de biosynthèse *ga1-3* croisé successivement avec différents mutants *della*, chez *Arabidopsis*. (p.42)

Figure 20. Patron d'expression de la protéine DELLA RGL2, phénotype du mutant ga1-3 rgl2-

1 et analyse de la germination des graines du mutant rgl2. (p.44)

Figure 21. Schéma de la voie de signalisation des GA. (p.46)

Figure 22. Mécanismes d'action des DELLA sur les protéines régulatrices. (p.50)

**Figure 23.** Rôle du complexe DELLA-ABI5-ABI3 sur la germination des graines chez *Arabidopsis.* (p.58)

**Figure 24.** Rôle du complexe PIF4-BZR1-ARF6 sur l'élongation cellulaire chez *Arabidopsis*. (p.58)

**Figure 25.** L'accumulation des DELLA inhibe la croissance du méristème racinaire chez *Arabidopsis.* (p.60)

**Figure 26.** Implication de la voie de signalisation des GA dans le contrôle de la prolifération cellulaire chez *Arabidopsis.* (p.60)

**Figure 27.** Implication des GA dans le contrôle de la taille du méristème racinaire, chez *Arabidopsis.* (p.62)

**Figure 28.** Les protéines DELLA GAI et RGA répriment la division cellulaire dans l'apex caulinaire au stade inflorescentiel chez *Arabidopsis*. (p.64)

**Figure 29.** La voie de signalisation des GA contrôle la hauteur de la plante à l'aide du complexe DELLA-TCP chez *Arabidopsis*. (p.64)

**Figure 30.** Rôle du complexe DELLA-SPL9 sur la formation des bourgeons axillaires chez *Arabidopsis.* (p.68)

**Figure 31.** Le complexe DELLA-BZR1 contrôle l'expression de *BRC1*, impliqué dans la croissance des bourgeons axillaires chez *Arabidopsis*. (p.70)

**Figure 32.** Rôle de la voie de signalisation des GA sur la transition florale, au niveau du méristème apical caulinaire et des feuilles. (p.72)

Figure 33. Les familles de protéines à homéodomaine, chez les plantes. (p.74)

Figure 34. La famille des facteurs de transcription ZFHD. (p.76)

Figure 35. Analyse de la dimérisation des ZFHD. (p.80)

Figure 36. Le facteur de transcription HB33 (ZFHD) se lie spécifiquement au consensus ATTA. (p.82)

Figure 37. Profils d'expression des gènes MINI ZINC FINGER (MIF) chez Arabidopsis. (p.84)

Figure 38. Profils d'expression des gènes ZFHD chez Arabidopsis. (p.84)

Figure 39. Rôle du dimère HB33-MIF1 dans le développement d'Arabidopsis. (p.86)

Figure 40. Rôle de HB25 sur l'élongation de l'hypocotyle chez Arabidopsis. (p.88)

**Figure 41.** Fonctions biologiques des ZFHD dans le développement, la croissance et la réponse au stress hydrique chez *Arabidopsis*. (p.90)

**Figure 42.** HB30 interagit avec les protéines DELLA GAI, RGA, RGL1, RGL2 et RGL3 en système hétérologue chez la levure. (p.94)

**Figure 43.** Interactions entre les FT ZFHD et les protéines DELLA GAI et RGA en système hétérologue, chez la levure. (p.94)

**Figure 44.** Extraction protéique des levures co-transformées et analyse par Western Blot de l'accumulation des ZFHD. (p.96)

**Figure 45.** Arbre phylogénétique des 14 membres de la famille des facteurs de transcription ZFHD chez *Arabidopsis.* (p.96)

Figure 46. HB30 interagit avec la protéine DELLA RGA in planta, en système transitoire. (p.98)

**Figure 47.** HB25 interagit avec la protéine DELLA RGA *in planta*, en système transitoire. (p.100)

Figure 48. HB30 interagit avec la protéine DELLA RGA, chez Arabidopsis. (p.102)

**Figure 49.** L'homéodomaine des ZFHD est engagé dans l'interaction avec les protéines DELLA. (p.104)

**Figure 50.** Le motif LHR1 des protéines DELLA est engagé dans l'interaction avec les ZFHD. (p.106)

Figure 51. Dimérisation des ZFHD *in planta* et impact des protéines DELLA. (p.108)

Figure 52. Alignement des éléments cis reconnus par les ZFHD. (p.110)

Figure 53. HB30 interagit spécifiquement à l'ADN via le motif TTCATTAATTACGT. (p.112)

Figure 54. Accumulation des protéines HB30 et RGA in vitro. (p.114)

Figure 55. RGA inhibe la capacité de HB30 à interagir à l'élément *cis* consensus. (p.116)

Figure 56. RGA inhibe l'activité transcriptionnelle de HB30. (p.118)

Figure 57. HB25, HB29 et HB34 sont des activateurs de la transcription. (p.120)

**Figure 58.** Analyse *in silico* de l'expression des gènes *ZFHD* chez *Arabidopsis thaliana*. (p.122)

**Figure 59.** Profils d'expression des gènes de la famille *ZFHD* au cours du développement d'*Arabidopsis thaliana*. (p.124)

**Figure 60.** Profils d'expression des gènes de la famille ZFHD dans les racines d'*Arabidopsis thaliana*. (p.126)

**Figure 61.** Patrons d'expression ou d'accumulation des ZFHD au niveau tissulaire, chez *Arabidopsis thaliana*. (p.128)

**Figure 62.** Patrons d'expression ou d'accumulation des ZFHD au niveau tissulaire, dans les racines d'*Arabidopsis thaliana*. (p.130)

Figure 63. Caractérisation des mutants zfhd par PCR à partir d'ADN génomique. (p.132)

Figure 64. Caractérisation des mutants zfhd par PCR sur ADN complémentaire. (p.134)

Figure 65. Caractérisation des mutants *zfhd* par qRT-PCR sur ADN complémentaire. (p.136)

Figure 66. Mesure de la longueur de l'hypocotyle chez les mutants zfhd. (p.138)

Figure 67. Etude de la croissance du système racinaire chez les mutants zfhd. (p.140)

Figure 68. Mesure de la surface foliaire chez les mutants zfhd. (p.142)

Figure 69. Analyse de la transition florale chez les mutants *zfhd*. (p.144)

Figure 70. Mesure de la hauteur finale des mutants *zfhd*. (p.146)

Figure 71. Analyse morphologique des hampes florales du quadruple mutant zfhd. (p.148)

Figure 72. Mesure de la longueur des entre-nœuds chez les mutants zfhd. (p.150)

Figure 73. Etude fonctionnelle de la construction inductible HB30-SRDX. (p.152)

Figure 74. Caractérisation des lignées surexpresseurs pour HB30. (p.154)

Figure 75. Gènes différentiellement exprimés déterminés par RNA-seq. (p.156)

**Figure 76.** Analyse comparative entre les DEG DOWN, chez HB30-SRDXind et les DEG UP, chez HB30OE. (p.158)

Figure 77. Recherche du motif reconnu par les ZFHD chez les gènes cibles candidats. (p.160)

**Figure 78.** Analyse comparative entre les DEG UP, chez HB30-SRDXind et les DEG UP ou DOWN, chez HB30OE. (p.162)

**Figure 79.** Analyse des DEG UP ou DOWN chez HB30OE – Recherche de cibles secondaires des ZFHD. (p.164)

**Figure 80.** Expression ectopique d'une DELLA non-dégradable, dans les territoires d'expression de *HB23*. (p.166)

**Figure 81.** Patrons d'accumulation de HB29, HB30, TCP14 et TCP15 au niveau des inflorescences, chez *Arabidopsis thaliana*. (p.192)

**Figure 82.** Fonctions biologiques du complexe transcriptionnel ZFHD-DELLA dans le développement, chez *Arabidopsis*. (p.194)

#### Liste des figures et tableaux supplémentaires

**Figure S1.** Interactions entre les FT ZFHD et les protéines DELLA GAI et RGA en système hétérologue chez la levure. (p.200)

**Figure S2.** HB30 interagit avec la protéine DELLA RGA *in planta*, en système transitoire. (p.201)

Figure S3. HB30 interagit avec la protéine DELLA RGA, *in planta*. (p.202)

**Figure S4.** L'homéodomaine des ZFHD est engagé dans l'interaction avec les protéines DELLA. (p.203)

**Figure S5.** Le motif LHR1 des protéines DELLA est engagé dans l'interaction avec les ZFHD. (p.204)

Figure S6. Dimérisation des ZFHD in planta et impact des protéines DELLA. (p.205)

**Figure S7.** Analyse *in silico* de l'expression des gènes *ZFHD* chez *Arabidopsis thaliana*. (p.206)

**Figure S8.** Profils d'expression des gènes de la famille ZFHD, au cours du développement d'*Arabidopsis thaliana*. (p.207)

**Figure S9.** Profils d'expression des gènes de la famille ZFHD, au cours du développement d'*Arabidopsis thaliana*. (p.208)

**Figure S10.** Analyses préliminaires de la compensation de l'expression génique, chez les mutants *zfhd*. (p.209)

Figure S11. Etude de la croissance du système racinaire, chez les mutants zfhd. (p.210)

Figure S12. Analyse du nombre de feuilles rosettes, chez les mutants zfhd. (p.211)

**Figure S13.** Mesure de la hauteur de la hampe florale des mutants *zfhd*, 14 jours après floraison. (p.211)

**Figure S14.** Analyse de la ramification des parties aériennes, chez les mutants *zfhd*. (p.212) **Figure S15.** Expression relative de *HB30* chez des lignées amiR. (p.213)

**Figure S16.** Analyse en composantes principales, ou PCA (Principal Component Analysis) à partir des données de RNA-seq. (p.214)

**Figure S17.** Liste des éléments *cis* ZFHD retrouvés dans les promoteurs de gènes cibles candidats. (p.215)

Tableau S1. Protéines interagissant avec les DELLA (DIP) chez *Arabidopsis*, partie 1. (p.216)
Tableau S1. Protéines interagissant avec les DELLA (DIP) chez *Arabidopsis*, partie 2. (p.217)
Tableau S2. Récapitulatif des mutants *zfhd*. (p.218)

#### Liste des annexes

Annexe 1. Amorces utilisées pour le clonage des régions codantes. (p.266)

Annexe 2. Amorces utilisées pour les qRT-PCR. (p.267)

Annexe 3. Amorces utilisées pour les RT-PCR (PCR sur ADNc). (p.267)

Annexe 4. Amorces utilisées pour le génotypage des mutants zfhd. (p.268)

**Annexe 5.** Amorces utilisées pour le clonage des fusions transcriptionnelles et traductionnelles. (p.269)

Annexe 6. Oligonucléotides utilisés dans les expériences de retard sur gel. (p.269)

Annexe 7. Amorces utilisées pour le clonage des versions délétées de HB30 et HB34. (p.269)

Annexe 8. Amorces utilisées pour le clonage de l'amiR ciblant HB30. (p.270)

Annexe 9. Amorces utilisées pour le clonage des lignées SRDX. (p.270)

**Annexe 10.** Amorces utilisées pour le clonage des constructions nécessaires aux tests d'activité transcriptionnelle (système luciférase). (p.270)

Annexe 11. Amorces diverses. (p.270)

Annexe 12. Article 1. (p.271)

Annexe 13. Article 2. (p.271)

### Abréviations

°C	Degrés Celsius
2-ODD	Dioxygénases 2-oxoglutarate-dépendantes
Δ	Délétion
Ø	Diamètre
ABA	Acide abscissique
ABI3, 5	ABA-INSENSITIVE3, 5
AD	Activating domain
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
Alx4	Aristaless-like4
amiR	artificial micro-RNA
ARF	Auxine-Response Factor
ARR	type-B ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR
ASL	Asymetric leaves(AS)/Lateral organ boundary (LOB)
BD	Binding domain
BELL	Protéine ayant un homéodomaine associé à un domaine Bell
BET	bromure d'ethydium
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
BR	Brassinostéroïdes
BRC1	BRANCHED1
BSA	Albumine de Sérum Bovin
BT5	BTB AND TAZ DOMAIN protein 5
BZR1	Brassinazole resistant 1
С	carbone
C19-GA	Gibbérelline à 19 carbones
C20-GA	Gibbérelline à 20 carbones
CDS	coding DNA sequence
СК	Cytokinines
CLE	CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION-RELATED
cm	centimètre
Co-IP	Co-Immunoprécipitation
Col-0	écotype Columbia-0
COP1	CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1
СРР	<i>ent</i> -copalyl diphosphate

CPS	ent-copalyl diphosphate synthase
CQ	centre quiescent
CUC	CUP-SHAPED COTYLEDON
CYCB1	cyclineB1
CYC/CDK	cyclin/cyclin-dependant kinase
DEG	Differentially Expressed Genes
DIP	DELLA-Interacting Proteins
DMAPP	diméthylallyl-pyrophosphate
DMSO	diméthylsulfoxyde
dNTP	mélange des 4 désoxyribonucléotide triphosphate
DO	Densité Optique
DTT	dithiothréitol
EAR	ET-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétraacétique
EMS	éthyl méthanesulfonate
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
ERD1	EARLY RESPONSE TO DEHYDRATATION STRESS 1
ET	Ethylène
EUI	ELONGATED UPPERMOST INTERNODE
FC	Fold Change
FIT	FER-like IRON DEFICIENCY-INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR
FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
FT ou TF	facteurs de transcription
GA	gibbérellines
GA13ox	GA13-oxydase
GA20ox	GA20-oxydase
GA2ox	GA2-oxydase
GA3ox	GA3-oxydase
GAI	GA INSENSITIVE
GAMT1, 2	Gibbérelline Methyltransferase 1, 2
GFP	Green Fluorescent Protein
GGDP	géranylgéranyl diphosphate
GID1, 2	GIBBERELLIN INSENSITIVE 1, 2
GO	Gene Ontology

GPS	géranyl pyrophosphate synthase
GUS	beta-glucuronidase
h	heure
HD	Homéodomaine
HD-Zip	Homeodomain-Leucine Zipper
HRP	Horseradish peroxidase
IAA	indole-3-acetic acid
IDD	INDETERMINATE DOMAIN
lgG	Immunoglobuline G
IPP	isopentényl-pyrophosphate
JA	Acide Jasmonique
KAO	acide <i>ent</i> -kaurénoïque oxydase
KN1	KNOTTED-1
KNOX	Protéine ayant un homéodomaine associé à une boite homéotique Knotted
КО	<i>ent</i> -kaurène oxydase
KS	<i>ent</i> -kaurène synthase
L	litre
LAS	LATERAL SUPPRESSOR
LB	Luria-Bertani
LEC1	LEAFY COTYLEDON1
Ler	Landsberg erecta
LFY	LEAFY
LHR1, 2	Leucine Heptad Repeat 1, 2
MEL4	MACCHI-BOU 4
mg	milligramme
MIF	MINI ZINC FINGER
min	minute
miR	micro-RNA
mL	millilitre
mM	millimolaire
mm	millimètre
MS	Murashige-Skoog
NASC	Nottingham Arabidopsis Stock Centre
ng	nanogramme
nm	nanomètre

NPF	NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER
OE	Overexpression
oligoDT	acide oligo désoxy thymidylate
р	p-valeur
p/v	poids/volume
P450	cytochromes P450 mono-oxygénases
PAC	paclobutrazol
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
РСА	Principal Component Analysis
PCF	PROLIFERATING CELL FACTOR
PCR	Polymerase Chain Reaction
рН	Potentiel Hydrogène
PHD	Protéine ayant un homéodomaine associé à un domaine Finger
PIF	PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR
PIN	PIN-FORMED
qRT-PCR	PCR quantitative en temps réel
RAX	REGULATOR OF AXILLARY MERISTEMS
REV	REVOLUTA
RFP	Red Fluorescent Protein
RGA	REPRESSOR OF ga1-3
RGL1, 2, 3	RGA-LIKE 1, 2, 3
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	rotation par minute
RSM1	RADIALIS-LIKE SANT/MYB 1
RT*	régulateurs transcriptionnels
RT	température ambiante
SA	Acide Salicylique
SCF	SKP1, CULLIN, F-BOX
SD	milieu minimum
SD-LWAH	milieu minimum - Leucine, Tryptophane, Alanine et Histidine
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
sec	seconde
SEC	SECRET AGENT
SKP1	S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 1
SL	Strigolactones

SLR1	SLENDER RICE1
SLY1	SLEEPY
SNE	SNEEZY
SOM	SOMNUS
SPL	SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE
SPY	SPINDLY
TAE	Tris-Acétate-EDTA
ТВЕ	Tris, Borate, EDTA
TBS	Tris-Buffered Saline
ТСР	TEOSINTE BRANCHED 1, CYCLOIDEA, PROLIFERATING CELL FACTOR
Tm	Température de fusion
TPS	Terpène Synthase
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
TZP	TANDEM ZINC-FINGER PLUS3
ub	ubiquitine
v	Volts
v/v	volume/volume
hð	microgramme
μL	microlitre
μM	micromolaire
μm	micromètre
UP/DOWN	DEG qui sont induits/réprimés
WB	Western Blot
wox	Protéine ayant un homéodomaine associé à une boite homéotique Wuschel
ZF	Zinc-Finger
ZFHD	Zinc-Finger HomeoDomain

Introduction

#### Introduction

#### Préambule

L'évolution a permis aux plantes de pouvoir s'adapter aux zones climatiques les plus exigeantes et ainsi coloniser une grande partie de la surface terrestre, du désert jusqu'aux zones les plus humides. Cependant, les conditions environnementales dans un lieu bien précis peuvent elles aussi varier, considérablement, selon le rythme circadien et au cours des différentes saisons. Les plantes, en tant qu'organismes sessiles, s'adaptent à ces conditions changeantes en se reposant sur une fine perception du niveau et de la qualité de la lumière, de la température, de la disponibilité des nutriments ou encore des attaques de pathogènes. Ces informations externes sont alors associées au programme génétique intrinsèque de la plante, afin d'ajuster la croissance et le développement, et assurer ainsi, la survie de l'espèce. Il a été démontré que les phytohormones, des peptides ou encore certains sucres, peuvent jouer le rôle de molécules de signalisation dans l'intégration des signaux environnementaux.

Plusieurs familles de phytohormones sont maintenant bien décrites : l'auxine (IAA), les cytokinines (CK), l'acide abscissique (ABA), l'éthylène (ET), les brassinostéroïdes (BR), les strigolactones (SL), l'acide jasmonique (JA), l'acide salicylique (SA) et les gibbérellines (GA). Les phytohormones se réfèrent à de petites molécules, qui s'accumulent à de faibles concentrations et qui peuvent agir directement dans le tissu où elles sont produites, mais elles peuvent également être transportées à courte ou longue distance, pour agir dans d'autres tissus ou organes. Il est bien connu que les phytohormones agissent comme médiateurs qui gouvernent des mécanismes clés au niveau du développement et de la croissance des plantes. Ces dernières années, il a été démontré que certaines hormones ont des fonctions redondantes amenant à une réponse synergique ou au contraire qu'elles pouvaient avoir un rôle antagoniste. Ainsi, les voies hormonales sont connectées entre elles à l'aide d'un réseau complexe d'interactions et de rétrocontrôles. Ces interactions peuvent moduler la synthèse, la perception ou le transport des hormones, dans le but de modifier leur niveau d'accumulation ou leur distribution. Durant mes 4 années de thèse, je me suis principalement intéressé aux GA, une phytohormone régulant divers processus tout au long du cycle de développement de la plante, de la germination de la graine, jusqu'à la maturation du fruit.



# Figure 1. Symptômes de la maladie bakanae observés chez le riz et causés lors d'une infection par le champignon *Gibberella fujikoroi.*

- A. Plantule de riz infectée par le champignon phytopathogène et présentant un allongement de la tige ainsi qu'un léger jaunissement des feuilles (flèche noire).
- B. Plante mature de riz présentant un allongement excessif de la tige.
- C. Plante mature de riz ayant développé des panicules dépourvues de graines, les plantes présentent également un allongement excessif des tiges.

Adapté de Bashyal, 2018.

#### 1. Les gibbérellines

#### 1.1. Découverte des GA et généralités

A la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, des chercheurs au Japon se sont intéressés à la maladie du « bakanae » chez le riz, signifiant « herbe folle ». Cette maladie provoque une croissance excessive des entre-nœuds, entrainant une infertilité et donc une perte conséquente au niveau des rendements en grains (Fig. 1). Des phytopathologistes ont mis en évidence que cette maladie, qui affecte fortement les cultures de riz à travers tout le pays, est d'origine fongique (Hori, 1898). Quelques années plus tard, deux chercheurs ont suggéré que ces symptômes de croissance exagérée sont causés par le champignon Gibberella fujikoroi (Sawada, 1912). Des filtrats stériles provenant du champignon ont été appliqués sur des plantules saines de riz et des symptômes similaires à la maladie du bakanae ont été observés (Kurosawa, 1926). En 1935, le chimiste Teijiro Yabuta obtient pour la première fois un extrait purifié contenant la molécule responsable de cette croissance excessive, qui portera le nom de gibbérelline, en lien avec le nom scientifique du champignon phytopathogène (Yabuta and Sumiki., 1937). En 1938, la molécule bioactive va être isolée sous sa forme cristalline et le nom gibbérelline A lui est attribué ; ce nom est l'origine de l'abréviation GA pour les gibbérellines (Yabuta and Hayashi., 1939). Une dizaine d'années plus tard, cette gibbérelline A est à nouveau analysée et il s'avère que c'est en fait un mélange de 3 gibbérellines distinctes, la GA<sub>1</sub>, la GA<sub>2</sub> et la GA<sub>3</sub> (Takahashi et al., 1955).

Les premières recherches sur les gibbérellines en dehors du Japon ne débuteront que dans les années 1950, après la seconde guerre mondiale. Les Etats-Unis et l'Angleterre s'intéressent alors de très près aux gibbérellines après avoir pris connaissance des premières recherches réalisées au Japon. Aux Etats-Unis, le mycologue John Mitchell obtient un extrait pouvant promouvoir la croissance des plantes et il lance les premiers essais à l'échelle agronomique (Marth et al., 1956). En 1953 les américains purifient un composé qu'ils appelleront gibbérelline-X (Stodola et al., 1955). En parallèle, les anglais isolent une molécule, ayant des propriétés chimiques différentes de la gibbérelline A, qu'ils appellent acide gibbérellique (Curtis et Cross., 1954). Par la suite, les chercheurs vont constater que la gibbérelline-X, l'acide gibbérellique et la GA<sub>3</sub> sont en réalité une même molécule, celle sécrétée par *Gibberella fujikoroi*.

A partir des années 1950, de nombreuses recherches sur l'effet des gibbérellines sur des plantes d'intérêts agronomiques, telles que le maïs ou le petit pois, ont été entreprises. Il est



#### Figure 2. Application d'acide gibbérellique sur des plantes à intérêt agronomique.

- A. L'application exogène de concentrations croissantes d'acide gibbérellique, de droite à gauche, favorise progressivement la croissance des plants de pois avant d'atteindre un plateau. Adapté de Brian and Hemming, 1955.
- B. L'application exogène d'acide gibbérellique promeut la croissance des plants de maïs sauvage (gauche) et elle restaure la croissance du mutant nain *dwarf-1* (droite). Adapté de Phiney, 1956.

important de rappeler qu'à cette époque les phytohormones n'étaient que peu caractérisées et seule l'auxine était connue comme une molécule impliquée dans la croissance des plantes. Des plantes sont traitées avec de l'acide gibbérellique et les phénotypes sont analysés et comparés avec ceux obtenus chez des plantes avant été traitées avec de l'auxine. Ces expériences sont réalisées sur différentes variétés de pois et avec des quantités croissantes de gibbérellines (Fig. 2A). L'acide gibbérellique est décrit comme ayant un rôle positif sur la hauteur, le poids frais ou le poids secs des plantes (Phinney, 1956). D'autres expériences mettent en évidence que la complémentation de mutants nains avec des gibbérellines permet la restauration de la croissance (Fig. 2B) (Brian and Hemming, 1955; Phinney, 1956). Des chercheurs émettent alors une hypothèse, les plantes pourraient également produire des gibbérellines. Des extraits de graines provenant de plantes à fleurs sont analysés et ils possèdent une activité similaire à l'acide gibbérellique (Phinney et al., 1957), le terme de « gibberellin-like activity » est souvent employé pour décrire les phénotypes observés. Finalement en 1958, des chercheurs isolent la GA<sub>1</sub> depuis des graines immatures d'haricots et mettent en évidence qu'il s'agit de la molécule responsable de la « gibberellin-like activity » (MacMillan and Suter, 1958). Les gibbérellines sont alors décrites comment étant un nouveau type de régulateur endogène de croissance chez les plantes.

Depuis les années 1950, ce ne sont pas moins de 137 gibbérellines qui ont été identifiées chez les plantes, certains champignons ou bactéries. Elles sont toutes nommées gibbérelline A<sub>x</sub> ou GA<sub>x</sub>, suite à un accord accepté en 1967 à Ottawa, x correspondant au nombre attribué selon l'ordre de leur découverte. La découverte des GA a été décrite en détails dans la revue de Hedden et Sponsel, 2015.

Dans les années 1960, les GA ont joué un rôle crucial en agriculture. La révolution verte a permis d'accroître les rendements en champs en utilisant des intrants, la mécanisation ou de nouvelles variétés de céréales. Par exemple, des riz (mutant *semidwarf1*) ou des blés (mutants *reduced height B1b* et *D1b*) semi-nains, qui résistent beaucoup mieux à la verse. La verse, provoquée par la pluie, le vent ou une attaque parasitaire, couche les tiges au sol dans les champs ce qui entraine une perte considérable au niveau du rendement. Il a fallu attendre plusieurs années après la découverte, et l'utilisation de ces mutants, pour mettre en évidence que le mutant *sd1* est un mutant de biosynthèse des GA et que *B1b* et *D1b* sont des mutants insensibles aux GA (Hedden, 2003; Pearce et al., 2011). De nos jours, 70% des blés cultivés possèdent une de ces mutations.



#### Figure 3. Structure chimique des gibbérellines.

- A. Squelette carboné de l'*ent*-gibbérellane, structure commune à toutes les GA, associé au schéma de numérotation des atomes de carbones, utilisé pour les GA.
- B. Structures chimiques des principales GA bioactives. Les GA bioactives possèdent des éléments structuraux qui sont nécessaires pour maintenir une forte affinité avec leur récepteur : un groupe hydroxyle en position C3, un groupe carboxyle en position C6 et une lactone sur les carbones 4 et 10 (en rouge).

Adapté de Hedden et Thomas, 2016.

#### 1.2. Métabolisme des GA

#### 1.2.1. Généralités

Les gibbérellines appartiennent au large groupe des acides carboxyliques diterpénoïdes tétracycliques et le précurseur commun à tous les diterpènes est le géranylgéranyl diphosphate (GGDP), composé de 20 atomes de carbone. Bien qu'il existe plus d'une centaine de gibbérellines, seules certaines sont bioactives, comme la GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> ou la GA<sub>7</sub>, les autres étant des précurseurs ou des catabolites dans la voie de biosynthèse. Toutes les gibbérellines ont un squelette commun, il s'agit de l'ent-gibbérellane (Fig. 3A). Les formes actives partagent une structure chimique commune qui leur est indispensable pour se lier au récepteur GID1A (GA INSENSITIVE DWARF 1) et initier la cascade de signalisation. Il a été démontré que les GA bioactives ont des prérequis structuraux augmentant l'affinité avec leur récepteur, elles possèdent toutes un groupe hydroxyle en position C3- $\beta$ , un groupe carboxyle sur le carbone 6 et une lactone sur les carbones 4 et 10 (Fig. 3B) (Yamaguchi, 2008). Malgré ces spécificités, des différences structurales sont observables, au sein même des GA bioactives, qui modifient leur stabilité. Par exemple, la structure de la GA<sub>3</sub> diffère légèrement de celle de la GA<sub>1</sub>, ce qui la rend insensible au mécanisme principal d'inactivation des GA chez les plantes. Les plantes étant dans l'incapacité de moduler le niveau d'accumulation de la GA<sub>3</sub>, cette dernière est produite à de très faibles concentrations dans les différents organes, la GA<sub>1</sub> et la GA<sub>4</sub> étant prédominantes chez les plantes. Le champignon *Gibberella fujikoroi*, quant à lui, produit et sécrète une quantité importante de GA<sub>3</sub> qui compromet la capacité de la plante infectée à se préserver d'une suraccumulation de GA, entrainant ainsi, une croissance excessive des entre-nœuds (Hedden, 2020).

Dans le but de caractériser des mutants affectés dans la synthèse des GA ou la sensibilité aux GA, un agent mutagène très utilisé chez les plantes, l'éthyl méthanesulfonate ou EMS, a permis d'obtenir un certain nombre de lignées indépendantes produisant des graines parfaitement développées, mais dont la germination est altérée voire inexistante (Koornneef and van der Veen, 1980). Après un traitement unique avec des GA exogènes, les différents mutants dans la capacité de germer et de se développer sont considérés comme étant des mutants affectés dans la voie de biosynthèse des GA. Les plantes ne produisant pas de GA sont vertes foncées, présentent un sévère nanisme, apparaissent très compacts avec des pétales et des étamines très peu développés et les graines produites germent difficilement (Koornneef and van der Veen, 1980). Les mutants ont été un outil majeur pour la caractérisation des voies de biosynthèse et de signalisation des GA. Deux types de mutants

#### Introduction



#### Figure 4. Biosynthèse des GA, du GGDP à l'ent-kaurène.

DMAPP : diméthylallyl-pyrophosphate ; IPP : isopentényl pyrophosphate ; GGPPS : *trans*-géranylgéranyl diphosphate synthase ; GGPP : *trans*-géranylgéranyl diphosphate ; CPS : *ent*-copalyl diphosphate synthase ; CPP : *ent*-copalyl diphosphate ; KS : *ent*-kaurène synthase. Le nom des molécules est en vert alors que le nom des enzymes est en rouge. Adapté de Hedden et Thomas, 2016.



Figure 5. Phénotype des mutants *ga1-3* et *ga2* chez *Arabidopsis* dont les gènes codant pour les enzymes CPS et KS sont mutés, respectivement.

- A. Plantes âgées de 52 jours, à gauche une plante sauvage (WT, écotype Ler) et à droite le mutant *ga1-3* dont le gène codant pour la CPS est muté. Adapté de Dill et Sun, 2001.
- B. Plantes âgées de 35 jours, à gauche une plante sauvage (WT, écotype Ler) et à droite le mutant ga2, dont le gène codant pour la KS est muté. Adapté de Yamaguchi et al, 1998.

sont mentionnés dans cette étude, les mutants de biosynthèse de GA, affectés dans la production d'une ou plusieurs enzymes de la voie de biosynthèse pouvant perturber l'accumulation de GA bioactives. D'un autre côté, certains mutants affectés dans la voie de signalisation sont définis comme des mutants insensibles aux GA bioactives, ou mutants « gain de fonction ». Si un traitement avec des GA exogènes permet de restaurer le phénotype nain d'un mutant de biosynthèse, il n'a aucun effet chez un mutant insensible aux GA.

Dans cette partie, seul le métabolisme des GA chez les plantes sera décrit bien que celui des champignons et bactéries ait été également caractérisé (Hedden et Thomas, 2012; Hedden et Sponsel, 2015; Yamaguchi, 2008).

#### 1.2.2. Biosynthèse des GA

Depuis plusieurs années, la voie de biosynthèse des GA a pu être caractérisée à l'aide de mutants perte de fonction, pour les différentes enzymes impliquées dans les étapes d'oxydation et de décarboxylation. Le précurseur de biosynthèse, le *trans*-géranylgéranyl diphosphate (GGDP), est le produit de l'isopentényl pyrophosphate (IPP) ou du diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP), qui sont issus de la voie du méthylérythritol phosphate et de la voie du mévalonate, respectivement. La voie du méthylérythritol phosphate assurant la disponibilité de la majorité des précurseurs utilisés pour la synthèse de GA (Kasahara et al., 2002). Pour les étapes suivantes, la biosynthèse des GA est souvent détaillée en 3 parties distinctes de par la nature des classes d'enzymes impliquées et la compartimentation subcellulaire des étapes de biosynthèse. Trois classes d'enzymes assurent la biosynthèse des GA chez les plantes, à partir du GGDP : les terpènes synthases (TPS) dans les plastes, les cytochromes P450 mono oxygénases (P450) à la surface des membranes plastidiales et du réticulum endoplasmique et les 2-oxoglutarate-dépendant dioxygénases (2-ODDs) dans le cytoplasme (Lange, 1998).

#### a) Du GGDP à l'ent-kaurène

Dans les plastes, le GGDP, provenant de la conversion l'IPP ou du DMAPP, va être cyclisé en *ent*-copalyl diphosphate (CPP) par la *ent*-copalyl diphosphate synthase (CPS), puis *ent*-kaurène par la *ent*-kaurène synthase (KS) (Fig. 4). L'*ent*-kaurène est accumulé dans le stroma des proplastes, des organites non différenciés se trouvant au niveau des méristèmes, ou dans les chloroplastes en développement (Aach et al., 1995, 1997). Des lignées rapportrices



#### Figure 6. Biosynthèse des GA, de l'ent-kaurène à la GA<sub>12.</sub>

KO : *ent*-kaurène oxydase ; KAO : acide *ent*-kaurènoïque oxydase ; GA13ox : GA13oxydase. Le nom des molécules est en vert alors que le nom des enzymes est en rouge. Adapté de Hedden et Thomas, 2016.



Figure 7. Phénotype des mutants *ga3, kao1* et *kao2* chez *Arabidopsis,* dont les gènes codant pour les enzymes KO, KAO1 et KAO2 sont mutés, respectivement.

- A. Plantes âgées de 34 jours, à gauche une plante sauvage (WT, écotype Ler) et à droite le mutant *ga3* dont le gène codant pour la KO est muté. Adapté de Helliwell et al., 1998.
- B. Plantes âgées de 40 jours, à gauche une plante sauvage Col-0, un mutant *ga1-3*, ainsi que le double mutant *kao1 kao2* dont les gènes codant pour la KAO1 et la KAO2 sont mutés. A droite, une application exogène de GA3 bioactives permet de restaurer la croissance des mutants. Adapté de Regnault et al., 2014.
fusionnées à la GFP ont mis en évidence une localisation de ces deux enzymes au niveau des plastes (Helliwell et al., 2001a). Chez *Arabidopsis*, contrairement à d'autres espèces, la CPS et la KS sont codées par des gènes uniques. Un mutant perte de fonction pour l'une de ces enzymes (*ga1-3* pour la CPS et *ga2* pour la KS) présente un phénotype très marqué qui est souligné par un sévère nanisme, une infertilité et une absence de germination (Fig. 5). Des ajouts exogènes de GA<sub>4</sub> et de GA<sub>7</sub> permettent une restauration totale ou partielle, des altérations phénotypiques chez ces mutants. Le phénotype de ces mutants a ainsi été caractérisé comme étant GA-dépendant (Koornneef and van der Veen, 1980). A l'inverse des mutants, une surexpression de *AtCPS* ou *AtKS* chez *Arabidopsis*, n'impacte ni le phénotype ni le niveau d'accumulation de GA bioactives, en comparaison avec des plantes contrôles. Ces résultats mettent en évidence qu'une suraccumulation de certains précurseurs de la voie de biosynthèse des GA n'affecte pas l'homéostasie des GA au sein de la plante. Ces deux premières étapes de la voie de biosynthèse ne sont donc pas limitantes (Fleet et al., 2003).

#### b) Du ent-kaurene à la GA<sub>12</sub>

La conversion de l'ent-kaurène en GA<sub>12</sub>-aldéhyde est catalysée par deux cytochromes monooxygénases (P450), l'ent-kaurène oxydase (KO) et l'acide ent-kaurènoïque oxydase (KAO) (Fig. 6) (Helliwell et al., 1999, 2001a). L'ent-kaurène, alors transporté des proplastes jusqu'à la surface du réticulum endoplasmique, subit trois étapes d'oxydation par la KO pour produire l'acide ent-kaurènoïque. Ensuite, la GA<sub>12</sub>, première GA à 20 carbones (C20-GA) dans la voie de biosynthèse, est produite par la KAO après 3 étapes d'hydroxylation et d'oxydation, à partir de l'acide ent-kaurènoïque. Dans cette seconde partie de la voie de biosynthèse, contrairement à la première partie, une même enzyme catalyse plusieurs réactions. Dans le génome d'Arabidopsis, un gène unique (AtKO) code pour la KO et deux gènes distincts codent chacun pour l'une des deux KAO, AtKAO1 et AtKAO2. La KO est localisée sur la membrane externe des chloroplastes et du réticulum endoplasmique (RE), alors que les deux KAO sont présentes uniquement à la surface du RE (Helliwell et al., 2001b). Chez Arabidopsis, un mutant perte de fonction pour le gène AtKO (mutant ga3) présente un sévère nanisme (Fig. 7A) (Helliwell et al., 1998). Les simples mutants kao1 et kao2 ont un phénotype similaire aux plantes contrôles, dans des conditions normales de croissance. Le double mutant kao1 kao2 présente des altérations au niveau de la germination, de la croissance, de la floraison ou de la fertilité. Un ajout exogène, récurrent, de GA<sub>3</sub> permet une restauration de tous les paramètres évoqués (Fig. 7B) (Regnault et al., 2014). Chez le riz, 5 gènes codent pour la KO, regroupés en tandem dans un cluster (OsKO1 à OsKO5). Le mutant nul osko2 présente un nanisme



**Figure 8. Biosynthèse des GA, de la GA<sub>12</sub> aux GA bioactives.** GA13ox : GA13-oxydase ; GA20ox : GA20-oxydase ; GA3ox : GA3-oxydase. Le nom des molécules est en vert alors que le nom des enzymes est en rouge. Adapté de Hedden et Thomas, 2016.

sévère, ainsi qu'une altération de la floraison et du développement des graines. Une mutation dans le gène *OsKO2* entraine également une sévère carence en GA, montrant ainsi le rôle important de ces enzymes dans la biosynthèse de GA (Sakamoto et al., 2004).

c) De la GA<sub>12</sub> aux gibbérellines bioactives

Au niveau du cytosol, la GA<sub>12</sub> va subir diverses étapes d'oxydation et de décarboxylation, catalysées par les dioxygénases 2-oxoglutarate-dépendantes (2-ODDs) (Fig. 8). Les 2-ODDs ont la particularité de reconnaître un large spectre de substrats, ce qui leur permet de catalyser diverses réactions et ainsi, d'obtenir une grande diversité de GA. Enfin, diverses classes de cette famille d'enzymes assurent les dernières étapes de la voie de biosynthèse des GA.

Dans un premier temps, la GA<sub>12</sub> peut être hydroxylée en position 13 par la GA13-oxydase (GA13ox), pour produire la GA<sub>53</sub>. Il s'agit d'une étape importante dans la voie de biosynthèse, puisque les GA13ox vont permettre d'ajuster la balance entre la GA<sub>1</sub> et la GA<sub>4</sub>, les deux GA bioactives prédominantes chez les plantes. Chez le riz, deux GA13ox catalysent cette hydroxylation : OsCYP714B1 et OsCYP714B2. Chez le double mutant *cyp714b1 cyp714b2*, les GA hydroxylées en position 13 (GA 13-OH), dont la GA<sub>1</sub> bioactive, sont plus faiblement accumulées, alors que la GA<sub>4</sub> bioactive se retrouve plus fortement accumulée (Magome et al., 2013). Le phénotype du double mutant est similaire à celui des plantes contrôles jusqu'à la floraison ; seul le dernier entre-nœud avant l'inflorescence sera plus long chez le double mutant. Des lignées transgéniques d'*Arabidopsis*, surexprimant *OsCYP714B1* ou *OsCYP714B2* présentent un phénotype semi-nain. Pour ces plantes, une surexpression des GA13ox conduit à une plus forte accumulation des GA 13-OH (Magome et al., 2013).

A partir de cette étape, la voie de biosynthèse des GA se divise en deux voies distinctes (Fig. 8). Trois étapes successives d'oxydation en position C-20, par les GA20-oxydases (GA20ox), permettent la conversion de la  $GA_{12}$  et de la  $GA_{53}$  en  $GA_9$  et  $GA_{20}$ , respectivement. Lors de la troisième oxydation, le carbone 20 est libéré sous forme de  $CO_2$ , la  $GA_9$  et la  $GA_{20}$  possèdent donc 19 atomes de carbone (C19-GA). Le génome *d'Arabidopsis* possède 5 gènes (*AtGA20ox1* à *AtGA20ox5*) codant chacun pour une GA20ox. Le simple mutant *ga20ox1* a un phénotype semi-nain et le simple mutant *ga20ox2* est légèrement plus petit que le contrôle Col-0. Le double mutant *ga20ox1* ga20ox2 présente un phénotype semi-nain plus sévère que le simple mutant *ga20ox1* (Fig. 9A). D'autres paramètres tels que la taille de l'hypocotyle, la floraison ou la germination des graines sont impactés chez le double mutant *ga20ox1 ga20ox2* ga20ox2



#### Figure 9. Phénotype des mutants ga20ox et ga3ox chez Arabidopsis.

3ox4

- A. Plantes âgées de 44 jours, à gauche, une plante sauvage (Wild-type, écotype Col-0) et à droite, plusieurs mutants simples puis multiples *ga20ox* dont différents gènes codant pour les *GA20ox* sont mutés. Adapté de Plackett et al., 2012.
- B. Plantes âgées de 44 jours, à gauche une plante sauvage (WT, écotype Col-0) et à droite, un mutant simple *ga3ox1*, ainsi que des mutants multiples *ga3ox*. Adapté de Hu et al., 2008.

(Plackett et al., 2012; Rieu et al., 2007). L'activité de la GA20ox est considérée comme étant le facteur limitant dans la voie de biosynthèse des GA.

Enfin, les GA3-oxydases (GA3ox) oxydent le carbone en position C3 de la GA<sub>9</sub> et la GA<sub>20</sub> pour produire les formes bioactives GA<sub>4</sub> et GA<sub>1</sub>, respectivement (Fig. 8). Le génome d'*Arabidopsis* code pour 4 gènes *GA3ox* (*AtGA3ox1* à *AtGA3ox4*). Chez *Arabidopsis*, le simple mutant *ga3ox1* est semi-nain avec une rosette plus petite, une hauteur finale réduite de 50% et un retard de floraison, en comparaison à des plantes contrôles (Fig. 9B). Les autres simples mutants *ga3ox* ont un phénotype similaire aux plantes contrôles. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que *GA3ox1* est le gène le plus exprimé de cette famille, dans l'ensemble des tissus chez *Arabidopsis*, excepté lors de la germination des graines (Mitchum et al., 2006). Concernant les mutant *ga3ox1* (Fig. 9B). Cependant, le double mutant *ga3ox1 ga3ox2* a des altérations phénotypiques plus sévères que le simple mutant *ga3ox1*. Ainsi, les gènes *AtGA3ox1* et *AtGA3ox2* ont un rôle très important pour le développement des plantes, d'autant qu'il s'agit de la dernière étape dans la biosynthèse de GA bioactives (Hu et al., 2008).

### 1.2.3. Catabolisme des GA

Il est essentiel pour la plante de pouvoir réguler efficacement la concentration en GA dans ses tissus, afin de pouvoir adapter rapidement sa croissance, notamment en cas de stress environnementaux. Bien que la plante puisse moduler l'expression des gènes codant pour les différentes enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse, l'inactivation des GA permet de diminuer bien plus rapidement la concentration en GA au niveau tissulaire. Plusieurs mécanismes d'inactivation des GA ont été identifiés, à ce jour.

Le mécanisme d'inactivation des GA le plus commun chez les plantes implique une modification structurale des GA, afin de diminuer l'affinité pour leur récepteur GID1A. Il s'agit de l'hydroxylation en position C2 chez les GA bioactives, ou leurs précurseurs C19-GA et C20-GA. Les GA2-oxydases (GA2ox) catalysant ces hydroxylations sont subdivisées en deux familles de 2-ODD, les C19-GA2ox et les C20-GA2ox. Chez *Arabidopsis*, GA2ox7 et GA2ox8, des C20-GA2ox, sont donc impliquées dans l'hydroxylation en position C2 des C20-GA. Une surexpression des gènes codant pour GA2ox7 ou GA2ox8 conduit à un nanisme chez les plantes, lié à une réduction de l'accumulation de GA bioactives par inactivation (Fig. 10A). Au



*ga1-3 p35S:At p35S:At WT CYP714A1 CYP714A2* 

# Figure 10. Phénotype de lignées transgéniques d'*Arabidopsis* qui surexpriment différents gènes codant pour des enzymes impliquées dans le catabolisme des GA.

- A. Plantes âgées de 48 jours, à gauche une plante sauvage (WT, écotype Wassilewskija) et à droite des lignées qui surexpriment *AtGA2ox7* ou *AtGA2ox8*. Adapté de Schomburg et al., 2003.
- B. Plantes âgées de 54 jours, à gauche le mutant de biosynthèse ga1-3, puis des lignées qui surexpriment AtCYP714A1 et AtCYP714A2 et à gauche une plante sauvage (WT, écotype Col-0). Adapté de Nomura et al., 2013.

contraire, le double mutant ga2ox7 ga2ox8 va fortement accumuler les GA bioactives conduisant, notamment, à une floraison plus précoce en jour court (Schomburg et al., 2003). Concernant les C19-GA2ox, le génome d'Arabidopsis code pour 5 enzymes inactivant les C19-GA. Un quintuple mutant pour ces 5 gènes va initier une floraison plus précocement, les plantes sont plus grandes et elles possèdent davantage de fleurs, cependant stériles, aucune graine n'est produite (Rieu et al., 2008). D'après des travaux récents chez le riz, des enzymes de la famille des C19-GA2ox et des C20-GA2ox sont capables de former un tétramère avec deux molécules de GA<sub>4</sub> pour augmenter leur activité. Une accumulation de GA<sub>4</sub> promeut la formation des tétramères augmentant ainsi, l'efficacité d'inactivation des GA. Ce second mécanisme de régulation assuré par les GA2ox permettrait d'anticiper et de contrôler l'homéostasie des GA (Takehara et al., 2020). Les GA2ox jouent donc un rôle essentiel pour le développement de la plante, dans des conditions normales de croissance mais également en réponse à des variations des conditions environnementales. Une induction spécifique de l'expression de certains gènes GA2ox est observée en réponse à différents stress abiotiques (Colebrook et al., 2014). Par exemple, des plantes ayant subi un stress mécanique présentent une croissance plus faible, qui est associée à une plus forte expression du gène AtGA2ox7 codant pour une C20-GA2ox (Lange and Lange, 2015).

Un autre mécanisme d'inactivation des GA a été mis en évidence chez le riz. EUI1 et EUI2 sont deux cytochromes P450 mono-oxygénases, appartenant à la famille des CYP714 et EUI1 peut hydrolyser la GA<sub>1</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>12</sub> ou la GA<sub>53</sub> en formes époxydes inactives. Le gène EUI1 est fortement exprimé au niveau des entre-nœuds, il est important pour le développement chez le riz en restreignant la hauteur de la tige (Zhu et al., 2006). Les tissus végétatifs du riz n'accumulent que très peu les 4 GA citées ci-dessus, alors que ces formes sont très présentes dans les tissus des organes reproductifs. EUI1 aurait ainsi un rôle particulier dans la régulation du niveau de GA, provenant des inflorescences, au niveau des entre-nœuds. Le mutant eui1 accumule davantage de GA bioactives au niveau des entre-nœuds de par l'absence de cette voie de catabolisme. Fait intéressant, la caractérisation des mutants eui1 a permis d'améliorer grandement la production de riz (Liang et al., 2008). Le second gène EUI, EUI2, code pour une hydrolase dont la fonction n'est pas encore définie. Le génome d'Arabidopsis code pour deux gènes CYP714, AtCYP714A1 et AtCYP714A2. Les enzymes CYP714A1 et A2 catalysent la conversion de la GA12 en GA12 16-carboxylée ou en GA12 12 $\alpha$ -carboxylée, respectivement (Nomura et al., 2013). Une surexpression de AtCYP714A1 conduit à un nanisme modéré, alors que la surexpression de AtCYP714A2 conduit à un nanisme très sévère (Fig. 10B).

Les C19-GA peuvent également être inactivées par une méthylation catalysée par des méthyltransférases de la famille des SABATH. Chez *Arabidopsis*, deux membres de cette famille, *GAMT1* et *GAMT2*, sont exprimés dans l'ensemble des siliques, dont les graines. Une expression ectopique de ces gènes, chez *Nicotiana tabacum*, conduit à une déficience en GA et engendre un nanisme, ainsi que des problèmes de fertilité chez les plantes. Des phénotypes similaires ont été observés suite à une surexpression des gènes *GAMT1* ou *GAMT2* chez *Arabidopsis*, la GA<sub>4</sub> et d'autres précurseurs étant plus faiblement accumulés. Au contraire, les mutants simples *gamt1* et *gamt2* accumulent fortement des GA dans les siliques, dont la GA<sub>1</sub> bioactive. Ce mécanisme d'inactivation permet ainsi, de contrôler le niveau d'accumulation des GA dans un organe bien spécifique dans le but de contrôler, sans doute exclusivement, le développement et la germination précoce des graines (Varbanova et al., 2007; Xing et al., 2007).

Peu de temps après la caractérisation de la GA<sub>1</sub>, il a été rapporté que les GA peuvent se lier à des molécules de faible poids moléculaires dont le glucose, le terme de GA conjuguées est employé (Schneider and Schliemann, 1994). Les GA conjuguées pourraient alors être plus facilement stockées, ou transportées, mais depuis les années 1990, cela n'est qu'une piste de recherche. Cependant, quelques expériences mettent en avant une probable réversibilité de la conjugaison des GA (Schneider et al., 1992). Ainsi, la conjugaison des GA serait potentiellement un mécanisme d'inactivation réversible, permettant un relargage rapide de GA bioactives depuis des zones de stockage telles que les chloroplastes (Jin et al., 2011).

### 1.2.4. Sites de production des GA

L'identification des sites de biosynthèse des GA est primordiale pour déterminer la fonction des GA au cours des différents stades de développement. L'utilisation de lignées rapportrices des gènes codant pour les enzymes intervenant dans la biosynthèse, des analyses du transcriptome ou encore des GA radiomarquées, permettent d'identifier les principaux sites de synthèse des GA.

Avant de caractériser les sites de production ou d'accumulation des GA bioactives, il est intéressant d'observer dans quels tissus ou organes se déroulent les différentes étapes de la voie de biosynthèse des GA. Chez *Arabidopsis*, le gène *GA1* code pour la *ent*-kaurène synthase A qui catalyse la première étape de la voie de biosynthèse des GA, comme décrit précédemment dans cette étude. Dans les années 1990, le patron d'expression de *GA1* est



Figure 11. Localisation histochimique de l'activité du promoteur du gène *GA1*, chez une lignée transgénique d'*Arabidopsis* contenant la construction *pGA1-GUS*.

A. Plantules âgées de 5 jours ; B. Inflorescences ; C. Extrémités des racines. Adapté de Silverstone et al., 1997a.



Figure 12. Profils d'expression des gènes *GA20ox* à différents stades de développement chez *Arabidopsis.* 

Les niveaux relatifs d'expression des ARNm ont été déterminés par RT-PCR quantitative à partir de 3 réplicas biologiques pour chacun des tissus. Adapté de Rieu et al., 2007.



Figure 13. Localisation histochimique de l'activité du promoteur *des gènes GA3ox1* et *GA3ox2* chez des lignées transgéniques d'*Arabidopsis*.

Plantules âgées de 3 jours. A. Lignée *pGA3ox1-GUS* ; B. Lignée *pGA3ox2-GUS*. Adapté de Mitchum et al., 2006.

déterminé grâce à une étude combinant des analyses RT-PCR et l'utilisation d'une lignée rapportrice ; promoteur *GA1* fusionné au gène rapporteur *GUS* (Fig.11) *(Silverstone et al., 1997a)*. Le gène *GA1* est fortement exprimé dans certains organes pendant la croissance et le développement, notamment ceux qui prolifèrent rapidement comme les méristèmes caulinaire et racinaire, les fleurs en développement ou encore les graines (Silverstone et al., 1997a). Les gènes *KAO1* et *KAO2* codent pour des enzymes qui catalysent la formation de GA<sub>12</sub>, une autre étape de la voie de biosynthèse, ils sont également exprimés dans les jeunes organes en croissance et les graines en germination (Regnault et al., 2014).

Les GA20ox sont impliquées plus tardivement dans la voie de biosynthèse des GA. Les 5 enzymes de cette famille ont des fonctions similaires, mais des patrons d'expression distincts et dépendants du stade de développement. De manière générale, les gènes *GA20ox1*, *GA20ox2* et *GA20ox3* sont fortement exprimés à tous les stades de développement chez Arabidopsis, de la germination des graines jusqu'à la maturation des siliques (Fig. 12). *GA20ox3* est le gène le plus fortement exprimé dans les graines, puis il s'agit de *GA20ox2* chez les plantules (3 à 7 jours) et *GA20ox1* chez les jeunes plantes (11 à 24 jours). Dans les inflorescences, *GA20ox1* et *GA20ox2* représentent les transcrits majoritaires des GA20ox. *GA20ox4* et *GA20ox5* sont tous les deux plus faiblement exprimés, à presque tous les stades de développement, que les autres membres de la famille (Fig. 12) (Rieu et al., 2007).

Enfin, les gènes *GA3ox*, qui codent pour les enzymes catalysant la dernière étape de la synthèse des GA bioactives, sont fortement exprimés dans tous les organes. *GA3ox1* étant le gène le plus exprimé dans la tige, les cotylédons, le méristème apical caulinaire et certains tissus au niveau racinaire (Fig. 13) (Mitchum et al., 2006).

L'analyse de l'expression des gènes codant pour les différentes enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des GA est un bon outil pour identifier les sites de production des GA, mais il ne rend pas compte de l'efficacité dans la traduction des transcrits, ainsi que la stabilité des enzymes. L'utilisation de GA radiomarquées permet d'obtenir davantage d'informations, même si la résolution spatiale est très limitante (Smith, 1992). Avec ces différentes informations, il est maintenant admis que les GA bioactives sont produites dans les jeunes tissus en prolifération, notamment les méristèmes. Aussi, dans certains organes, comme dans les racines chez *Arabidopsis*, les transcrits impliqués dans la biosynthèse des GA s'accumulent directement sur les sites d'actions des GA (Dugardeyn et al., 2007). Cependant, les différentes enzymes nécessaires à la biosynthèse des GA ne sont pas toujours présentes



# Figure 14. Analyse phénotypique des parties aériennes suite à une greffe de scions ou de porte-greffe provenant de différents mutants de biosynthèse des GA, chez *Arabidopsis*.

- A. Schéma de la voie de biosynthèse des GA chez les embryophytes. Les enzymes intervenant dans la voie de biosynthèse sont indiquées en gris et les mutants associés sont indiqués en rouge.
- B. Plantes âgées de 4 à 5 semaines (après greffe), le génotype est indiqué de la sorte : porte-greffe/scion. A gauche, une plante contrôle greffée Col-0/Col-0 et tout à droite une plante greffée ga20ox1 ga20ox2 ga20ox3/kao1 kao2 mettant en évidence que les GA<sub>12</sub> synthétisées dans les racines peuvent être transportées à longue distance vers les parties aériennes pour être converties en GA bioactives et restaurer la croissance des parties aériennes de la plante.

Adapté de Regnault et al., 2015.

dans un même tissu ou une même cellule. Par exemple, les GA sont importantes pour l'élongation cellulaire au niveau des entre-nœuds, cela impliquerait un mouvement des GA, ou certains précurseurs, des méristèmes jusqu'aux zones d'élongation (Hoogendoorn et al., 1990). A l'inverse, des GA bioactives pourraient être synthétisées dans des organes qui ne sont pas en croissance pour être transportées sur les sites d'action (Silverstone et al., 1997a).

#### 1.3. Transport des GA

En tant qu'organismes sessiles, les plantes ont développé des mécanismes très performants pour ajuster et coordonner efficacement leur développement et leur croissance, en réponse aux variations environnementales. Les phytohormones, et notamment les GA, jouent le rôle de molécules de signalisation pouvant être transportées vers les différents organes de la plante. L'analyse des exsudats du phloème et du xylème démontre que le système vasculaire des plantes joue un rôle important dans la distribution de phythormones (détaillé dans la revu Lacombe and Achard, 2016). Plusieurs études réalisées avec des micro-greffes, chez plusieurs espèces et à l'aide de différents mutants dans la voie de biosynthèse des GA, prouvent l'existence d'un transport longue distance des GA (Proebsting et al., 1992, Katsumi et al., 1983). Une étude sur la distribution de GA bioactives fluorescentes, dans les racines d'Arabidopsis, vient également supporter un transport local ainsi qu'un transport longue distance (Shani et al., 2013). Hormis l'auxine, dont le transport polarisé de cellule en cellule est assuré par un mécanisme unique, il est maintenant admis que les phytohormones peuvent être transportées à longue distance via le système vasculaire. Le système vasculaire des plantes assure ainsi deux fonctions cruciales, soutenir mécaniquement les parties aériennes et permettre l'acheminement à longue distance de diverses ressources, dont les GA, dans tous les organes (détaillé dans la revu Lucas et al., 2013).

Plus récemment, des expériences de micro-greffes, réalisées avec des mutants de la voie de biosynthèse des GA, ont apporté de nouveaux éléments sur la caractérisation du transport acropète et basipète des GA (Fig. 14). La GA<sub>12</sub> est le précurseur majeur transporté à longue distance, chez *Arabidopsis thaliana,* vers les tissus en croissance pour être converti en GA bioactives (Regnault et al., 2015). Il n'est pas exclu que d'autres précurseurs ou formes actives puissent être transportés localement. De façon intéressante, on ne retrouve aucune GA3ox dans les pétales, alors que les mutants *ga3ox* présentent des défauts d'allongement des pétales (Hu et al., 2008a; Koornneef and van der Veen, 1980). Ainsi, un transport ou une diffusion de GA bioactives pourrait exister entre le réceptacle floral et/ou les étamines vers les



#### Figure 15. Transporteurs de GA, identifiés à ce jour.

Arbres phylogénétiques des transporteurs de GA connus à ce jour. Un code couleur avec des cercles rend compte de l'activité dans le transport de GA ; le système hétérologue comprend des expériences chez la levure ainsi que chez des oocytes de *Xenopus*.

A. Arbre phylogénétique de la famille des transporteurs NPF ; B. Arbre phylogénétique de la famille des transporteurs SWEET. Adapté de Binenbaum et al., 2018.

pétales, pour y stimuler la croissance. Un transport de GA bioactives pourrait aussi exister entre les anthères et le filet, *GA3ox1* étant le seul des quatre gènes à être exprimé dans le filet des étamines et mutant *ga3ox1* possédant des étamines similaires à une plante sauvage (Hu et al., 2008a).

A ce jour, le transport des GA implique des transporteurs appartenant à deux grandes familles, les 'nitrate transporter 1/peptide transporter family' (NPF) et les transporteurs SWEET (détaillé dans la revu Binenbaum et al., 2018). La famille des transporteurs NPF est conservée au cours de l'évolution, 53 membres ont été identifiés chez Arabidopsis thaliana (Fig. 15A). Les NPF se localisent au niveau de la membrane plasmique et sont connus comme étant des transporteurs de nitrate, de peptides, de glucosinolates, mais également de métabolites spécialisés et de différentes hormones. Ces transporteurs peuvent également être situés dans la membrane de la vacuole pour un transport subcellulaire. Pour exemple, NPF6.3 et NPF4.6 sont des transporteurs de l'auxine et de l'ABA, respectivement (Kanno et al., 2012; Krouk et al., 2010). D'après une autre étude, certains NPF peuvent transporter les GA, l'ABA et l'acide jasmonique (Chiba et al., 2015). D'après Chiba et al., 2015, sur 45 transporteurs NFP d'Arabidopsis étudiés, 18 peuvent transporter plus d'une molécule de GA, simultanément. De par la complexité de la famille des NPF, associer un rôle biologique à chacun de ses membres demeure difficile. Plusieurs simples mutants *npf* ont un phénotype semblable aux plantes contrôles, comme par exemple npf3.1 et npf3.2 (Tal et al., 2016) ou npf2.10 et npf2.11 (Nour-Eldin et al., 2012). Il est presque certain qu'une redondance fonctionnelle existe au sein de la famille des transporteurs NPF.

La famille de transporteurs SWEET est également conservée au cours de l'évolution, 17 membres ont été identifiés chez *Arabidopsis thaliana* (Fig. 15B). Ces transporteurs prennent en charge divers sucres comme le sucrose ou le fructose (Eom et al., 2015). Parmi cette famille, SWEET13 et SWEET14 sont également capables d'importer, *in vitro* (en levure et en oocyte), des GA bioactives, ainsi que leurs précurseurs. Chez *Arabidopsis*, le transport longue distance des GA chez le double mutant *sweet13 sweet14* est par conséquent altéré, ce qui réduit sa fertilité ; un traitement exogène de GA restaure le phénotype (Kanno et al., 2016).

Ainsi, le transport représente le troisième facteur influençant la distribution spatiotemporelle des GA, en étroite corrélation avec la biosynthèse et l'inactivation (détaillé dans la revue Rizza and Jones, 2019).



# Figure 16. Phénotype des mutants gid1 chez Arabidopsis.

Plantes âgées de 37 jours, à gauche les mutants simples *gid1a gid1b* ou *gid1c* et sur la droite différentes combinaisons de mutants multiples *gid1*. Tout à droite, une plante sauvage (WT, écotype Col-0). Adapté de Griffiths et al., 2007.



## Figure 17. Interaction entre le complexe GA-GID1 et les DELLA.

- A. Schéma de l'interaction entre le complexe GA-GID1 et les DELLA. Après perception des GA bioactives par leur récepteur GID1, le complexe GA-GID1 peut interagir avec les protéines DELLA pour modifier leur conformation. GA : Gibbérellines bioactives ; GID1 : récepteur des GA ; DELLA : protéines DELLA.
- B. Structure cristalline du complexe GA-GID1-DELLA. La structure contient une molécule de GA<sub>3</sub>, l'extension N-terminale du récepteur GID1a (vert), le domaine principal de GID1a (bleu clair) et le domaine DELLA de la protéine GAI (brun). Adapté de Gao et al., 2017.

#### 2. La voie de signalisation des GA

Si la voie de biosynthèse des GA est relativement bien comprise, le mécanisme moléculaire par lequel les GA modulent la croissance et le développement de la plante est bien moins détaillé. Comme décrit précédemment, les mutants de biosynthèse de GA présentent un nanisme plus ou moins sévère, un retard de floraison ou encore un problème de germination. Cette approche génétique souligne le rôle essentiel des GA pour le développement et la croissance des plantes. La caractérisation de la voie de signalisation des GA a mis en évidence que les GA favorisaient la croissance des plantes en déstabilisant des répresseurs de croissance, les protéines DELLA (Davière and Achard, 2013; Harberd, 2003). Plusieurs composants de la voie de signalisation, dont les protéines DELLA, ont été caractérisés chez *Arabidopsis*, cependant leur redondance fonctionnelle a rendu leur caractérisation plus complexe (Dill et al., 2004; Nakajima et al., 2006). Chez le riz, plusieurs composants de la voie de signalisation sont codés par des gènes uniques, rendant l'étude plus accessible.

### 2.1. Perception des GA et formation du complexe GA-GID1

Les GA bioactives sont percues par leur récepteur, qui est soluble, nommé GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 (ou GID1), caractérisé en premier lieu chez le riz (Ueguchi-Tanaka et al., 2005) et un an plus tard, chez Arabidopsis (Nakajima et al., 2006). Chez Arabidopsis, 3 gènes homologues codent pour 3 récepteurs GID1, il s'agit de GID1a, GID1b et GID1c. Les 3 gènes GID1 sont exprimés dans différents organes, tout au long du développement de la plante, dans les fleurs, les siliques, la tige, les feuilles, les racines ou encore dans les graines imbibées (Nakajima et al., 2006). Bien que les profils d'expression de ces 3 gènes puissent se recouvrir, indiquant une probable redondance fonctionnelle, des différences dans les niveaux d'expression sont observées, ce qui suggère une certaine spécificité des récepteurs GID1 au niveau tissulaire. Par exemple, GID1a est le gène plus exprimé dans tous les tissus, hormis dans les racines, alors que GID1c est le gène le moins exprimé, dans presque tous les tissus, chez Arabidopsis (Griffiths et al., 2007). La redondance fonctionnelle des récepteurs GID1 peut être illustrée par la surexpression d'un seul des 3 gènes GID1 d'Arabidopsis, chez le mutant gid1-1 du riz, permettant de restaurer le phénotype de nanisme lié à une insensibilité aux GA. Aussi, chez Arabidopsis, les simples mutants gid1 ne présentent aucune altération phénotypique grâce à la redondance fonctionnelle des récepteurs aux GA ; et l'expression des autres gènes GID1 est toujours stable, il n'y a pas de compensation au niveau transcriptionnel entre les 3 gènes GID1 (Fig. 16). Le triple mutant gid1a gid1b gid1c, quant à lui, complètement



# Figure 18. Structure d'une DELLA avec ses différents domaines.

DELLA : motif contenant la séquence en acides aminés D-E-L-L-A, donnant le nom à cette famille de protéines ; Poly S/T/V : motif polymérique Sérine-Thréonine-Valine ; LHR1 et LHR2 : motifs Leucine Heptad Repeat ; Motifs VHIID, PFYRE et SAW : le nom de chacun des motifs fait référence à sa séquence en acides aminés ; NLS : signal de localisation nucléaire.



# Figure 19. Phénotype du mutant de biosynthèse *ga1-3* croisé successivement avec différents mutants *della*, chez *Arabidopsis*.

Plantes âgées de 5 semaines, à gauche une plante sauvage (WT, écotype Ler), ainsi que le mutant de biosynthèse *ga1-3*. Vers la droite, les gènes codant pour les protéines DELLA sont successivement mutés permettant de restaurer séquentiellement la croissance des parties aériennes du mutant *ga1-3*.

insensible aux GA, présente un phénotype très sévère de nanisme, ne pouvant pas être restauré suite à un traitement avec des GA exogènes (Fig. 16) (Griffiths et al., 2007).

La structure du récepteur GID1 a été caractérisée à l'aide d'analyses en cristallographie, il se compose principalement de 8 feuillets beta, 7 hélices alpha, ainsi que 6 molécules d'eau, alors séquestrées au sein du récepteur (Fig. 17B). L'ensemble de ces éléments font partie intégrante de deux structures essentielles chez le récepteur, une poche de fixation pour les GA bioactives, ainsi qu'une extension N-terminal (Murase et al., 2008; Shimada et al., 2008). Plusieurs groupes polaires vont permettre aux GA bioactives de former des liaisons avec le récepteur et certaines molécules d'eau, au niveau de la poche du récepteur. Dès lors que la GA bioactive est fixée au niveau de la poche, le groupe hydroxyle en position C3, rendant la GA<sub>1</sub> et la GA<sub>3</sub> bioactives, induit un changement de conformation de l'extrémité N-terminale du récepteur pour refermer la poche de fixation des GA. La nouvelle conformation du complexe GID1-GA va stimuler l'interaction d'une protéine DELLA, au niveau de cette extrémité N-terminale, venant stabiliser l'interaction GID1-GA (Fig. 17A). Le mécanisme principal d'inactivation des GA, l'ajout d'un groupe hydroxyle en position C2, entraine quant à lui, une interférence stérique qui empêche la liaison des GA au récepteur GID1, au niveau de la poche de fixation (Murase et al., 2008).

#### 2.2. Les DELLA, régulateurs clés de la signalisation GA

Les protéines DELLA agissent comme répresseurs clés de la voie de signalisation des GA (Peng et al., 1997; Silverstone et al., 1998). Les DELLA appartiennent à la famille des régulateurs transcriptionnels GRAS et le génome d'*Arabidopsis* code pour 5 protéines DELLA : GA-INSENSITIVE (GAI), Repressor of ga1-3 (RGA), RGA-LIKE1 (RGL1), RGL2 et RGL3 (Davière and Achard, 2016). Une seule protéine DELLA a été identifiée chez le riz, il s'agit de SLENDER RICE1 (SLR1). Les DELLA contiennent deux régions principales ; un domaine de perception aux GA en position N-terminale et un domaine GRAS (GA INSENSITIVE, REPRESSOR OF GAI1-3, SCARECROW) en position C-terminale (Fig. 18) (Pysh et al., 1999). Chez *Arabidopsis*, le domaine N-terminal est constitué de 3 motifs spécifiques, les motifs DELLA et VHYNP qui sont impliqués dans l'interaction DELLA-GID1 et un motif polymérique Sérine-Thréonine-Valine (Poly S/T/V), qui peut être phosphorylé ou glycosylé, afin de moduler l'activité des DELLA. Le domaine GRAS C-terminal possède 2 motifs leucine heptad repeat (LHR1 et LHR2), qui sont impliqués dans les interactions protéine-protéine, un signal de localisation nucléaire (NLS), ainsi que les motifs VHIID, PFYRE et SAW qui



Figure 20. Patron d'expression de la protéine DELLA RGL2, phénotype du mutant *ga1-3 rgl2-1* et analyse de la germination des graines du mutant *rgl2.* 

- A. Analyse de l'accumulation des transcrits *RGL2*, *RGA* et *GAI* dans différents tissus chez des plantes âgées de 28 jours, par Northern blot. Adapté de Lee et al., 2002.
- B. Plantes âgées de 30 jours, à gauche le mutant de biosynthèse ga1-3 et à droite le double mutant ga1-3 rgl2-1 ; les plantes présentent toutes une taille de rosette identique. Adapté de Lee et al., 2002.
- C. Test de germination réalisé à partir de graines de plantes sauvages à gauche (WT, écotype Col-0), ainsi que des graines des mutants *rgl1, rgl2* ou *rgl3*. Les graines ont été traitées avec du paclobutrazol 120µM (PAC), un inhibiteur de la biosynthèse de GA. Le % de germination indiqué est issu de la moyenne de 3 réplicas biologiques (100 à 160 graines/génotype/réplica). Les graines du mutant *rgl2* sont résistantes à un traitement au PAC. Adapté de Tyler et al., 2004.

contrôlent l'interaction des DELLA avec GID1 et les protéines F-box (Fig. 18) (Gao et al., 2017).

L'interaction entre GID1 et SLR1 a été observée dans un premier temps en système doublehybride chez la levure, en présence de GA (Ueguchi-Tanaka et al., 2005). Par la suite, une interaction entre les 3 récepteurs GID1 et les protéines DELLA, dans un contexte GAdépendant, a été démontrée chez *Arabidopsis* (Griffiths et al., 2007; Nakajima et al., 2006). Une mutation dans le domaine GRAS abolit l'activité des protéines DELLA, ce qui permet de restaurer le phénotype d'un mutant de biosynthèse des GA, comme *ga1-3* (Dill and Sun, 2001; Silverstone et al., 1997b, 1998). A l'inverse, une perte du domaine de perception aux GA (motif DELLA) rend les protéines DELLA non-dégradables, et donc insensibles aux GA, ce qui conduit à une plante naine. Une autre approche génétique met également en évidence que les protéines DELLA sont des répresseurs de la voie de signalisation des GA. Le phénotype du mutant *ga1-3*, qui présente un sévère nanisme, peut-être restauré progressivement en mutant séquentiellement les 5 gènes codant pour les protéines DELLA (Fig. 19) (Silverstone et al., 1997b).

Les séquences des DELLA sont très conservées chez plusieurs espèces, comme chez Arabidopsis, le riz, le blé, l'orge ou le maïs (Davière and Achard, 2013). Une expression ectopique de RGA, sous le contrôle du promoteur RGL2, permet de restaurer le phénotype du mutant rgl2 mettant en évidence une redondance fonctionnelle au sein des protéines DELLA (Gallego-Bartolome et al., 2010). Bien que les 5 DELLA aient des fonctions redondantes, elles ont également des fonctions spécifiques liées à leurs patrons d'expression et d'accumulation au sein des différents tissus ou organes de la plante (Fig. 20A) (Lee et al., 2002; Peng et al., 1997). RGA et GAI sont impliqués dans la régulation de la croissance et l'induction florale (Dill and Sun, 2001; King et al., 2001), RGL1 et RGL2 modulent le développement floral (Cheng et al., 2004; Tyler et al., 2004) et RGL3 est accumulé en réponses à des stress environnementaux, ainsi que des stress biotiques (Achard et al., 2008; Wild et al., 2012). Une approche génétique souligne également l'implication de RGL2 dans l'inhibition de la germination des graines (Fig. 20C) (Lee et al., 2002; Tyler et al., 2004). Les graines du mutant ga1-3, décrit précédemment, sont incapables de germer sans ajout exogène de GA. Les graines du double mutant ga1-3 rgl2 germent très bien, alors que les graines du double mutant ga1-3 rgl1 ne peuvent pas germer sans ajout exogène de GA bioactives. Cette expérience met en avant le rôle de RGL2 en tant régulateur négatif dans le contrôle de la germination des graines, en réponse aux GA. Aussi, le simple mutant ga1-3 et le double mutant ga1-3 rgl2



#### Figure 21. Schéma de la voie de signalisation des GA.

Le changement de conformation des protéines DELLA permet le recrutement du complexe SCF afin de polyubiquitiner les protéines DELLA. Le protéasome 26S reconnaît cette polyubiquitination comme un signal de dégradation. La dégradation des protéines DELLA entraine ainsi une levée de l'inhibition de la croissance.

GA : Gibbérellines bioactives ; GID1 : récepteur des GA ; DELLA : protéines DELLA ; Complexe SCF : complexe Skp1-Cullin-F box protein-E3 ubiquitine ligase ; ub : ubiquitine.

présentent un nanisme similaire, ce qui souligne le fait que RGL2 n'est pas impliqué dans le contrôle de l'élongation de la tige chez les plantes, à l'inverse de GAI et RGA (Fig. 20B) (Lee et al., 2002).

La voie de signalisation des GA peut moduler, par un rétrocontrôle à l'aide des protéines DELLA, l'expression des gènes codant pour les différents éléments de la voie de signalisation. Pour exemple, les protéines DELLA interagissent directement aux promoteurs des gènes *GID1a* et *GID1b* pour moduler leur expression (*Zentella et al., 2007*). Chez le triple mutant *ga1-3 rga-24 gai-t6*, les gènes *GID1a* et *GID1b* sont plus faiblement exprimés. Chez le mutant de biosynthèse *ga1-3*, un traitement avec des GA bioactives entraine une déstabilisation des DELLA et donc une réduction du niveau d'expression des gènes *GID1a GID1b* et *GID1c*, codant pour les récepteurs des GA (Griffiths et al., 2007). A l'inverse, chez un mutant gain de fonction *rga-Δ17* produisant une protéine RGA ne pouvant pas être dégradée en présence de GA et présentant un phénotype très sévère de nanisme, les gènes *GID1a* et *GID1c* sont plus fortement exprimés.

#### 2.3. Dégradation des DELLA par le protéasome

Les domaines DELLA et TVHYNP de la protéine DELLA interagissent avec le récepteur GID1 ayant fixé une GA bioactive. La formation du complexe GA-GID1-DELLA induit alors une modification dans la conformation du domaine GRAS de la protéine DELLA (Hirano et al., 2010). Après ce changement de conformation, un complexe Skp1-Cullin-F box protein-E3 ubiquitine ligase (complexe SCF-E3) est recruté et se lie aux motifs VHIID et LHRII (domaine GRAS C-terminal) de la protéine DELLA, via le domaine C-terminal d'une protéine adaptatrice F-box (Fig. 21). Les gènes codant pour les protéines F-box sont caractérisés chez Arabidopsis avec SLEEPY (SLY1) et son homologue SNEEZY (SNE) et chez le riz avec GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF2 (GID2), dont les séquences protéiques partagent une très forte homologie (Ariizumi et al., 2011; Dill et al., 2004). Les mutants nuls sly1 et gid2 présentent un phénotype de nanisme (Sasaki et al., 2003; Steber et al., 1998), insensibles aux GA, dû à une accumulation des protéines DELLA, RGA ou SLR1, respectivement (McGinnis et al., 2003). La surexpression de SNE, dans un mutant sly1, permet une diminution partielle de l'accumulation des DELLA, et donc une complémentation partielle du phénotype de nanisme, soulignant ainsi, une redondance fonctionnelle des deux F-box, chez Arabidopsis (Strader et al., 2004). Les protéines F-box correspondent donc à des régulateurs positifs de la voie de signalisation des GA. D'après une étude chez le riz, une interaction entre le récepteur GID1 et

les motifs DELLA/TVHYNP de la protéine DELLA SLR1 est nécessaire, mais pas suffisante, pour permettre le recrutement de la F-box GID2. En effet, une interaction entre GID1 et le domaine GRAS de SLR1 est indispensable pour permettre un recrutement optimal de GID2 (Hirano et al., 2010).

Le complexe SCF-E3, en interaction avec le complexe GA-GID1-DELLA via la protéine F-box, vient catalyser la conjugaison de 4 protéines d'ubiquitines sur une lysine des protéines DELLA. Cette polyubiquitination, alors reconnue par le protéasome 26S comme signal de dégradation, entraine la déstabilisation des protéines DELLA (Fig. 21). De nombreux processus biologiques sont régulés par un système SCF-protéasome, dans lesquels la protéine F-box confère la spécificité de la protéine cible à dégrader. La dégradation des protéines doit être finement contrôlée au niveau spatial et temporel, aussi, la simple présence de la protéine cible ne doit pas entrainer systématiquement sa dégradation (Ravid and Hochstrasser, 2008). Dans la voie de signalisation des GA, une interaction entre les motifs DELLA/TVHYNP, ainsi que le domaine GRAS des protéines DELLA et le récepteur GID1 pourrait être un signal permettant de contrôler efficacement la dégradation des protéines DELLA (Hirano et al., 2010). Ce mécanisme de dégradation est dynamique, les protéines DELLA sont rapidement déstabilisées suite à un traitement avec des GA (Silverstone et al., 2001).

### 2.4. Régulation de l'activité et de la stabilité des DELLA par des mécanismes alternatifs

Comme décrit précédemment, les protéines DELLA peuvent subir une polyubiquitination, induite par la présence de GA bioactives, pour favoriser leur dégradation. Cependant, les DELLA peuvent subir d'autres types de modifications post-traductionnelles, telles que la SUMOylation, la phosphorylation ou encore la glycosylation ; pouvant moduler leur conformation, leur stabilité et leur activité. Les protéines SPINDLY (SPY) et SECRET AGENT (SEC) ont un rôle antagoniste dans la glycosylation des DELLA pour favoriser ou inhiber, respectivement, la capacité des DELLA à établir des interactions protéine-protéine (revu par Camut et al., 2017).

Un autre mécanisme de dégradation des DELLA, indépendant des GA, a été mis en évidence. Une récente étude démontre que sous certaines conditions environnementales, notamment en présence de températures élevées ou d'ombre, des protéines DELLA insensibles aux GA peuvent tout de même être dégradées. Cette dégradation alternative des DELLA est assurée par une interaction physique entre une E3 ubiquitine ligase, CONSTITUTIVELY



# Figure 22. Mécanismes d'action des DELLA sur les protéines régulatrices.

- A. Mécanisme de séquestration. Les protéines DELLA peuvent séquestrer des protéines régulatrices, ou des facteurs de transcription, pour les empêcher de se fixer sur le promoteur des gènes cibles et de moduler leur transcription.
- B. Mécanisme de transactivation. Lorsque les protéines DELLA interagissent avec des facteurs de transcription, et que ces derniers vont se fixer sur le promoteur de gènes cibles, elles peuvent induire fortement en *trans* l'expression des gènes cibles. PR : protéine régulatrice.

PHOTOMORPHOGENIC1 (COP1), et les protéines DELLA. Ainsi, la déstabilisation des protéines DELLA pourrait être assurée à la fois par la signalisation GA, mais également par COP1, en réponse à certains facteurs environnementaux (Blanco-Touriñán et al., 2020).

# 2.5. Mécanismes d'action des DELLA

La fonction biologique des DELLA réside dans leur capacité à interagir avec de multiples classes de protéines régulatrices. Plusieurs dizaines de protéines interagissant aux DELLA ont été caractérisées à ce jour, regroupées sous le terme de DELLA-interacting Proteins ou DIP. Quand leur dégradation n'est pas assurée, notamment en absence de GA, les protéines DELLA s'accumulent au niveau nucléaire pour jouer leur rôle de régulateur transcriptionnel. Pour exemple, le niveau d'expression de plusieurs centaines de gènes est modulé, lors de la germination du mutant de biosynthèse de GA *ga1-3*, après un traitement aux GA<sub>4</sub> ayant entrainé une rapide dégradation des protéines DELLA (Ogawa et al., 2003). Les protéines DELLA, dépourvues de domaine de liaison à l'ADN, une interaction avec différentes classes de facteurs de transcription devient nécessaire pour contrôler l'expression d'une multitude de gènes cibles. Depuis quelques années, deux mécanismes moléculaires principaux ont été identifiés et permettent d'expliquer comment les DELLA modulent la transcription de gènes cibles, contrôlant ainsi le développement et la croissance des plantes (Fig. 22). Le mécanisme d'action privilégié par les protéines DELLA semble spécifique à chaque facteur de transcription.

# 2.5.1. Mécanisme de séquestration

Par ce premier mécanisme, en absence de GA, les protéines DELLA séquestrent des facteurs de transcription, ou des protéines régulatrices, en interagissant physiquement avec eux, les empêchant ainsi de se fixer sur les promoteurs des gènes cibles et d'activer leur transcription (Fig. 22A). Dès que les conditions de croissance sont favorables, les GA bioactives alors présentes, permettent la déstabilisation des protéines DELLA, levant ainsi l'inhibition des protéines régulatrices responsables de la croissance chez les plantes.

Le mécanisme de séquestration des DELLA est mis en évidence pour la première fois avec les facteurs de transcription PIF (PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS) faisant partie de la famille des bHLH (basic Helix-Loop-Helix) (Feng et al., 2008; de Lucas et al., 2008). Par la suite, le laboratoire a identifié d'autres protéines régulatrices séquestrées par les DELLA, telles que les TCP (TEOSINTE BRANCHED1 (TB1), CYCLOIDEA (CYC), and

### Introduction

PROLIFERATING CELL FACTOR (PCR)) ou les protéines JAZ (Jasmonate ZIM-domain) (Davière et al., 2014; Wild et al., 2012).

Les domaines engagés dans ces interactions ont été caractérisés pour les différentes protéines. Concernant les DELLA, le domaine GRAS, comprenant les répétitions 'leucine'-Leucine heptad repeat (LHR1 et LHR2), est requis dans les interactions DELLA-DIP, lors d'une séquestration. Chez les différents facteurs de transcription caractérisés, le domaine de liaison à l'ADN, permettant d'exercer leur fonction de régulateurs transcriptionnels, est engagé dans les interactions avec les DELLA, d'où cette incapacité temporaire à se lier aux promoteurs des gènes cibles. Par exemple, les facteurs de transcription PIF sont séquestrés par les DELLA via leur domaine bHLH, domaine de liaison à l'ADN (Feng et al., 2008; de Lucas et al., 2008).

#### 2.5.2. Mécanisme de transactivation

En absence de GA, les protéines DELLA peuvent également interagir aux facteurs de transcription, via les motifs LHR1 et SAW du domaine GRAS, sans masquer le domaine de liaison à l'ADN de ces FT. Des essais de transactivation en levures démontrent que SLR1, une protéine homologue de GAI chez le riz, agit comme un activateur transcriptionnel ou un coactivateur (Ogawa et al., 2000). Des expériences complémentaires mettent en évidence que les motifs DELLA/TVHYNP, du domaine N-terminal de la protéine DELLA SLR1, possèdent une activité transactivatrice (Hirano et al., 2012). Ce second mécanisme permet ainsi aux DELLA, lorsqu'elles interagissent avec des FT et que ces derniers se fixent sur les promoteurs des gènes cibles, d'induire fortement en *trans* l'expression de ces gènes cibles (Fig. 22B). Ce mécanisme d'action des protéines DELLA a été caractérisé chez *Arabidopsis* pour plusieurs FT de la famille IDD (INDETERMINATE DOMAIN) ou des FT de la famille ARR (type-B ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR) (Marín-de la Rosa et al., 2015; Yoshida et al., 2014). La présence de GA bioactives entraine la dégradation des DELLA inhibant leur capacité d'activer en *trans* l'expression de gènes cibles.

Le mécanisme moléculaire de la transactivation demeure encore peu caractérisé à ce jour, néanmoins, il semblerait que des modifications dans la conformation de la chromatine puissent jouer un rôle dans la mise en place de ce mécanisme. En effet, les protéines DELLA peuvent interagir avec des unités du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF pour améliorer la transcription des gènes cibles (Sarnowska et al., 2013). D'autres études

confirment que les DELLA interagissent avec des complexes de remodelage de la chromatine (Park et al., 2017; Zhang et al., 2014).

A l'aide de ces deux mécanismes, les DELLA peuvent ainsi, inhiber par séquestration, la transcription de gènes cibles activateurs de la croissance, ou au contraire, par transactivation, favoriser l'expression de gènes répresseurs de la croissance.

# 2.6. Rôle de la voie de signalisation sur l'homéostasie des GA

L'accumulation des GA bioactives est finement régulée via des interconnexions complexes entre la biosynthèse, le catabolisme ou encore le transport. Une accumulation trop importante, ou au contraire une diminution en GA bioactives, peut fortement altérer la croissance et le développement des plantes ; les mutants de biosynthèse décrits précédemment illustrent parfaitement ce point. Lorsque le mutant nain de biosynthèse *ga1-3* est traité avec des GA<sub>4</sub> bioactives, l'expression des gènes *GA200x1*, *GA200x2*, *GA200x3* est fortement et rapidement réprimée, ainsi que celle d'autres gènes de la voie de biosynthèse comme *KO1* ou *GA30x1* (Olszewski et al., 2002). Les gènes codant pour les enzymes *GA20x*, responsables de la désactivation des GA, sont quant à eux plus fortement exprimés en réponse à une accumulation de GA bioactives (Elliott et al., 2001; Thomas et al., 1999). Il y a donc des mécanismes qui permettent de contrôler constamment et efficacement la production de GA pour qu'elle soit optimale, en intégrant les différents facteurs environnementaux.

Il est aussi admis que la voie de signalisation joue un rôle important dans la biosynthèse des GA. Pour exemple, des mutants de la voie signalisation, *gai-t6* ou *rga-24*, incapables de produire les protéines DELLA GAI ou RGA, accumulent plus faiblement les transcrits *GA200x* et *GA30x* en comparaison à des plantes sauvages (Croker et al., 1990; Dill and Sun, 2001; Martin et al., 1996; Silverstone et al., 2001). Des résultats identiques sont retrouvés chez le pois, organisme pour lequel deux protéines DELLA ont été identifiés, CRY et LA. Chez les mutants simples *cry* ou *la*, les gènes de biosynthèse *PsGA200x1, PsGA30x1* et *PsGA30x2* sont réprimés alors que les gènes *PsGA20x1et PsGA20x2*, codant pour des enzymes impliquées dans le catabolisme, sont surexprimés (Weston et al., 2008). Aussi, un mutant qui n'accumule pas de protéines DELLA a besoin de moins de GA bioactives pour assurer une croissance identique à une plante sauvage (Peng et al., 1997; Silverstone et al., 1998). La hauteur du triple mutant *gai-t6 rga-24 ga1-3*, ne produisant pas les protéines DELLA GAI et RGA ni de GA bioactives, est identique à celle d'une plante sauvage (King et al., 2001).

A l'inverse, une accumulation des DELLA entraine l'activation d'un mécanisme de rétrocontrôle positif sur la biosynthèse des GA ; permettant d'assurer une production optimale de GA en fonction des besoins actuels de la plante. Par exemple, des plantes insensibles aux GA, qui accumulent une protéine DELLA non dégradable, présentent des concentrations plus élevées en GA bioactives, mais plus faibles pour les différents précurseurs de la voie de biosynthèse. Dans cette expérience, un rétrocontrôle positif de la biosynthèse des GA est mis en place pour tenter de restaurer, sans succès, la croissance des plantes (Talon et al., 1990; Ueguchi-Tanaka et al., 2000). Une hypothèse envisageable, pouvant expliquer ce mécanisme de régulation, serait que les protéines DELLA active en *trans*, à l'aide de DIP, l'expression des gènes de biosynthèse des GA et qu'en absence de DELLA ces gènes soient moins exprimés.

#### 3. Rôle des GA dans le développement des plantes

#### 3.1. Généralités

L'intégration permanente des facteurs environnementaux combinés au programme génétique intrinsèque permet d'ajuster la croissance de la plante dans le but d'assurer sa survie et donc la persistance de l'espèce. Les phytohormones, et notamment les GA, sont des médiateurs qui gouvernent des mécanismes clés, tout au long du développement et de la croissance des plantes. Les mutants de biosynthèse décrits précédemment témoignent du rôle primordial des GA de par leurs phénotypes caractéristiques. Des altérations phénotypiques similaires sont retrouvées chez ces mutants, avec des défauts de germination, des anomalies au niveau du développement des parties aériennes, une floraison retardée, ou encore un système racinaire réduit, pour citer quelques étapes clés de transition du développement. Au niveau cellulaire, la croissance est régulée par deux processus, la division et l'expansion cellulaire (Achard et al., 2009; de Lucas et al., 2008).

#### 3.2. Germination de la graine

La germination des graines est initiée lorsque les conditions environnementales sont favorables, la température et la lumière étant des paramètres privilégiés et les optimaux spécifiques à chaque espèce. L'équilibre entre la dormance et la germination des graines repose principalement sur une balance dynamique entre la synthèse et le catabolisme de l'ABA et les GA, qui répriment et activent la germination, respectivement.



Figure 23. Rôle du complexe DELLA-ABI5-ABI3 sur la germination des graines chez *Arabidopsis*.

Une température élevée active l'expression de *SOM (SOMNUS)* à l'aide d'une augmentation de la biosynthèse de l'ABA et une diminution de la biosynthèse de GA. Le complexe DELLA-ABI5-ABI3 favorise l'expression de *SOM*. SOM régule également la biosynthèse de l'ABA et des GA permettant d'établir un rétrocontrôle positif. Adapté de Lim et al., 2014.



#### Figure 24. Rôle du complexe PIF4-BZR1-ARF6 sur l'élongation cellulaire chez *Arabidopsis*.

Le complexe PIF4-BZR1-ARF6 active fortement la transcription d'une multitude de gènes impliqués dans l'élongation cellulaire au niveau de l'hypocotyle. Les protéines DELLA peuvent interagir avec les 3 facteurs du complexe, bloquant ainsi l'activité transcriptionnelle du complexe. Les GA favorisent l'élongation de l'hypocotyle en déstabilisant les répresseurs nucléaires DELLA pour libérer les protéines et permettre la formation du complexe PIF4-BZR1-ARF6.

GA : gibbérellines ; PIF4 : PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4 ; BZR1 : Brassinazole resistant 1 ; ARF6 : Auxin-Response Factor 6. Adapté de Chaiwanon et al., 2016. En absence de lumière, le FT PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 3-LIKE5 (PIF1) inhibe la germination en réduisant la concentration en GA bioactives, augmentant ainsi l'accumulation des répresseurs nucléaires DELLA, et notamment RGL2, principal répresseur de la germination (Ref, Peng et al. 2002). En présence de lumière, la dégradation de PIF1 induite par les phytochromes, entraine une synthèse de GA bioactives et donc la déstabilisation de RGL2 (Xue et al., 2022). En absence de GA, RGL2 s'accumule et s'associe avec ABA-INSENSITIVE3 et 5 (ABI3 et ABI5), deux composants clés de la voie de signalisation de l'ABA, pour induire l'expression de *SOMNUS (SOM)*, un répresseur central de la germination (Fig. 23). Par rétrocontrôle, ce dernier diminue et augmente le niveau d'accumulation de GA et d'ABA, respectivement. Par ailleurs, la lumière réprime l'expression de *SOM* pour favoriser la germination (Lim et al., 2014). RGL2 interagit également avec d'autres protéines régulatrices, comme SPATULA ou SCARECROW-LIKE 3 (SCL3), pour contrôler la germination des graines (détaillé dans la revue Xue et al., 2022).

### 3.3. Elongation de l'hypocotyle

Après germination, l'élongation de l'hypocotyle, régie en grande partie par la qualité de la lumière, repose sur une action synergique des voies de signalisation des brassinostéroïdes (BR), de l'auxine (IAA) et des GA (Liu et al., 2018). Une plantule qui croit à l'obscurité, développe un phénotype de skotomorphogenèse caractérisé par un hypocotyle très allongé, la formation d'une crosse apicale alors que la croissance des cotylédons et des méristèmes apicaux caulinaire et racinaire, est inhibée. A l'inverse, si la qualité de la lumière est suffisante, le terme de photomorphogenèse est usité. Dans ce cas, les plantules déploient les cotylédons et développent un système racinaire plus important, alors que la croissance de l'hypocotyle, dépourvu de crosse apicale, demeure restreinte (von Arnim and Deng, 1996). La skotomorphogenèse et la photomorphogenèse contrôlent l'élongation de l'hypocotyle en jouant principalement sur l'expansion cellulaire. La prolifération cellulaire non requise lors de l'élongation de l'hypocotyle, joue principalement un rôle en amont lors du développement de la plantule.

L'expansion cellulaire au niveau de l'hypocotyle s'établit sur la fonction d'un complexe (BZR-ARF-PIF) formé de trois protéines régulatrices, BZR1 (Brassinazole resistant 1) - un FT de la voie de signalisation des brassinostéroïdes, ARF6 (Auxin-Response Factor 6) - un régulateur auxine-dépendant, et PIF4 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4) - un FT régulé par la lumière et la température (Fig. 24). Le complexe BZR-ARF-PIF active fortement la



Figure 25. L'accumulation des DELLA inhibe la croissance du méristème racinaire chez *Arabidopsis*.

Racines de plantules âgées de 5 jours (après imbibition), à gauche l'extrémité d'une racine d'une plante sauvage (écotype Ler), au centre le mutant *ga1-3* et à droite le mutant *ga1-3* quadruple-DELLA. Le centre quiescent et la zone de transition entre le cortex méristèmatique et les cellules différenciées sont indiqués à l'aide de flèches bleu et rouge, respectivement. La barre d'échelle représente  $100\mu m$ . Adapté de Achard et al., 2009.



Figure 26. Implication de la voie de signalisation des GA dans le contrôle de la prolifération cellulaire chez *Arabidopsis*.

GA : gibbérellines ; PR : protéine régulatrice ; CKI : inhibiteur du complexe cyclin/cyclindependant kinase (CYC/CDK) impliqué dans la prolifération cellulaire ; CYC CDK : complexe cyclin/cyclin-dependant kinase.
transcription d'une multitude de gènes cibles promouvant ainsi l'élongation de l'hypocotyle (Oh et al., 2014). Au contraire, les protéines DELLA limitent leur action, en interagissant avec ces FT au niveau de leur domaine de liaison à l'ADN, bloquant ainsi leur activité transcriptionnelle (Bai et al., 2012; Feng et al., 2008; de Lucas et al., 2008; Oh et al., 2014; Bernardo-García et al., 2014). Les GA activent l'élongation cellulaire, en libérant les protéines régulatrices du complexe BZR-ARF-PIF, via la déstabilisation des DELLA (Fig. 24) (Chaiwanon et al., 2016). De manière consistante, les cellules de l'hypocotyle sont plus allongées chez un quadruple mutant DELLA, en comparaison à des plantes contrôles. A l'opposé, l'expression d'une protéine DELLA non dégradable, réprime l'activité du complexe BZR-ARF-PIF inhibant ainsi, l'expansion cellulaire au niveau de l'hypocotyle (Ben-Targem et al., 2021; Ragni et al., 2011). Il est important de préciser que le programme génétique intrinsèque, les facteurs environnementaux tels que la lumière ou encore différentes voies de signalisation hormonales sont autant de facteurs qui contrôlent l'élongation cellulaire de l'hypocotyle chez *Arabidopsis thaliana*.

#### 3.4. Croissance racinaire

Au contraire de l'hypocotyle, la croissance de la racine résulte à la fois de divisions et d'élongations cellulaires qui dépendent de la fonction continue du méristème racinaire. Le méristème racinaire émane d'un groupe de cellules indifférenciées, qui génèrent des cellules qui se divisent plusieurs fois avant de s'allonger et de se différencier. Pour déterminer précisément si les protéines DELLA jouaient un rôle crucial dans le contrôle de l'activité du méristème racinaire, deux études ont suivi la croissance du méristème apical racinaire d'un mutant de biosynthèse de GA (qui accumule les DELLA) en comparaison au contrôle, au cours du développement (Achard et al., 2009 ; Ubeda-Tomás et al., 2009). Ces études ont révélé que l'accumulation des protéines DELLA réprimait la croissance du méristème racinaire. Pour étayer davantage le rôle des protéines DELLA dans le contrôle de la division des cellules racinaires, les auteurs ont ensuite introduit chez le mutant de biosynthèse ga1-3 la construction *pCYCB1;1:Dbox-GUS*, qui s'exprime à la phase G2/M du cycle cellulaire et qui permet de suivre l'activité mitotique. L'absence de GA chez le mutant ga1-3 réduit fortement le nombre de cellules en division, et un traitement aux GA est suffisant pour que ce mutant puisse recouvrir un nombre de cellules en division identique au contrôle (Achard et al., 2009; Ubeda-Tomás et al., 2009 ; Fig. 25). La division des cellules eucaryotes est régie par l'action consécutive de complexes cyclines (CYC) et cyclines-dépendantes-kinases (CDK), dont l'activité contrôle deux importantes phases de transition du cycle cellulaire, les transitions G1/S



## Figure 27. Implication des GA dans le contrôle de la taille du méristème racinaire, chez *Arabidopsis*.

- A. Les cellules de l'endoderme (En) doivent doubler de taille avant de pouvoir se diviser, cette élongation cellulaire est contrôlée par les GA.
- B. En absence de GA, l'élongation des cellules de l'endoderme est plus faible ce qui impacte l'élongation des cellules des tissus adjacents, entrainant une réduction de la division cellulaire ; le méristème est plus petit.

Les flèches noires représentent l'élongation cellulaire, les barres noires avec une tête représentent l'inhibition de l'élongation cellulaire et les lignes rouges représentent la division cellulaire. St : stèle ; P : péricycle ; En : endoderme ; C : cortex et Ep : épiderme. Adapté de Ubeda-Tomás et al., 2009. et G2/M. Il a été démontré que la signalisation GA régulait le niveau d'expression de régulateurs négatifs du cycle cellulaire, les CKI (des inhibiteurs de CDK). En absence de GA, le niveau d'expression des CKI est augmenté, et un traitement aux GA, réduit l'expression de ces derniers (Fig. 26). Suite à ces observations, il a été proposé que les GA/DELLA régulaient la prolifération cellulaire via le contrôle transcriptionnel d'inhibiteurs du cycle cellulaire (Achard et al., 2009 ; Ubeda-Tomás et al., 2009).

Outre leur rôle au niveau du méristème racinaire, les GA/DELLA contrôlent l'élongation des cellules, principalement au niveau de l'endoderme. En effet, par une approche génétique qui consiste à exprimer la protéine DELLA non dégradable gai, spécifiquement dans des tissus sélectionnés de la racine, il a été démontré que l'endoderme représente le principal tissu sensible aux GA, qui régule l'expansion des cellules (et limite le taux d'élongation des autres cellules) et en conséquence la racine dans son ensemble (Ubeda-Tomás et al., 2008) (Fig. 27). Ainsi, la voie de signalisation des GA contrôle la croissance racinaire via son double effet sur la division et l'élongation des cellules.

En aparté, il convient de mentionner ici, que depuis une décennie, de multiples études soulignent le rôle des DELLA agissant comme intégrateurs de l'action des GA, et devenant des régulateurs clés émergeants de l'architecture du système racinaire ; Comme nous l'avons vu ci-avant, les DELLA contrôlent les dynamiques de la croissance racinaire, et plus encore, sont aussi requises pour l'établissement des endosymbioses racinaires avec les bactéries rhizobium, au niveau des nodosités chez les poacées, et avec les champignons, lors de l'établissement de mycorhizes arbusculaires (détaillé dans la revue Fonouni-Farde et al., 2016).

#### 3.5. Hauteur de la plante

En parallèle du développement du système racinaire, les cellules des méristèmes apicaux caulinaires prolifèrent continuellement, puis s'allongent assurant la croissance de la plante en hauteur (Ingram and Waites, 2006). Le mécanisme par lequel les DELLA répriment la prolifération cellulaire dans les méristèmes racinaires pourrait être identique à celui retrouvé au niveau des méristèmes apicaux caulinaires. L'utilisation de la construction rapportrice *pCYCB1;1:Dbox-GUS* met en évidence que l'activité mitotique diminue quand une plante contrôle est traitée avec du PAC, un inhibiteur de la voie de biosynthèse des GA (Fig. 28). Au contraire, un traitement avec des GA, chez le mutant *ga1-3*, permet d'augmenter la prolifération cellulaire, initialement réduite, du fait de l'accumulation des DELLA (Achard et al.,



Figure 28. Les protéines DELLA GAI et RGA répriment la division cellulaire dans l'apex caulinaire au stade inflorescentiel chez *Arabidopsis*.

Utilisation de la lignée rapportrice pCYCB1;1:Dbox-GUS en tant que marqueur de la prolifération cellulaire par localisation histochimique de l'activité GUS. Des traitements avec des GA<sub>3</sub> bioactives et du paclobutrazol (PAC) sont réalisés sur des apex inflorescentiels, disséqués, à partir de plante sauvage (écotype Ler), du mutant *ga1-3* et du double mutant *gai-t6 rga-24*, âgées de 5 semaines. Les plantes ont été traitées 2 fois, une semaine après floraison, avec 100µM de GA<sub>3</sub> ou 10µM de PAC. La barre d'échelle représente 0,5mm. Adapté de Davière et al., 2014.



## Figure 29. La voie de signalisation des GA contrôle la hauteur de la plante à l'aide du complexe DELLA-TCP chez *Arabidopsis*.

- A. Modèle d'implication de la voie de signalisation des GA dans le contrôle de la prolifération cellulaire dans les apex caulinaires, au stade inflorescentiel.
- B. Plantes âgées de 6 semaines, à gauche une plante sauvage (écotype Col-0), le double mutant *tcp14-4 tcp15-3* et à droite deux lignées indépendantes (2.4 et 27) ayant intégré un amiR ciblant *TCP8* et *TCP22* pour réprimer leur expression. Adapté de Davière et al., 2014.

2009; Davière et al., 2014). A l'opposé, un traitement avec des GA ou du PAC chez le double mutant *gai-t6 rga-24* affecte peu la prolifération cellulaire au niveau des méristèmes apicaux caulinaires ; elle est semblable à celle observée chez des plantes contrôles non-traitées et ce peu importe les conditions de traitements (Fig. 28). En accord avec ces observations, de précédentes études ont révélé que les protéines GAI et RGA, étaient les principales protéines DELLA inhibant l'élongation de la tige (Dill and Sun, 2001; King et al., 2001). *GAI* et *RGA* sont les deux DELLA les plus fortement exprimés dans l'apex caulinaire (Davière et al., 2014).

Dans une étude antérieure, le laboratoire a révélé, au niveau de l'apex caulinaire, une interaction entre RGA et le facteur de transcription TCP14 (TEOSINTE BRANCHED 1 [TB1], CYCLOIDEA [CYC], and PROLIFERATING CELL FACTOR [PCF]). Les facteurs de transcription de la famille des TCP possèdent un motif bHLH (basic Helix-Loop-Helix) leur permettant de se fixer à l'ADN ou d'établir des interactions protéines-protéines. Chez *Arabidopsis*, 24 gènes codent pour des FT TCP, divisés en deux classes (I et II), dont TCP14 appartenant à la classe I. La protéine RGA interagit avec l'ensemble des TCP de la classe I, en système hétérologue chez la levure (Davière et al., 2014). Le domaine leucine heptade repeat 1 (LHR1) de la protéine RGA et deux domaines de TCP14, dont le domaine bHLH de liaison à l'ADN, sont impliqués dans l'interaction RGA-TCP14. Des expériences complémentaires, comme l'EMSA (Electro Mobility Shift Assay), mettent en évidence que la protéine RGA inhibe l'activité transcriptionnelle de TCP14 par un mécanisme de séquestration (Fig. 29A) (Davière et al., 2014).

Les TCP sont connus pour contrôler plusieurs paramètres clés du développement, dont la prolifération cellulaire, pouvant directement impacter la morphologie des fleurs, la forme des feuilles ou encore la ramification des parties aériennes. Les TCP modulent également la synthèse d'hormones et participent à la régulation du rythme circadien (Martín-Trillo and Cubas, 2010). Une analyse fonctionnelle de TCP14 et son proche homologue TCP15, par une approche génétique, démontre que la longueur de tous les entre-nœuds d'une tige est réduite chez le double mutant *tcp14 tcp15*. Des lignées rapportrices viennent étayer ces analyses, les gènes *TCP14* et *TCP15* sont exprimés dans les jeunes tiges en développement (Kieffer et al., 2011).

L'expression de plusieurs gènes du cycle cellulaire, notamment *CYCB1;1*, est plus faible chez le double mutant *tcp14 tcp15*, en comparaison à des plantes contrôles, au niveau des apices caulinaires. D'après une analyse *in silico*, 39% des promoteurs des gènes impliqués dans le cycle cellulaire possèdent un motif reconnu par les TCP de classe I (Davière et al., 2014). Ainsi, le complexe DELLA-TCP de classe I semble réguler l'expression d'un grand nombre de

gènes contrôlant le cycle mitotique. Chez le riz, les facteurs de transcription PCF1 et PCF2, appartenant à la classe I des TCP, jouent également un rôle dans la prolifération cellulaire au niveau des méristèmes (Kosugi and Ohashi, 1997).

Le double mutant *tcp14 tcp15*, ayant intégré un micro-ARN artificiel réduisant l'expression de *TCP8* et *TCP22*, présente un phénotype de nanisme plus sévère que le double mutant *tcp14 tcp15 ;* soulignant une redondance fonctionnelle chez cette famille multigénique (Fig. 29B) (Davière et al., 2014). Une redondance fonctionnelle au sein de la famille des TCP de classe I permettrait de favoriser, de façon synergique, la prolifération cellulaire, régulant ainsi la hauteur de la plante (Davière et al., 2014; Kieffer et al., 2011). En résumé, les GA contrôlent la hauteur de la plante par la déstabilisation des protéines DELLA au niveau du méristème caulinaire permettant aux FT qui ne sont plus séquestrés, notamment les TCP de classe I, de venir activer la transcription de gènes cibles impliqués dans la prolifération cellulaire (Fig. 29A).

#### 3.6. Initiation et développement des branches secondaires

Pour s'adapter efficacement à des conditions environnementales changeantes, la plante peut moduler son architecture en jouant sur sa hauteur, mais également, sur la formation des branches secondaires ; un aspect morphologique très important. Lors de la croissance en hauteur de la plante, assurée par une prolifération cellulaire depuis le méristème apical caulinaire, des bourgeons axillaires peuvent se former sur la tige, à l'aisselle d'une feuille cauline (Wang and Jiao, 2018). Un méristème axillaire est identique en tout point à un méristème apical, il a une structure et une fonction similaires, assurant la formation d'un organe latéral.

L'auxine, et plus récemment certains sucres, ont été caractérisés en tant que régulateurs de la dominance apicale chez les plantes (revu dans Barbier et al., 2017; Domagalska and Leyser, 2011; Sakr et al., 2018). Cependant, d'autres phytohormones, notamment les cytokinines (CK), les strigolactones (SL) et les brassinostéroïdes (BR), jouent un rôle important dans l'initiation de la formation et le débourrement des bourgeons axillaires. De nombreuses revues font l'état des lieux des connaissances récentes, relatives à l'intégration des divers signaux hormonaux, leurs interconnexions et la régulation génétique, sur l'initiation, l'inhibition de croissance ou le débourrement des bourgeons axillaires (Rameau et al., 2015; Wai and An, 2017; Wang and Jiao, 2018; Wang et al., 2018; Yang and Jiao, 2016). Volontairement, je me focaliserai dans les paragraphes suivants, sur le rôle des GA et de la signalisation GA, au



Figure 30. Rôle du complexe DELLA-SPL9 sur la formation des bourgeons axillaires chez *Arabidopsis*.

SPL9 : SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE 9 ; LAS : LATERAL SUPPRESSOR ; *GA2ox4* : gène codant pour une enzyme impliquée dans le catabolisme des GA.

cours de l'initiation et le développement des ramifications axillaires. Fait intéressant, la formation des bourgeons axillaires se réduit fortement chez le quintuple mutant DELLA (*rga gai rgl1 rgl1 rgl3*), en comparaison des plantes contrôles, démontrant que les GA ont un rôle dans ce processus développemental (Zhang et al., 2020). De plus, un traitement avec des GA bioactives, inhibe la formation des bourgeons axillaires chez des plantes contrôles. Une analyse du patron d'accumulation des protéines DELLA, qui reflète la concentration en GA, montre que RGA est fortement accumulée autour des primordia foliaires, zones d'émergences des bourgeons axillaires (Zhang et al., 2020).

Au niveau moléculaire, les facteurs de transcription LATERAL SUPPRESSOR (LAS), appartenant à la famille des protéines GRAS, exercent un rôle essentiel pour la formation des bourgeons axillaires en maintenant le potentiel méristématique d'un groupe de cellules souches au niveau de l'aisselle de la feuille. Pour exemple, les mutants las sont pratiquement incapables de former un bourgeon axillaire (Greb et al., 2003). Il a été démontré que les facteurs LAS activatient la transcription du gène GA2ox4, codant pour une 2-ODD impliquée dans l'inactivation des GA, dans la zone autour des primordia foliaires, permettant de réduire localement la concentration en GA bioactives, afin de favoriser l'accumulation des DELLA (Zhang et al., 2020). Par ailleurs, le facteur de transcription SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE 9 (SPL9) réprime spécifiquement l'expression du gène LAS en se fixant directement sur son promoteur (Tian et al., 2014). Il s'avère que les protéines DELLA interagissent avec les SPL, notamment SPL9, en système hétérologue chez la levure, mais également chez Arabidopsis (Yu et al., 2012; Zhang et al., 2020). Une accumulation des protéines DELLA inhibe l'activité transcriptionnelle de SPL9, réduisant ainsi son effet sur l'expression des gènes LAS (Fig. 30). En accord avec ce résultat, la délétion du domaine GRAS de la protéine RGA abolit l'interaction RGA-SPL9. En amont, au niveau transcriptionnel, les gènes SPL sont réprimés par le microARN156 (miR156) et le complexe miR156/SPL fonctionne comme régulateur dans les transitions entre phase végétative et phase reproductive chez Arabidopsis thaliana, ainsi que chez le riz (Wang et al., 2009, 2015; Wu et al., 2009). Ainsi, une inactivation de miR156 provoque une diminution du nombre de bourgeons axillaires (Zhang et al., 2020).

Les gènes *REGULATOR OF AXILLARY MERISTEMS (RAX1, RAX2 et RAX3),* codant pour des protéines MYB R2R3, sont également impliqués dans les premières étapes de l'initiation des bourgeons axillaires (Keller et al., 2006; Müller et al., 2006). *RAX1* est exprimé spécifiquement dans un groupe restreint de cellules autour des primordia foliaires, lieux d'initiation des bourgeons axillaires. La formation de bourgeons axillaires est altérée, sur



Figure 31. Le complexe DELLA-BZR1 contrôle l'expression de *BRC1*, impliqué dans la croissance des bourgeons axillaires chez *Arabidopsis*.

- A. Plantes matures, à gauche le mutant *brc1*, au centre une plante sauvage (WT, écotype Col-0) et à droite le mutant *brc2*. Le nombre de ramifications primaires initiées au niveau de la rosette est plus important chez les mutants *brc1* et *brc2* que chez la plante sauvage. Adapté de Aguilar-Martínez et al., 2007.
- B. Schéma représentant le rôle du complexe DELLA-BZR1 sur l'expression du gène *BRC1* impliqué dans la croissance des bourgeons axillaires. Inspiré de Xia et al., 2021 et Li et al., 2012.

l'ensemble de la tige, chez le mutant *rax1*. RAX1, tout comme les FT LAS, réduit localement la concentration en GA dans l'apex caulinaire (Keller et al., 2006; Müller et al., 2006). En résumé, les FT LAS ou RAX favorisent l'initiation de la formation du bourgeon axillaire tout en assurant une faible concentration en GA bioactives au niveau de l'aisselle des primordia foliaires. Le gène *REVOLUTA (REV)*, codant pour une protéine à Homeobox-Leucine-Zipper, semble aussi réguler l'initiation des bourgeons axillaires (Otsuga et al., 2001).

Après initiation du bourgeon axillaire, celui-ci peut rester en dormance à l'aisselle des primordia foliaires ou se développer en branche secondaire. BRANCHED1 (BRC1) représente un régulateur central qui inhibe le développement des bourgeons axillaires en intégrant le programme génétique intrinsèque de la plante, les différentes voies de signalisations hormonales impliquées ainsi que les facteurs environnementaux (Fig. 31A) (Aguilar-Martínez et al., 2007; Martín-Fontecha et al., 2018; Poza-Carrión et al., 2007). Une forte expression du gène BRANCHED1 (BRC1), qui appartient à la classe II des FT TCP, provoque l'arrêt du développement du bourgeon axillaire. Un complexe protéique incluant le facteur de transcription BRASSINAZOLE-RESISTANT1 (BZR1), un composant de la voie de signalisation des brassinostéroïdes (BR), inhibe l'expression de BRC1 (Xia et al., 2021). Il s'avère que les protéines DELLA interagissent avec BZR1 et une expression ectopique de RGA, sous le contrôle du promoteur BZR1, réduit l'abondance et l'activité de BZR1 (Li et al., 2012). Ainsi, les voies de signalisation des GA et des BR contrôlent la prolifération cellulaire et donc le développement des branches secondaires à l'aide du complexe BZR1-DELLA (Fig. 31B). En plus d'inhiber la prolifération cellulaire dans les branches secondaires, une autre fonction de BRC1 serait de perturber l'organisation des cellules souches dans l'aisselle des primordia foliaires, ce qui affecterait le potentiel méristématique de ces cellules (Aguilar-Martínez et al., 2007).

#### 3.7. Transition florale

Le cycle de la plante est divisé en deux parties, la phase végétative et la phase reproductive. Après la germination de la graine, pendant la phase végétative, le méristème apical caulinaire assure la croissance en hauteur de la plante tout en produisant en permanence des organes latéraux. Par la suite, pendant la phase reproductive, le méristème apical caulinaire et les méristèmes axillaires se mettent à produire des fleurs. Le passage entre les deux phases se réfère à la transition florale. La transition florale est contrôlée par de multiples facteurs



### Figure 32. Rôle de la voie de signalisation des GA sur la transition florale, au niveau du méristème apical caulinaire et des feuilles.

Les flèches noires ou les barres noires avec une tête indiquent un effet positif ou négatif, respectivement, au niveau transcriptionnel ou dans la voie de signalisation. Les flèches vertes ou les barres rouges avec une tête indiquent un effet positif ou négatif, respectivement, au niveau protéique. Les protéines régulatrices de couleur rouge sont des répresseurs de la transition florale alors que celles en bleu sont activatrices. Les gènes de l'identité florale du méristème sont en vert et les pointillés bleus mettent en évidence le transport de FT (FLOWERING LOCUS T) des feuilles vers le méristème apical caulinaire. Adapté de Bao et al., 2020.

extérieurs (température, photopériode, etc...), mais aussi, internes à la plante (parmi lesquels l'âge de la plante, la concentration en gibbérellines, ...) (Fig. 32) (Poethig, 2003).

Les GA ont un rôle pivot dans la transition florale, avec la contribution importante d'un grand nombre d'interconnexions entre diverses phytohormones, et les protéines DELLA participent activement à ce processus développemental. Beaucoup de mutants nuls de la voie de biosynthèse ou de la voie de signalisation des GA présentent des altérations au niveau de la floraison. Pour exemple, en jours courts, le mutant de biosynthèse *ga1-3* est incapable de fleurir sans un traitement exogène avec des GA bioactives. Il peut ainsi passer de la phase végétative à la sénescence, sans avoir produit un seul bourgeon floral (Wilson et al., 1992). Les GA jouent également un rôle crucial dans l'induction florale en jours longs, un triple mutant pour les récepteurs aux GA présente un sévère retard de floraison en comparaison à des plantes contrôles (Fig. 16) (Griffiths et al., 2007).

Une diminution de l'accumulation de miR156, accentuée en fonction de l'âge de la plante, engendre une augmentation de l'expression des gènes *SPL*, comme décrit précédemment. Les gènes SPL vont alors promouvoir la transition florale en activant plusieurs régulateurs tels que miR172, les gènes MADS-box et LEAFY (LFY) (Wang et al., 2009; Wu et al., 2009; Yamaguchi, 2008). Cependant, les DELLA peuvent interagir aux protéines SPL pour inhiber l'activation transcriptionnelle des gènes *MADS-box* et du miR172 et bloquer ainsi, l'induction florale. Aussi, l'âge de la plante et la voie de signalisation des GA, deux éléments régulant la transition florale, sont intégrés au niveau de l'interaction SPL-DELLA. Plus récemment, il a été mis en évidence que les GA pouvaient également favoriser l'expression des *SPL*, pour induire la floraison (Porri et al., 2012).

Les protéines DELLA interagissent également avec d'autres protéines régulatrices (détaillé dans la revue Bao et al., 2020), comme les facteurs de transcription WRKY, qui possèdent un domaine Zinc-Finger, pour moduler la transition florale au niveau du méristème apical caulinaire (Fig. 32). Aussi, une homéostasie relative des GA semble nécessaire pour induire la floraison ; rendue possible par une régulation dynamique de l'expression de certains gènes de la voie de biosynthèse ou par le transport de GA bioactives (Bao et al., 2020).



#### Figure 33. Les familles de protéines à homéodomaine, chez les plantes.

- A. Structure d'un homéodomaine (HD) complexé à l'ADN ; l'homéodomaine est constitué de 60 acides aminés, intégrés à 3 hélices alpha, afin de former cette structure. Adapté de Dror et al., 2014.
- B. Représentation schématique des différentes familles de protéines à homédomaine chez les plantes et de leurs domaines caractéristiques. AD : domaine acide ; DM : motif de dimérisation ; EAR : motif de répression amphiphile ; ELK : motif possédant 3 acides aminés conservés Glu, Leu et Lys ; HD : homéodomaine ; LZ : glissière à leucine ; M1 et M2 : domaine impliqués dans la conformation du domaine d'interaction Meinox ; PHD : homéodomaine des plantes ; V : boîte VSLTLGL ; WD : domaine WUS. Adapté de Ariel et al., 2007.

#### 3.8. Autres aspects développementaux régulés par des interactions FT-DELLA

A ce jour, quelques dizaines de DIP ont été identifiés, néanmoins, ils ne peuvent pas expliquer l'action pléiotropique de la voie de signalisation des GA, tout au long du développement de la plante (Tableau S1, parties 1 et 2). Les mécanismes moléculaires impliqués, dans la mise en place de l'architecture des parties aériennes, demeurent partiellement inconnus. Avec la motivation d'identifier de nouveaux DIP, le laboratoire a réalisé un crible en double-hybride chez la levure, à partir d'ADNc des apices caulinaires disséqués d'*Arabidopsis*, et en utilisant la protéine DELLA-RGA comme proie. Au cours de ce crible, plusieurs DIP ont été identifiés, dont TCP14 impliqué dans la prolifération cellulaire au niveau de la tige, comme décrit précédemment (Davière et al., 2014). La découverte des protéines FER-LIKE IRON DEFICIENCY (FIT) et ses homologues, dont l'interaction avec les protéines DELLA régule l'assimilation du fer par les racines, fût également caractérisée, à l'issue de ce crible (Wild et al., 2016). Lors du crible, le FT ZINC-FINGER HOMEODOMAIN (ZFHD) HB30 a été identifié plusieurs fois et sa fonction biologique reste encore méconnue ; c'est en ce sens un candidat d'intérêt. Point important, aucune étude publiée à ce jour, ne mentionne une interaction HB30-RGA ou, de manière plus générale, une interaction ZFHD-DELLA.

#### 4. Les facteurs de transcription à Zinc-finger Homeodomain (ZFHD)

#### 4.1. Les facteurs de transcription à homéodomaine

Chez les plantes, environ 2000 facteurs de transcription (FT) sont regroupés dans plus de 50 familles en fonction de la nature de leurs domaines de liaison à l'ADN (Bollier et al., 2022; Lehti-Shiu et al., 2017). L'homéodomaine (HD) est le domaine de liaison à l'ADN le plus répandu chez les plantes et les animaux ; chez *Arabidopsis* 5% des FT possèdent un HD (Mukherjee et al., 2009). Il est composé de 60 acides aminés, qui sont intégrés à 3 hélices alpha, formant une structure capable de se lier à l'ADN (Fig. 33A) (Wolberger, 1996). La première protéine à homéodomaine a été découverte chez *Drosophila melanogaster* en 1983, codée par le gène *ANTENNAPEDIA* (Garber et al., 1983). Chez les plantes, le premier gène codant pour une protéine à homéodomaine fût identifié en 1991, il s'agit de *KNOTTED-1* (KN1) chez le maïs (Vollbrecht et al., 1991).

Dans le règne végétal, les gènes à homéodomaine sont classés en 6 familles distinctes en fonction de la taille des gènes, de l'emplacement de la séquence codante pour l'HD au sein du gène, de la structure des gènes, mais surtout, en fonction des autres domaines



#### Figure 34. La famille des facteurs de transcription ZFHD.

- A. Structure d'un domaine Zinc-Finger (ZF) de type C2H2. Le domaine ZF C2H2 se compose de 2 résidus de cystéines (Cys) et de 2 résidus d'histidines (His) qui sont liés à un ion de Zinc (Zn), auquel s'ajoute un feuillet beta antiparallèle (en vert) et une hélice alpha (en rouge). Adapté de Ganss et Jheon., 2004.
- B. Arbre phylogénétique des 14 membres de la famille des facteurs de transcription ZFHD chez Arabidopsis. Chaque gène est positionné au sein de la famille en fonction de sa séquence d'ADN complète. Les tests utilisés pour réaliser cet arbre phylogénétique sont les composants MUSCLE (multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput), Gblock (Alignment curation), PhyML (tree building) et TreeDyn (tree drawing), disponibles sur le site internet Phylogénie.fr. La longueur des branches, conditionnée entre 0 et 1 est fonction du degré d'évolution des membres fils par rapport à leur plus proche ancêtre commun. La statistique en rouge représente le Bootstrap, la parcimonie de la branche. Réalisé par le laboratoire d'accueil, cet arbre phylogénétique corrobore celui réalisé par Hu et al., 2008b.

caractéristiques que renferment ces gènes (Fig. 33B). Ainsi, l'HD peut se combiner à un domaine Leucine Zipper (*HD-Zip*), à un domaine Finger (*PHD*), à une boîte homéotique Wuschel (*WOX*), à une boîte homéotique Knotted (*KNOX*), à un domaine Bell (*BELL*) ou encore à un Zinc-finger (*ZFHD*) (Ariel et al., 2007). Ces domaines additionnels apportent généralement une spécificité d'interaction à l'ADN ou permettent d'établir une interaction protéine-protéine (Bürglin and Affolter, 2016). Chez les animaux, 300 gènes ayant un HD sont regroupés dans 11 familles distinctes (Holland et al., 2007).

Il convient de différencier les gènes à homéodomaine et les gènes homéotiques. Les gènes homéotiques jouent un rôle crucial dans la mise en place du plan d'organisation des différents organes, chez un organisme. Un gène homéotique bien connu est *ANTENNAPEDIA* chez la drosophile, mais le terme de 'gènes homéotiques' s'utilise aussi chez les plantes, avec notamment le modèle ABC, qui régit la structure des fleurs, pour citer un exemple. Ainsi, les gènes homéotiques, bien qu'ils possèdent un homéodomaine, portent ce nom de par la fonction essentielle qu'ils jouent lors du développement de l'organisme. Les gènes ayant un HD ne sont donc pas, pour la grande majorité, des gènes homéotiques.

Les protéines DELLA peuvent interagir avec des FT à homéodomaine. Pour exemple, les DELLA s'associent avec KNAT1, appartenant à la famille des gènes *KNOX*, pour réguler la différenciation des fibres du xylème, un des composants de ce tissu vasculaire (Felipo-Benavent et al., 2018).

#### 4.2. Identification de la famille multigénique ZFHD et généralités

Le crible réalisé par le laboratoire a permis l'identification d'un nouveau DIP, le FT HB30, appartenant à la famille des ZFHD ; famille dans laquelle l'HD est associé à un domaine Zincfinger (ZF). Le domaine ZF est composé d'un atome de zinc en son centre maintenu par des cystéines (C) et/ou des histidines (H) qui sont fixés sur une hélice alpha, ainsi qu'un feuillet bêta (Fig. 34A) (Ganss and Jheon, 2004). Il existe différentes classes de ZF en fonction du type et du nombre d'acides aminés qui maintiennent l'atome de zinc : C2H2, C2C2, C2HC, C2C2C2C2, et C2HCC2C2 (Ciftci-Yilmaz and Mittler, 2008; Takatsuji, 1998). Le domaine ZF se trouve très souvent associé à un domaine de liaison à l'ADN, par exemple un HD, permettant aux FT de se lier à l'ADN, à l'ARN ou d'établir des interactions protéine-protéine. Les FT possédant un ZF, ainsi qu'un domaine de liaison à l'ADN sont, pour la plupart, impliqués dans d'importants processus biologiques tels que le développement des fleurs, la morphogénèse lumière-dépendante et la réponse aux pathogènes (Gamsjaeger et al., 2007; Takatsuji, 1998).

Les FT appartenant à la famille des ZFHD sont donc composés d'un ZF, ainsi que d'un HD, conférant sa capacité de liaison à l'ADN. Au niveau phylogénétique, les ZFHD se rencontrent chez toutes les plantes terrestres, ou embryophytes, incluant les angiospermes, les gymnospermes, les ptéridophytes et les bryophytes. Les premiers ZFHD décrits dans la littérature ont été identifiés au nombre de 4 chez Flaveria trinervia, en 2001 (Windhövel et al., 2001). Cependant, aucun ZFHD n'a été identifié, par homologie de séquence, chez les animaux, les champignons, les levures, les algues vertes ou les procaryotes (Hu et al., 2008b). Fait intéressant, les ZFHD sont souvent évoqués comme étant plante-spécifiques, néanmoins, plusieurs études soulignent le fait que le génome humain possèderait 14 gènes ayant à la fois des domaines HD et ZF, regroupés dans 5 familles distinctes. Cependant, les séquences de ces gènes sont très différentes, de celles des ZFHD identifiés chez les plantes, car ces domaines ZF et HD fréquemment répétés en tandem (Bürglin and Affolter, 2016; Holland et al., 2007). Chez les plantes, il existe également des gènes MINI ZINC FINGER (MIF) codant pour des protéines qui partagent une séguence similaire avec le domaine ZF des ZFHD, toutefois, dépourvus d'HD. Un grand nombre de ZFHD possèdent deux motifs conservés entre les domaines ZF et HD, il s'agit des motifs LALP et EDST ; leur fonction demeure inconnue à ce jour (Hu et al., 2008b). Dans le règne végétal, la présence ou l'absence de ces deux motifs a permis d'affiner la résolution des analyses phylogénétiques, pour finalement diviser les ZFHD en 7 classes distinctes (récemment détaillé par Bollier et al., 2022; découvert par Hu et al., 2008b).

Le nombre de gènes *ZFHD* et *MIF* identifiés varie énormément selon les espèces, 13 gènes pour le blé (Abu-Romman, 2014), 15 gènes pour le riz (Xu et al., 2014) et jusqu'à 54 gènes *ZFHD* chez le soja (Park et al., 2007). Le génome d'*Arabidopsis thaliana* code pour 14 *ZFHD*, ainsi que 3 *MIF*. Une étude phylogénétique conduite au laboratoire, en comparant les séquences en acides aminés des ZFHD, a permis d'établir un arbre phylogénétique pour cette famille ; il corrobore celui établi par Hu et al., 2008b (Fig. 34B). Deux nomenclatures sont couramment utilisées pour décrire cette famille multigénique de 14 membres, les termes *ZHD* 1 à 14 ou *HB* 21 à 34 sont employés. Pour simplifier la compréhension de notre étude, seul la nomenclature *HB21* à *HB34* sera employée. Trois paires de *ZFHD* possèdent des séquences de taille similaire entre les domaines ZF et HD pouvant être expliquées par une duplication du génome : *HB31-HB21*, *HB28-HB24* et *HB34-HB23* (Hu et al., 2008b; Vision et al., 2000). Le

ATHB21	ATHB22	ATHB23	ATHB24	ATHB25	ATHB26	ATHB27	ATHB28	ATHB29	ATHB30	ATHB31	ATHB32	ATHB33	ATHB34	AD
--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	----

ATHB21	-	+++	+-	-	+++	_	_	-	+	-	_	_	+-	_	_
ATHB22	++++	++++	++++	++++	+++	_	_	++++	++++	++++	+++	_	++++	++	_
ATHB23	++	++++	++	+++	++++	-	-	++	+	++	+++	-	+++	+-	-
ATHB24	-	+++	++	-	++++	-	-	-	+ + +	-	+-	-	-	-	-
ATHB25	++	+++	++++	++++	+	-	+-	+++	+++	+++	+++	-	+++	+	-
ATHB26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ATHB27	-	-	+-	-	+-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
ATHB28	-	++++	+	-	+++	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-
ATHB29	+++	+++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	++	+++	++++	+++	++++	+++	++
ATHB30	-	+++	++	+-	+++	-	-	+-	+++	+-	+	-	+	-	-
ATHB31	+-	+++	+	+-	++++	-	-	++	+++	+	+	-	++	-	-
ATHB32	-	-	-	-	+-	-	-	-	+-	-	-	-	-	-	-
ATHB33	+-	++++	++++	-	++++	-	-	++	++++	++	+++	-	+-	-	-
ATHB34	-	++++	++	+-	++++	-	-	+	+++	+-	+-	-	++	-	-
BD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

#### Figure 35. Analyse de la dimérisation des ZFHD.

Analyse de la dimérisation des ZFHD (hétérodimère et homodimère) en double-hybride chez la levure. La force d'interaction est symbolisée de cette façon : ++++ (très forte), +++ (forte), ++ (modérée), + (faible) et +- (très faible). AD : GAL4AD ; BD : GAL4BD. Adapté de Tan and Irish et al., 2006.

gène *HB26* ne figure pas dans les bases de données transcriptomiques publiques, il s'agit probablement d'un pseudo-gène (Tan and Irish, 2006). Les 14 gènes *ZFHD* ne possèdent pas d'intron et codent pour des protéines ayant un domaine ZF de type C5H3 au niveau de l'extrémité N-terminale, et un HD dans l'extrémité C-terminale (Fig. 38A). Les gènes *ZFHD* sont assez petits, leurs séquences codantes s'étendent entre 700 et 1000 paires de base.

Concernant la sous-famille des gènes *MIF*, ils dérivent probablement d'un gène *ZFHD* dont la séquence codante pour l'HD a subi une délétion au cours de l'évolution. En effet, les gènes *MIF*, apparus plus tardivement que les *ZFHD*, sont retrouvés uniquement chez les angiospermes et les gymnospermes (Bollier et al., 2022; Hu et al., 2008b).

#### 4.3. Dimérisation fonctionnelle et élément cis reconnu par les ZFHD

L'activité des FT à HD se régit par la formation d'hétérodimères afin de modifier la sélectivité de la liaison à l'ADN, et ainsi, d'activer la transcription d'autres gènes cibles. Pour exemple, les protéines Aristaless-like4 (Alx4) et Goosecoid sont susceptibles de former des homodimères, ainsi que des hétérodimères ; et chaque type de dimère, capable de reconnaître une séquence d'ADN spécifique. Aussi, alors qu'un homodimère Alx4 active la transcription, l'hétérodimère Alx4/Goosecoid réprime la transcription (Tucker and Wisdom, 1999). L'hétérodimérisation assure donc une double fonction, contrôler la sélectivité de la liaison à l'ADN tout en activant ou inhibant la transcription de gènes cibles.

De même, les ZFHD, aptes à former des homodimères comme des hétérodimères, interagissent entre eux via leur domaine ZF (Windhövel et al., 2001). Les ZFHD dépourvus de leur HD sont toujours capable de dimériser, l'HD aurait ainsi un rôle secondaire dans la dimérisation des ZFHD. L'HD pourrait notamment jouer sur l'affinité des ZFHD qui vont hétérodimériser, assurer la stabilité du dimère ou encore interagir avec d'autres co-facteurs (Tan and Irish, 2006). Une analyse en double-hybride chez la levure révèle que les forces d'interactions ne sont pas identiques en fonction des dimères. Globalement, la force d'interaction protéine-protéine augmente pour les hétérodimères par rapport aux homodimères (Fig. 35). L'affinité entre les ZFHD lors de la formation d'hétérodimères pourrait être un mécanisme de régulation de l'activité transcriptionnelle, si plusieurs ZFHD partagent des patrons d'accumulation identiques ; ce point est abordé dans la partie suivante. Faits intéressants, HB29 hétérodimérise avec l'ensemble des ZFHD, alors que HB26 reste incapable d'hétérodimériser avec un seul des 13 membres, ni même de former un



Figure 36. Le facteur de transcription HB33 (ZFHD) se lie spécifiquement au consensus ATTA.

- A. Séquences nucléotidiques utilisées pour réaliser les expériences de retard sur gel (EMSA). BM1 à 4 : versions mutées de la séquence B, la mutation est soulignée sur chacune des séquences. Le consensus ATTA apparait en orange.
- B. Expérience de retard sur gel en utilisant les sondes A et B radiomarquées. L'apparition d'un retard spécifique est symbolisé par une marque rouge. HB33 interagit spécifiquement avec la séquence B.
- C. Expérience de retard sur gel en utilisant les versions mutées des séquences. HB33 interagit spécifiquement avec les séquences BM1 et B, mais pas avec BM2, BM3 et BM4. L'apparition d'un retard spécifique est symbolisé par une marque rouge. Les termes « luc » (oligonucléotide radiomarqué + protéine luciférase de contrôle ajoutée au lysat), « lysat » (oligonucléotide radiomarqué + lysat seul sans ajout de protéines) et « sonde » (oligonucléotide radiomarqué + eau) désignent les différentes conditions contrôles.

Adapté de Tan and Irish et al., 2006.

homodimère, confortant l'idée qu'il s'agisse probablement d'un pseudo-gène (Tan and Irish, 2006). Les MINI ZINC FINGER (MIF) ne possèdent pas d'HD, mais ont un domaine ZF pouvant dimériser avec les ZFHD. Il a été démontré que MIF1 et ses homologues interagissent physiquement avec HB33 (Seo et al., 2011).

Une grande majorité des FT possédant un HD interagissent à l'ADN via des élément *cis* contenant le motif NNATTA (Gehring et al., 1994). Des expériences de retard sur gel démontrent que HB33 se lie à l'ADN via le motif ATTA (Fig. 36) (Tan and Irish, 2006). Une autre étude, chez le soja, révèle que le FT GmZF-HD1 s'associe spécifiquement à la séquence AGTA<u>ATTA</u>AANNNNA<u>ATTA</u> du gène *GmCaM4*, qui contient deux motifs ATTA (Park et al., 2007). Chez *Arabidopsis*, HB25 reconnait spécifiquement un élément *cis* de 14 paires de base, du gène *EARLY RESPONSE TO DEHYDRATATION STRESS 1 (ERD1)*, dans laquelle se trouve la séquence AA<u>ATTG</u>, suggérant que le dernier nucléotide du motif ATTA n'est pas indispensable pour une liaison ZFHD-ADN (Tran et al., 2006). Dans l'ensemble de ces études, les ZFHD perdent la capacité de reconnaître l'élément *cis* du promoteur des gènes cibles, suite à une mutation dans le motif ATTA (Fig. 36C).

#### 4.4. Fonctions biologiques des ZFHD

#### 4.4.1. Patrons d'expression des ZFHD

Concernant les *MIF*, *MIF1* et *MIF3* sont fortement exprimés dans les racines et la tige et plus faiblement exprimés dans les feuilles et les fleurs. *MIF2* est fortement exprimé dans la tige, les fleurs et les siliques, inversement, absent dans les racines, les feuilles ou les plantules (Fig. 37) (Hu and Ma, 2006). Le simple mutant hypomorphe *mif1* ne présente aucune altération phénotypique suggérant une redondance fonctionnelle entre MIF1 et MIF3. Cependant, une surexpression de *MIF1* conduit à un phénotype de nanisme avec une dominance apicale réduite, une rosette plus compacte et des feuilles de couleur vert foncé. Aussi, les plantes qui surexpriment *MIF1* ont un retard de 3 mois sur la floraison, en comparaison à des plantes contrôles, et elles sont stériles. Les défauts phénotypiques observés chez les plantes qui surexpriment *MIF1* sont très certainement liés à des altérations dans les voies de réponses hormonales et peuvent en partie être expliqués par une inhibition de la division et de l'élongation cellulaire (Hu and Ma, 2006). Une seconde étude indique qu'une surexpression des gènes *MIF1* ou *MIF3* induit la formation de méristèmes caulinaires sur la marge foliaire et les GA modulent ce processus, puisqu'un ajout exogène de GA inhibe l'apparition de ces méristèmes (Hu et al., 2011). Les résultats d'une récente étude viennent étayer ces

#### Introduction



**Figure 37. Profils d'expression des gènes** *MINI ZINC FINGER (MIF)* chez *Arabidopsis.* Analyse RT-PCR des gènes *MIF1, MIF2* et *MIF3* dans différents organes ou à différents stades de développement. *APT1* est utilisé en tant que contrôle et le nombre de cycles réalisés pour chacune des réactions PCR est indiqué à droite de l'image. Adapté de Hu and Ma., 2006.



#### Figure 38. Profils d'expression des gènes ZFHD chez Arabidopsis.

- A. Représentation schématique de la longueur des protéines ZFHD, ainsi que de la position du domaine Zinc-Finger (ZF) et de l'homéodomaine (HD).
- B. Patrons d'expression des 14 ZFHD chez Arabidopsis obtenus par analyse RT-PCR. APT1 est utilisé en tant que contrôle et toutes les PCR ont été réalisées avec 28 cycles, hormis HB26 pour lequel la PCR a été réalisée avec 38 cycles.

Adapté de Hu et al., 2008b.

observations, MIF2 est engagé dans la régulation de la résiliation du méristème floral (Bollier et al., 2018). Les MIF pourraient ainsi favoriser la formation des méristèmes en jouant sur l'homéostasie ou la voie de signalisation des phytohormones. Il a été démontré que les MIF interfèrent dans la régulation de plusieurs réponses hormonales, cependant à un niveau autre que transcriptionnel ; un des mécanismes susceptible d'expliquer la fonction des MIF repose sur leur capacité à dimériser avec les ZFHD (Hu and Ma, 2006; Hu et al., 2011). D'après une récente étude, les MIF se lient également à l'ADN pour activer la transcription de gènes cibles, malgré l'absence d'HD (Han et al., 2017).

Les premiers ZFHD, identifiés au nombre de 4 chez Flaveria, sont exprimés essentiellement au niveau des parties aériennes, alors qu'ils sont indétectables dans les racines (Windhövel et al., 2001). Chez Arabidopsis, 13 ZFHD sont principalement exprimés dans les inflorescences ; le gène HB26 n'étant pas exprimés, puisqu'il s'agit d'un pseudogène. HB28 et HB33 semblent exclusifs des inflorescences, les autres ZFHD sont également exprimés dans d'autres tissus, toutefois, à des niveaux plus faibles, comme dans les racines, les feuilles de rosette ou la tige (Fig. 38) (Tan and Irish, 2006). Une autre étude montre que 8 ZFHD sont fortement exprimés dans les inflorescences et une majorité d'entre eux, dans les jeunes plantules ; suggérant qu'ils sont exprimés à la fois dans le méristème apical caulinaire à l'état végétatif et inflorescentiel. HB25, HB21, HB31, HB33 et HB28 étant les gènes les plus fortement exprimés dans les apices caulinaires (Hu et al., 2008b). Les données transcriptomiques publiques viennent appuyer les profils d'expression observés à travers ces différentes études. Aussi, l'interaction HB30-DELLA avait été identifié par le laboratoire dans les inflorescences, soutenant l'idée que les ZFHD sont essentiellement exprimés dans les apices caulinaires, ce qui suggère une probable redondance fonctionnelle chez cette famille multigénique. Pour exemple, HB23, HB30 et HB34 sont très proches au niveau phylogénétique et comportent des profils d'expression similaires. Une approche génétique vient étayer cette hypothèse, des simples mutants nuls pour les gènes HB22, HB23, HB25, HB29, HB31 HB32 et HB34 ne présentent aucune altération morphologique ou développementale (Tan and Irish, 2006).

#### 4.4.2. Rôle des ZFHD dans le développement des plantes

Comme énoncé précédemment, les simples mutants *zfhd* ou *mif* ne présentent peu ou pas d'altérations phénotypiques. A ce jour, la majorité des quelques études réalisées pour déterminer les fonctions biologiques des ZFHD reposent sur des lignées qui surexpriment des



#### Figure 39. Rôle du dimère HB33-MIF1 dans le développement d'Arabidopsis.

- A. Plantes âgées de 5 semaines, à gauche une plante sauvage (écotype Col-0), puis une plante qui surexprime *MIF1*, une plante qui surexprime *HB33* et tout à droite une plante obtenue par croisement des deux lignées surexpresseurs *MIF1* et *HB33*. Dans les lignées surexpresseurs, *MIF1* et *HB33* sont 200 fois et 60 fois plus exprimés que chez une plante sauvage, respectivement.
- B. Schéma représentant le double rôle de MIF1. Au niveau cytoplasmique, MIF1 peut inhiber la localisation nucléaire de HB33 en formant un hétérodimère. Au niveau nucléaire, l'hétérodimère MIF1-HB33 présente une capacité de liaison à l'ADN plus faible qu'un homodimère HB33 ; perturbant ainsi l'activité transcriptionnelle de HB33. Adapté de Hong et al., 2011.

*ZFHD*. Un point important est soulevé par Bollier et al., 2022, une expression ectopique d'un *ZFHD* et sa forte accumulation peuvent notamment perturber l'affinité que les ZFHD pourraient avoir, en condition normale, naturelle ou physiologique, lors de la formation de dimères avec des cofacteurs. Ainsi, les phénotypes observés chez des lignées qui surexpriment un *ZFHD* sont des pistes de recherche pour définir les fonctions biologiques précises des interactions ZFHD-DELLA pour le développement des plantes.

Une surexpression de *HB33* entraine une croissance accélérée notamment au niveau des feuilles, alors plus larges et composées de cellules plus grandes (Seo et al., 2011) ; l'architecture florale de ces plantes est aussi altérée (Fig. 39A) (Hong et al., 2011). Une étude plus récente démontre qu'une surexpression de *HB33* favorise la régénération des parties aériennes en promouvant la réponse des cytokinines (Kim et al., 2019). Des expériences de retard sur gel démontrent que MIF1 bloque la capacité de liaison à l'ADN de l'homodimère HB33, par compétition en formant des hétérodimères MIF1-HB33. Les MIF peuvent également moduler le transport nucléo-cytoplasmique des ZFHD ; MIF1 empêchant l'accumulation de HB33 dans les noyaux (Hong et al., 2011). Le phénotype des plantes qui surexpriment *HB33* est restauré quand MIF1 est co-exprimé, de manière constitutive, suggérant que MIF1 régule négativement HB33 (Fig. 39A) (Hong et al., 2011). Ainsi, les MIF interagissent probablement avec l'ensemble des ZFHD pour moduler l'import nucléaire des ZFHD et inhiber leur liaison à l'ADN (Fig. 39B) (Hong et al., 2011; Seo et al., 2011).

Les ZFHD semblent impliqués au niveau transcriptionnel dans la régulation des gènes de la voie de la biosynthèse des GA (Bueso et al., 2014). La surexpression de *HB25* entraine une surexpression du gène *GA3ox2*, codant pour une enzyme impliquée dans les dernières étapes de biosynthèse des GA, ce qui conduit à une plus forte accumulation en GA bioactives. Les plantules qui surexpriment *HB25* ont un hypocotyle plus long (Fig. 40) ; de même, les graines produites par ces plantes sont plus grosses. Au niveau des inflorescences, les cellules du style ont une taille plus grande chez les plantes qui surexpriment *HB25*, permettant de réduire l'expression de *HB25*, entraine une réduction de l'expression de *GA3ox2*, qui conduit à une réduction de l'hypocotyle en comparaison avec des plantes contrôles (Fig. 40) (Bueso et al., 2014).

Une autre étude démontre l'implication des ZFHD dans l'élongation de l'hypocotyle. Le facteur de transcription TANDEM ZINC-FINGER PLUS3 (TZP), intégrateur de la lumière et de la signalisation de la photopériode, joue un rôle important dans la croissance chez *Arabidopsis* 



Figure 40. Rôle de HB25 sur l'élongation de l'hypocotyle chez Arabidopsis.

- A. Plantules âgées de 7 jours (croissance en jour long). Les deux premières plantules à gauche sont des lignées surexpresseurs HB25 (atbh25-1D et pUBQ10:ATHB25), puis une plante sauvage (WT, écotype Col-0) et tout à droite un mutant antisens HB25.
- B. Longueur de l'hypocotyle (en mm) chez des plantules âgées de 7 jours pour les différentes lignées décrites dans la partie A de cette figure. Les hypocotyles de 10 plantules ont été mesurés, pour chacune des lignées.

Adapté de Bueso et al., 2014.

(détaillé dans Perrella et al., 2018). Ce FT possède 2 domaines ZF et est capable de dimériser avec HB23 (Perrella et al., 2018). Dans les plantules, les gènes *TZP* et *HB23* sont fortement exprimés, notamment à l'apex de l'hypocotyle. Les mutants simples *tzp* ou *hb23* présentent un hypocotyle plus court que celui des plantes contrôles. A l'inverse, les lignées qui surexpriment *TZP* ou *HB23* ont des hypocotyles allongés (Perrella et al., 2018). Le complexe HB23-TZP permet ainsi, de réguler l'expression de gènes impliqués dans l'élongation de l'hypocotyle, dans un contexte lumière-dépendant (Fig. 41).

L'expression des *ZFHD* semble être sous le contrôle des facteurs environnementaux. En fonction des espèces et du type de stress (stress hydrique, stress salin ou un stress lié à la température), l'expression des *ZFHD* peut être réprimée ou favorisée (détaillé récemment dans la revue Bollier et al., 2022). Pour exemple, l'expression du gène *HB29* est induite en réponse à un stress hydrique ou une forte salinité. HB29 interagit alors avec un cofacteur NAC pour induire l'expression du gène *EARLY RESPONSE TO DEHYDRATATION STRESS 1* (*ERD1*) ; ERD1 étant connu pour favoriser l'adaptation des plantes à un stress hydrique. Les plantes qui surexpriment *HB29* résistent mieux au stress hydrique (Tran et al., 2006). Lors d'un stress hydrique, le gène *HB33* est quant à lui réprimé, entrainant une répression de la croissance racinaire et une inhibition de la germination (Okushima et al., 2005). Une seconde étude exergue l'implication de HB33 dans la tolérance au stress hydrique (Fig. 41) (Wang et al., 2011). D'après une étude chez l'amarante, l'expression du gène *MIF1* est favorisée en réponse à un stress hydrique (Huerta-Ocampo et al., 2011).

Récemment, une analyse souligne que les gènes *ZFHD* et *MIF* sont régulés par une multitude de FT impliqués dans le développement des inflorescences ; suggérant qu'ils sont eux-mêmes impliqués dans ce processus développemental (Bollier et al., 2022).

L'ensemble des études réalisées à ce jour, sur les facteurs de transcription ZFHD (Fig. 41), mettent en évidence que les ZFHD peuvent interagir entre eux, avec les MIF ou encore avec des cofacteurs possédant un domaine ZF, dans le but de réguler l'expression d'un grand nombre de gènes cibles. La diversité des protéines pouvant interagir avec les ZFHD, leur disponibilité, et l'affinité lors de la formation de dimères, sont autant de points qui peuvent expliquer l'action pléiotropique des ZFHD, dans la régulation de divers processus, tout au long du développement et plus spécifiquement dans les parties aériennes.



# Figure 41. Fonctions biologiques des ZFHD dans le développement, la croissance et la réponse au stress hydrique chez *Arabidopsis*.

MIF : MINI ZINC FINGER ; ARF2 : Auxin-Response Factor 2 ; ERD1 : EARLY RESPONSE TO DEHYDRATATION STRESS 1. Les facteurs de transcription ZFHD sont indiqués par la couleur rouge. Adapté de Bollier et al., 2022.

#### 5. Objectifs de la thèse

La caractérisation de plusieurs dizaines de DIP a mis évidence que la voie de signalisation des GA contrôle divers processus développementaux tout au long de la croissance de la plante. Cependant, si les GA exercent un rôle important dans la mise en place de l'architecture des parties aériennes des plantes, les mécanismes moléculaires mis en jeu demeurent méconnus. Afin d'identifier de nouveaux DIP impliqués dans la forme des plantes, le laboratoire a réalisé un crible en double hybride chez la levure en utilisant pour proie la protéine DELLA RGA, et a identifié le facteur de transcription HB30. Ce facteur appartient à la famille des ZINC-FINGER HOMEODOMAIN (ZFHD), une classe de facteurs de transcription très peu étudiée jusqu'à présent, mais qui semble être impliquée dans diverses processus développementaux tels que l'élongation de l'hypocotyle, l'architecture florale ou encore le développement des parties aériennes (Bueso et al., 2014; Hong et al., 2011; Kim et al., 2019; Seo et al., 2011). Malgré une forte expression dans presque tous les organes de la plante, la fonction de HB30 n'est pas décrite dans la littérature. C'est dans ce contexte que nous avons souhaité étudier le rôle de l'interaction HB30-RGA (et ZFHD-DELLA en général) au cours du développement de la plante, avec un regard particulier sur le développement des parties aériennes.

Etant donné que les ZFHD exercent vraisemblablement des activités redondantes, une analyse combinatoire a été conduite en amont, basée sur la littérature, les données transcriptomiques publiques et des résultats préliminaires ; le but étant de sélectionner les candidats ZFHD les plus pertinents pour entreprendre une approche génétique. Puis dans un deuxième temps, nous avons réalisé une analyse fonctionnelle des ZFHD, afin de définir le rôle de l'interaction ZFHD-DELLA sur le développement de la plante.

Mes travaux de thèse sont subdivisés en 5 grandes parties :

- 1. Caractérisation de l'interaction entre les DELLA et les ZFHD
- 2. Effet des DELLA sur l'activité transcriptionnelle des ZFHD
- 3. Analyse de l'expression des ZFHD
- 4. Etude morphologique des mutants *zfhd* chez *Arabidopsis thaliana*
- 5. Rôle des interactions DELLA-ZFHD sur le développement des plantes

# **Résultats**



# Figure 42. HB30 interagit avec les protéines DELLA GAI, RGA, RGL1, RGL2 et RGL3 en système hétérologue chez la levure.

Résultats d'interactions en double-hybride chez la levure. Le FT HB30 est testé par paires avec les 5 protéines DELLA d'*Arabidopsis* : GAI, RGA, RGL1, RGL2 ou RGL3. Les levures transformées sont cultivées sur milieu contrôle sans leucine et tryptophane (SD-LW) et sur milieu sélectif sans leucine, tryptophane, adénine et histidine (SD-LWAH). Une croissance sur milieu sélectif témoigne d'une interaction entre les deux protéines. Les vecteurs vides pGBKT7 et pGADT7 ont été inclus comme contrôle négatif. Les photos des levures ont été prises après 5 jours de culture à 30°C. AD : domaine activateur ; BD : domaine de liaison à l'ADN.



# Figure 43. Interactions entre les FT ZFHD et les protéines DELLA GAI et RGA en système hétérologue, chez la levure.

Résultats d'interactions en double-hybride chez la levure. Les 14 facteurs de transcription de HB21 à HB34 sont testés par paires avec les deux protéines DELLA : GAI et RGA. Seules les paires ZFHD-DELLA pour lesquelles une interaction a été observée sur milieu sélectif sont représentées dans cette figure. Les levures transformées sont cultivées sur milieu contrôle sans leucine et tryptophane (SD-LW) et sur milieu sélectif sans leucine, tryptophane, adénine et histidine (SD-LWAH). Les vecteurs vides pGBKT7 et pGADT7 ont été inclus comme contrôle négatif. Les photos des levures ont été prises après 5 jours de culture à 30°C. AD : domaine activateur ; BD : domaine de liaison à l'ADN.

# Chapitre 1 : Caractérisation de l'interaction entre les protéines DELLA et les facteurs de transcription ZFHD

#### 1. Introduction du chapitre 1

Dans le but d'identifier de nouveaux facteurs interagissant aux DELLA (DIP), impliqués dans le développement des parties aériennes des plantes, le laboratoire a réalisé un crible en double hybride chez la levure, en utilisant la protéine RGA comme proie. Le crible a été réalisé sur une collection d'ADNc issus d'apices caulinaires disséqués d'*Arabidopsis.* Ce crible a permis d'isoler plusieurs DIP, dont les TCP (Davière et al., 2014) et HB30 (identifié 3 fois). Le FT HB30 pourrait ainsi être un nouveau DIP impliqué dans le développement des inflorescences, ou des parties aériennes, chez *Arabidopsis.* La caractérisation précise de l'interaction HB30-RGA, et plus généralement des interactions ZFHD-DELLA, est une première étape indispensable pour que nous puissions étudier par la suite l'implication de la voie de signalisation des GA, dans ces processus développementaux.

Point important, HB30 fait partie de la famille des Zinc-Finger Homeodomain (ZFHD), une famille qui est composée de 14 membres (Fig. 34B) (HB21 à HB34). Aussi, la protéine DELLA RGA utilisée en tant que proie, appartient à une famille de 5 membres (GAI, RGA, RGL1, RGL2 et RGL3). Il est donc important de déterminer les différents membres, chez ces deux familles, pouvant être impliqués dans des interactions ZFHD-DELLA. En parallèle, pour appréhender le rôle des interactions ZFHD-DELLA sur le développement des plantes, l'interaction ZFHD-DELLA doit être confirmée *in planta*.

Ensuite, une cartographie fine pour chacun des partenaires a été réalisée, pour identifier les domaines impliqués dans les interactions ZFHD-DELLA. Il s'agit d'un préalable indispensable, afin de définir l'effet présumable des DELLA, sur l'activité transcriptionnelle des ZFHD.

Enfin, l'homodimérisation et l'hétérodimérisation sont des éléments importants chez certains facteurs de transcription, leviers de modulation de leur activité transcriptionnelle. Bien que la dimérisation des ZFHD soit déjà caractérisée, en système hétérologue chez la levure (Fig. 35) (Tan and Irish, 2006), l'analyse de ce mécanisme *in planta* reste préférable. Pour finir, j'ai étudié l'impact des protéines DELLA sur la dimérisation des ZFHD.



Figure 44. Extraction protéique des levures co-transformées et analyse par Western Blot de l'accumulation des ZFHD.

L'accumulation des ZFHD (fusionnés au tag HA pour le plasmide pGADT7) et des protéines DELLA (fusionnées au tag MYC pour le plasmide pGBKT7) est observée par analyse Western Blot, après extraction des protéines totales des levures co-transformées, utilisées dans le cadre des analyses en double-hybride (Figure S1). La flèche orange indique la présence d'une bande spécifique à la protéine d'intérêt recherchée. C : contrôle négatif. Poids moléculaires attendus (tag HA de 1,1 kDa inclus) : HB21 : 36 kDa ; HB26 : 26 kDa ; HB27 : 29 kDa ; HB30 : 30 kDa.



### Figure 45. Arbre phylogénétique des 14 membres de la famille des facteurs de transcription ZFHD chez *Arabidopsis*.

Les ZFHD interagissant avec les protéines DELLA GAI et RGA, en système hétérologue chez la levure, sont entourés en rouge. Chaque gène est positionné au sein de la famille en fonction de sa séquence d'ADN complète. Les tests utilisés pour réaliser cet arbre phylogénétique sont les composants MUSCLE (multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput), Gblock (Alignment curation), PhyML (tree building) et TreeDyn (tree drawing), disponibles sur le site internet Phylogénie.fr. La longueur des branches, conditionnée entre 0 et 1 est fonction du degré d'évolution des membres fils par rapport à leur plus proche ancêtre commun. La statistique en rouge représente le Bootstrap, la parcimonie de la branche. Réalisé par le laboratoire d'accueil, cet arbre phylogénétique corrobore celui réalisé par Hu et al., 2008b.
#### 2. Interactions ZFHD-DELLA en système hétérologue chez la levure

Avant le début de ma thèse, le laboratoire avait initié des expériences en double-hybride chez la levure pour tester l'interaction entre HB30 et les 5 protéines DELLA d'*Arabidopsis*. Pour contourner de possibles auto-activations des DELLA en système hétérologue chez la levure (de Lucas et al., 2008), des versions tronquées des gènes codant pour les DELLA, délétées de leur domaine N-terminal (Fig. 18), ont été utilisées pour toutes les expériences en double-hybride (versions appelées M5GAI, M5RGA, M5RGL1, M5RGL2 et M5RGL3). Le gène codant pour HB30 a été cloné puis intégré par recombinaison dans le plasmide pGADT7, et les séquences codantes pour les DELLA tronquées ont été intégrées dans le plasmide pGBKT7. Après co-transformation des levures avec les deux vecteurs (comprenant un ZFHD et une DELLA), les levures ont été cultivées sur le milieu sélectif (SD-LWAH), afin d'identifier les éventuelles interactions ZFHD-DELLA. Cette étude a révélé que toutes les levures co-transformées avec HB30 et chacune des 5 DELLA se développaient sur milieu sélectif, indiquant que HB30 est capable d'interagir avec les 5 protéines DELLA d'*Arabidopsis* (Fig. 42).

Pour compléter cette analyse, j'ai ensuite testé les interactions entre les 14 membres de la famille des ZFHD et les protéines DELLA GAI et RGA, qui exercent un rôle crucial pour la croissance de la plante tout au long de son développement (Dill and Sun, 2001; King et al., 2001). J'ai entrepris le clonage de l'ensemble des constructions et différentes combinaisons ont été testées. Cette analyse a révélé qu'en plus de HB30, GAI et RGA étaient capables d'interagir avec HB21, HB26, HB27, HB28, HB32 et HB34. Il est important de noter, que pour certaines combinaisons, l'interaction semble être plus forte avec GAI qu'avec RGA (Fig. 43). Pour toutes les autres combinaisons, aucune interaction n'a été observée sur milieu sélectif.

Dans le but de valider les interactions ZFHD-DELLA observées, il est important de vérifier le niveau d'accumulation de chaque protéine dans les levures co-transformées. Les protéines ZFHD et DELLA étant respectivement fusionnées à une étiquette HA ou MYC (étiquettes présentes dans les plasmides pGADT7 et pGBKT7, respectivement), nous avons vérifié le niveau d'accumulation de chaque protéine par Western Blot (WB). De manière générale, nous avons observé une étroite corrélation entre le niveau d'accumulation des protéines ZFHD en levures et la force d'interaction entre ces facteurs et les protéines DELLA. Par exemple, HB26, HB27 et HB30, qui sont fortement accumulées en levures ; interagissent fortement avec GAI et RGA (Fig. 44 et Fig. S1). Fait notable, une corrélation s'établie entre l'absence d'accumulation des protéines ZFHD dans les levures co-transformées, pour lesquelles aucune

### Résultats





Figure 46. HB30 interagit avec la protéine DELLA RGA *in planta*, en système transitoire.

- A. Les protéines HB30-RFP et GFP-RGA ont été exprimées de manière transitoire, 48 heures avant l'expérience, chez *Nicotiana benthamiana*. L'utilisation de la technique FRET-FLIM a permis de mesurer le temps de demi-vie de la GFP (en ns) dans minimum 50 noyaux pour chaque condition (n>50). Le FRET entre deux conditions est exprimé en pourcentage ; un FRET>7% témoigne d'une interaction protéine-protéine. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis, p < 0,05.</p>
- B. Immuno-détection des protéines HB30-RFP (anticorps anti-RFP) et GFP-RGA (anticorps anti-GFP), par Western Blot, dans les extraits totaux protéiques issus des plants de *Nicotiana benthamiana* utilisée pour l'expérience de FRET-FLIM (Fig. 46A). La quantité totale de protéines déposées dans chaque puits est mis en évidence par une coloration au bleu de Coomassie.

interaction ZFHD-DELLA n'a été observée par double hybride. Ces problèmes d'accumulation rencontrés pour certains ZFHD sont vraisemblablement associés au niveau d'expression du plasmide dans les levures co-transformées, qui peut être trop faible, ou au contraire trop fort, et pourrait conduire à une forme de toxicité pour les levures. En conclusion, les protéines DELLA interagissent avec tous les ZFHD qui montrent une expression en levure. Même si nous n'avons pas pu le confirmer, il est fort probable que les DELLA interagissent avec l'ensemble des membres de la famille des ZFHD. En effet, en se basant sur l'analyse phylogénétique des ZFHD réalisé (Fig. 45), nous pouvons observer que les DELLA sont capables d'interagir en levure avec des ZFHD appartenant à différents embranchements. De manière similaire, il serait surprenant que les protéines GAI et RGA puissent interagir avec HB30 et HB34, mais pas avec HB23, qui partage une séquence nucléotidique très proche et qui appartient au même embranchement (Fig. 43).

#### 3. Interactions ZFHD-DELLA in planta en expression transitoire

Pour confirmer les interactions ZFHD-DELLA in planta, nous avons réalisé des expériences de FRET-FLIM par expression transitoire des protéines d'intérêts chez Nicotiana benthamiana. Le principe du FRET s'appuie sur un transfert d'énergie entre une protéine fluorescente 'donneur' (GFP) à une protéine fluorescente 'accepteur' (RFP), si les deux protéines fluorescentes sont suffisamment proches (distance inférieure à 10nm). La valeur du FRET peut être calculée et doit être supérieure à 7% pour valider une interaction protéineprotéine. Pour réaliser ces expériences, j'ai entrepris le clonage de plusieurs constructions pour exprimer différents ZFHD sous le contrôle d'un promoteur constitutif : p35S:HB30-RFP, p35S:HB25-RFP et p35S:HB29-RFP. Ces constructions ont été exprimées seules ou en combinaison avec la construction p35S:GFP-RGA. Comme attendu, par microscopie confocale, nous avons observé dans un premier temps que les protéines HB30-RFP, HB25-RFP et HB29-RFP co-localisent avec la protéine GFP-RGA, dans le noyau des cellules (excepté dans le nucléole) (Fig. 47). Par FLIM-FRET, nous avons ensuite validé l'interaction entre HB30 et RGA (FRET compris entre 9 et 10%) (Fig. 46A et Fig. S2). A titre de contrôle, nous avons vérifié par Western Blot, que l'ensemble des protéines soit bien accumulé dans les feuilles des plantes agro-infiltrées (Fig. 46B).

Précédemment, nous n'avions pas pu confirmer en levure, si RGA était capable d'interagir avec l'ensemble des ZFHD. Pour répondre à cette question, nous avons sélectionné deux ZFHD (HB25 et HB29) qui pour lesquels nous n'avions pas observé d'interaction avec les



Figure 47. HB25 interagit avec la protéine DELLA RGA *in planta*, en système transitoire.

Les protéines GFP-RGA, en combinaison avec HB25-RFP ou HB29-RFP, ont été exprimées de manière transitoire, 48 heures avant l'expérience, chez *Nicotiana benthamiana*. L'utilisation de la technique FRET-FLIM a permis de mesurer le temps de demi-vie de la GFP (en ns) dans minimum 50 noyaux pour chaque condition (n>50). Le FRET entre deux conditions est exprimé en pourcentage ; un FRET>7% témoigne d'une interaction protéine-protéine. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis (Fig. 47A) ou à l'aide d'un test Anova à deux facteurs suivi d'une comparaison de Tukey (Fig. 47B), p < 0,05.

DELLA (probablement lié à un problème d'expression en levure). Les expériences de FLIM-FRET montrent que HB25 interagit fortement avec RGA (avec un FRET de 23,3%), mais de manière surprenante, nous n'avons pas observé d'interaction entre HB29 et RGA (FRET inférieur à 5%) (Fig. 47A et B). A ce stade de l'étude, nous ne pouvons donc toujours pas confirmer si les DELLA interagissent avec les 14 ZFHD, même si c'est fort probable de par leur similarité de séquence. Des analyses complémentaires avec d'autres ZFHD seront nécessaires pour affirmer cette conclusion.

Avant que je débute ma thèse et que j'initie le clonage de lignées transgéniques stables, le laboratoire avait également testé l'interaction HB30-RGA par co-immunoprécipitation, une approche complémentaire au FRET-FLIM. Pour cette analyse, des feuilles de *Nicotiana benthamiana* ont été agro-infiltrées avec les constructions *p355:RFP-HB30* et *p355:GFP-RGA* seules ou en combinaison. Après expression, les protéines totales ont été extraites et la protéine GFP-RGA a été immunoprécipitée au moyen d'un anticorps anti-GFP. Dans un deuxième temps, au moyen d'un anticorps anti-RFP, le laboratoire a analysé si la protéine RFP-HB30 est co-immunoprécipitée avec la protéine GFP-RGA. Les résultats illustrés en Figure S3A montrent que l'immunoprécipitation de GFP-RGA conduit bien à une co-immunoprécipitation de la protéine RFP-HB30. Comme par FLIM-FRET, cette approche complémentaire confirme une interaction entre HB30 et RGA *in planta*, en expression transitoire chez *Nicotiana benthamiana*.

# 4. Interaction HB30-RGA in planta chez Arabidopsis thaliana

Bien que nous ayons pu démontrer que certains ZFHD interagissent avec les protéines DELLA à l'aide de plusieurs techniques, nous avons souhaité, pour la suite de notre étude, confirmer ces interactions chez *Arabidopsis thaliana*. Au début de ma thèse, le laboratoire avait déjà en sa possession des lignées stables d'*Arabidopsis,* comprenant les constructions *pRGA:GFP-RGA* et *p35S:RFP-HB30* (lignées #4 et #8), que nous avons pu utiliser pour réaliser d'autres expériences de co-immunoprécipitation. Tout comme chez *Nicotiana benthamiana*, nous avons démontré que l'immunoprécipitation de GFP-RGA conduit à une co-immunoprécipitation de la protéine RFP-HB30 (Fig. S3B) ; mettant en évidence une interaction HB30-RGA chez *Arabidopsis*.

Cependant, chez ces lignées, le gène codant pour la protéine RFP-HB30 est exprimé de manière constitutive, sous le contrôle du promoteur *35S*. La protéine RFP-HB30 peut ainsi



### Figure 48. HB30 interagit avec la protéine DELLA RGA, chez Arabidopsis.

Résultats de la co-immunoprécipitation réalisée à partir des extraits totaux de protéines (Input) issus de deux lignées stables d'*Arabidopsis thaliana* indépendantes (plantules âgées de 10 jours) ayant été transformées avec la construction *pHB30:HB30-GFP* (lignées #1.4 et #1.7). Les extraits totaux de protéines ont été immunoprécipitées avec un anticorps anti-GFP. Les protéines co-immunoprécipitées sont détectées par un anticorps anti-RGA. La quantité totale de protéines déposées dans chaque puit (Input) est mis en évidence par une coloration au bleu de Coomassie.

être fortement accumulée dans des territoires où la protéine HB30 endogène n'est pas forcément présente, pouvant conduire à une interprétation erronée des résultats. Pour lever ce doute, j'ai cloné le gène *HB30* en aval de son propre promoteur, fusionné à la protéine fluorescente GFP (*pHB30:HB30-GFP*). Des lignées transgéniques stables ont été obtenues (lignées #1.4 et #1.7) et l'interaction entre la protéine HB30-GFP et la protéine RGA endogène a été testée par co-immunoprécipitation. Comme précédemment, nous avons pu de nouveau confirmer l'interaction entre ces deux protéines (Fig. 48).

Pris dans leur ensemble, les résultats obtenus à l'aide de ces différentes approches démontrent que les protéines DELLA interagissent avec plusieurs ZFHD chez *Arabidopsis*.

#### 5. Domaines engagés dans l'interaction ZFHD-DELLA

Dans le but de cartographier les domaines engagés dans le contact entre les ZFHD et les DELLA, nous avons utilisé des versions tronquées ou délétées pour ces protéines. Concernant les ZFHD, j'ai ôté spécifiquement, par des étapes de sous-clonage, les séquences codant pour les motifs Zinc-Finger (ZF) ou l'homéodomaine (HD) ; nommé respectivement  $\Delta$ ZF et  $\Delta$ HD (Fig. 49A). Le clonage de versions délétées a été entrepris pour les gènes HB30 et HB34, qui sont des cibles d'intérêts et pour lesquels une interaction avec les protéines DELLA a été observée en double-hybride chez la levure (Fig. 43). Plusieurs expériences indépendantes d'interactions en double-hybride ont mis en évidence un contact entre les protéines DELLA et les versions  $\Delta$ ZF, à la fois pour HB30 et HB34 (Fig. 49B et Fig. S4). Les versions délétées  $\Delta$ ZF, tout comme les protéines ZFHD complètes (Fig. 43), interagissent plus fortement avec GAI, qu'avec RGA. Aucune interaction n'a été observée entre les protéines DELLA et les versions délétées, sans homéodomaine ( $\Delta$ HD), pour HB30 et HB34. Ces résultats suggèrent que les ZFHD interagissent aux protéines DELLA via leur homéodomaine et que ce domaine semble essentiel à l'interaction.

Pour les protéines DELLA, le laboratoire avait déjà en sa possession diverses versions tronquées de RGA. Plusieurs motifs (DELLA, VHYNP, LHR1 et 2, VHIID, PFYRE et SAW) de la protéine RGA sont délétés, ou non, selon les différents fragments (Fig. 50A). Des tests d'interaction en double-hybride ont mis en évidence que la force d'interaction entre la protéine M5-RGA et HB30 est identique à celle observée entre le fragment F1RGA et HB30 (Fig. 50B et Fig. S5). Il semblerait que les interactions entre les fragments ReligRGA et del2RGA avec HB30 soient plus faibles. Il est important de noter que les protéines tronquées ont



# Figure 49. L'homéodomaine des ZFHD est engagé dans l'interaction avec les protéines DELLA.

- A. Représentation schématique d'un ZFHD, et des versions tronquées ΔHD et ΔZF, utilisées pour cartographier les domaines engagés dans l'interaction ZFHD-DELLA. HD : homéodomaine ; ZF : Zinc-Finger.
- B. Combinaison des résultats de plusieurs tests d'interaction en double-hybride chez la levure (Fig. S4). Les FT HB30 et HB34, ainsi que leurs versions tronquées ΔHD et ΔZF, sont testés par paires avec les protéines DELLA GAI et RGA. Les levures transformées sont cultivées sur milieu contrôle sans leucine et tryptophane (SD-LW) et sur milieu sélectif sans leucine, tryptophane, adénine et histidine (SD-LWAH). Une croissance sur milieu sélectif témoigne d'une interaction entre les deux protéines. Les vecteurs vides pGBKT7 et pGADT7 ont été inclus comme contrôle négatif. Les photos des levures ont été prises après 5 jours de culture à 30°C.

vraisemblablement une structure tridimensionnelle différente de la protéine native ; d'autres motifs peuvent ainsi être exposés, pouvant conduire à des interactions non spécifiques. Cependant, lorsque que le motif LHR1 (Leucine Heptad Repeat 1) est tronqué, chez le fragment del1RGA, l'interaction avec HB30 est totalement perdue. Ces résultats révèlent que le motif LHR1 de la protéine RGA est impliqué dans le contact avec HB30. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que d'autres motifs, présents chez les protéines DELLA, puissent stabiliser l'interaction ZFHD-DELLA. Le motif LHR1 est connu pour être impliqué dans les interactions entre les protéines DELLA et un grand nombre de DIP (DELLA-interacting proteins) ; corroborant ainsi nos résultats (Van De Velde et al., 2017).

En conclusion, Les protéines DELLA interagissent avec l'homéodomaine des ZFHD, suggérant que les DELLA affecteraient la capacité de liaison à l'ADN des ZFHD et non leur dimérisation (qui implique le motif ZF).

6. Dimérisation des ZFHD *in planta* et impact des protéines DELLA sur la formation des dimères

Des travaux antérieurs ont montré que les ZFHD forment des homodimères, ou des hétérodimères, afin de moduler leur sélectivité à l'ADN et activer la transcription de gènes cibles (Tan and Irish, 2006; Windhövel et al., 2001). Après avoir validé l'interaction entre les ZFHD et les DELLA, nous avons étudié l'homodimérisation et l'hétérodimérisation des ZFHD *in planta.* En parallèle, nous avons jugé pertinent de tester l'impact des DELLA sur la stabilité ou la formation des dimères ZFHD. Pour ce faire, plusieurs interactions ont été testées par FRET-FLIM en exprimant différentes constructions de manière transitoire chez *Nicotiana benthamiana*.

Lors d'une première expérience, la construction *p35S:HB30-GFP* a été agro-infiltrée seule ou en combinaison avec *p35S:HB30-RFP*; et un FRET de 19,8% a été mesuré confirmant l'homodimérisation de HB30 *in planta* (Fig. 51A et Fig. S6A). Dans cette même expérience, une troisième condition a été testée où les deux constructions *HB30-GFP* et *HB30-RFP* ont été co-exprimées avec la construction *p35S:RGA*. En présence de RGA, l'homodimérisation de HB30 ne semble pas être altérée puisque le FRET entre les deux protéines fluorescentes reste stable autour de 20% (Fig. 51A et Fig. S6A).

De manière similaire, nous avons testé l'effet de RGA sur l'hétérodimérisation des ZFHD. Pour cet essai, la construction *p35S:HB30-GFP* a été agro-infiltrée seule ou en combinaison avec





# Figure 50. Le motif LHR1 des protéines DELLA est engagé dans l'interaction avec les ZFHD.

- A. Représentation schématique de la protéine RGA et des différents fragments testés en double-hybride. Les motifs conservés, pour chacun des fragments, sont indiqués.
- B. Le FT HB30 est testé par paires avec les différents fragments de la protéine RGA. Les levures transformées sont cultivées sur milieu contrôle sans leucine et tryptophane (SD-LW) et sur milieu sélectif sans leucine, tryptophane, adénine et histidine (SD-LWAH). Une croissance sur milieu sélectif témoigne d'une interaction entre les deux protéines. Les vecteurs vides pGBKT7 et pGADT7 ont été inclus comme contrôle négatif. Les photos des levures ont été prises après 5 jours de culture à 30°C.

*p35S:RFP-HB34.* Comme attendu, nous avons confirmé que HB30 et HB34 interagissent *in planta* avec un FRET de 8% (Fig. 51B et Fig. S6B). Comme précédemment, en présence de RGA, l'hétérodimérisation de HB30 et HB34 ne semble pas être altérée, puisque le FRET entre les deux protéines fluorescentes reste supérieur à 8% (Fig. 51B et Fig. S6B).

#### 7. Discussion du chapitre 1

En conclusion, nous avons validé l'interaction ZFHD-DELLA en système hétérologue chez la levure avec HB30, puis avec différents membres de la famille ZFHD. Une interaction in planta a été confirmée par la suite, en système transitoire avec des expériences de FRET-FLIM, ou par co-immunoprécipitation en utilisant des lignées transgéniques stables d'Arabidopsis thaliana. Nous avons mis en évidence les domaines d'interactions des deux protéines partenaires, l'homéodomaine des ZFHD entre en contact principalement avec le motif LHR1 du fragment F1RGA (ou ReligRGA et del2RGA, avec une interaction plus faible). Il est notoire que les homéodomaines permettent une liaison du FT à l'ADN au niveau des promoteurs des gènes cibles, il est alors possible d'évoquer un potentiel mécanisme de séquestration de la part des DELLA sur les ZFHD, qui ne seraient alors plus capables de se lier aux éléments cis d'un promoteur cible. Une majorité des interactions DELLA-DIP décrites à ce jour, font l'objet d'un mécanisme de séquestration. Par ailleurs, si les DELLA peuvent séquestrer les ZFHD, il a été montré par FRET-FLIM que leur présence n'altère pas la dimérisation des ZFHD via leurs domaines Zinc-Finger. Dans la littérature, les dimérisations décrites pour les ZFHD ont été observées en double-hybride chez la levure (Tan and Irish, 2006; Windhövel et al., 2001), nous affirmons par cette étude que les ZFHD peuvent homodimériser et hétérodimériser in planta. Le fait d'avoir validé une homodimérisation des ZFHD est une information essentielle pour la réalisation d'une approche par retard sur gel (EMSA), que je détaillerai dans le chapitre 2 des résultats de cette étude.

#### Chapitre 2 : Effet des DELLA sur l'activité transcriptionnelle des ZFHD

#### 1. Introduction du chapitre 2

Il est admis que la fonction biologique des DELLA réside dans leur capacité à interagir avec différentes classes de protéines régulatrices dans le but de contrôler l'expression d'une multitude de gènes cibles. Deux mécanismes moléculaires principaux, la séquestration et la transactivation, ont été identifiés et permettent d'expliquer comment les répresseurs nucléaires DELLA contrôlent le développement et la croissance des plantes (décrit dans la



### Figure 51. Dimérisation des ZFHD *in planta* et impact des protéines DELLA.

Les protéines HB30-GFP, HB30-RFP, RFP-HB34 et RGA ont été exprimées de manière transitoire, 48 heures avant l'expérience, chez *Nicotiana benthamiana*. L'utilisation de la technique FRET-FLIM a permis de mesurer le temps de demi-vie de la GFP (en ns) dans minimum 50 noyaux pour chaque condition (n>50). Le FRET entre deux conditions est exprimé en pourcentage ; un FRET>7% témoigne d'une interaction protéine-protéine. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis, p < 0.05.

L'immuno-détection des protéines HB30-GFP (anticorps anti-GFP), HB30-RFP (anticorps anti-RFP), RFP-HB34 (anticorps anti-RFP) et RGA (anticorps RGA), par Western Blot, dans les extraits totaux protéiques issus des plants de *Nicotiana benthamiana* utilisés pour l'expérience de FRET-FILM est présentée à droite. La quantité totale de protéines déposées dans chaque puits est mis en évidence par une coloration au bleu de Coomassie.

partie 2.5 de l'introduction). Dans le chapitre précédent, j'ai démontré que les DELLA interagissaient avec une nouvelle classe de FT, les ZFHD, et caractérisé les domaines impliqués dans l'interaction pour chacune des deux familles de protéines. Dans ce second chapitre, j'ai étudié les conséquences de cette interaction sur l'activité transcriptionnelle des ZFHD.

Dans un premier temps, j'ai caractérisé l'élément *cis* consensus reconnu par les ZFHD, qui est présent dans le promoteur des gènes cibles, en alignant les motifs reconnus par plusieurs membres de la famille des ZFHD. La séquence de ce motif corrobore avec celle proposée dans la littérature, qui se base sur la propriété des FT à homéodomaine. L'identification de cette séquence consensus était une étape indispensable pour mettre en place les différentes approches moléculaires, afin d'étudier le mécanisme d'action des DELLA sur les ZFHD.

Dans un deuxième temps, j'ai analysé l'activité transcriptionnelle de HB30, en déterminant principalement s'il activait ou réprimait la transcription de gènes cibles. Enfin, j'ai caractérisé le mécanisme moléculaire privilégié par les DELLA lors d'une interaction avec les ZFHD, en utilisant deux approches complémentaires.

### 2. Détermination de l'élément cis consensus reconnu par les ZFHD

Comme décrit précédemment (dans la partie 4.3 de l'introduction), la majorité des FT qui possèdent un homéodomaine, interagissent à l'ADN en reconnaissant une courte séquence comprenant le motif NN<u>ATTA</u> (Gehring et al., 1994). De manière consistante, les quelques publications présentant des expériences de retard sur gel (EMSA) effectuées avec des ZFHD semblent confirmer ce motif. En effet, chez *Arabidopsis*, il a été démontré que HB25 et HB33 se liaient préférentiellement aux motifs AA<u>ATTG</u> et GTA<u>ATTA</u>, respectivement (Tan and Irish, 2006; Tran et al., 2006).

Dans le but de caractériser plus précisément ce motif, j'ai recherché dans la base de données publique Plant Cistrome Database (DAP-seq), les éléments *cis* reconnus par l'ensemble des ZFHD d'*Arabidopsis* (Bartlett et al., 2017). Cette ressource rassemble les séquences d'éléments *cis* reconnus par 529 FT, dont 6 ZFHD (HB21, HB23, HB24, HB25, HB32 et HB34). J'ai récupéré les séquences des éléments *cis* reconnus par ces 6 ZFHD, puis réalisé un alignement, afin de déterminer un consensus spécifique pour toute la famille (Fig. 52). La séquence consensus définie est la suivante : TTAATTAATT. Nous retrouvons dans cette

HB32:	ATAATGCGATT
HB34:	ATTAATCATTTTA
HB21:	ACACCAATAATTGATTA
HB33:	ATTAATTACTTTTT
HB24:	ΑΑΑΑΑΤΑΑΤΤΑΑΤΤΑ
HB23:	AATTTATTAATTAATTAAATT
HB25:	ΤΑΑΤΤΑΑΤΤΤΑΤΤΤ



# Figure 52. Alignement des éléments *cis* reconnus par les ZFHD.

Les éléments *cis* présentés dans cette figure ont été obtenus à l'aide des bases de données publiques (Plant Cistrome Database; Bartlett et al., 2017). Après alignement des éléments *cis*, le consensus commun reconnu par les ZFHD a été défini. Le motif TAAT, qui est conservé dans l'ensemble des éléments *cis*, est mis en évidence (souligné).

séquence deux motifs ATTA en tandem, corroborant les motifs de liaison à l'ADN des ZFHD identifiés dans la littérature. De par la forte alternance des bases azotées A et T, et pour éviter tous problèmes techniques (dimérisation des amorces, etc..) nous avons finalement opté pour l'utilisation de la séquence TT<u>C</u>ATTAATTA<u>CG</u>T pour nos différentes expériences, en ayant substitué 3 nucléotides par un C ou un G.

3. Mécanisme d'action des DELLA sur les ZFHD

#### 3.1. Mise en évidence du mécanisme d'action des DELLA sur les ZFHD

Dans le but d'étudier le mécanisme d'action des DELLA, nous avons initié une approche par retard sur gel (EMSA). Pour réaliser cette expérience, nous avons utilisé l'élément *cis* déterminé préalablement (version sauvage : TTCAT<u>TAAT</u>TACGT), ainsi qu'une version mutée (TTCAT<u>GGG</u>TTACGT) de ce motif. Dans une expérience d'EMSA, la présence d'un retard sur gel rend compte d'une interaction entre un fragment d'ADN radiomarquée (sonde) et une protéine d'intérêt.

En amont, j'ai entrepris plusieurs clonages pour produire les protéines recombinantes RGA et HB30. Cependant, pour des raisons techniques liées à la complexité des protéines HB30 (de par la présence de l'ion Zinc notamment), leur production ou leur purification ont posé problème. Nous avons essayé de produire ces protéines chez *Escherichia coli* ou dans des cellules d'insectes en utilisant différents plasmides (pHMGWA et pAC8RGW). Même si nous avons observé à plusieurs reprises une production des protéines recombinantes d'intérêts, il était impossible de les purifier dans un tampon natif compatible avec l'approche EMSA.

Pour contourner ce problème, nous avons produit la protéine HB30, de manière transitoire, chez *Nicotiana benthamiana* (après agro-infiltration de la construction *p35S:HB30-GFP*). Après vérification de son expression par microscopie confocale et Western Blot, un extrait protéique total (en condition native) a été obtenu, puis une première expérience de retard sur gel a été effectuée (Fig. 53). Lorsque l'extrait protéique contenant HB30 est incubé avec la sonde ADN comportant un doublet de l'élément *cis*, deux retards sur gel sont observés, indiquant que des protéines présentes dans l'extrait total sont capables d'interagir avec la sonde (Fig. 53). Au contraire, aucun retard n'est observé lorsque la sonde est incubée avec un extrait total contrôle sans HB30. Les deux retards sur gel précédemment observés sont donc le résultat d'une interaction entre HB30 et la sonde. Les deux bandes retardées peuvent être le résultat d'une simple et double interaction de HB30 sur les 2 motifs présents dans la sonde. Enfin, pour tester la spécificité de l'interaction, un test a été effectué avec une sonde

### Résultats



	1	2	3	4	5	6	7	8
Sonde	WТ	WТ	WТ	WТ	WТ	MUT	MUT	MUT
Extrait total avec HB30		х	х				х	
Extrait total sans HB30				х	х			х
RGA			х		х			

### Figure 53. HB30 interagit spécifiquement à l'ADN via le motif TTCATTAATTACGT.

Pour cette expérience préliminaire de retard sur gel, nous avons utilisé un extrait de protéines totales de *Nicotiana benthamiana* préalablement agroinfiltré avec la construction *p35S:HB30-GFP* (extrait total avec HB30) ou non agroinfiltré (extrait total sans HB30), et la protéine recombinante RGA (produite chez *E. coli*). Deux sondes ADN ont été utilisées, une sonde sauvage (WT) : TTCAT<u>TAAT</u>TACGTAAAAAATTCAT<u>TAAT</u>TACGT et une version mutée de la sonde (MUT) au niveau du consensus de l'élément *cis* : TTCAT<u>GGGT</u>TACGTAAAAAATTCAT<u>GGGT</u>TACGTAAAAAATTCAT<u>GGGT</u>TACGTAAAAAATTCAT<u>GGGT</u>TACGTAAAAAATTCAT<u>GGGT</u>TACGT. Les sondes ADN radiomarquées au <sup>32</sup>P ont été incubées avec les différents extraits protéiques comme indiqué.

En présence de HB30, deux retards sur gel sont observés avec la sonde WT (puits 2, flèches oranges) mais aucun avec la sonde mutée (puits 7). Les deux retards sont probablement la liaison d'un monomère et d'un dimère de HB30 à la sonde ADN. Par ailleurs, aucun retard n'est observé avec l'extrait protéique sans HB30 (puits 4). La protéine recombinante RGA ne semble pas être fonctionnelle dans cette expérience. La flèche noire indique la présence de la sonde libre.

ADN où les 2 éléments *cis* sont mutés (Fig. 53). De façon remarquable, aucun retard sur gel n'est observé, quel que soit l'extrait protéique utilisé (avec ou sans HB30). Pris dans leur ensemble, ces résultats démontrent que HB30 interagit spécifiquement à l'élément *cis* consensus précédemment défini : TTCAT<u>TAAT</u>TACGT (Fig. 52).

Etant donné que les protéines DELLA interagissent aux ZFHD via leur domaine d'interaction à l'ADN (l'homéodomaine, Fig. 49), il est vraisemblable que les DELLA altèrent la fixation des ZFHD à leur élément *cis*. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons souhaité incuber l'élément *cis* radiomarqué avec l'extrait protéique total comprenant HB30, en absence ou en présence de RGA. Malheureusement, nous avons eu beaucoup de mal à obtenir un extrait protéique total stable comportant RGA (après agro-infiltration de la construction *p35S:RFP-RGA* chez *Nicotiana benthamiana*). De manière similaire, nous n'avons pas réussi à produire RGA chez *Escherichia coli* ; seules d'infimes quantités de RGA en condition native ont été obtenues après purification. Une expérience de retard sur gel a tout de même été tentée avec la protéine RGA recombinante, mais aucune différence n'a été observée ; avec ou sans RGA, HB30 interagit à l'élément *cis* (Fig. 53). Etant donné les difficultés rencontrées pour produire RGA en condition native (mais aussi HB30), il nous est impossible de valider ce dernier résultat.

Pour lever cette difficulté, nous avons entrepris une stratégie alternative qui consiste à produire *in vitro* HB30 et RGA, en utilisant un extrait de germe de blé (kit TnT coupled wheat germ extract system de Promega) qui permet de coupler transcription et traduction en une seule réaction. Pour cela, *HB30* et *RGA* ont été clonés dans le plasmide pHM6WA qui permet d'exprimer les deux protéines, fusionnées à une étiquette HIS-FLAG, sous le promoteur *SP6*, compatible avec le système d'expression. Après une incubation des deux plasmides dans les extraits de germe de blé, à 25°C, pendant 2h (dans deux réactions distinctes), la quantité de protéines HB30 et RGA produites a été estimée par Western Blot (Fig. 54). Les deux protéines ont été produites en quantité importante et similaire, et peuvent donc être utilisées pour des expériences de compétition par gel retard, sans purification (la purification pourrait altérer le repliement des protéines).

Pour ce nouvel essai, nous avons préféré utiliser une sonde ADN qui ne contient qu'un seul élément *cis*, pour simplifier la lecture du résultat. Malgré cette optimisation, comme pour l'essai précédent, nous observons deux bandes retardées lorsque l'extrait contenant HB30 est incubée avec la sonde ADN contrôle (WT) (Fig. 55). Par contre, à la différence, la bande retardée la plus haute (de plus haut poids moléculaire) est toujours visible quel que soit l'extrait protéique utilisé (GFP ou RGA). La bande inférieure, quant à elle, n'est détectée que lorsque



# Figure 54. Accumulation des protéines HB30 et RGA in vitro.

Les protéines HB30 et RGA (fusionnées à une étiquette FLAG et HIS) ont été produites *in vitro* dans des extraits de wheat germ (transcription-traduction couplé, kit Promega), dans deux réactions distinctes. Les protéines HB30-FLAG et RGA-FLAG produites sont analysées par Western Blot à l'aide d'un anticorps anti-FLAG. La quantité totale de protéines déposées dans chaque puits est mis en évidence par une coloration au bleu de Coomassie. Masse moléculaire attendue pour les protéines d'intérêts : 72 kDa pour RGA et 37 kDa pour HB30.

la sonde ADN est incubée avec l'extrait comprenant HB30. Par ailleurs, les deux bandes retardées sont absentes lorsque c'est la sonde mutée qui est utilisée, quel que soit l'extrait protéique testé (Fig. 55). Pris dans leur ensemble, ces résultats confirment que HB30 se fixe spécifiquement à l'élément *cis* TTCAT<u>TAAT</u>TACGT (bande retardée la plus basse, de plus faible poids moléculaire) et suggère que la seconde bande (la plus haute, de plus haut poids moléculaire) correspond à l'interaction d'une protéine présente dans l'extrait de germe de blé (dans le kit Promega) à l'élément *cis*, et qui possèderait les mêmes spécificités d'interaction que HB30 (pourrait correspondre à un FT à homéodomaine).

De façon remarquable, nous observons pour la première fois que la présence de RGA altère la fixation de HB30 à l'élément *cis*. En effet, lorsque nous augmentons progressivement la quantité de RGA incubée avec HB30 et l'élément *cis* radiomarqué, nous observons une concomitante réduction de l'intensité de la bande retardée de faible poids moléculaire, correspondant à HB30 fixé à la sonde ADN (Fig. 55). Au contraire, l'intensité de la bande retardée de plus haut poids moléculaire reste inchangée, indépendamment de la quantité de RGA ajoutée au milieu réactionnel. Quel que soit la nature de cette protéine responsable de ce retard sur gel, RGA n'altère pas sa fixation à l'élément *cis*.

Nous pouvons donc conclure que RGA, en interagissant à HB30, bloque la capacité de liaison à l'ADN de ce dernier via un mécanisme de séquestration. Si RGA avait pour fonction d'augmenter en *trans* l'activité transcriptionnelle de HB30 (comme c'est le cas pour les interactions DELLA-IDD décrites dans la partie 2.5.2. de l'introduction (Yoshida et al., 2014)), les résultats des tests de retard sur gel auraient été différents. En effet, lors de ce mécanisme de régulation, les protéines DELLA interagissent à l'ADN fixées au FT. Dans ce cas, par gel retard, nous aurions dû avoir un « super retard » (un retard de plus haut poids moléculaire lorsque les deux protéines RGA et HB30 sont incubés ensemble avec l'ADN). Or nous voyons une disparition du signal retardé et non une migration de la bande vers de plus hauts poids moléculaires. Donc, en accord avec les données du double hybride (les domaines impliqués dans l'interaction RGA-HB30), nous pouvons affirmer que RGA agit via un mécanisme de séquestration vis à vis de HB30.

### 3.2. Effet des protéines DELLA sur l'activité transcriptionnelle des ZFHD

Précédemment, nous avons démontré que la fixation de RGA à HB30 altérait la liaison de HB30 à l'ADN. Avant de tester les conséquences de la formation du complexe RGA-HB30 sur



### Figure 55. RGA inhibe la capacité de HB30 à interagir à l'élément *cis* consensus.

Pour cette expérience de retard sur gel, les protéines HB30, RGA et GFP ont été produites *in vitro* à l'aide du système d'expression « wheat germ » de Promega. Deux sondes ADN ont été utilisées, une sonde sauvage (WT) comprenant l'élément *cis* consensus défini en Fig. 52 et de séquence : TTCATTAATTACGT, et une version mutée de la sonde (MUT) : TTCAT<u>GGG</u>TTACGT, où le motif TAAT a été remplacé par GGGT.

Les sondes ADN radiomarquées au <sup>32</sup>P ont été incubées avec les différentes protéines comme indiqué. En présence de HB30, un retard sur gel est observé avec la sonde WT (puits 2 et 12, flèches oranges) mais aucun avec la sonde mutée (puits 8). Par ailleurs, aucun retard n'est observé en absence de HB30 (puits 10 et 11). Une quantité croissante de RGA inhibe progressivement la capacité de HB30 à se lier à la sonde WT (puits 3 à 5). La flèche noire indique la présence de la sonde libre.

l'activité transcriptionnelle de HB30, il est essentiel de définir au préalable si HB30 (et les ZFHD en général) a une activité activatrice ou répressive sur l'expression de gènes cibles.

Les expériences de retard sur gel ont permis de démontrer que HB30 se liait spécifiquement à l'élément cis TTCATTAATTACGT. Etant donné qu'à ce stade de l'étude, nous ne connaissons aucun gène cible de HB30, pour étudier son activité transcriptionnelle, nous avons construit un promoteur synthétique qui comprend un multimère de l'élément cis (5 répétitions + spacer AAAAAA entre les motifs) fusionné à un promoteur minimal 35S et un domaine activateur de la traduction  $\Omega$  (Fig. 56A). Pour l'analyse, nous avons cloné ce promoteur synthétique dans le plasmide pGREENii-0800, en amont du gène LUCIFERASE (firefly). Ce plasmide comprend aussi une cassette contrôle qui exprime le gène RENILLA sous promoteur Ubiquitin. Pour tester l'activité transcriptionnelle de HB30, nous avons agroinfiltré dans des feuilles de Nicotiana benthamiana cette construction rapportrice, avec la construction effectrice p35S:HB30-GFP. Trois jours après infiltration, des disques foliaires sont prélevés et l'activité transcriptionnelle est suivie par mesure de la bioluminescence émise par la LUCIFERASE et la RENILLA, après incubation des disques dans une solution contenant le substrat des 2 enzymes. En calculant le ratio FIREFLY/RENILLA des activités mesurées (afin de normaliser les valeurs), l'activité transcriptionnelle de HB30 est déterminée de manière quantitative (d'après le protocole utilisé dans Resentini et al., 2015).

En absence de constructions effectrices, l'activité transcriptionnelle mesurée est fixée arbitrairement à 1 (activité basale). Lorsque la construction effectrice *p35S:HB30-GFP* est agro-infiltrée avec la construction rapportrice, nous observons une augmentation substantielle du signal détecté (x2) par rapport à l'activité basale (Fig. 56B). Ce résultat démontre que HB30 est un activateur transcriptionnel. Par ailleurs, il confirme que le promoteur synthétique construit est fonctionnel. Enfin, pour mesurer l'effet de RGA sur l'activité transcriptionnelle de HB30, nous avons agro-infiltré deux constructions effectrices, *p35S:HB30-GFP* et *p35S:RGA-HA*, avec la construction rapportrice. Confirmant les résultats des expériences de retard sur gel, l'expression de RGA diminue l'activité transcriptionnelle de HB30 (Fig. 56B).

Il existe plusieurs exemples dans la littérature où des FT, qui appartiennent à une même famille, possèdent des activités transcriptionnelles différentes voire opposées. Par exemple, les Auxin-response factors (ARF) agissent comme activateurs ou répresseurs (Ulmasov et al., 1999). Pour étendre l'étude à plusieurs ZFHD, j'ai également analysé l'activité transcriptionnelle de 3 autres ZFHD appartenant à des embranchements différents. Dans ce but, j'ai réalisé le clonage des constructions *p35S:HB25-GFP, p35S:HB29-GFP* et *p35S:HB34-GFP*. Lorsque ces constructions effectrices ont été agro-infiltrées avec la



### Figure 56. RGA inhibe l'activité transcriptionnelle de HB30.

- A. Promoteur synthétique comprenant le consensus TTCAT<u>TAAT</u>TACGT multimérisé 6 fois (séparé par la séquence AAAAAA), le promoteur minimal 35S caMV et l'activateur de la traduction Ω. Cette séquence a été clonée dans un plasmide pGREEN contenant les gènes codant pour les deux enzymes firefly et renilla.
- B. Histogramme regroupant les résultats obtenus lors des tests d'activité transcriptionnelle in planta à l'aide du système firefly/renilla (2 réplicats biologiques, en noir et en gris). L'activité transcriptionnelle est mesurée en faisant le ratio firefly/renilla des intensités de luminescence respectives. Le signal basal de l'activité transcriptionnelle (construction rapportrice agro-infiltrée seule) a été fixé arbitrairement à 1 (contrôle). Les autres valeurs ont été normalisées par rapport au ratio obtenu pour la condition contrôle. Lorsque les constructions effectrice p35S:HB30-GFP et rapportrice sont agroinfiltrés ensemble chez Nicotiana benthamiana, l'activité transcriptionnelle est augmentée. L'ajout de la construction p35S:RGA-HA diminue l'activité transcriptionnelle de HB30 qui atteint le niveau basal. L'erreur standard (5 réplicats techniques provenant de 2 réplicats biologiques) est indiquée. L'astérisque indique une différence significative avec le signal basal (p < 0,05, test t de Student). Sur la partie droite de la figure est présenté les résultats de l'immuno-détection des protéines HB30-GFP (anticorps anti-GFP) et RGA-HA (anticorps anti-RGA), par Western Blot, dans les extraits protéiques totaux issus des plants de Nicotiana benthamiana utilisés pour un des réplicats de cette analyse. La quantité totale de protéines déposées dans chaque puits est mis en évidence par une coloration au bleu de Coomassie.

construction rapportrice, nous avons toujours noté une augmentation (plus ou moins importante) de l'activité transcriptionnelle (Fig. 57). Bien qu'il s'agisse d'une analyse préliminaire, HB25 et HB29 (et dans une moindre mesure HB34) semblent être des activateurs de la transcription, tout comme HB30. Ces résultats devront être confortés par d'autres essais et étendus à d'autres ZFHD.

#### 4. Discussion du chapitre 2

Dans le premier chapitre de cette étude, j'ai démontré que les ZFHD interagissaient aux protéines DELLA via leur homéodomaine, sans pour autant altérer la dimérisation des ZFHD. Un potentiel mécanisme de séquestration de la part des DELLA sur les ZFHD a été évoqué, mécanisme que j'ai pu valider dans ce second chapitre à l'aide de deux techniques complémentaires. Lors d'une séquestration d'un FT par les DELLA, le domaine de liaison à l'ADN, permettant aux FT d'exercer leur fonction de régulateurs transcriptionnels, est toujours engagé dans l'interaction ; étayant nos résultats (pour exemple : Feng et al., 2008; de Lucas et al., 2008). En présence de RGA, HB30 séquestré n'est alors plus capable de se lier de manière spécifique à l'élément *cis* TTCAT<u>TAAT</u>TACGT des gènes cibles et d'activer leur transcription. De manière générale, une accumulation des protéines DELLA *in planta* conduit à une inhibition de l'activité transcriptionnelle des ZFHD et donc, à une répression des gènes cibles.

### Chapitre 3 : Analyse de l'expression des ZFHD

1. Introduction du chapitre 3

Nous avons démontré dans les deux chapitres précédents que les protéines DELLA interagissaient aux ZFHD, et que cette interaction altérait l'activité transcriptionnelle de cette famille de FT. Dans ce troisième chapitre, je me suis intéressé au patron d'expression des 14 *ZFHD*, dans le but de sélectionner ceux qui ont une expression élevée dans les hampes florales et qui peuvent exercer un rôle important dans la mise en place de l'architecture des plantes (hauteur finale et degré de ramification, deux traits morphologiques contrôlés par la signalisation GA). Pour rappel, HB30 a été caractérisé par le laboratoire, dans un crible en double hybride à partir d'une collection d'ADNc issus d'apices inflorescentiels.

Premièrement, j'ai entrepris une étude *in silico* de l'expression des *ZFHD*, en confrontant les bases de données transcriptomiques publiques avec les données bibliographiques. Puis, pour

### Résultats



### Figure 57. HB25, HB29 et HB34 sont des activateurs de la transcription.

Histogramme regroupant les résultats obtenus lors d'un test d'activité transcriptionnelle *in planta* à l'aide du système firefly/renilla. La construction rapportrice utilisée est décrite dans la Fig. 56A. Les constructions effectrices *p35S:HB30-GFP*, *p35S:HB25-GFP*, *p35S:HB29-GFP*, *p35S:HB34-GFP* et rapportrice ont été agro-infiltrées chez *Nicotiana benthamiana* et l'activité transcriptionnelle est mesurée en faisant le ratio firefly/renilla des intensités de luminescence respectives. Le signal basal de l'activité transcriptionnelle (construction rapportrice agro-infiltrée seule) a été fixé arbitrairement à 1 (contrôle). Les autres valeurs ont été normalisées par rapport au ratio obtenu pour la condition contrôle. L'erreur standard est indiquée et l'astérisque indique une différence significative par rapport à la valeur du signal basal (p < 0,05, test t de Student).

affiner ces données, j'ai analysé les profils d'expression de l'ensemble des *ZFHD* par qRT-PCR, à différents stades de développement chez *Arabidopsis thaliana*.

Suite à l'obtention des profils d'expression, nous avons sélectionné les *ZFHD* les plus pertinents pour l'étude, à savoir ceux qui sont fortement exprimés dans les hampes florales. Puis, des lignées rapportrices de fusion transcriptionnelle et traductionnelle *ZFHD*:*GUS* ont été obtenues, pour déterminer précisément les patrons tissulaires des ZFHD sélectionnés. Le but ultime de ce chapitre est d'évaluer si certains ZFHD peuvent avoir des activités redondantes dans certains tissus ou organes, information clé avant toute approche génétique.

# 2. Profils d'expression des ZFHD au cours du développement d'Arabidopsis

# 2.1. Analyse in silico des patrons d'expression des ZFHD

L'application eFP browser, disponible sur le site <u>www.bar.utoronto.ca</u>, regroupe l'ensemble des données publiques d'expression de gènes chez *Arabidopsis*. Grâce à cet outil, nous avons étudié les profils d'expression des 14 gènes de la famille *ZFHD* (Fig. 58 et Fig. S7). Fait important, le gène *HB26* (AT5G60480) n'est pas présent dans les bases de données ; il est vraisemblable qu'il s'agisse d'un pseudogène (Tan and Irish, 2006). Parmi les 13 autres *ZFHD*, l'analyse révèle que ces FT ont des patrons d'expression spécifiques et/ou redondants dans tous les organes de la plante et à divers stades de développement. Par ailleurs, cette analyse révèle que *HB25*, *HB30*, *HB31*, *HB33* et *HB34* sont les *ZFHD* qui montrent la plus forte expression dans les inflorescences ou les apices caulinaires (Fig. 58). Les autres *ZFHD* ont une expression très faible dans ces organes (Fig. S7).

Concernant les données bibliographiques, des études d'expression par Northern Blot ont montré que *HB30, HB31, HB33* et *HB34* sont fortement exprimés dans les inflorescences et les fleurs matures, confirmant les données transcriptomiques publiques (Fig. 38) (Hu et al., 2008b; Tan and Irish, 2006). Dans une autre étude, il a été rapporté que *HB25, HB31* et *HB33* font partie d'une liste de 18 gènes codant pour des FT, préférentiellement exprimés dans les jeunes inflorescences (Zhang et al., 2005).

Pris dans leur ensemble, les données *in silico* suggèrent que *HB30* et *HB34* (qui appartiennent au même embranchement, Fig. 45), ainsi que *HB25*, *HB31* et *HB33*, sont les membres de la famille *ZFHD* qui sont le plus fortement exprimés dans les inflorescences. Ces FT exercent vraisemblablement un rôle important dans le développement des organes aériens des plantes

### Résultats



Figure 58. Analyse *in silico* de l'expression des gènes ZFHD chez Arabidopsis thaliana.

Analyse comparative des *ZFHD* les plus fortement exprimés dans les inflorescences d'*Arabidopsis thaliana* à l'aide des données transcriptomiques publiques recensées sur le site eFP Browser. Le mode absolu a été utilisé avec un signal seuil fixé à 300.

(élongation de la tige, formation des organes latéraux) et sont donc une cible de choix pour l'étude.

## 2.2. Analyse de l'expression des ZFHD à divers stades de développement

Pour préciser les données *in silico*, j'ai analysé les profils d'expression des 14 *ZFHD*, à plusieurs stades clés du développement d'*Arabidopsis thaliana*, par qRT-PCR. Les résultats regroupés dans la figure 59 montrent qu'un grand nombre de *ZFHD* sont exprimés à des niveaux variables dans les inflorescences (hormis *HB26*, certainement un pseudogène). Au contraire, dans les siliques, tous les *ZFHD* sont faiblement exprimés excepté *HB30* (identifié dans le crible en double hybride). Il est important de noter par ailleurs, que *HB30* est le seul *ZFHD* qui montre une expression élevée à tous les stades de développement analysés. D'autres gènes montrent également des niveaux d'expression relativement élevés à certains stades du développement comme *HB22*, *HB23*, *HB31* et *HB33*. Un triplicata biologique de cette expérience a été réalisé (Fig. S8 et S9), et bien que l'amplitude des niveaux d'expression diffère d'une expérience à une autre, les tendances sont conservées. Autre point avéré, les gènes qui montrent des patrons d'expression semblables n'appartiennent pas forcément au même embranchement. Il est donc fort probable que les ZFHD d'un embranchement donné n'aient pas les mêmes fonctions.

En parallèle, une analyse similaire à partir d'apices caulinaires disséqués, a été conduite afin de déterminer si les profils et les niveaux d'expression des *ZFHD* diffèrent de ceux obtenus à partir des inflorescences. Cette analyse montre qu'en général, les niveaux d'expression des FT dans les apices caulinaires disséqués sont proches de ceux obtenus à partir des inflorescences (Fig. 59). Ce résultat indique que les *ZFHD* sont essentiellement exprimés dans les apices.

Enfin, pour compléter cette analyse, nous avons déterminé par qRT-PCR le profil d'expression des *ZFHD* au niveau racinaire. Les résultats obtenus (triplicata biologique) indiquent que les *ZFHD* ont un profil et un niveau d'expression qui sont spécifiques aux racines, et qui ne corroborent avec aucun autre organe et/ou stade de développement (Fig. 60). En effet, au niveau racinaire, *HB29* est 4 à 5 fois plus exprimé que les autres *ZFHD*. Parmi les autres *ZFHD*, on peut noter que l'embranchement comprenant *HB23*, *HB30* et *HB34*, mais aussi les gènes *HB24*, *HB27* et *HB32* sont également exprimés dans la racine, mais à des niveaux bien



# Figure 59. Profils d'expression des gènes de la famille *ZFHD* au cours du développement d'*Arabidopsis thaliana*.

Expression relative des 14 gènes *ZFHD*, déterminée par qRT-PCR, à partir d'ARN totaux issus de plantules âgées de 10 jours, de plantules âgées de 21 jours, de feuilles de rosettes de plantes âgées de 5 semaines, de fleurs, d'apices caulinaires disséqués et de jeunes siliques issues de plantes âgées de 7 semaines. Le niveau d'expression de chaque gène, normalisé à partir de deux gènes de référence, est relatif à celui de *HB34* dans les plantules âgées de 10 jours, fixé arbitrairement à 1 en utilisant le logiciel LightCycler480 1.5.0 SP3. L'efficacité des amorces a été calculée pour chacun des couples (comprise entre 1,7 et 2,3). Les gènes sont classés selon l'arbre phylogénétique des ZFHD (Fig. 45). L'erreur standard indique la variabilité technique de la qRT-PCR (n=3).

plus faibles que celui de *HB29* (Fig. 60). Ces derniers résultats suggèrent que les ZFHD exercent aussi une fonction biologique au cours du développement du système racinaire.

En conclusion, les patrons d'expression des *ZFHD* sont spécifiques et différents à chaque stade de développement, mais ont toutefois fait apparaître une probable redondance fonctionnelle. Par ailleurs, il est important de noter que les résultats de cette analyse d'expression corroborent assez bien avec les données *in silico*. En s'appuyant sur l'ensemble de ces résultats, ainsi que l'analyse phylogénétique, nous avons sélectionné pour la suite de cette étude, 7 gènes *ZFHD* qui ont une forte expression dans l'apex caulinaire : *HB23, HB25, HB28, HB30, HB31, HB33* et *HB34,* ainsi que le gène *HB29* pour son patron d'expression spécifique au niveau racinaire.

#### 3. Patrons d'expression et d'accumulation des ZFHD au niveau tissulaire

Dans le but d'obtenir des patrons d'expression et d'accumulation tissulaires de ZFHD sélectionnés précédemment, j'ai construit plusieurs lignées rapportrices transcriptionnelles et traductionnelles, ZFHD:GUS. Pour cette analyse, j'ai sélectionné les gènes *HB23* et *HB30* qui ont montré une forte expression par qRT-PCR à différents stades du développement. Aussi, pour mettre en évidence une potentielle fonction biologique des *ZFHD* dans le développement du système racinaire, j'ai trouvé qu'il était pertinent d'inclure le gène *HB29* ; *ZFHD* le plus exprimé dans cet organe. J'ai ainsi introduit, chez *Arabidopsis*, deux constructions fusions transcriptionnelles (*pHB23:GUS* et *pHB30:GUS*) et trois constructions fusions traductionnelles (*pHB23:GUS*, *pHB30:HB30-GUS* et *pHB29:HB29-GUS*), pour caractériser les patrons d'expression et d'accumulation des protéines, respectivement. Plusieurs lignées indépendantes, présentant une insertion unique et une coloration bleue reproductible, ont été sélectionnées pour chacune des constructions.

Au cours de la germination (24h après imbibition), nous avons observé une coloration GUS chez le lignée *pHB30:GUS* au niveau des cotylédons et à l'extrémité de la radicule des embryons (Fig. 61). Le même patron GUS a été observé chez la lignée *pHB30:HB30-GUS*. A l'opposé, aucun signal n'a été détecté chez les lignées *HB23:GUS* et *HB29:GUS*. Ces deux gènes ne semblent pas être exprimés dans les embryons de graines en germination.

Au stade plantule, *HB30* est exprimé dans tous les organes excepté les racines. Les transcrits et la protéine sont détectés dans les cotylédons, les jeunes feuilles, l'apex caulinaire et



# Figure 60. Profils d'expression des gènes de la famille ZFHD dans les racines d'*Arabidopsis thaliana*.

Expression relative des 14 gènes *ZFHD*, déterminée par qRT-PCR, à partir d'ARN totaux issus de racines de plantules âgées de 10 jours. Le niveau d'expression de chaque gène, normalisé à partir de deux gènes de référence, est relatif à celui de *HB34* dans les plantules âgées de 10 jours (Fig. 59), fixé arbitrairement à 1, en utilisant le logiciel LightCycler480 1.5.0 SP3. L'efficacité des amorces a été calculée pour chacun des couples (comprise entre 1,7 et 2,3). Les gènes sont classés selon l'arbre phylogénétique des ZFHD (Fig. 45). L'erreur standard indique la variabilité technique de la qRT-PCR (n=3). L'expérience a été reproduite 3 fois et chaque réplicata est indiqué sur le graphe en noir, gris foncé et gris clair.

l'hypocotyle (Fig. 61). *HB23*, qui appartient au même embranchement que *HB30*, a un patron d'expression similaire à celui de *HB30*, mais avec des niveaux plus faibles. Par contre, *HB23* est exprimé dans la racine (la protéine s'accumule également), contrairement à *HB30* (Fig. 61). Enfin, concernant *HB29*, ce dernier a un patron d'expression complétement opposé à celui de *HB30*, au stade plantule. Le transcrit et la protéine HB29 sont détectés uniquement dans le système racinaire, excepté la coiffe radiculaire (racines principales et secondaires, Fig. 61), confirmant globalement les résultats de qRT-PCR.

A un stade de développement plus avancé, HB29 qui n'était pas exprimé dans les parties aériennes de la plantule, est accumulé dans les inflorescences, principalement dans le filet des étamines (Fig. 61). Concernant HB30, une forte activité GUS est localisée dans le filet des étamines et dans les jeunes bourgeons floraux. Enfin, le patron d'accumulation de HB23 est similaire à celui de HB30 au niveau des inflorescences, mais avec un niveau d'accumulation bien plus faible (Fig. 61).

De manière générale, il est important de noter que les patrons d'accumulation des ZFHD reflètent généralement ceux des transcrits, suggérant que le niveau d'accumulation des ZFHD (et leur distribution au niveau tissulaire) est essentiellement régulé au niveau transcriptionnel et non au niveau traductionnel ou post-traductionnel. Il sera important de confirmer ce résultat pour les autres ZFHD.

# 4. Discussion du chapitre 3

Au cours de ce chapitre, nous avons étudié les profils d'expression des 14 *ZFHD* et déterminé les patrons d'accumulation de certains FT, au cours du développement, par différentes approches complémentaires. Cette analyse confirme que HB30 représente le ZFHD le plus fortement accumulé dans les parties aériennes chez *Arabidopsis*, principalement dans les apices (zone méristématique caulinaire et inflorescentiel). Ce niveau d'expression pourrait expliquer en partie pourquoi c'est ce ZFHD qui a été caractérisé dans le crible en double hybride. Tout comme HB30, HB23 qui appartient au même embranchement, est largement accumulé dans les apices, et pourraient ensemble exercer un rôle redondant et important dans la mise en place de l'architecture des parties aériennes de la plante.

L'ensemble des résultats obtenus relatifs à HB29 mettent en évidence que ce ZFHD est fortement exprimé au niveau racinaire et accumulé dans l'ensemble des tissus de la racine ;

#### Embryons 24 heures après imbibition







pHB23:HB23-GUS



pHB29:HB29-GUS



pHB30:HB30-GUS

#### Plantules âgées de 7 jours



2 mm

pHB30:GUS

pHB30:GUS



pHB23:HB23-GUS



pHB29:HB29-GUS

pHB23:HB23-GUS pHB29:HB29-GUS pHB30:HB30-GUS



pHB30:HB30-GUS



pHB23:GUS

#### Inflorescences









pHB30:HB30-GUS

# Figure 61. Patrons d'expression ou d'accumulation des ZFHD au niveau tissulaire, chez *Arabidopsis thaliana*.

Photos représentatives de l'activité GUS de plusieurs lignées rapportrices transcriptionnelles et traductionnelles ZFHD:GUS à différents stades de développement. Les photos des embryons et des parties aériennes ont été prises à la loupe binoculaire. Les lignées utilisées présentent une insertion unique de la construction et les photos ont été prises 18 heures après le début de la réaction avec le substrat (X-gluc).

excepté dans la coiffe racinaire (Fig. 60 et 62). Etant donné que les GA jouent un rôle essentiel dans le développement du système racinaire, HB29 pourrait être un relai important de la signalisation GA dans la racine, même si pour des raisons techniques, nous avons échoué à démontrer l'existence d'une interaction entre HB29 et les DELLA (chapitre 1). Fait intéressant, aucun autre ZFHD ne semble partager le patron d'expression de *HB29* dans la racine ; la redondance fonctionnelle pourrait être réduite dans la racine et ainsi faciliter l'étude.

Dans l'ensemble, les analyses de l'expression génique ont révélé que les transcrits des gènes *HB30* et ses proches homologues *HB23* et *HB34*, mais aussi *HB25, HB28, HB29, HB31* et *HB33* étaient fortement accumulés dans les inflorescences (en particulier dans les méristèmes et étamines) ou dans la racine. Ces gènes s'avèrent donc être de bons candidats pour déterminer, dans la suite de cette étude, si les interactions ZFHD-DELLA contribuent substantiellement à la forme générale des plantes.

# Chapitre 4 : Etude morphologique des mutants zfhd chez Arabidopsis thaliana

1. Introduction du chapitre 4

L'intégralité des résultats exposés dans les précédents chapitres de cette étude tend vers une même hypothèse, la voie de signalisation des GA pourrait contrôler le développement des parties aériennes et racinaires à l'aide du complexe transcriptionnelle ZFHD-DELLA, chez *Arabidopsis*. Dans l'optique de répondre à cette question biologique, l'analyse génétique présentée dans ce chapitre s'est concentrée exclusivement sur les 8 gènes *ZFHD* sélectionnés précédemment : *HB23, HB25, HB28, HB29, HB30, HB31, HB33* et *HB34*.

Avant tout, nous avons recherché des mutants d'insertion pour chacun de ces gènes, dans les collections de mutants. Après une caractérisation complète de chacun de ces mutants, notre stratégie a été d'obtenir un multiple mutant *zfhd*, pour préciser la fonction biologique de l'interaction ZFHD-DELLA, tout en contournant la redondance fonctionnelle de cette famille multigénique. J'ai réalisé par la suite des analyses morphologiques détaillées, chez les mutants simples et multiples *zfhd*, tout au long du développement de la plante. J'ai observé des altérations morphologiques particulièrement marquantes au niveau des parties aériennes ; toutes ces observations sont décrites dans ce chapitre.

Pour plusieurs *ZFHD* d'intérêts, notamment *HB30*, aucun mutant nul n'est présent dans les collections existantes. Nous avons donc développé des stratégies alternatives dans le but

### Résultats

#### Racines principales de plantules âgées de 7 jours







pHB23:GUS

pHB30:GUS

pHB23:HB23-GUS pHB29:HB29-GUS pHB30:HB30-GUS

### Racines secondaires de plantules âgées de 7 jours



pHB23:GUS



pHB23:HB23-GUS



0.1 mm

pHB30:HB30-GUS



pHB30:GUS



pHB29:HB29-GUS

#### Figure 62. Patrons d'expression ou d'accumulation des ZFHD au niveau tissulaire, dans les racines d'Arabidopsis thaliana.

Photos représentatives de l'activité GUS de plusieurs lignées rapportrices transcriptionnelles et traductionnelles ZFHD:GUS dans le système racinaire. Les photos des racines ont été prises à l'aide d'un microscope optique. Les lignées utilisées présentent une insertion unique de la construction et les photos ont été prises 18 heures après le début de la réaction avec le substrat (X-gluc).

d'obtenir des mutants nuls, ou hypomorphes, pour ces gènes ou pour convertir HB30 en facteur répresseur. Pour affiner la caractérisation fonctionnelle de cette famille de FT, j'ai aussi entrepris la construction de lignées 'surexpresseurs' pour plusieurs gènes *ZFHD* sélectionnés.

2. Stratégie pour obtenir un mutant multiple zfhd

2.1. Caractérisation des mutants simples d'insertion T-DNA

Nous avons recherché des mutants d'insertion T-DNA, pour les gènes *HB23, HB25, HB28, HB29, HB30, HB31, HB33* et *HB34*, dans les collections du Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC), en privilégiant des mutants dont le T-DNA est inséré dans la séquence codante des gènes (CDS). Les graines des mutants suivants ont été obtenues par le laboratoire : *hb25* (SALK\_133857C), *hb28* (SALK\_117668), *hb29* et *hb29.2* (SAIL\_818\_D10 et GK-408H11), *hb30 et hb30.2* (GABI\_363F04 et SM3.3405), *hb31* (SALKseq\_113591.1) et *hb33* (SALK\_097388.45.35.x). Les mutants homozygotes pour *hb23* (SALK\_059288) et *hb34* (SALK\_085482) ont été caractérisés préalablement par le laboratoire. Les informations concernant l'ensemble des mutants *zfhd* sont regroupées dans le Tableau S2. Certains mutants *zfhd* étant hétérozygotes au moment de leur réception, nous avons réalisé plusieurs étapes de sélection et de génotypage. A ce jour, nous avons obtenu tous ces mutants *zfhd* à l'état homozygote (Fig. 63).

Même si les transcrits non complets d'un gène muté sont souvent peu stables et rapidement dégradés, il est important d'étudier, chez les simples mutants *zfhd*, l'accumulation des transcrits correspondants. Ces résultats permettent notamment de pouvoir discriminer une reprise de la transcription après l'insertion T-DNA, ou la présence d'un transcrit non complet correspondant à la région du gène en amont de l'insertion. Pour rappel, les séquences codantes pour le domaine Zinc-finger et l'Homéodomaine sont situées à proximité des extrémités 5' et 3', respectivement. Un transcrit *ZFHD* non complet, mais comportant la séquence codante pour l'un de ces domaines, tout en étant assez stable pour être traduit en une protéine tronquée, pourrait altérer la dimérisation et l'activité transcriptionnelle de l'ensemble des ZFHD.

Dans ce but, j'ai réalisé une analyse RT-PCR, à partir d'ADNc issus d'inflorescences des différents mutants, en utilisant des amorces spécifiques, de part et d'autre du lieu d'insertion du T-DNA. Les résultats obtenus mettent en évidence que tous les simples mutants *zfhd*, hormis *hb29.1* et *hb29.2*, n'accumulent pas de transcrits pour les gènes correspondants mutés



### Figure 63. Caractérisation des mutants *zfhd* par PCR à partir d'ADN génomique.

Résultats des PCR réalisées sur l'ADN génomique (ADNg) extrait des simples mutants *zfhd*. Les amorces utilisées sont différentes et spécifiques pour chacun des gènes *ZFHD*. Pour le détail de chacun des mutants présentés dans cette figure, se référer au tableau S2. Pour le mutant *hb30.2*, SM3.3405, un couple d'amorces spécifique à ce type d'insertion (transposon) a été utilisé mais une amplification chez le contrôle Col-0 est également observée. En utilisant un couple d'amorces ciblant spécifiquement le gène *HB30* au complet (WT), aucune amplification n'est observée pour le mutant SM3.3405. Même si la présence du transposon ne peut être vérifiée chez *hb30.2.*, le gène *HB30* semble être muté.
par l'insertion d'un T-DNA (Fig. 64) ; confirmant par la même occasion que ces mutants sont bien homozygotes. En parallèle, j'ai réalisé des analyses qRT-PCR à partir des mêmes ADNc dans le but de confirmer, par une approche quantitative, qu'il s'agit bien de mutants nuls. Un duplicata de cette expérience confirme que les mutants *hb23, hb25, hb31* et *hb34* correspondent réellement à des mutants nuls (Fig. 65). Cependant, pour les mutants *hb28, hb30.1* et *hb30.2*, nous avons remarqué que l'expression des gènes correspondants est modérément affectée par l'insertion du T-DNA. Ces mutants sont donc hypomorphes (Fig. 65). Pour *HB33*, plusieurs couples d'amorces en qRT-PCR ont donné des résultats similaires, son expression n'est pas affectée chez le mutant *hb33*. Les mutants *hb33* et *hb29.1* ont donc été écartés pour la suite de l'étude. Concernant le mutant *hb29.2*, même si sa caractérisation n'est pas complète, de par l'absence d'une analyse qRT-PCR pour suivre l'expression de *HB29*, les résultats obtenus lors de l'analyse RT-PCR indiquent qu'il ne s'agit probablement pas d'un mutant nul (Fig. 64).

Etant donné que *HB30* et *HB33* sont des candidats clés pour notre étude sur le développement des parties aériennes, des stratégies alternatives ont été développées pour obtenir spécifiquement des mutants nuls ou hypomorphes. Ces stratégies sont développées dans la partie 4 de ce chapitre.

#### 2.2. Obtention de mutants multiples zfhd

Il est couramment observé dans les familles multigéniques, une compensation d'expression de certains membres lorsque d'autres membres sont mutés. Nous avons donc décidé qu'il était stratégique d'éteindre un maximum de gènes *ZFHD* candidats, fortement exprimés dans les apices caulinaires. D'après les résultats présentés dans le paragraphe précédent, 4 mutants nuls *zfhd* répondent à nos critères : *hb23*, *hb25*, *hb31* et *hb34*.

Il est nécessaire de préciser que le mutant *hb31* (SALKseq\_113591.1) possède un polymorphisme (AT2G47390) sur un autre chromosome que le gène *HB31* (AT1G14440). Les plantes possédant ce polymorphisme ont un phénotype bien caractéristique, avec une rosette très compacte, une floraison extrêmement précoce et une tige principale très chétive. De par ce phénotype facilement reconnaissable, nous avons pu contre-sélectionner ce polymorphisme lors des étapes de croisement et de génotypage. De plus, les phénotypes associés à la mutation des gènes *ZFHD*, qui seront décrits dans la partie suivante, s'avèrent être totalement à l'opposé de ceux observés pour ce polymorphisme.



### Figure 64. Caractérisation des mutants *zfhd* par PCR sur ADN complémentaire.

Résultats des PCR réalisées sur l'ADN complémentaire (ADNc) obtenu après rétrotranscription des ARN messagers extraits des simples mutants *zfhd*. Les amorces utilisées sont spécifiques pour chacun des gènes *ZFHD*. L'analyse de l'expression du gène *EF1alpha* est un contrôle pour valider la qualité des ADNc. Pour le détail de chacun des mutants présentés dans cette figure, se référer au tableau S2. L'obtention d'un multiple mutant zfhd, à partir des simples mutants d'insertion T-DNA confirmés, a été une priorité majeure tout au long de mes travaux de thèse. J'ai tout d'abord généré le double mutant hb23 hb34, puis le triple mutant hb23 hb31 hb34. A ce stade, des analyses préliminaires de compensation d'expression génique ont été conduites (Fig. S10). Les résultats montrent que l'expression de HB30 est plutôt stable chez les simples mutants zfhd, même si elle augmente légèrement chez certains d'entre eux. Par exemple, l'expression de HB30 augmente de 35% chez le simple mutant hb25 (Fig. S10A). Chez les deux multiples mutants zfhd générés, nous avons déterminé par gRT-PCR le niveau d'expression des 14 gènes ZFHD, en comparaison à des plantules contrôles Col-0. Bien que préliminaire, cette étude a révélé des différences de niveau d'expression pour certains gènes chez les deux multiples mutants. Pour faciliter l'analyse des résultats, un tableau récapitulatif comparatif a été réalisé (Fig. S10B). On peut voir que chez le double mutant hb23 hb34, 3 gènes sont réprimés, 6 gènes sont induits et 2 autres montrent une expression inchangée. Chez le triple mutant hb23 hb31 hb34, 2 gènes sont régulés négativement, 7 gènes sont induits et un gène reste stable. L'ensemble de ces résultats préliminaires se regroupent et suggèrent qu'une compensation se met en place chez les multiples mutants, avec notamment une induction de l'expression d'au moins 6 ZFHD chez le double et le triple mutant zfhd.

Dans l'optique d'obtenir d'autres combinaisons de multiples mutants *zfhd*, plusieurs croisements ont été effectués, et depuis peu, nous avons obtenu 3 nouveaux doubles mutants (*hb31 hb34, hb25 hb31* et *hb23 hb31*), 2 nouveaux triples mutants (*hb23 hb25 hb34* et *hb25 hb31* hb34) et un quadruple mutant (*hb23 hb25 hb31 hb34*). L'ensemble de ces mutants constitue un outil essentiel pour étudier le rôle des complexes ZFHD-DELLA sur le développement des hampes florales.

#### 3. Analyse morphologique des mutants *zfhd*

#### 3.1. Longueur de l'hypocotyle

Les analyses qRT-PCR ont montré que plusieurs gènes *ZFHD* sont fortement exprimés au stade plantule, dont *HB23*, *HB25* et *HB31*, pour lesquels, nous possédons des mutants nuls. De plus, il est décrit dans la littérature qu'une lignée anti-sens *hb25*, permettant de réduire l'expression de *HB25*, présente un hypocotyle plus court (Fig. 40) (Bueso et al., 2014). Déjà commenté dans l'introduction, nous savons également que la voie de signalisation des GA est impliquée dans l'élongation de l'hypocotyle par le biais d'interactions DELLA-DIP. Si nous



**Figure 65. Caractérisation des mutants** *zfhd* **par qRT-PCR sur ADN complémentaire.** Expression relative des gènes *ZFHD*, déterminée par qRT-PCR à partir d'ARN totaux issus d'inflorescences de différents mutants *zfhd*, chez *Arabidopsis thaliana*. Le niveau d'expression de chaque gène *ZFHD*, normalisé à partir de deux gènes de référence, est relatif à son expression dans les plantes contrôles Col-0, fixé arbitrairement à 1 en utilisant le logiciel LightCycler480 1.5.0 SP3. L'efficacité des amorces a été fixée arbitrairement à 2 pour cette expérience. L'erreur standard indique la variabilité technique de la qRT-PCR (n=3). rassemblons toutes ces informations, il devient pertinent d'analyser la longueur de l'hypocotyle chez les simples et les multiples mutants *zfhd*.

Nous avons ainsi initié une analyse morphologique, chez de jeunes plantules cultivées *in vitro*, en mesurant la longueur de l'hypocotyle. De manière intéressante, le simple mutant *hb25*, ainsi que tous les multiples mutants possédant la mutation *hb25* ont un hypocotyle plus court d'environ 20%, en comparaison à des plantules contrôles (Fig. 66). Ces résultats viennent donc étayer les données recensées dans la littérature, le gène *HB25* pourrait avoir un rôle majeur dans l'élongation de l'hypocotyle. Par ailleurs, de manière intéressante, la réduction de la taille de l'hypocotyle s'accentue chez le quadruple mutant *hb23 hb25 hb31 hb34*, par rapport au simple mutant *hb25*. Il est ainsi envisageable que d'autres ZFHD, comme HB23, HB31 et HB34 auraient (néanmoins, dans une moindre mesure) une fonction similaire et additive à HB25.

### 3.2. Etude du système racinaire

En regroupant les analyses de l'activité GUS chez les lignées rapportrices, ainsi que les qRT-PCR (Parties 2 et 3 du Chapitre 3 des résultats), nous avons émis une hypothèse selon laquelle la signalisation GA pourrait contrôler le développement racinaire via des interactions ZFHD-DELLA. Même si HB29 semble être le ZFHD principalement impliqué dans ce mécanisme, d'autres membres de cette famille multigénique pourraient avoir une fonction similaire ; notamment *HB23* et *HB34* qui sont exprimés, mais plus faiblement, dans les racines (Fig. 60).

Lors des analyses morphologiques, nous avons observé que le triple mutant *hb23 hb25 hb34* a une racine primaire plus courte que les autres multiples mutants (Fig. 67A). La mutation *hb31* pourrait alors avoir un effet opposé, d'après la longueur des racines primaires des triples mutants *hb25 hb31 hb34* et *hb23 hb31 hb34*. De manière générale, le triple mutant *hb23 hb25 hb34*, ainsi que le quadruple mutant *zhfd*, semblent avoir un système racinaire bien moins développé. En effet, la longueur totale des racines secondaires (Fig. 67B), tout comme leur nombre (Fig. 67C), illustrent deux paramètres fortement impactés, chez ces deux multiples mutants *zfhd*.





La longueur de l'hypocotyle de plantules sauvages (Col-0) et mutées *zfhd* âgées de 7 jours, cultivées en jours courts (8h lumière /16h obscurité) et à faible intensité lumineuse, a été mesurée. La distribution des valeurs est représentée sous forme de boxplot, et la moyenne des longueurs est indiquée par la barre noire horizontale à l'intérieur du rectangle. Deux réplicas biologiques ont été effectués et sont présentés en (A) et (B). L'analyse statistique (n compris entre 8 et 24) a été réalisée à l'aide d'un test de Welch (A) ou à l'aide d'un test Anova à deux facteurs suivi d'une comparaison de Tukey (B), p < 0.05.

#### 3.3. Mesure de la surface foliaire

D'autres paramètres morphologiques ont été mesurés à partir d'analyses effectuées en sol, chez les différents multiples mutants, à des stades plus avancés du développement. Dans un premier temps, à l'aide d'un script que nous avons développé à l'institut, utilisable avec le logiciel ImageJ, j'ai déterminé la surface foliaire d'un grand nombre de jeunes plantes. Nous remarquons que, lorsque les mutations *hb25* et *hb34* sont présentes chez un multiple mutant, les jeunes plantes présentent une surface foliaire plus petite (Fig. 68A). La surface foliaire chez les triples mutants *hb23 hb25 hb34* et *hb25 hb31 hb34*, ainsi que chez le quadruple mutant *zfhd*, est environ deux fois plus petite que chez les plantes contrôles (Col-0). Ces résultats viennent étayer ceux obtenus en conditions *in vitro*, les multiples mutants comprenant les mutations *hb25* et *hb34* présentent un retard de croissance qui est observable du stade plantule, jusqu'à la jeune plante.

Suite à l'analyse de ces résultats, nous avons jugé qu'il était important de réaliser une nouvelle série de croisements, afin d'obtenir le double mutant *hb25 hb34 ;* que nous avons récemment caractérisé à l'état homozygote. Dans la suite de cette étude morphologique des mutants *zfhd*, le phénotype du double mutant *hb25 hb34* sera donc observé à plusieurs stades clés du développement. Pour compléter notre étude, et associer une fonction plus précise à chaque ZFHD, certains paramètres ont également été mesurés chez les simples mutants *hb23, hb25, hb31* et *HB34*. Cette caractérisation morphologique complémentaire est d'autant plus intéressante, puisque nous ne pouvons pas écarter le fait que certains ZFHD puissent avoir un rôle d'activateur de la croissance, alors que d'autres membres de cette famille pourraient avoir une fonction répressive.

De ce fait, j'ai complété l'analyse en mesurant la surface foliaire des simples mutants *zfhd* et du double mutant *hb25 hb34*. Fait intéressant, les simples mutants *hb23, hb25, hb31* et *hb34* ont tous une surface foliaire plus petite que celle des plantes contrôles (Fig. 68B). Le double mutant *hb25 hb34* présente également un sévère retard de croissance avec une surface foliaire nettement affectée, tout comme le quadruple mutant, ainsi que les triples mutants *zfhd*, en comparaison à des plantes contrôles (Fig. 68B et C). Ces résultats indiquent que HB25 et HB34 exercent un rôle prédominant dans le contrôle de la croissance chez *Arabidopsis thaliana*.





Trois paramètres morphologiques du système racinaire ont été mesurés chez des plantules contrôles (Col-0) et mutées *zfhd* âgées de 14 jours, cultivées en jours longs (16h lumière / 8h obscurité) à une intensité lumineuse standard. (A) Moyenne de la longueur de la racine primaire, (B) somme de la longueur des racines secondaires et (C) nombre de racines secondaires. La distribution des valeurs est représentée sous forme de boxplot et la moyenne de chaque paramètres pour chaque lignée, est indiquée par une barre noire horizontale à l'intérieur de chaque rectangle. L'analyse statistique (n compris entre 7 et 20) a été réalisée à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis (A et B) ou à l'aide d'un test de Welch (C), p < 0,05. Les résultats d'un second réplica sont présentés en Fig. S11.

#### 3.4. Analyse de la transition florale

Dans la continuité de l'étude morphologique, nous avons ensuite analysé la transition florale chez les simples et les multiples mutants *zfhd*. Le fait que HB30, et possiblement d'autres ZFHD, soient fortement accumulés dans le méristème apical caulinaire à l'état végétatif et inflorescentiel, suggère que les ZFHD pourraient être impliqués dans le développement des parties aériennes dès l'émergence de la hampe florale principale.

Nous avons observé qu'une combinaison des mutations pour *hb25 hb34*, chez les multiples mutants *zfhd*, affecte la transition florale (Fig. 69A et B). Le double mutant *hb25 hb34* est fortement impacté, la transition florale intervient environ 9 jours après les plantes contrôles (Fig. 69). Cependant, il est admis que le paramètre clé qui détermine le temps de floraison est le nombre de feuilles rosettes, et non l'âge de la plante, au moment de l'initiation de la hampe florale. Dans notre étude, le nombre de feuilles semble être identique chez toutes les combinaisons de multiples mutants, en comparaison à des plantes contrôles (Fig. S12). Nous pouvons donc en conclure qu'une mutation des gènes *ZFHD* n'entraine pas spécifiquement un retard de floraison, mais impacte la croissance de la plante, du stade plantule jusqu'à l'initiation de la hampe florale.

#### 3.5. Analyse détaillée du développement des parties aériennes

Pour rappel, lors du crible réalisé par le laboratoire, une interaction HB30-DELLA a été observé à plusieurs reprises dans des apices caulinaires disséqués d'*Arabidopsis*. Nous avions alors émis une hypothèse selon laquelle les GA pourraient être impliquées dans le développement des parties aériennes des plantes, au moins en partie via des interactions DELLA-ZFHD. L'ensemble des résultats obtenus jusqu'ici, notamment les patrons d'expression et d'accumulation des ZFHD, soutiennent cette hypothèse. Par conséquent, nous avons caractérisé une série de paramètres au niveau des parties aériennes, après le développement de l'ensemble des ramifications et des inflorescences, chez des plantes adultes.

#### 3.5.1. Hauteur finale des plantes

Dans un premier temps, la hauteur des plantes a été mesurée 14 jours après floraison. Le quadruple mutant *zfhd* est environ 15% plus petit, en comparaison aux plantes contrôles (Fig. S13). Par la suite, la hauteur finale des plantes a été évaluée chez les multiples mutants *zfhd*, âgés de plus de 8 semaines, en mesurant la hauteur de la hampe florale principale. Nous





La surface foliaire de plantes contrôles (Col-0) et mutées *zfhd* a été mesurée sur des plantes âgées de 24 jours (A) et 17 jours (B), cultivées en jours longs (16h lumière / 8h obscurité). La distribution des valeurs est représentée sous forme de boxplot, la surface foliaire moyenne des plantes est indiquée par la barre noire à l'intérieur des rectangles. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test Anova à deux facteurs suivi d'une comparaison de Tukey (A) ou à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis (B), p < 0,05. (C) Photos représentatives d'une plante sauvage (Col-0), du double mutant *hb25 hb34* et du quadruple mutant *hb23 hb25 hb31 hb34* âgées de 4 semaines.

avons remarqué que la hampe florale principale est plus petite chez l'ensemble des multiples mutants comprenant les mutations *hb25* et *hb34* (Fig. 70A). Le double mutant *hb25 hb34* a une hauteur finale identique à celle du quadruple mutant *hb23 hb25 hb31 hb34*, leur tige dominante est environ 20% plus petite, en comparaison aux plantes contrôles (Fig. 70B et C).

#### 3.5.2. Etude de la ramification des parties aériennes

Pour réaliser une étude morphologique minutieuse de la ramification des hampes, je me suis concentré uniquement sur le quadruple mutant *hb23 hb25 hb31 hb34*, en comparaison à des plantes contrôles. J'ai tout d'abord compté le nombre total de hampes florales, incluant la tige principale, qui émergent de la rosette. Le quadruple mutant *zfhd* possède autant de hampes florales secondaires, et qui sont également de même longueur, que les plantes contrôles (Fig. 71A et B). Nous avons alors dénombré les branches secondaires qui émergent de ces hampes florales. Qu'il s'agisse de la tige principale ou des hampes florales secondaires, le quadruple mutant *zfhd* présente un nombre de branches secondaires identique aux plantes contrôles (Fig. 71C et D).

Enfin, la longueur du premier entre-nœud a été mesurée, sur la tige principale et sur les hampes florales secondaires. Fait intéressant, le premier entre-nœud de toutes les hampes florales est pratiquement 2 fois plus court chez le quadruple mutant *hb23 hb25 hb31 hb34*, en comparaison aux plantes contrôles (Fig. 71E et F). Une nouvelle étude morphologique, bien que préliminaire, suggère que le double mutant *hb25 hb34* présenterait un phénotype semblable au quadruple mutant *zfhd* (Fig. S14). Suite à ces résultats, nous avons jugé qu'il était pertinent d'approfondir cette analyse sur la longueur des entre-nœuds.

#### 3.5.3. Mesure de la longueur des entre-nœuds

Alors que la longueur des entre-nœuds est légèrement altérée chez les simples mutants *zfhd*, elle est très fortement impactée chez les multiples mutants. De manière générale, la longueur des 4 premiers entre-nœuds est réduite de moitié chez les multiples mutants *zfhd* comprenant les mutations *hb25* et *hb34* (Fig. 72A). En faisant la somme de la longueur des 4 premiers entre-nœuds, nous observons une différence moyenne de 7cm entre les plantes contrôles (somme totale = 14cm) et les multiples mutants *zfhd* (somme totale = 7cm). Pour rappel, la tige principale des multiples mutants comportant les mutations pour *hb25* et *hb34* est environ 15 à 20% plus petite, soit environ 7cm plus petite, que les plantes contrôles (Fig. 70B). Ces résultats mettent en évidence que la différence de taille observée chez les multiples mutants

#### Résultats





(A et B) Détermination du nombre jours moyens requis (après germination) pour que la tige d'une plante contrôle (Col-0) ou mutée *zfhd* émerge du centre de la rosette (temps de floraison). La valeur représentée sur l'histogramme indique le nombre de jours nécessaires pour que 50% de la population soit en fleur, pour chaque génotype. Les plantes analysées dans cette expérience ont été cultivées en jours longs (16h lumière / 8h obscurité). (C) Photos représentatives d'une plante sauvage (Col-0) et du quadruple mutant *hb23 hb25 hb31 hb34* âgées de 5 semaines.

*zfhd* est principalement liée à la longueur de leurs entre-nœuds. D'après nos observations préliminaires, la longueur de la seconde partie de la hampe florale, celle qui comporte les siliques, pourrait être légèrement affectée, mais dans une moindre mesure, chez les multiples mutants *zfhd* (Fig. 72B).

Il est important de noter que la longueur des entre-nœuds n'affecte pas uniquement la hauteur finale des plantes, elle contrôle également l'émergence des branches secondaires. Chez les multiples mutants *zfhd*, étant donné que tous les entre-nœuds sont plus courts, les points d'émergence de toutes les branches secondaires sont ainsi affectés.

Pour conclure, les multiples mutants *zfhd* présentent un retard de croissance, ils sont plus petits à cause d'une diminution de la longueur des entre-nœuds et le développement des parties aériennes est également impacté. Ces traits phénotypiques leur confèrent un aspect plus compact et buissonnant, en d'autres termes, trapu, rappelant le phénotype des mutants GA décrits précédemment dans l'introduction de cette étude (Fig. 9).

4. Stratégies alternatives pour obtenir des mutants hypomorphes ou nuls pour les gènes *HB30* et *HB33* 

Bien que nous ayons pu définir l'impact morphologique associé à une mutation de plusieurs *ZFHD* d'intérêts, les gènes *HB30* et *HB33*, pour lesquels il n'existe aucun mutant nul d'insertion T-DNA dans les collections, sont des candidats clés pour notre étude. Nous avons donc entrepris plusieurs stratégies complémentaires, afin d'obtenir des mutants nuls, ou hypomorphes, pour *HB30* et *HB33*.

#### 4.1. Les micro-ARN artificiels

Une première stratégie repose sur la génération de plusieurs micro-ARN artificiels (amiR) ciblant *HB30* seul ou en combinaison avec d'autres *ZFHD*, comme *HB23*, *HB33* et *HB34*. Après avoir introduit les constructions chez *Arabidopsis thaliana* (fond génétique Col-0), nous avons directement analysé l'effet de l'expression des amiR sur les gènes ciblés (effet dominant), par qRT-PCR, chez les plantes transformées de première génération. Malheureusement, nous n'avons pas obtenu une extinction suffisante lorsque l'amiR cible plusieurs *ZFHD*. Cependant, un amiR ciblant exclusivement le gène *HB30* montre une réduction d'environ 70% de l'expression du gène, en faisant une moyenne de plusieurs lignées indépendantes exprimant cet amiR (Fig. S15). Bien que ces lignées amiR ne présentent pas

#### Résultats





La hauteur finale de la hampe florale principale a été mesurée chez des plantes contrôles (Col-0) et chez plusieurs multiples mutants *zfhd* (A et B), âgés de plus de 8 semaines, cultivés en jours longs (16h lumière / 8h obscurité). La distribution des valeurs est représentée sous forme de boxplot, et la hauteur moyenne de chaque génotype est indiquée par une barre noire horizontale à l'intérieur du rectangle. L'analyse statistique (n compris entre 19 et 24) a été réalisée à l'aide d'un test Anova à deux facteurs suivi d'une comparaison de Tukey (A et B), p < 0,05. (C) Photos représentatives d'une plante sauvage (Col-0), des simples mutants *hb25* et *hb34*, du double mutant *hb25 hb34* et du quadruple mutant *hb25 hb31 hb34* âgées de 8 semaines.

de phénotype particulier (probablement lié à la redondance fonctionnelle), nous avons montré que l'expression d'un amiR pouvait être une bonne stratégie pour réduire l'expression de *HB30*.

### 4.2. La technique du CRISPR-Cas9

Nous avons initiée une autre stratégie pour obtenir des mutants nuls *hb30* et *hb33* (au contraire de la stratégie amiR), basée sur la méthodologie CRISPR-Cas9. Pour cela, nous avons introduit chez *Arabidopsis*, à la fois dans un fond génétique Col-0 et chez le quadruple mutant *hb23 hb25 hb31 hb34*, une construction (comprenant des ARN guides) ciblant spécifiquement ces deux gènes. Ces nouvelles lignées transgéniques sont en cours d'analyse et nous espérons pouvoir caractériser prochainement un sextuple mutant *zfhd*.

### 4.3. La fusion d'un domaine SRDX pour convertir HB30 en répresseur

En parallèle, une troisième stratégie a été employée, pour visualiser l'effet de la perte d'activité de HB30 en fusionnant un motif répresseur EAR (SRDX) au gène codant pour *HB30* (Hiratsu et al., 2003). Pour rappel, nous avions identifié précédemment que HB30 était un activateur de la transcription, à l'aide des tests d'activité transcriptionnelle (Chapitre 2, Partie 3.2). D'après nos connaissances sur cette famille multigénique, et en se basant sur la littérature, il est fort probable que HB30 hétérodimérise avec d'autres ZFHD pour activer la transcription de gènes cibles (Tan and Irish, 2006). Ainsi, en convertissant HB30 en facteur répresseur, cet outil présente un avantage considérable, il va permettre de réprimer de manière dominante la transcription de tous les gènes cibles de HB30 et d'autres ZFHD ayant une fonction redondante.

Plusieurs clonages ont été initiés (*p35S:HB30-SRDX* et *pHB30:HB30-SRDX*), sans avoir la possibilité d'obtenir des transformants primaires, après transformation d'*Arabidopsis thaliana*. Dans le but de contourner une probable létalité des transformants primaires, suspectée, et qui serait liée à une forte expression du facteur répresseur HB30-SRDX, une construction dont l'expression de *HB30-SRDX* est induite par ajout d'œstradiol, a été introduite chez *Arabidopsis*.

Au cours de la sélection des transformants, des lignées T2 pour cette construction ont pu être analysées sur milieu MS additionné d'œstradiol. Ces lignées présentent toutes des phénotypes plus ou moins sévères. Nous avons facilement pu analyser la ségrégation de ces





Pour analyser les effets des mutations *hb23 hb25 hb31 hb34* sur le développement des hampes florales, différents paramètres morphologiques ont été mesurés chez la plante contrôle (Col-0) et le quadruple mutant *hb23 hb25 hb31 hb34* âgés de plus de 8 semaines, cultivés en jours longs (16h lumière / 8h obscurité). (A) Nombre total de hampes florales, (B) hauteur moyenne des hampes florales secondaires, (C) nombre de branches secondaires sur la hampe florale principale, (D) nombre total de branches secondaires sur la hampe florale principale, (D) nombre total de branches secondaires sur la hampe florale principale, (D) nombre total de branches secondaires sur les hampes florales secondaires, (E) longueur du premier entre-nœud sur la hampe florale principale, et (F) longueur du premier entre-nœud sur les hampes florales secondaires. L'analyse statistique (n compris entre 22 et 24) a été réalisée à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis (A, B et C), à l'aide d'un test de Welch (E) et à l'aide d'un test Anova à deux facteurs suivi d'une comparaison de Tukey (D et F), p < 0,05. Les résultats d'un second réplica sont présentés en Fig. S14.

lignées, car il était aisé de discerner les plantes sensibles (ayant intégré notre construction HB30-SRDX et présentant un arrêt de croissance) des plantes insensibles à l'œstradiol (plantes sauvages) (Fig. 73A). Pour contrôle, nous avons récolté séparément les plantes dites « sensibles » et « insensibles » pour chacune des lignées, dans le but de réaliser des analyses qRT-PCR. Comme attendu, l'expression du gène *HB30* est plus forte (pour toutes les lignées indépendantes analysées), chez les plantes sensibles à l'œstradiol par rapport à celles qui ne montrent pas de phénotype. Pour rappel, les plantes sensibles à l'œstradiol, expriment à la fois l'endogène *HB30* et le transgène *HB30-SRDX* au contraire des plantes insensibles qui n'expriment que l'endogène. Pour la suite de l'étude, nous avons sélectionné la lignée HB30-SRDX #25 présentant un phénotype modéré (Fig. 73A).

Afin de définir les conditions d'induction de cette lignée, nous avons ensuite réalisé une cinétique après application d'œstradiol. Les résultats montrent que *HB30-SRDX* est détecté dès 2 heures après induction, et atteint une expression maximale 8 heures après induction (Fig. 73B). En parallèle, nous avons confirmé que l'application d'œstradiol n'affectait pas l'expression de *HB30* (endogène) chez les plantes contrôles (Fig. 73B).

Bien que la construction *HB30-SRDX* soit fortement exprimée (et induise un fort arrêt de croissance), il est important de vérifier qu'elle soit fonctionnelle. Pour ce faire, nous avons analysé l'expression de 3 gènes (*EFR1*, *HB2* et *PIF7*) qui sont, dans un contexte génétique sauvage, régulés de manière positive par les facteurs de transcription ZFHD (d'après Perrella et al., 2018). Les analyses qRT-PCR mettent en évidence que ces 3 gènes sont réprimés, suite à une induction à l'œstradiol, chez la lignée HB30-SRDX #25 (Fig. 73C). Au contraire, chez une lignée qui surexprime *HB30* (voir partie 5 ci-après), la transcription de ces 3 gènes cibles augmente fortement, en comparaison à des plantes contrôles (Fig. 73C). La construction *HB30-SRDX* est donc bien fonctionnelle.

En conclusion, même si la stratégie Crispr-Cas9 pour obtenir des mutants nuls *hb30* et *hb33* est toujours en cours de développement, nous avons pu développer deux outils majeurs : un amiR permettant de diminuer l'expression de *HB30* d'environ 70% et une construction permettant de convertir HB30 en un facteur répresseur. Ces outils pourront être utilisés pour affiner les résultats de l'étude morphologique réalisée sur les mutants *zfhd* et définir la fonction biologique des interactions ZFHD-DELLA au cours du développement des plantes.



#### Figure 72. Mesure de la longueur des entre-nœuds chez les mutants *zfhd*.

- A. La longueur des entre-nœuds, sur la hampe florale principale, a été mesurée chez des plantes contrôles (Col-0) et chez plusieurs multiples mutants *zfhd*. Les plantes analysées dans cette expérience sont âgées de plus de 8 semaines et ont été cultivées en jours longs (16h lumière / 8h obscurité). L'écart-type pour chaque condition (n compris entre 19 et 22) est indiqué.
- B. Photos représentatives de la hampe florale principale d'une plante sauvage (Col-0), du double mutant *hb25 hb34* et du quadruple mutant *hb23 hb25 hb31 hb34* âgés de plus de 8 semaines.

5. Etude de l'impact d'une suraccumulation de HB30 sur la croissance des plantes

Pour approfondir notre étude sur la fonction des ZFHD, nous avons également entrepris la construction de lignées surexpresseurs pour différents *ZFHD* sélectionnés en chapitre 3. Alors que les lignées surexpresseurs pour *HB23*, *HB25* et *HB29* et *HB34* sont en cours d'obtention, des lignées *p35S:HB30-GFP* ont déjà été obtenues et caractérisées.

Lors d'une première étape de sélection, j'ai analysé le niveau d'expression de *HB30* au sein de différentes lignées transgéniques indépendantes. Toutes ces lignées surexprimaient *HB30* avec un facteur de 2 à 12 par rapport aux plantes contrôles (Fig. 74A) ; la lignée #27 montrant le plus fort niveau d'expression. Pour étendre l'étude, j'ai analysé le niveau d'expression de *HB30* chez d'autres lignées indépendantes, et fait intéressant, j'ai observé qu'il y avait une stricte corrélation entre le niveau d'expression de *HB30* et la croissance de la plante (Fig. 74B). En effet, une forte accumulation de HB30 affecte grandement le développement des plantes, entrainant un arrêt total de la croissance après une initiation très rapide d'une hampe florale chétive. Il est donc impossible d'obtenir une lignée stable accumulant fortement HB30, puisque les plantes sont stériles. La lignée *p35S:HB30-GFP* #27, bien qu'elle ne puisse pas être caractérisée à l'état homozygote stable, est actuellement un des meilleurs candidats que nous possédons et qui pourra être utilisé pour de futures expériences. Par ailleurs, nous avons déjà utilisé avec succès la lignée #27 dans la partie précédente de cette étude, pour analyser l'expression de gènes cibles de HB30.

#### 6. Discussion du chapitre 4

Après la caractérisation des simples mutants *hb23*, *hb25*, *hb31* et *hb34*, nous avons obtenu par croisements, plusieurs multiples mutants *zfhd*, dont le quadruple mutant *hb23 hb25 hb31 hb34*. Pour conclure quant aux analyses morphologiques réalisées sur ces mutants *zfhd*, il semblerait que HB25 joue un rôle important tout au long du développement de *Arabidopsis*. Quand *HB25* et *HB34* sont mutés en combinaison, le phénotype semble davantage marqué. Nous pensons, d'après ces analyses, que les FT HB25 et HB34 sont des activateurs de la transcription, comme HB30. Le FT HB31 pourrait avoir un rôle répresseur, nous avons vu dans plusieurs analyses que le triple mutant *hb25 hb31 hb34* a toujours un phénotype moins marqué, alors qu'il y a bien la combinaison *hb25 hb34*. Le triple mutant *hb23 hb31 hb34*, qui ne possède pas la mutation pour *HB25*, a presque toujours un phénotype identique au contrôle au cours des différents stades de développement analysés.



**Figure 73. Etude fonctionnelle de la construction inductible** *HB30-SRDX***.** Les résultats présentés dans cette figure ont été obtenus par analyse qRT-PCR. L'efficacité des amorces a été fixée arbitrairement à 2. L'erreur standard indique la variabilité technique de la qRT-PCR (n=3).

- A. Des plantes de la lignée transgénique HB30-SRDX #25 de seconde génération (lignée ségrégant T2) ont été cultivées pendant 14 jours sur milieu MS avec 50 μM œstradiol. Deux populations de plantes sont visibles: <sup>3</sup>/<sub>4</sub> de petites plantes (inhibition de croissance) et un <sup>1</sup>/<sub>4</sub> de plantes de tailles équivalentes à des plantes contrôles (Col-0). En noir, expression relative de HB30 chez les grandes plantes (fixé arbitrairement à 1) et en orange, l'expression de HB30 chez les plantes naines, sensibles à l'œstradiol.
- B. Expression relative de *HB30* au cours d'une cinétique d'induction à l'œstradiol (0h à 24h) chez des plantules (âgées de 10 jours à la fin de la cinétique) sauvages (Col-0, à gauche) et chez la lignée T2 *HB30-SRDX #*25 (à droite). L'expression de *HB30* est fixée arbitrairement à 1 au T0 de l'induction. Les plantes ont été cultivées 9 jours sur milieu MS solide puis 24h en milieu MS liquide (avec ou sans œstradiol).
- C. Expression relative de 3 gènes cibles potentiels de HB30 (Perrella et al., 2018) chez la lignée T2 HB30-SRDX #25 (à gauche, chez des plantules insensibles ou sensibles à l'œstradiol) et chez une lignée surexprimant HB30 (à droite, en comparaison à des plantes contrôles Col-0). La valeur de chaque gène cible a été fixé arbitrairement à 1, chez des plantes insensibles (à gauche) ou chez les plantes contrôles Col-0 (à droite). Les plantes ont été cultivées 14 jours sur milieu MS solide (avec ou sans œstradiol).

Pris dans leur ensemble, ces résultats ont révélé un rôle clé des ZFHD, au stade plantule, sur la croissance de l'hypocotyle et le développement du système racinaire. La fonction des ZFHD ne s'arrête pas là, ils sont également impliqués dans le développement de *Arabidopsis* à des stades plus avancés, notamment au stade rosette (végétatif) ou au cours de la transition florale. Enfin, les ZFHD contrôlent le développement des parties aériennes (hauteur et ramification des plantes) chez *Arabidopsis*, en régulant principalement la longueur des entrenœuds. Les phénotypes de retard de croissance observés chez les lignées surexpresseurs *HB30* suggèrent également l'implication notoire des ZFHD dans la croissance des plantes. En reprenant l'ensemble des résultats, et en considérant que les DELLA séquestrent les ZFHD pour bloquer leur activité transcriptionnelle, il est vraisemblable que la signalisation GA contrôle le développement des plantes, en partie, via son effet sur les FT ZFHD.

Les stratégies alternatives évoquées dans ce chapitre sont autant d'outils complémentaires qui seront pertinent pour affiner la fonction biologique des ZFHD tout en définissant le rôle précis de HB30. Pour rappel, en plus d'être le *ZFHD* le plus fortement exprimé dans les inflorescences, HB30 a été identifié comme interagissant aux protéines DELLA à partir d'ADNc provenant d'inflorescences d'*Arabidopsis*. Il sera donc intéressant de se focaliser davantage sur cet aspect morphologique, pour de futures analyses phénotypiques visant à définir la fonction biologique des interactions HB30-DELLA.

# Chapitre 5 : Caractérisation du régulon ZFHD et implication de la voie de signalisation des GA dans sa régulation

#### 1. Introduction du chapitre 5

Les études moléculaires et morphologiques réalisées dans les chapitres précédents ont mis en évidence l'implication des interactions ZFHD-DELLA dans la modulation de la croissance des plantes, à plusieurs stades clés du développement. Dans ce dernier chapitre, nous avons étudié le régulon (cibles directes et secondaires) du complexe transcriptionnelle ZFHD-DELLA.

Tout d'abord, une analyse RNA-seq a permis d'identifier plusieurs gènes candidats (potentiels cibles directes des ZFHD) qui sont décrits dans la littérature pour leur rôle à différents stades clés du développement. Nous avons recherché l'élément *cis* consensus reconnu par les ZFHD (Fig. 52), dans les régions promotrices de l'ensemble des gènes candidats. En parallèle, pour préciser le régulon ZFHD, une caractérisation des cibles secondaires a été conduite.



#### Figure 74. Caractérisation des lignées surexpresseurs pour HB30.

- A. Expression relative de *HB30*, déterminée par qRT-PCR à partir d'ARN totaux issus de plantules âgées de 14 jours, chez plusieurs lignées indépendantes exprimant la construction *p35S:HB30-GFP* (transformants primaires). Le niveau d'expression de *HB30* chez les différentes lignées, normalisé à partir de deux gènes de référence, est relatif au niveau d'expression de *HB30* chez des plantes contrôles (Col-0), fixé arbitrairement à 1 en utilisant le logiciel LightCycler480 1.5.0 SP3. L'efficacité des amorces a été fixée arbitrairement à 2 pour cette expérience. L'erreur standard indique la variabilité technique de la qRT-PCR (n=3).
- B. En bas, Immuno-détection des protéines HB30-GFP à l'aide d'un anticorps anti-GFP dans des extraits protéiques totaux issus de différentes lignées indépendantes exprimant la construction *p35S:HB30-GFP* (lignées différentes de celles analysées en A). La quantité totale de protéines déposée dans chaque puits est mise en évidence par une coloration au bleu de Coomassie. En haut, photo représentative des plantes transgéniques âgées d'environ 5 semaines, analysées par Western Blot.

Après avoir confirmé les gènes cibles des ZFHD, l'analyse de l'effet des GA sur le régulon ZFHD devient primordiale. Dans l'attente de ces résultats, j'ai observé les conséquences de l'accumulation d'une protéine DELLA non dégradable (gai), dans les territoires d'expression des *ZFHD* (expression ectopique de *gai*), sur le développement d'*Arabidopsis*.

#### 2. Caractérisation du régulon ZFHD par RNA-seq

Pour étudier le régulon ZFHD, c'est à dire caractériser l'ensemble des gènes régulés par les ZFHD (cibles directes et indirectes), nous avons déterminé le transcriptome de lignées dont l'activité transcriptionnelle d'un ZFHD est altérée. Etant donné que les ZFHD reconnaissent et interagissent au même élément *cis* (Fig. 52), nous présumons que leur fonction est déterminée par leur patron d'expression plutôt que par leur activité, même si nous ne pouvons pas exclure, à ce stade de l'étude, que certains ZFHD puissent avoir une activité transcriptionnelle plus ou moins élevée (ou opposée), que d'autres (voir Discussion du Chapitre 4 des résultats). Dans ce contexte, nous avons choisi d'effectuer l'étude transcriptomique avec deux lignées transgéniques différentes (étudiées dans le chapitre précédent), qui expriment de manière constitutif HB30. La première est la lignée inductible pXVE:HB30-SRDX qui présente le double avantage d'exprimer de manière conditionnelle HB30-SRDX (après induction à l'œstradiol) et de réprimer de manière dominante (via le domaine répresseur SRDX) la transcription de gènes cibles, même en présence de ZFHD endogènes fonctionnellement redondants (mimant ainsi, un multiple mutant *zfhd*). La deuxième lignée utilisée, qui est complémentaire à la première, surexprime HB30 (p35S:HB30-GFP). Si la première lignée a pour objectif principal d'identifier les cibles directes des ZFHD (après induction courte à l'œstradiol), la seconde tentera d'identifier les cibles secondaires (même si en théorie, les deux lignées permettront d'identifier à la fois des cibles directes et secondaires). Pour simplifier la compréhension des résultats, les deux lignées seront ci-après dénommées HB30-SRDXind (lignée pXVE:HB30-SRDX induite) et HB30OE (lignée *p35S:HB30-GFP*). J'utiliserai le terme DEG pour définir les gènes différentiellement exprimés, et les termes UP et DOWN pour indiquer les groupes de gènes qui sont induits ou réprimés, respectivement.

Même si l'étude est axée principalement sur le développement des parties aériennes de la plante, nous avons fait le choix de caractériser le régulon ZFHD au stade plantules (âgées de 10 jours) essentiellement pour deux raisons. La première et principale raison, est qu'il est extrêmement difficile d'induire efficacement à l'œstradiol des plantes adultes cultivées en terre. Au contraire, ce système fonctionne efficacement en culture liquide *in vitro*, après des temps





- A. L'ensemble des gènes différentiellement exprimés (DEG) chez la lignée pXVE:HB30-SRDX induite à l'œstradiol (24h) en comparaison à la lignée pXVE:HB30-SRDX noninduite (log<sub>2</sub>FC, axe des abscisses) sont représentés par des points en fonction du – Log<sub>10</sub>(p-valeur ajustée).
- B. L'ensemble des gènes différentiellement exprimés (DEG) chez la lignée p35S:*HB30-GFP* en comparaison aux plantules contrôles Col-0 (log<sub>2</sub>FC, axe des abscisses) sont représentés par des points en fonction du –Log<sub>10</sub>(p-valeur ajustée).

La ligne horizontale indique le seuil significatif pour les DEG (p < 0,05). Les gènes régulés positivement ou négativement sont indiqués avec des points rouges ou bleus, respectivement (seuils  $\log_2 FC < -1$  et > +1). Les gènes qui ne sont pas différentiellement exprimés sont indiqués par des points gris. Les Volcano plots présentés dans cette figure ont été obtenus à l'aide du logiciel VolcaNoseR. FC : Fold Change.

de cinétique courts, de quelques heures à plusieurs jours. La deuxième raison du choix d'étudier le régulon au stade plantule, repose sur le fait que les ZFHD sont fortement exprimés à ce stade de développement (dans l'hypocotyle, le méristème caulinaire, les cotylédons et la racine) et que les multiples mutants *zfhd* montrent de sévères phénotypes de croissance au stade plantule. L'analyse transcriptomique, effectuée par RNAseq (réalisée par la société Microsynth), a donc été faite au stade plantules de 10 jours cultivées *in vitro*, en condition jours longs (16h de lumière / 8h d'obscurité), à 22°C. Les plantules HB30-SRDX ont été cultivées pendant 9 jours sur milieu MS gélosé puis transférées en milieu MS liquide (contrôle non induit) ou supplémenté avec 50 µM d'œstradiol. Même si HB30-SRDX est induit dès les premières heures après incubation des plantules dans l'œstradiol, le pic d'expression est observé après 8-12h (Fig. 73B). Pour caractériser un maximum de gènes cibles, nous avons opté de faire le RNAseq sur des plantules induites à l'œstradiol pendant 24h (reprenant la méthode effective, d'une autre étude réalisée avec la lignée pXVE :TCP3-SRDX (Koyama et al., 2010)). Les plantules HB30OE (et Col-0 pour contrôle), quant à elles, ont été cultivées pendant 10 jours sur milieu MS gélosé, dans les mêmes conditions que les plantules HB30-SRDX. Les ARN totaux préparés au laboratoire à partir de 3 réplicats biologiques pour chacune des 4 modalités (HB30-SRDXind et HB30-SRDX, HB30OE et Col-0), ont été envoyés à la compagnie, après vérification de leur intégrité au BioAnalyser, pour séquençage par Illumina Novaseg. 1 627 627 616 reads (de 51 bases de longueur moyen) ont été obtenus au total. Une analyse en composantes principales ou PCA (Principal Component Analysis) a été réalisée à partir des données obtenues pour l'ensemble des modalités de l'expérience (Fig. S16). Les résultats de la PCA confirment que les transcriptomes de nos réplicats biologiques sont très similaires. Par ailleurs, cette analyse statistique met en évidence que le traitement à l'œstradiol chez les lignées HB30-SRDX correspond au facteur majeur (Principal Component 1), responsable des différences observées entre les transcriptomes.

La première analyse globale révèle que l'induction de *HB30-SRDX* induit l'expression de 2900 gènes et réprime celle de 500 gènes (seuil  $\log_2$ FC fixé à +1 et -1, respectivement, avec une p-valeur ajustée < 0,05) (Fig. 75A). A titre de contrôle, *HB30* est retrouvé dans la liste des gènes fortement induits ( $\log_2$ FC=4,65), correspondant à *HB30-SRDX*. La seconde analyse révèle que la surexpression de *HB30* induit l'expression de 540 gènes et réprime celle de 612 gènes (seuil  $\log_2$ FC +1 et -1, respectivement, avec une p-valeur ajustée < 0,05) (Fig. 75B). Le gène *HB30* est également retrouvé induit ( $\log_2$ FC=4,86).



## Figure 76. Analyse comparative entre les DEG DOWN, chez HB30-SRDXind et les DEG UP, chez HB30OE.

- A. Diagramme de Venne représentant les DEG DOWN chez HB30-SRDXind (log<sub>2</sub>FC < -1) et les DEG UP chez HB30OE (log2FC > 1); avec p-valeur ajustée < 0,05. Pour chaque condition, deux informations sont indiquées : le nombre de DEG et le % des DEG totaux associé. Le diagramme de Venne présenté a été obtenu à l'aide du logiciel VENNY v2.1.</p>
- B. Analyse fonctionnelle par GO (Gene Ontology) des DEG ayant un log<sub>2</sub>FC < -1 chez HB30-SRDXind tout en ayant un log2FC > 1 chez HB30OE; avec p-valeur ajustée < 0,05. L'analyse d'enrichissement GO permet de regrouper les DEG par rapport à leurs fonctions biologiques. Un arbre de classification hiérarchique résume les corrélations entre les principales fonctions listées. Le diamètre du point bleu représente la significativité de la p-valeur. Les analyses GO ont été réalisées à l'aide du logiciel ShinyGo v0.76.
- C. Analyse fonctionnelle par GO des DEG ayant un log<sub>2</sub>FC < -1 chez HB30-SRDXind et qui ne sont pas induits chez HB30OE; avec p-valeur ajustée < 0,05. DEG : Gènes différentiellement exprimés ; FC : Fold Change ; GO : Gene Ontology.

#### 2.1. Recherche de gènes cibles candidats

Dans le but de déterminer les gènes cibles directs des ZFHD, une analyse comparative a été réalisée entre les DEG DOWN chez HB30-SRDXind et les DEG UP chez HB30OE. Cette analyse a permis de dresser une liste de 85 gènes co-régulés (8,9% des DEG totaux) (Fig. 76A). Ces gènes sont des cibles directes hautement probables. Une analyse d'enrichissement GO (Gene Ontology), permettant de regrouper les DEG par rapport à leurs fonctions biologiques, révèle que ces 85 gènes appartiennent essentiellement à deux groupes fonctionnels ayant un rôle dans la synthèse et l'organisation de la paroi cellulaire, et à un degré moindre, dans la réponse aux stress oxydants/ROS (dérivés réactifs de l'oxygène) (Fig. 76B).

Par ailleurs, dans cette même analyse comparative, nous avons identifié 415 DEG réprimés uniquement chez HB30-SRDXind (ces gènes ne sont pas retrouvés chez HB30OE). Il s'agit donc de gènes cibles candidats, mais avec une certitude moins élevée. L'analyse GO réalisée sur ces 415 DEG, révèle que ces gènes sont principalement impliqués dans l'organisation de la paroi cellulaire, dans la différenciation cellulaire mais également dans le développement racinaire et dans la réponse aux hormones (auxine et cytokinine) (Fig. 76C).

Par ailleurs, parmi les 500 DEG DOWN identifiés chez HB30-SRDXind (85 + 415), nous retrouvons une liste de quelques gènes exerçant des rôles importants à différents stades clés du développement. Parmi ces gènes, nous avons identifié par exemple 3 gènes, CLE2, CLE4 et CLE7 codant pour des polypeptides appartenant à la famille CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION-RELATED (CLE), composée de 32 gènes. Les peptides CLE, bien qu'ils ne soient pas tous caractérisés, sont connus pour jouer un rôle important dans différents processus développementaux ; ils ont également un rôle de médiateurs en réponse aux stress environnementaux (revu par Fletcher, 2020). Un autre candidat, le gène BT5, régulé par l'auxine, code pour la protéine BTB AND TAZ DOMAIN protein 5 (BT5), appartenant à une famille de 5 membres chez Arabidopsis (BT1-BT5), et impliquée dans le développement des graines (Robert et al., 2009). A des stades plus précoces du développement, le gène RADIALIS-LIKE SANT/MYB 1 (RSM1) joue un rôle important dans le développement embryonnaire et le développement des plantules (Yang et al., 2018). Le gène ASL5, un homologue des gènes Asymetric leaves(AS)/Lateral organ boundary (LOB), contrôle quant à lui le développement des feuilles et la dominance apicale (Nakazawa et al., 2003). Plus intéressant, nous avons identifié 2 gènes qui semblent particulièrement pertinent dans le cadre de la thèse. Le gène MACCHI-BOU 4 (MEL4) code pour une protéine qui régule la distribution des PIN, contrôlant ainsi le transport polarisé de l'auxine, ainsi que le développement des



### Figure 77. Recherche du motif reconnu par les ZFHD chez les gènes cibles candidats.

Diagramme de Venne représentant les DEG DOWN chez HB30-SRDXind ( $\log_2$ FC < -1) et les DEG UP chez HB30OE ( $\log_2$ FC > 1) qui ont été analysés dans cette expérience *in silico*. Pour chaque condition, le motif indiqué a été recherché spécifiquement dans les séquences de 1000 paires de base en amont du départ de transcription de chaque DEG. Deux paramètres ont été étudiés, le nombre de DEG possédant l'élément *cis* (en %) dans chaque condition puis le nombre moyen d'élément *cis* retrouvé chez ces DEG (p-valeur < 0,0001 et E-valeur < 10). Le motif recherché à été défini après avoir aligné les éléments *cis* reconnus par plusieurs ZFHD (Fig. 52). La fréquence aléatoire d'apparition des nucléotides utilisée lors de la recherche de l'élément *cis* est la suivante : A 0.275 C 0.225 G 0.225 T 0.275. Les régions promotrices ont été obtenus à l'aide du logiciel Sequence Bulk Download et la recherche d'élément *cis* à l'aide des logiciels FIMO et MAST v.5.4.1. Le diagramme de Venne présenté a été obtenu à l'aide du logiciel VENNY v2.1. DEG : Gènes différentiellement exprimés

\*La liste des éléments *cis* identifiés chez les DEG co-régulés (41,5%) est disponible (Fig. S17).

plantes (Furutani et al., 2011). Le gène *CUC2*, codant pour un facteur de transcription, constitue également une cible d'intérêt, car il limite la croissance au niveau des feuilles et du méristème apical caulinaire en inhibant la prolifération cellulaire (Li et al., 2020). Enfin, il convient de noter que dans cette liste de gènes cibles candidats, est aussi retrouvé *GA3ox1*, qui code pour une enzyme impliquée dans la dernière étape du métabolisme GA (Hu et al., 2008a; Mitchum et al., 2006).

Pour aller plus loin dans l'analyse des gènes cibles, nous avons recherché dans un deuxième temps, la présence d'au moins un élément cis reconnu par les ZFHD (défini en Fig. 52) dans la région promotrice (1000 paires de base en amont du départ de la transcription) de tous les gènes cibles candidats. Lors de l'analyse comparative entre les DEG DOWN chez HB30-SRDXind et DEG UP chez HB30OE, nous avions obtenu une liste de 85 gènes ; des cibles directes hautement probables (Fig. 76A). Parmi 82 gènes analysés dans cette liste (nous n'avons pas obtenu les séquences promotrices de 3 gènes), 41,5% d'entre eux (34/82) possèdent au moins un élément cis reconnu par les ZFHD dans leur région promotrice (Fig. 77). Au contraire, parmi les 415 gènes exclusivement réprimés chez HB30-SRDXind (Fig. 76A), seuls 25,3% d'entre eux (104/411) possèdent au moins un élément cis. Une analyse similaire a été faite sur les 455 DEG exclusivement induits chez HB30OE (Fig. 76A), seuls 15,8% des gènes possèdent au moins un élément *cis* dans leur promoteur (70/444; Fig. 77). Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent fortement que la liste des DEG DOWN chez HB30-SRDXind est enrichie en cibles directes, alors que celle des DEG DOWN et UP chez HB30OE contient essentiellement des cibles secondaires. Il est important également de noter, que si la liste des DEG DOWN chez HB30-SRDXind est enrichie en élément cis, le ratio motif/gène reste identique pour chacune des listes. Enfin, fait important, tous les DEG précédemment sélectionnés pour leur fonction importante au cours du développement (CLE, BT5, ASL5, MEL4, CUC2, GA3ox1) contiennent tous dans leur région promotrice la présence d'au moins une copie de l'élément cis reconnu par les ZFHD (Fig. 77).

Si nous nous sommes intéressés jusqu'à présent aux DEG DOWN chez HB30-SRDXind, il y a néanmoins, à notre grande surprise, une majorité de DEG UP pour cette condition (2900 gènes ; Fig. 75A). Dans le but de déterminer s'il s'agit ou non, de cibles secondaires, nous avons conduit deux analyses comparatives, entre les DEG UP chez HB30-SRDXind, et les DEG UP ou DOWN chez HB30OE (Fig. 78). L'analyse GO réalisée sur les DEG qui sont à la fois UP chez HB30-SRDXind et UP chez HB30OE (179 gènes co-régulés), montre que ces gènes sont principalement impliqués dans la réponse au stress hypoxique (Fig. 78A) ; ces



## Figure 78. Analyse comparative entre les DEG UP, chez HB30-SRDXind et les DEG UP ou DOWN, chez HB30OE.

- A. Diagramme de Venne et analyse par GO (Gene Ontology) des DEG UP chez HB30-SRDXind ( $log_2FC > 1$ ) et des DEG UP chez HB30OE ( $log_2FC > 1$ ).
- B. Diagramme de Venne des DEG UP chez HB30-SRDXind ( $log_2FC > 1$ ) et des DEG DOWN chez HB30OE ( $log_2FC < -1$ ).
- C. Analyse par GO de l'ensemble des DEG UP chez HB30-SRDXind.

Pour les diagrammes de Venne : Pour chaque condition, deux informations sont indiquées : le nombre de DEG et le % des DEG totaux associé. Les diagrammes de Venne présentés ont été obtenu à l'aide du logiciel VENNY v2.1.

Pour l'analyse fonctionnelle par GO : L'analyse d'enrichissement GO permet de regrouper les DEG par rapport à leurs fonctions biologiques. Un arbre de classification hiérarchique résume les corrélations entre les principales fonctions listées. Le diamètre du point bleu représente la significativité de la p-valeur. Les analyses GO ont été réalisées à l'aide du logiciel ShinyGo v0.76. DEG : Gènes différentiellement exprimés.

gènes sont probablement des cibles secondaires. En parallèle, l'analyse GO réalisée sur les DEG qui sont à la fois UP chez HB30-SRDXind et DOWN chez HB30OE (131 gènes co-régulés), n'a pas permis d'identifier de fonctions communes précises pour ces gènes (Fig. 78B). Pour finir, nous avons conduit une analyse GO sur l'ensemble des 2900 DEG UP chez HB30-SRDXind (Fig. 78C). Fait intéressant, les fonctions surreprésentées sont associées aux réponses au stress biotique et abiotique (p-valeur la plus faible). L'expression de la majorité de ces gènes est donc vraisemblablement associée au traitement à l'œstradiol permettant d'induire l'expression de la construction *HB30-SRDX*. Nous retrouvons tout de même des gènes dont la fonction est associée aux réponses à l'hypoxie, ces gènes pourraient être des cibles secondaires.

#### 2.2. Recherche de cibles secondaires

Dans la partie précédente, nous avons identifié un certain nombre de gènes pouvant être des cibles secondaires (notamment parmi les DEG UP chez HB30-SRDXind) et qui ont un rôle dans la réponse à l'hypoxie. Pour affiner la recherche de cibles secondaires, nous avons effectué une analyse GO sur les DEG UP et DOWN, identifiés chez HB30OE (Fig. 79). Une première analyse GO, sur les 540 DEG UP chez HB30OE, indique qu'un grand nombre de gènes ont un rôle dans la réponse au stress hypoxique (Fig. 79A). Nous retrouvons également des gènes impliqués dans la réponse à la déficience nutritionnelle au niveau racinaire. Une seconde analyse GO, sur les 612 DEG DOWN identifiés chez HB30OE, n'a pas permis d'identifier de fonctions principales pour ces gènes, nous retrouvons une multitude de fonctions associées à la détoxification des radicaux oxygénés, au transport d'ions ou à la réponse au stress (Fig. 79B).

## 3. Effet de l'accumulation d'une protéine DELLA non-dégradable, dans les territoires d'expression d'un *ZFHD*, sur le développement d'*Arabidopsis*

Une fois que nous aurons confirmé les gènes cibles des ZFHD, identifiés à l'aide de l'approche transcriptomique, nous pourrons analyser rigoureusement l'effet des GA sur le régulon ZFHD par des approches pharmacologiques. Dans l'attente de ces résultats, j'ai entrepris le clonage d'une construction permettant d'exprimer une protéine DELLA non-dégradable (gai, Peng et al., 1997) dans les territoires d'expression de *HB23*. Le promoteur du gène *HB23* est idéal pour cette stratégie car il fortement actif à plusieurs stades de développement (Fig. 59), en plus d'être un proche homologue de *HB30*. Par ailleurs, nous possédons un mutant nul d'insertion T-DNA pour le gène *HB23*, ce qui nous a permis de corréler les phénotypes

#### Résultats



## Figure 79. Analyse des DEG UP ou DOWN chez HB30OE – Recherche de cibles secondaires des ZFHD.

A. Analyse par GO (Gene Ontology) de l'ensemble des DEG UP chez HB30OE (log<sub>2</sub>FC > 1).

B. Analyse par GO de l'ensemble des DEG DOWN chez HB30OE ( $log_2FC < -1$ ).

L'analyse d'enrichissement GO permet de regrouper les DEG par rapport à leurs fonctions biologiques. Un arbre de classification hiérarchique résume les corrélations entre les principales fonctions listées. Le diamètre du point bleu représente la significativité de la p-valeur. Les analyses GO ont été réalisées à l'aide du logiciel ShinyGo v0.76. DEG : Gènes différentiellement exprimés.

observés. Après transformation des plantes, j'ai sélectionné deux lignées transgéniques accumulant à des niveaux différents la protéine DELLA non-dégradable, et suivi leur développement (Fig. 80A). J'ai analysé la surface foliaire, ainsi que la transition florale chez ces deux lignées (#1 et #2), en comparaison à des plantes contrôles (Col-0) et au quadruple mutant *hb23 hb25 hb31 hb34*. La lignée #1, accumulant fortement gai, présente une surface foliaire nettement plus petite, en comparaison aux plantes contrôles Col-0 (Fig. 80A). Aussi, la transition florale est fortement impactée chez la lignée #1, avec un retard d'environ 8 jours par rapport aux plantes contrôles (Fig. 80B). Ces phénotypes morphologiques sont moins sévères chez la lignée #2, qui exprime plus modérément *gai*.

En conclusion, une forte accumulation de la protéine gai, dans les territoires d'expression de *HB23*, réprime le développement des plantes. Ces résultats sont cohérents avec le fait que les protéines DELLA inhibent l'activité transcriptionnelle des ZFHD (Fig. 56) ; les phénotypes observés sont similaires aux multiples mutants *zfhd*.

#### 4. Discussion du chapitre 5

Des études antérieures démontrent que le gène GA3ox2, codant pour une enzyme de la voie de biosynthèse des GA, est induit chez le surexpresseur HB25 (Bueso et al., 2014). Dans le cadre de notre étude, nous avons démontré que le gène GA3ox1, codant pour une enzyme ayant la même fonction que GA3ox2, se trouve réprimé quand HB30-SRDX est induit, ce qui étaye l'hypothèse que les ZFHD pourraient moduler la biosynthèse des GA. Par ailleurs, il a été démontré que les surexpresseurs HB25 accumulaient davantage de GA bioactives (GA1 et  $GA_4$ ) en comparaison à des plantes contrôles (Bueso et al., 2014). Fait intéressant, les auteurs de cette étude ont également mis en évidence que les gènes codant pour les FT contrôlant le niveau d'expression de GA3ox1 et GA3ox2, ne sont pas différentiellement régulés chez le surexpresseur HB25 ; laissant penser que GA3ox2 pourrait être une cible directe de HB25. Ces résultats confortent notre hypothèse que GA3ox1 serait aussi une cible directe de HB30. Buesco et coll. ont également démontré qu'un grand nombre de gènes fortement induits chez le surexpresseur HB25, en comparaison à des plantes contrôles, sont également induits en réponse aux GA. Ils ont pu dresser une liste de 24 DEG co-régulés (Bueso et al., 2014). Parmi cette liste, nous retrouvons dans notre étude deux gènes également induits (At5q48850, et plus faiblement At1g14970) chez HB30OE, et le gène At1g29090, réprimé chez HB30-SRDXind.



## Figure 80. Expression ectopique d'une DELLA non-dégradable, dans les territoires d'expression de *HB23*.

- A. La surface foliaire a été mesurée chez des plantes contrôles (écotype Col-0), le quadruple mutant *hb23 hb25 HB31 hb34* et chez deux lignées transgéniques *pHB23:gai.1-RFP* (#1 et #2). Les plantes analysées dans cette expérience (n compris entre 22 et 23) sont âgées de 24 jours et ont été cultivées en jours longs (16h lumière / 8h obscurité). La répartition des valeurs est indiquée grâce au boxplot et la barre noire horizontale dans le rectangle indique la moyenne propre à chaque condition. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test Anova à deux facteurs suivi d'une comparaison de Tukey, p < 0,05. A droite en haut, photos représentatives d'une plante sauvage (écotype Col-0) et des deux lignées *pHB23:gai.1-RFP* (#1 et #2), âgées de 5 semaines. A droite en bas, Immuno-détection des protéines gai.1-RFP (anticorps anti-RFP) par Western Blot, dans des extraits protéiques totaux issus des plantes contrôles (Col-0) et des lignées #1 ou #2. La quantité totale de protéines déposées dans chaque puits est mis en évidence par une coloration au bleu de Coomassie.
- B. Graphique représentant le nombre de jours, après germination, nécessaire aux lignées pHB23:gai.1-RFP pour entrer en floraison, en comparaison au quadruple mutant hb23 hb25 hb31 hb34 et aux plantes contrôles (Col-0). Le temps de floraison pour un génotype est validé dès lors que la hampe florale a émergé du centre de la rosette chez au moins 50% de la population. Les plantes analysées dans cette expérience ont été cultivées en jours longs.

Dans l'ensemble, cette analyse transcriptomique nous a permis d'identifier un nombre important de gènes cibles candidats des ZFHD. Outre leur régulation transcriptionnelle, un grand nombre d'entre eux contiennent dans leur région promotrice au moins une copie de l'élément *cis.* Nous avons également pu affiner la fonction biologique du complexe transcriptionnel ZFHD-DELLA, en mettant en évidence que les ZFHD contrôlent la transcription de gènes impliqués dans la synthèse et l'organisation de la paroi, dans le développement racinaire, dans les réponses hormonales (auxine et cytokinine) ou encore dans la réponse à l'hypoxie.

Nous allons prochainement mettre en place des expériences de retard sur gel ou d'immunoprécipitation de la chromatine pour valider une interaction entre les ZFHD et une séquence de la région promotrice (contenant l'élément *cis* reconnu par les ZFHD) des gènes candidats les plus pertinents.

Dès lors que nous aurons validé plusieurs gènes cibles des ZFHD, nous pourrons déterminer l'effet des GA sur le régulon ZFHD. Nous pourrons réaliser des traitements avec des GA bioactives ou du paclobutrazol (un inhibiteur de la biosynthèse des GA), sur le matériel génétique généré tout au long de mes travaux de thèse, tout en suivant l'expression des gènes cibles des ZFHD par qRT-PCR.
## **Discussion générale**

### Partie 1. Effet des protéines DELLA sur l'activité transcriptionnelle d'une nouvelle famille de DIP, les Zinc-Finger Homeodomain (ZFHD).

Les protéines DELLA interagissent avec les FT ZFHD. Les résultats de cette étude suggèrent que les 14 ZFHD interagissent très probablement avec les 5 protéines DELLA, chez *Arabidopsis thaliana*. Néanmoins, il sera nécessaire de confirmer que HB23, HB29, HB31 et HB33, qui sont des FT intéressants pour notre étude, interagissent avec les DELLA. Pour ce faire, des mesures de FRET-FLIM pourront facilement être réalisées.

Nous avons démontré que les protéines DELLA interagissaient via leur domaine LHR1 à l'homéodomaine (HD) des ZFHD. Le motif LHR1 des DELLA est connu pour être impliqué dans les interactions DELLA-DIP (Van De Velde et al., 2017). Par ailleurs, il a également été démontré que les DELLA interagissaient avec l'homéodomaine d'autres DIP, comme avec le FT KNAT1 (Felipo-Benavent et al., 2018). Dans notre étude, nous avons utilisé des versions tronquées des DELLA pour cartographier les domaines engagés, néanmoins, cela affecte probablement le repliement des DELLA et expose d'autres domaines qui pourraient conduire à des interactions artéfactuelles en double-hybride chez la levure. Je trouve qu'il serait pertinent d'ôter spécifiquement le domaine LHR1 par délétion, comme nous avons pu le faire pour les ZFHD. D'autre part, cette stratégie permettrait d'identifier précisément si un autre domaine est engagé dans la stabilité de l'interaction ZFHD-DELLA, en ôtant séquentiellement les différents domaines de la protéine DELLA.

Concernant les ZFHD, nous avons démontré que leur homéodomaine s'associait avec les DELLA et qu'il était nécessaire à cette interaction. Cependant, toutes les protéines ayant un homéodomaine n'interagissent pas avec les DELLA, constat qui souligne que d'autres motifs protéiques interviennent dans la stabilisation de l'interaction ZFHD-DELLA. Le fait de déterminer si des domaines annexes sont fréquemment engagés dans la stabilisation des interactions ZFHD-DIP permettrait à l'avenir d'identifier plus efficacement de nouveaux DIP, notamment à l'aide d'analyse *in silico*.

Les DELLA inhibent l'activité transcriptionnelle des ZFHD. Par une approche combinatoire, avec des expériences de retard sur gel et des tests d'activité transcriptionnelle en système luciférase, nous avons démontré que RGA séquestrait HB30 en interagissant avec son domaine de liaison à l'ADN (HD). Ces résultats suggèrent que les DELLA séquestrent l'ensemble des ZFHD, inhibant ainsi, leur capacité à se fixer au promoteur de gènes cibles ;

ce qui étaye le mode d'action majeur des DELLA, établit dès 2008, avec de nombreux facteurs de transcription (Feng et al., 2008; de Lucas et al., 2008; Van De Velde et al., 2017).

Ensuite, nous avons mis en évidence que les ZFHD HB25, HB29, HB30 et HB34 se comportaient comme des activateurs de la transcription, à l'aide de tests de l'activité transcriptionnelle avec le système luciférase. Par ailleurs, lors de l'analyse morphologique du double mutant *hb25 hb34*, nous avons observé un sévère retard de croissance à plusieurs stades clés du développement. Ces résultats suggèrent que les FT HB25 et HB34 pourraient être des activateurs de la transcription de gènes favorisant la croissance. Les résultats obtenus récemment par RNA-seq, ainsi que ceux présentés dans la littérature, viennent étayer cette hypothèse. En effet, même si nous n'avons pas encore confirmé qu'il s'agissait de cibles directs des ZFHD, nous avons pu voir que plusieurs gènes, dont l'expression est induite chez le surexpresseur *HB25* (Bueso et al., 2014), sont également induits chez le surexpresseur *HB30*, ou réprimés suite à l'induction de la construction *HB30-SRDX*.

Néanmoins, les analyses phénotypiques du quadruple mutant *hb23 hb25 hb31 hb34* laissent supposer que HB31 pourrait être un répresseur de la croissance. Il est donc souhaitable de tester l'activité transcriptionnelle des FT HB31 et HB34, à l'aide du système luciférase. Cette information permettra une meilleure compréhension des phénotypes observés au sein des différentes combinaisons de multiples mutants, tout en étant utile, si de nouvelles approches génétiques doivent être mises en place.

Les ZFHD reconnaissent un élément *cis* commun dans les promoteurs de gènes cibles. Pris dans leur ensemble, nos résultats soutiennent l'idée qu'une majorité de ZFHD sont des activateurs de la transcription qui réguleraient l'expression de gènes communs. Il ne serait pas surprenant que les ZFHD modulent l'expression de gènes cibles communs car les bases de données publiques indiquent que les éléments *cis*, reconnu par plusieurs ZFHD, sont très similaires (Fig. 52, analyse DAP-seq). Nous sommes maintenant convaincus que la majorité des ZFHD reconnaissent le consensus, que nous avons défini dans notre étude (TTCAT<u>TAAT</u>TACGT), dans la région promotrice des gènes cibles, pour activer leur transcription. De plus, lors de l'analyse RNA-seq, nous avons observé que cet élément *cis* était surreprésenté dans les régions promotrices des gènes cibles candidats de HB30 (41,5% des gènes).

Des expériences de retard sur gel attestent qu'une mutation dans le motif <u>TAAT</u>, par ailleurs parfaitement conservé dans l'ensemble des élément *cis* reconnus par les ZFHD, conduit à une perte de l'interaction ZFHD-ADN. Pour étayer ces résultats, nous avons récemment fait synthétiser, par l'entreprise Genscript, une construction comprenant un multimère de la version mutée de l'élément *cis* TTCAT<u>GGG</u>TTACGT qui pourra être utilisé dans de prochaines expériences en système luciférase (au lieu de TTCAT<u>TAA</u>TTACGT, utilisé jusqu'à présent). Pour définir si des différences plus subtiles existent dans les éléments *cis* reconnus spécifiquement par certains ZFHD, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine pourront être entreprises.

La dimérisation des ZFHD module leur activité transcriptionnelle. Il a été démontré que les ZFHD pouvaient former des hétérodimères ou des homodimères, en interagissant via leur domaine Zinc-Finger (ZF), pour moduler leur sélectivité à l'ADN (Tan and Irish, 2006; Windhövel et al., 2001). Nous avons démontré pour la première fois, à travers cette étude, que les ZFHD hétérodimérisaient et homodimérisaient *in planta*.

Cependant, seule l'activité transcriptionnelle d'homodimères ZFHD a été testée à ce jour, à l'aide du système luciférase. Il serait intéressant d'exprimer de manière transitoire les *ZFHD*, que nous avons validé en tant qu'activateurs de la transcription (HB23, HB25, HB29 et probablement HB34), en combinaison, pour observer l'effet d'une hétérodimérisation des ZFHD sur leur activité transcriptionnelle.

Les ZFHD peuvent également dimériser avec les MINI ZINC FINGER (MIF), des protéines qui possèdent uniquement un domaine ZF ; 3 protéines MIF ont été identifiées chez *Arabidopsis* (Hu and Ma, 2006). Pour exemple, MIF1 bloque la capacité de liaison à l'ADN de HB33 en favorisant la formation d'hétérodimère MIF1-HB33 (Hong et al., 2011). Alors qu'un dimère ZFHD pourrait activer la transcription de gènes cibles, la formation d'un hétérodimère ZFHD-MIF, au contraire, bloque la liaison à l'ADN des ZFHD. Il serait intéressant d'étudier ce mécanisme, chez les ZFHD d'intérêts pour cette étude, à savoir HB23, HB25, HB30, HB31, HB33 et HB34. Ces différents ZFHD pourront être exprimés de manière transitoire chez *Nicotiana benthamiana*, seuls ou en combinaison avec un MIF, dans le but de tester l'activité transcriptionnelle des ZFHD à l'aide du système luciférase.

En conclusion, l'activité transcriptionnelle des ZFHD est régulée à deux niveaux. Si l'interaction d'un ZFHD avec un MIF empêche la formation d'un dimère ZFHD, l'interaction d'un ZFHD ou

d'un dimère ZFHD avec une DELLA bloque l'interaction des ZFHD aux promoteurs de gènes cibles. Dans ce contexte, on peut se demander si ces deux mécanismes de régulation coexistent au sein d'une même cellule ou d'un tissu. Ainsi, il conviendrait de comparer précisément les patrons d'expression des 5 DELLA et des 3 MIF, afin de déterminer s'ils sont exprimés en même temps et dans les mêmes tissus que les ZFHD. Une approche génétique pourra éventuellement être initiée en fonction de ces résultats.

**Une redondance fonctionnelle est observée chez les ZFHD**. Les gènes *ZFHD* ont des séquences en acides nucléiques très conservées chez *Arabidopsis thaliana* (Fig. 45) et les FT ZFHD possèdent deux domaines (ZF et HD), mais également des motifs (LALP et EDST) qui sont conservés chez les différents membres (Hu et al., 2008b). L'analyse combinatoire que nous avons réalisée indique que plusieurs ZFHD sont exprimés à chaque stade de développement et à des niveaux différents (Fig. 59). Plusieurs d'entre eux, comme *HB23, HB30* et *HB33* ont une expression intense dans la majorité des stades de développement analysés par qRT-PCR (plantules, feuilles de rosettes et inflorescences). L'ensemble de ces résultats indique que les ZFHD sont sujets à une redondance fonctionnelle. Ce phénomène pourrait s'avérer être un frein dans notre étude sur la fonction biologique des interactions ZFHD-DELLA. Nous avons donc décidé d'éteindre plusieurs gènes *ZFHD*, que nous avions jugé important pour notre étude, dans le but d'obtenir des multiples mutants *zfhd*.

La redondance fonctionnelle des ZFHD pourrait notamment expliquer les résultats de Tan and Irish, (2006), relatifs à l'absence d'altérations phénotypiques chez les simples mutants *HB23*, *HB25*, *HB31 HB32*, *HB33* et *HB34*. J'ai malgré tout pu démontrer, au cours de cette étude et en réalisant des analyses morphologiques très précises, que les simples mutants *zfhd* présentent de légères altérations phénotypiques. La longueur de l'hypocotyle (Fig. 66), la surface foliaire (Fig. 68B), la transition florale (Fig. 69) et la longueur des entre-nœuds (Fig. 72A) sont légèrement affectées chez certains simples mutants *zfhd* analysés (*hb23, hb25, hb31* et *hb34*), en comparaison à des plantes contrôles.

Pour mieux caractériser cette redondance fonctionnelle et comprendre les phénotypes observés, il conviendrait de réaliser une nouvelle étude de l'expression génique des 14 *ZFHD* chez les multiples mutants *zfhd* récemment caractérisés, notamment chez le quadruple mutant *hb23 hb25 hb31 hb34*. Une analyse préliminaire de l'expression génique avait d'ailleurs mis en évidence qu'une compensation se mettait en place chez le double mutant *hb23 hb34* et

chez le triple mutant *hb23 hb31 hb34*, avec au moins 6 gènes *ZFHD* montrant une expression induite (Fig. S10).

#### Partie 2. Rôle de l'interaction ZFHD-DELLA sur le développement des plantes.

Rôle du complexe ZFHD-DELLA sur le développement embryonnaire. Il est admis que les GA jouent un rôle important dès le développement embryonnaire, un mutant de biosynthèse des GA (mutant ga1-3) présente, entre autres, des cotylédons moins développés et un axe embryonnaire plus petit (Hu et al., 2018). Il a été récemment mis en évidence que les DELLA interagissaient avec LEAFY COTYLEDON1 (LEC1), un régulateur clé de l'embryogénèse, pour inhiber son activité transcriptionnelle. En présence de GA, la dégradation des DELLA permet la libération de LEC1 qui promeut alors l'accumulation d'auxine pour faciliter la croissance des plantes (Hu et al., 2018). Dans notre étude, nous avons observé que HB30 était fortement exprimé et accumulé au niveau embryonnaire, dans les cotylédons et la radicule, chez Arabidopsis (Fig. 61). De plus, je n'ai jamais pu obtenir de plantules exprimant le répresseur HB30-SRDX (sous le contrôle d'un promoteur constitutif ou endogène), étayant ainsi l'hypothèse que HB30 joue un rôle crucial dans le développement embryonnaire. D'un autre côté, l'analyse RNA-seq a mis en évidence que l'expression du gène RADIALIS-LIKE SANT/MYB 1 (RSM1) était induite par HB30, et ce gène pourrait être une cible directe des ZFHD. Le gène RSM1 est connu pour son rôle dans le développement embryonnaire, tout comme au stade plantule (Yang et al., 2018). Ainsi, le complexe transcriptionnel ZFHD-DELLA pourrait être impliqué, en synergie avec le complexe LEC1-DELLA, dans le développement embryonnaire.

**Rôle du complexe ZFHD-DELLA sur l'élongation de l'hypocotyle**. La voie de signalisation des GA, par l'intermédiaire des DELLA, module de manière notoire, l'élongation de l'hypocotyle. Le complexe BZR-ARF-PIF, décrit dans le chapitre 3 de l'introduction, contribue largement dans l'expansion de l'hypocotyle. Les DELLA peuvent interagir avec chacun de ces facteurs de transcription, et de ce fait, inhiber la formation du complexe BZR-ARF-PIF et bloquer la transcription des gènes cibles favorisant l'expansion cellulaire (Bai et al., 2012; Feng et al., 2008; de Lucas et al., 2008; Oh et al., 2014; Bernardo-García et al., 2014). Une étude affirme qu'une lignée anti-sens *hb25*, permettant de réduire l'expression de *HB25*, présente un hypocotyle plus court en comparaison à des plantes contrôles (Bueso et al., 2014). Nous avons confirmé ces résultats avec le mutant nul *hb25* et les analyses phénotypiques ont par ailleurs démontré que les multiples mutants *zfhd* présentent un hypocotyle plus court que celui

du simple mutant *hb25*. Le FT HB25 pourrait avoir un rôle majeur dans l'élongation de l'hypocotyle et d'autres ZFHD comme HB23, HB31 et HB34 auraient une fonction similaire et additive, mais dans une moindre mesure. Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent fortement que les complexes transcriptionnels ZFHD-DELLA exerceraient un rôle dans l'expansion cellulaire, au niveau de l'hypocotyle.

Rôle du complexe ZFHD-DELLA sur le développement du système racinaire. La voie de signalisation des GA intervient aussi dans la croissance et le développement racinaire. Une accumulation des protéines DELLA inhibe la prolifération et l'élongation cellulaire en activant l'expression d'inhibiteurs du cycle cellulaire (Achard et al., 2009; Ubeda-Tomás et al., 2009). Les répresseurs nucléaires DELLA peuvent également séquestrer des FT, comme PIF ou TCP, qui sont impliqués dans l'expansion ou la prolifération cellulaire, respectivement (Bernardo-García et al., 2014; Davière et al., 2014). Au cours d'une analyse morphologique du système racinaire, j'ai observé que le triple mutant hb23 hb25 hb34 présentait des racines primaires et secondaires plus courtes, ainsi qu'un nombre inférieur de racines secondaires. Bien que HB23 soit faiblement exprimé dans les racines, d'après les analyses gRT-PCR, il semble être fortement accumulé au niveau du système vasculaire des racines primaires et secondaires, selon les colorations GUS. Par ailleurs, nos analyses RNA-seq soulignent que HB30 favorise la transcription de gènes impliqués dans le développement racinaire (morphogénèse et différenciation de l'épiderme racinaire) (Fig. 76C). Le gène HB30 est exprimé dans la zone d'émergence, et dans le système vasculaire, des racines secondaires (Fig. 62). Ces résultats suggèrent que la voie de signalisation des GA modulerait le développement du système racinaire, en partie, via les interactions ZFHD-DELLA.

En parallèle, nous avons constaté que le gène *HB29* était largement plus exprimé que les autres *ZFHD* au niveau racinaire, laissant supposer un rôle d'autant plus important dans la croissance ou le développement des racines. Pour confirmer cette hypothèse, une construction convertissant HB29 en facteur répresseur (à l'aide d'une fusion du domaine SRDX), a été récemment initiée au laboratoire. Alternativement, la stratégie Crispr-Cas9, permettant d'obtenir un mutant nul *hb29*, pourrait également s'avérer pertinente pour étudier la fonction biologique de l'interaction HB29-DELLA au cours du développement racinaire.

**Rôle du complexe ZFHD-DELLA sur la hauteur des plantes.** De précédentes études démontrent que la voie de signalisation des GA, par l'intermédiaire des DELLA, régulait la hauteur des plantes. Cependant, les mécanismes moléculaires dépendants des GA, impliqués

dans le développement des parties aériennes, demeurent en partie inconnus. Le laboratoire a néanmoins mis en évidence que les FT TCP, pouvant être séquestrés par les DELLA, activaient la transcription de gènes impliqués dans le cycle cellulaire. Une interaction TCP-DELLA affecte alors la longueur des entre-nœuds et donc de manière plus générale, la croissance des plantes (Davière et al., 2014; Kieffer et al., 2011). Le laboratoire a démontré plus récemment, à l'aide d'un nouveau biosenseur, que la signalisation GA jouait un rôle dans le développement des entre-nœuds en contrôlant l'orientation des divisions cellulaires, au niveau des régions inter-primordia (Shi et al., 2022).

Au cours de l'étude, nous avons constaté, à l'aide des analyses morphologiques effectuées, que les entre-nœuds des multiples mutants *zfhd* étaient en moyenne deux fois plus petits que ceux de plantes contrôles. La formation de complexes transcriptionnels ZFHD-DELLA pourrait également moduler la croissance des entre-nœuds, en synergie avec les complexes TCP-DELLA. Cette observation permet d'affiner le rôle de la voie de signalisation des GA dans la régulation de la hauteur des plantes. Dans cette ligne, il serait pertinent de réaliser de nouvelles colorations GUS, afin de définir précisément les patrons d'expression ou d'accumulation de certains ZFHD au niveau des nœuds/entre-nœuds.

**Rôle du complexe ZFHD-DELLA dans le développement des inflorescences**. Le fait d'avoir identifié une interaction HB30-DELLA, dans les apices disséqués lors du crible en double-hybride, laisse supposer que les ZFHD jouent un rôle dans le développement des inflorescences. D'après les analyses qRT-PCR, les profils d'expression des *ZFHD* semblent être identiques dans les inflorescences et les apices caulinaires disséqués, et *HB30* et *HB33* sont notamment abondamment exprimés. D'un autre côté, selon les analyses de l'activité GUS, HB29 et HB30 semblent s'accumuler principalement dans les jeunes bourgeons floraux et dans le filet des étamines.

L'élongation du filament des étamines requiert une régulation fine, afin que les anthères atteignent le stigmate du pistil, à un moment très précis du développement chez les fleurs (Cheng et al., 2004). Les GA contrôlent ce processus développemental ; le mutant de biosynthèse *ga1-3* présente des altérations phénotypiques importantes au niveau des organes floraux, avec notamment une élongation restreinte des étamines (Cheng et al., 2004; Rieu et al., 2007; Tyler et al., 2004). Récemment, une étude indique que les TCP de classe 1, notamment TCP15, favorisaient la croissance des filaments des étamines (Gastaldi et al., 2020). Fait intéressant, une surexpression de *TCP15* permet de restaurer le phénotype des

mutants déficients en GA. Nos résultats suggèrent que HB29, HB30 et potentiellement d'autres ZFHD, pourraient avoir une fonction similaire aux TCP de classe 1. Pour affiner le rôle du complexe transcriptionnel ZFHD-DELLA dans ce processus développemental, de nouvelles analyses phénotypiques en se focalisant davantage sur le développement des organes inflorescentiels, devront être réalisés chez le double mutant *hb25 hb34* et le quadruple mutant *hb25 hb31 hb34*.

**Fonctions biologiques du complexe HB30-DELLA.** Nous sommes convaincus que HB23, HB25, HB31 et HB34 jouent un rôle important à plusieurs stades clés du développement chez *Arabidopsis.* Cependant, les fonctions biologiques du complexe HB30-DELLA doivent maintenant être précisées. Tous les résultats que nous avons pu regrouper, au cours de cette étude, suggèrent que HB30 pourrait avoir un rôle primordial dans le développement des plantes. En effet, son expression dominante dans la majorité des stades de développement analysés, devient spécifique dans les jeunes siliques. De plus, une accumulation du répresseur HB30-SRDX, dès la germination de la graine, inhibe fortement le développement des plantules (Fig. 73A). Enfin, les phénotypes des lignées surexpresseurs *HB30* suggèrent qu'une modification de l'expression de *HB30* affecte grandement le développement de plantes ; une accumulation trop importante de HB30 pourrait être létal pour la plante (Fig. 74B).

Dès lors que nous aurons obtenu un mutant *hb30*, si viable (à l'état homozygote), à l'aide de la stratégie Crispr-Cas9, nous nous attacherons à affiner le rôle de complexe transcriptionnel HB30-DELLA au cours du cycle de développement de la plante. Les patrons d'expression et d'accumulation de HB30 indiquent sans nul doute la nécessité d'effectuer une analyse morphologique détaillée, à tous les stades de développement. En attendant, il conviendra d'analyser le phénotype des lignées amiR ciblant spécifiquement *HB30*, montrant une réduction d'environ 70% de l'expression du gène *HB30* (Fig. S15). Nous avons également la possibilité de croiser la lignée amiR ciblant *HB30* avec le quadruple mutant *hb23 hb25 hb31 hb34*, afin d'obtenir un quintuple mutant *zfhd*. Enfin, le phénotype du mutant hypomorphe *hb30.2* pourra être caractérisé, en parallèle (Fig. 65).

Interconnexions entre le complexe ZFHD-DELLA et d'autres voies hormonales. Un consensus étaye souvent l'idée que de multiples interconnexions complexes entre diverses voies hormonales régissent grand nombre de processus développementaux. Pour exemple, nous savons que la dominance apicale est contrôlée majoritairement par l'auxine, les cytokinines, les strigolactones et certains sucres (revu dans Barbier et al., 2017; Domagalska

and Leyser, 2011; Sakr et al., 2018). Dans la même ligne, nos analyses RNA-seq ont révélé que le gène *ASL5*, un homologue des gènes *Asymetric leaves(AS)/Lateral organ boundary (LOB)*, partageant une fonction dans la dominance apicale (Nakazawa et al., 2003), était induit par HB30 ; suggérant que la voie de signalisation des GA agirait certainement dans ce processus développemental.

De manière générale, HB30 induit l'expression de plusieurs gènes de réponse à l'auxine et aux cytokinines (Fig. 76C). Ainsi, HB30 régule positivement le gène *BTB AND TAZ DOMAIN protein 5 (BT5)*, dont l'expression est aussi contrôlée par l'auxine (Robert et al., 2009). De plus, les ZFHD semblent activer la transcription du gène *MACCHI-BOU 4 (MEL4)*, qui régule la distribution des PIN permettant en conséquence de contrôler le transport polarisé de l'auxine (Furutani et al., 2011). Dès lors, la voie de signalisation des GA, via les interactions ZFHD-DELLA capables de réguler la transcription de gènes cibles clés, pourrait contrôler de façon synergique, certains processus développementaux définis comme étant dépendants de l'auxine.

**Rétrocontrôle positif des ZFHD sur la biosynthèse de GA**. Une étude antérieure révèle une induction du gène *GA3ox2*, codant pour une enzyme de la voie de biosynthèse des GA, chez le surexpresseur *HB25*; entrainant une accumulation plus importante des GA bioactives (GA<sub>1</sub> et GA<sub>4</sub>) chez ces lignées (Bueso et al., 2014). Dans notre étude, nous avons mis en évidence que l'expression du gène *GA3ox1*, codant pour une enzyme ayant une fonction similaire à GA3ox2, est favorisée par HB30.

Les ZFHD pourraient ainsi mettre en place un rétrocontrôle positif en régulant la biosynthèse de GA. En effet, si les ZFHD favorisent l'accumulation des GA bioactives, une déstabilisation constante des répresseurs nucléaires DELLA serait assurée, permettant alors aux ZFHD de ne plus être séquestrés et de pouvoir réguler activement la transcription de gènes cibles. En intégrant le biosenseur de la signalisation GA récemment développé par le laboratoire (Shi et al., 2022), dans un multiple mutant *zfhd* ou un surexpresseur *ZFHD*, nous pourrions aisément identifier une variation du niveau d'accumulation des GA dans les organes dont le développement est, en partie, sous le contrôle du complexe transcriptionnel ZFHD-DELLA.

## **Conclusions générales et perspectives**

La voie de signalisation des GA, à travers des interactions entre les répresseurs nucléaires DELLA et des protéines régulatrices (DIP), contrôle une multitude de processus développementaux clés, chez les plantes. Les GA bioactives interviennent pour finement réguler le niveau d'accumulation des protéines DELLA, en favorisant leur déstabilisation, et permettre une levée de l'inhibition de la croissance. A ce jour, plusieurs dizaines de protéines régulatrices, pouvant interagir avec les protéines DELLA (DIP), ont été identifiées, sans toutefois expliquer pleinement l'action pléiotropique de la voie de signalisation des GA (récemment revu par Xue et al., 2022). La majorité des DIP ayant été caractérisés (Tableau S1) est impliquée dans la germination des graines ou dans le développement des plantules (élongation de l'hypocotyle ou développement de la crosse apicale).

Dans le but d'identifier de nouveaux DIP impliqués spécifiquement dans le développement des parties aériennes, le laboratoire a réalisé un crible en double-hybride à partir d'ADNc des apices caulinaires disséqués d'*Arabidopsis,* et en utilisant une protéine DELLA comme proie. Le facteur de transcription HB30, appartenant à la famille des Zinc-Finger Homeodomain (ZFHD), composée de 14 membres, chez *Arabidopsis thaliana* (Fig. 34B), a été identifié et la fonction de cette famille restait encore méconnue. Alors que le crible réalisé témoigne d'une interaction ZFHD-DELLA au niveau des apices caulinaires, aucune étude publiée à ce jour ne mentionne une interaction ZFHD-DELLA. Ces divers aspects ont fondé et suscité l'intérêt grandissant d'étudier cette nouvelle famille de DIP. Dans ce contexte, les objectifs principaux de ma thèse ont été définis, et deux grandes problématiques ont été soulevées :

# 1. Quelles sont les conséquences d'une interaction ZFHD-DELLA sur l'activité transcriptionnelle des ZFHD ?

#### 2. Comment l'interaction ZFHD-DELLA module le développement des plantes ?

Tout d'abord, j'ai mis en évidence qu'une majorité des FT ZFHD étaient des activateurs de la transcription ; la formation d'hétérodimères permettrait aux ZFHD une modulation plausible de leur sélectivité de la liaison à l'ADN (Tucker and Wisdom, 1999). En combinant plusieurs approches, j'ai révélé que les DELLA inhibaient l'activité transcriptionnelle des ZFHD, par un mécanisme de séquestration, en interagissant avec leur domaine de liaison à l'ADN. En présence de DELLA, bien que les ZFHD puissent toujours homodimériser ou hétérodimériser via leur domaine Zinc-Finger, ceux-ci ne sont plus capables de se fixer sur l'élément *cis* TTCAT<u>TAAT</u>TACGT. En outre, la fonction biologique des ZFHD serait définie principalement par leur patron d'expression, plutôt que par leur activité, car ces FT reconnaissent et





pHB29:HB29-GUS

pHB30:HB30-GUS



pTCP14:TCP14-GUS

pTCP15:TCP15-GUS

#### Figure 81. Patrons d'accumulation de HB29, HB30, TCP14 et TCP15 au niveau des inflorescences, chez *Arabidopsis thaliana*.

Photos représentatives de l'activité GUS de plusieurs lignées rapportrices traductionnelles *pZFHD:ZFHD-GU*S ou *pTCP:TCP-GUS* (adapté de Kieffer et al., 2011.), au niveau des inflorescences matures.

Pour les lignées ZFHD:GUS, les photos des colorations GUS ont été prises à la loupe binoculaire. Les lignées utilisées présentent une insertion unique de la construction et les photos ont été prises 18 heures après le début de la réaction avec le substrat (X-gluc).

interagissent au même élément *cis* dans les régions promotrices de gènes cibles, probablement avec quelques nuances à définir (Fig. 52). Les profils d'expression des ZFHD sont spécifiques et différents à chaque stade de développement, laissant néanmoins apparaître une redondance fonctionnelle.

Par la suite, des études moléculaires et morphologiques chez Arabidopsis ont mis en évidence le rôle clé des ZFHD pour la régulation de la croissance, dès le stade plantule et jusqu'au développement des parties aériennes. La caractérisation du régulon ZFHD (cibles directes et secondaires) a permis d'identifier un grand nombre de gènes cibles candidats des ZFHD, potentiellement impliqués dans la réponse aux stress oxydants/ROS, dans le développement racinaire, dans les réponses hormonales (auxine et cytokinine) ou encore dans la réponse à l'hypoxie. Nonobstant, les gènes regroupés en cibles directes hautement probables appartiennent essentiellement à un groupe fonctionnel ayant un rôle dans la synthèse et l'organisation de la paroi. L'interaction ZFHD-DELLA pourrait ainsi moduler la croissance des plantes en contrôlant l'élongation cellulaire, à plusieurs stades clés du développement. Les altérations phénotypiques observées chez les mutants *zfhd* viennent étayer cette hypothèse. En effet, des multiples mutants *zfhd* présentent, entre autres, un hypocotyle plus court, et il est admis que la croissance de l'hypocotyle est exclusivement assurée par un processus d'expansion cellulaire (Oh et al., 2014). Par ailleurs, une étude démontre qu'une surexpression de HB25 entrainait une augmentation de la taille des cellules au niveau du style des fleurs (Bueso et al., 2014).

D'après les altérations phénotypiques observées chez les multiples mutants *zfhd*, au niveau des parties aériennes, les ZFHD semblent avoir un rôle essentiel dans la croissance des entrenœuds, en contrôlant l'élongation cellulaire. Fait intéressant, le laboratoire a précédemment démontré que le facteur de transcription TCP14 (identifié au niveau des apices caulinaires au cours du même crible que HB30), agissait de concert avec les ZFHD dans la croissance des entre-nœuds, en activant la prolifération cellulaire. Il a été démontré que la présence de protéines DELLA bloquait la capacité des TCP à activer la transcription de gènes cibles impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (Davière et al., 2014; Kieffer et al., 2011). D'autre part, les profils d'accumulation de TCP14, et son proche homologue TCP15 sont très similaires à ceux des ZFHD, notamment au niveau des inflorescences ; avec une forte expression dans les jeunes bourgeons floraux (Fig. 81). Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que les complexes transcriptionnels ZFHD-DELLA et TCP-DELLA contrôleraient de



### Figure 82. Fonctions biologiques du complexe transcriptionnel ZFHD-DELLA dans le développement, chez *Arabidopsis*.

Schéma représentant le rôle du complexe transcriptionnel ZFHD-DELLA. En présence de GA, les protéines DELLA sont déstabilisées permettant aux ZFHD de pouvoir activer la transcription de gènes cibles en reconnaissant l'élément *cis* TTCAT<u>TAAT</u>TACGT dans leur région promotrice. La formation de dimères ZFHD permet alors la transcription de gènes cibles ayant plusieurs fonctions biologiques importantes, dont la régulation de l'élongation cellulaire. Les hétérodimères ZFHD-MIF pourraient, au contraire, inhiber la transcription de ces gènes cibles.

manière concomitante, des processus développementaux communs en régulant, respectivement et de façon synergique, l'élongation ou la prolifération cellulaire.

Prochainement, des expériences de retard sur gel et d'immunoprécipitation de la chromatine seront conduites, pour valider les gènes cibles des ZFHD identifiés dans cette étude. L'effet des GA sur le régulon ZFHD pourra alors être analysé à l'aide d'approches moléculaires. Nous analyserons par exemple l'expression des gènes cibles des ZFHD par qRT-PCR, après traitement GA ou paclobutrazol, sur le matériel génétique généré tout au long de mes travaux de thèse. Ces résultats permettront de repositionner la fonction biologique du régulon ZFHD dans un contexte dépendant des GA.

Un des derniers objectifs, à plus long terme, sera d'étudier si les GA contribuent à l'adaptation de la morphologie des plantes, face aux conditions changeantes de l'environnement, à travers les interactions ZFHD-DELLA. Notoirement, les stress environnementaux (i.e. sécheresse, froid, chaleur ou carence en nutriments) ont des effets dramatiques sur le développement caulinaire et racinaire. D'après la littérature, l'expression des ZFHD semble en partie, être sous le contrôle des facteurs environnementaux. Pour exemple, un stress hydrique va favoriser ou réprimer l'expression de certains ZFHD (Fig. 41) (récemment revu par Bollier et al., 2022). La sécheresse, ainsi que la carence nutritive (et en particulier l'azote) seront ainsi privilégiées. En effet, une étude récente menée par le laboratoire et à laquelle j'ai contribué (Annexe 12), montre que le nitrate (forme d'azote principalement assimilée par les plantes) réquie la biosynthèse de GA et ainsi, la voie de signalisation des GA, et en conséquence, le développement des plantes (Camut et al., 2021). Nous avons également observé que des gènes impliqués dans la réponse à la déficience nutritionnelle au niveau racinaire, pourraient être régulés par les ZFHD (Fig. 79A). Enfin, un nombre conséquent de gènes cibles secondaires du régulon ZFHD sont impliqués dans la réponse à l'hypoxie, il pourrait s'avérer pertinent d'analyser le phénotype des multiples mutants *zfhd*, en réponse à une déprivation de l'oxygène.

Enfin, la hauteur des plantes est un trait agronomique faisant l'objet de nombreuses recherches, dans le but d'améliorer le rendement des plantes cultivées. Il serait intéressant d'identifier le rôle de l'interaction ZFHD-DELLA dans ce processus développemental chez d'autres espèces ayant un intérêt agronomique.

Pris dans son ensemble, mon travail de thèse a permis de caractériser une nouvelle famille de DIP et ainsi, fournir des éléments nouveaux et essentiels, afin de mieux appréhender

l'action pléiotropique de la voie de signalisation des GA sur le développement des plantes. En regroupant l'ensemble des informations recueillies par nos travaux et les éléments de la littérature, j'ai pu réaliser un schéma mettant en exergue le rôle du complexe ZFHD-DELLA sur le développement à divers stades du cycle de vie, chez *Arabidopsis* (Fig. 82).

# Figures supplémentaires



### Figure S1. Interactions entre les FT ZFHD et les protéines DELLA GAI et RGA en système hétérologue chez la levure.

**Résultats préliminaires des tests d'interaction présentés dans la figure 43.** Résultats d'interactions en double-hybride chez la levure, premier réplica obtenu. Les 14 facteurs de transcription de HB21 à HB34 sont testés par paires avec les deux protéines DELLA : GAI et RGA. Les levures transformées sont cultivées sur milieu contrôle sans leucine et tryptophane (SD-LW) et sur milieu sélectif sans leucine, tryptophane, adénine et histidine (SD-LWAH). Une croissance sur milieu sélectif témoigne d'une interaction entre les deux protéines. Les vecteurs vides pGBKT7 et pGADT7 ont été inclus comme contrôle négatif. Les photos des levures ont été prises après 5 jours de culture à 30°C. L'absence de co-transformants est indiquée par le symbole Ø.



#### Figure S2. HB30 interagit avec la protéine DELLA RGA *in planta*, en système transitoire.

Second réplica de l'expérience présentée dans la figure 46A. Les protéines HB30-RFP et GFP-RGA ont été exprimées de manière transitoire, 48 heures avant l'expérience, chez *Nicotiana benthamiana*. L'utilisation de la technique FRET-FLIM a permis de mesurer le temps de demi-vie de la GFP (en ns) dans minimum 50 noyaux pour chaque condition (n>50). Le FRET entre deux conditions est exprimé en pourcentage ; un FRET>7% témoigne d'une interaction protéine-protéine. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test de Welch, p < 0,05.



#### Figure S3. HB30 interagit avec la protéine DELLA RGA, in planta.

- A. Résultats de la co-immunoprécipitation réalisée à partir des extraits totaux de protéines (Input) issus de feuilles de *Nicotiana benthamiana* agro-infiltrées avec les constructions *p35S:RFP-HB30* et *p35S:GFP-RGA* seules ou en combinaison. Les extraits totaux protéiques ont été immunoprécipitées avec un anticorps anti-GFP. Les protéines coimmunoprécipitées sont détectées par un anticorps anti-RFP.
- B. Résultats de la co-immunoprécipitation réalisée à partir des extraits totaux de protéines (Input) issus de deux lignées stables d'*Arabidopsis thaliana* indépendantes (#4 et #8) ayant été transformées avec les constructions *pRGA:GFP-RGA* et *p35S:RFP-HB30*. Les extraits totaux de protéines ont été immunoprécipitées avec un anticorps anti-GFP. Les protéines co-immunoprécipitées sont détectées par un anticorps anti-RFP.



Figure S4. L'homéodomaine des ZFHD est engagé dans l'interaction avec les protéines DELLA.

Résultats de 3 tests indépendants d'interaction en double-hybride chez la levure utilisés pour réaliser la figure 49B. Les FT HB30 et HB34, ainsi que leurs versions tronquées  $\Delta$ HD et  $\Delta$ ZF, sont testés par paires avec les protéines DELLA GAI et RGA. Les levures transformées sont cultivées sur milieu contrôle sans leucine et tryptophane (SD-LW) et sur milieu sélectif sans leucine, tryptophane, adénine et histidine (SD-LWAH). Une croissance sur milieu sélectif témoigne d'une interaction entre les deux protéines. Les vecteurs vides pGBKT7 et pGADT7 ont été inclus comme contrôle négatif. Les photos des levures ont été prises après 5 jours de culture à 30°C. L'absence de co-transformants est indiquée par le symbole Ø. HD : homéodomaine ; ZF : Zinc-Finger.



Figure S5. Le motif LHR1 des protéines DELLA est engagé dans l'interaction avec les ZFHD.

**Second réplica de l'expérience présenté dans la figure 50B.** Le FT HB30 est testé par paires avec les différents fragments de la protéine RGA. Les levures transformées sont cultivées sur milieu contrôle sans leucine et tryptophane (SD-LW) et sur milieu sélectif sans leucine, tryptophane, adénine et histidine (SD-LWAH). Une croissance sur milieu sélectif témoigne d'une interaction entre les deux protéines. Les vecteurs vides pGBKT7 et pGADT7 ont été inclus comme contrôle négatif. Les photos des levures ont été prises après 5 jours de culture à 30°C.




Second réplica de l'expérience présenté dans la figure 51. Les protéines HB30-GFP, HB30-RFP, RFP-HB34 et RGA-HA ont été exprimées de manière transitoire, 48 heures avant l'expérience, chez *Nicotiana benthamiana*. L'utilisation de la technique FRET-FLIM a permis de mesurer le temps de demi-vie de la GFP (en ns) dans minimum 50 noyaux pour chaque condition (n>50). Le FRET entre deux conditions est exprimé en pourcentage ; un FRET>7% témoigne d'une interaction protéine-protéine. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test de Welch (Fig. S6A) ou à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis (Fig. S6B), p < 0,05.



Figure S7. Analyse *in silico* de l'expression des gènes ZFHD chez Arabidopsis thaliana.

Analyse comparative des *ZFHD* faiblement exprimés dans les inflorescences d'*Arabidopsis thaliana* à l'aide des données transcriptomiques publiques recensées sur le site eFP Browser. Le mode absolu a été utilisé avec un signal seuil fixé à 300.



## Figure S8. Profils d'expression des gènes de la famille ZFHD, au cours du développement d'*Arabidopsis thaliana*.

Second réplica de l'expérience présentée Fig. 59. Expression relative des 14 gènes *ZFHD*, déterminée par qRT-PCR à partir d'ARN totaux issus de plantules âgées de 10 jours, de plantules âgées de 21 jours, de feuilles de rosettes de plantes âgées de 5 semaines, de fleurs, d'apices caulinaires disséqués et de jeunes siliques issues de plantes âgées de 7 semaines. Le niveau d'expression de chaque gène, normalisé à partir de deux gènes de référence, est relatif à celui de *HB34* dans les plantules 10 jours, fixé arbitrairement à 1 en utilisant le logiciel LightCycler480 1.5.0 SP3. L'efficacité des amorces a été calculée pour chacun des couples (comprise entre 1,7 et 2,3). Les gènes sont classés selon l'arbre phylogénétique des ZFHD (Fig. 45). L'erreur standard indique la variabilité technique de la qRT-PCR (n=3).



## Figure S9. Profils d'expression des gènes de la famille ZFHD, au cours du développement d'*Arabidopsis thaliana*.

Troisième réplica de l'expérience présentée Fig. 59. Expression relative des 14 gènes *ZFHD*, déterminée par qRT-PCR à partir d'ARN totaux issus de plantules âgées de 10 jours, de plantules âgées de 21 jours, de feuilles de rosettes de plantes âgées de 5 semaines, de fleurs, d'apices caulinaires disséqués et de jeunes siliques issues de plantes âgées de 7 semaines. Le niveau d'expression de chaque gène, normalisé à partir de deux gènes de référence, est relatif à celui de *HB34* dans les plantules 10 jours, fixé arbitrairement à 1 en utilisant le logiciel LightCycler480 1.5.0 SP3. L'efficacité des amorces a été calculée pour chacun des couples (comprise entre 1,7 et 2,3). Les gènes sont classés selon l'arbre phylogénétique des ZFHD (Fig. 45). L'erreur standard indique la variabilité technique de la qRT-PCR (n=3).



В	Expressi faible	on plus (<1)	Identio	que (≃1)	Express forte	ion plus e (>1)
Gènes ZFHD	Double mutant	Triple mutant	Double mutant	Triple mutant	Double mutant	Triple mutant
HB30	0,8					1,3
HB33					1,35	1,96
HB31					1,43	
HB22			0,94	1,05		
HB23						
HB25					3,7	5,92
HB34						
HB32					1,17	1,57
HB24	0,85					1,19
HB28					2,28	2,96
HB29					1,79	1,17
HB21		0,31	0,94			
HB26	0,54	0,53				
HB27						
Total du nombre de gènes	3	2	2	1	6	7

## Figure S10. Analyses préliminaires de la compensation de l'expression génique, chez les mutants *zfhd*.

**A.** Expression relative de *HB30*, déterminée par qRT-PCR à partir d'ARN totaux issus d'inflorescences de différents mutants *zfhd*, chez *Arabidopsis thaliana*. Le niveau d'expression de *HB30*, normalisé à partir de deux gènes de référence, est relatif à son expression dans les plantes contrôles Col-0, fixé arbitrairement à 1 en utilisant le logiciel LightCycler480 1.5.0 SP3. L'efficacité des amorces a été fixée arbitrairement à 2 pour cette expérience. L'erreur standard indique la variabilité technique de la qRT-PCR (n=3).

**B.** Tableau récapitulatif des résultats obtenus en qRT-PCR sur l'expression de l'ensemble des 14 gènes *ZFHD* chez un double mutant *hb23 hb34* et un triple mutant *hb23 hb31 hb34*. Des plantes Col-0 ont été cultivées en parallèle des deux multiples mutants et ont été utilisées en tant que contrôle. L'analyse a été effectuée sur des plantules âgées de 7 jours (±SD ; n=18 à 24). Le nombre inscrit dans chaque case correspond au 'fold change' de l'expression d'un gène dans le double mutant ou le triple mutant en ayant fixé arbitrairement l'expression du même gène à 1 pour les plantules contrôles Col-0. Un 'fold change' <1 indique une expression plus faible du gène chez le mutant que dans les plantules contrôles Col-0, un 'fold change' d'environ 1 indique une expression identique, et un 'fold change' >1 indique une expression plus forte.



#### Figure S11. Etude de la croissance du système racinaire, chez les mutants *zfhd*.

Second réplica de l'expérience présentée figure 67. (A) Moyenne de la longueur de la racine primaire, (B) somme de la longueur des racines secondaires et (C) nombre de racines secondaires de plantules contrôles et mutantes *zfhd* âgées de 14 jours, cultivées en jours longs. La distribution des valeurs est indiquée grâce au boxplot et la barre noire horizontale dans le rectangle indique la moyenne propre à chaque condition. L'analyse statistique (n compris entre 19 et 22) a été réalisée à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis, p < 0,05.





Le nombre de feuilles rosettes, après floraison, a été analysé chez les multiples mutants *zfhd* ainsi que chez des plantes contrôles (Col-0). La distribution des valeurs est illustrée sous forme de boxplot, et le nombre moyen de feuilles est indiqué par la barre noire horizontale dans le rectangle, pour chaque génotype. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test de Welch, p < 0.05



## Figure S13. Mesure de la hauteur de la hampe florale des mutants *zfhd*, 14 jours après floraison.

La hauteur de la hampe florale principale a été mesurée 14 jours après floraison chez des plantes contrôles (Col-0) et chez plusieurs multiples mutants *zfhd*. Le temps de floraison pouvant être différent pour certains génotypes, les plantes analysées sont âgées de 6 à 7 semaines et ont été cultivées en jours longs (16h lumière / 8h obscurité). La distribution des valeurs est représentée sous forme de boxplot, et la hauteur moyenne est indiquée par la barre noire horizontale dans le rectangle, pour chaque génotype. L'analyse statistique (n compris entre 22 et 24) a été réalisée à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis, p < 0,05.



Figure S14. Analyse de la ramification des parties aériennes, chez les mutants *zfhd*.

Similaire à l'analyse présentée en Fig. 71, six paramètres morphologiques des hampes florales ont été mesurés chez la plante contrôle (Col-0), le double mutant *hb25 hb34* et le quadruple mutant *hb23 hb25 hb31 hb34* âgés de plus de 8 semaines, cultivés en jours longs (16h lumière / 8h obscurité). (A) Nombre total de hampes florales, (B) hauteur moyenne des hampes florales secondaires, (C) nombre de branches secondaires sur la hampe florale principale, (D) nombre total de branches secondaires sur les hampes florales secondaires, (E) longueur du premier entre-nœud sur la hampe florale principale, et (F) longueur du premier entre-nœud sur les hampes florales secondaires. L'analyse statistique (n compris entre 9 et 10) a été réalisée à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis (A et C), à l'aide d'un test de Welch (D et E) et à l'aide d'un test Anova à deux facteurs suivi d'une comparaison de Tukey (B et F), p < 0,05.



#### Figure S15. Expression relative de HB30 chez des lignées amiR.

Expression relative de *HB30*, déterminée par qRT-PCR à partir d'ARN totaux issus d'inflorescences, chez plusieurs lignées indépendantes transformées à partir de différents amiR. Trois lignées indépendantes, provenant de la transformation avec le même amiR, présentent une expression plus faible de *HB30*. Le niveau d'expression de *HB30* chez les différentes lignées, normalisé à partir de deux gènes de référence, est relatif au niveau d'expression de *HB30* chez des plantes contrôles, fixé arbitrairement à 1, en utilisant le logiciel LightCycler480 1.5.0 SP3. L'efficacité des amorces a été fixée arbitrairement à 2 pour cette expérience. L'erreur standard indique la variabilité technique de la qRT-PCR (n=3).



## Figure S16. Analyse en composantes principales, ou PCA (Principal Component Analysis) à partir des données de RNA-seq.

Résultats de l'analyse PCA, la similarité entre chaque jeux de données est corrélée aux distances de projection dans l'espace, défini par les deux composantes principales PC1 et PC2. Une couleur identique indique que les jeux de données appartiennent à une même condition (réplicats biologiques).

Sequence Name	Strand	Start	End	p-value	q-value	Matched Sequence	AT4G20190	+	734	745	2.65e-05	0.0749	TATAATTAGGTA
AT4G08410	-	29	40	4.82e-06	0.0408	AATAATTACTTT	AT4G18650	+	745	756	2.65e-05	0.0749	GATAATTACATA
AT5G24140	-	892	903	4.82e-06	0.0408	ААТААТТАСТТА	AT4G28850	-	7	18	4.58e-05 (	0.0749	САТААТТАТАТА
AT1G26360	+	836	847	4.82e-06	0.0408	AATAATTAGTTT	AT3G21340	-	211	222	4.58e-05 (	0.0749	ATTAATTAAGTT
AT4G10350	-	107	118	1.07e-05	0.0408	TTTAATTATTTT	AT4G18650	-	281	292	4.58e-05 (	0.0749	ATTAATTAATTC
AT2G20520	-	245	256	1.07e-05	0.0408	AATAATTATATT	AT3G30775	-	317	328	4.58e-05 (	0.0749	TCTAATTAAATT
AT4G18650	-	285	296	1.07e-05	0.0408	ATTAATTAATTA	AT5G51520	-	327	338	4.58e-05 (	0.0749	СТТААТТАТАТА
AT2G32620	-	370	381	1.07e-05	0.0408	AATAATTATTTT	AT5G51520	-	507	518	4.58e-05 (	0.0749	GTTAATTATATA
AT4G08620	-	617	628	1.07e-05	0.0408	AATAATTATTTA	AT4G02270	-	515	526	4.58e-05 (	0.0749	ΑGTAATTAAATA
AT4G08400	-	646	657	1.07e-05	0.0408	TTTAATTAATTT	AT2G16980	_	530	541	4.58e-05 (	0.0749	САТААТТАТТТА
AT4G08400	-	655	666	1.07e-05	0.0408	AATAATTAATTT	AT2G39040	-	820	831	4.58e-05 (	0.0749	САТААТТАТТА
AT4G08410	-	661	672	1.07e-05	0.0408	TTTAATTAATTT	AT4G37160		834	845	4 58e-05 (	0 0749	ТСТА АТТАТАТАТА ТСТА АТТАТАТАТА
AT1G54970	-	771	782	1.07e-05	0.0408	ATTAATTAATTA	AT5G51520		800	010	4 58e-05 (	0.0749	
AT1G16905	-	920	931	1.07e-05	0.0408	ATTAATTAATTT	AT5G54370		922	033	4 58e-05 (	0.0749	
AT4G13390	-	950	961	1.07e-05	0.0408	AATAATTAAATT	AT4G02270		922	035	4.580.05	0.0749	
AT5G43590	+	182	193	1.07e-05	0.0408	ATTAATTAAATT	AT5C21080	-	924	935	4.580.05	0.0749	
AT4G18650	+	283	294	1.07e-05	0.0408	ATTAATTAATTA	AT 5G21080	-	935	940	4.586-05	0.0749	
AT4G08620	+	619	630	1.07e-05	0.0408	AATAATTATTTA	A14G08410	+	31	42	4.586-05	0.0749	
AT4G08400	+	648	659	1.07e-05	0.0408	ATTAATTAAATT	A15G22410	+	222	233	4.586-05	0.0749	
AT4G08410	+	663	674	1.07e-05	0.0408	ATTAATTAAATT	AT4G37610	+	225	236	4.58e-05	0.0749	TCTAATTAAATA
AT3G30775	+	695	706	1.07e-05	0.0408	АТТААТТАААТА	AT5G51520	+	329	340	4.58e-05 0	0.0749	TATAATTAAGTT
AT2G23410	+	721	732	1.07e-05	0.0408	TTTAATTAATTT	AT2G32620	+	372	383	4.58e-05 0	0.0749	AATAATTATTTG
AT1G54970	+	769	780	1.07e-05	0.0408	ATTAATTAATTA	AT2G16980	+	532	543	4.58e-05 (	0.0749	AATAATTATGTA
AT5G51520	+	901	912	1.07e-05	0.0408	TATAATTATTTT	AT4G08400	+	657	668	4.58e-05	0.0749	ATTAATTATTTC
AT5G54370	+	920	931	1.07e-05	0.0408	AATAATTAATTA	AT4G37610	+	740	751	4.58e-05	0.0749	GATAATTAAATA
AT2G21650	-	27	38	2.65e-05	0.0749	TTTAATTACCTT	AT2G39040	+	822	833	4.58e-05 (	0.0749	AATAATTATGTT
AT1G51470	-	740	751	2.65e-05	0.0749	ACTAATTACATT	AT3G59830	+	841	852	4.58e-05	0.0749	GTTAATTATATA
AT1G34520	+	54	65	2.65e-05	0.0749	ATTAATTACATG	AT5G59090	+	899	910	4.58e-05	0.0749	TATAATTATGTA
AT3G43110	+	431	442	2.65e-05	0.0749	CTTAATTACATT	AT5G57625	+	959	970	4.58e-05	0.0749	ATTAATTAATTC

## Figure S17. Liste des éléments *cis* ZFHD retrouvés dans les promoteurs de gènes cibles candidats.

Liste de l'ensemble des éléments *cis* identifiés par le logiciel MAST v.5.4.1 (en se basant au motif consensus ZFHD indiqué Fig.77), dans les régions promotrices des 32 gènes cibles candidats (parmi 82 gènes) identifiés parmi les DEG DOWN chez HB30-SRDXind et DEG UP chez HB30OE. Le numéro d'accession du gène associé à chaque motif est indiqué. Certains gènes possèdent plusieurs motifs. Cette liste est associée à la figure 77.

Mécanisme	DIP	Fonction	Références
	NAP	Dégradation de la chlorophylle et sénescence des feuilles	(Lei et al., 2020)
	MYB21 et MYB24	Elongation du filet des anthères	(Huang et al., 2020)
	HAT1	Initiation des trichomes et croissance foliaire	(Tan et al.,2021)
	WRKY6	Dégradation de la chlorophylle et sénescence induite par l'obscurité	(Zhang et al., 2018b)
	WRKY75	Floraison	(Zhang et al., 2018a)
	bHLH48 et 60	Floraison (jour long)	(Li et al., 2017)
	ALC	Formation des fruits	(Arnaud et al., 2010)
	ARF6	Elongation de l'hypocotyle	(Oh et al., 2014)
	BES1	Elongation de l'hypocotyle	(Bai et al., 2012)
	bHLH 38 et 39	Prélèvement du fer dans la racine	(Wild et al., 2016)
	BZR1	Elongation de l'hypocotyle	(Bai et al., 2012)
	со	Floraison	(Xu et al., 2016)
	EGL3	Développement des trichomes	(Qi et al., 2014)
Séquestration	EIN3	Développement de la crosse apicale	(An et al., 2012)
de FI	FIT	Prélèvement du fer dans la racine	(Wild et al., 2016)
	GL1 et 3	Développement des trichomes	(Qi et al., 2014)
	ML1	Germination des graines	(Rombolá-Caldentey et al., 2014)
	MYC2	Production de composés volatils dans les fleurs	(Hong et al., 2012)
	NF-YC9	Germination des graines et floraison	(Hou et al., 2014)
	PDF2	Germination des graines	(Rombolá-Caldentey et al., 2014)
	PIF3 et 4	Élongation de l'hypocotyle	(Feng et al., 2008 ; de Lucas et al., 2008)
	PIF5	Développement de la crosse apicale	(Gallego-Bartolomé et al., 2011)
	RAP2.3	Développement de la crosse apicale	(Rosa et al., 2014)
	SPL15	Floraison	(Hyun et al., 2016)
	SCL27	Skotomorphogenèse	(Ma et al., 2014)
	SCL3	Germination des graines, élongation de l'hypocotyle et de la racine	(Zhang et al., 2011)
	TCP14	Élongation de la tige, division cellulaire dans les méristèmes apicaux	(Davière et al., 2014)

**Tableau S1. Protéines interagissant avec les DELLA (DIP) chez** *Arabidopsis*, partie 1. DIP : DELLA interacting protein ; FT : facteur de transcription ; RT\* : régulateur transcriptionnel. Le code couleur orange correspond aux DIP récemment caractérisés, ne figurant pas dans la publication de Van De Velde., 2017. Adapté de Van De Velde., 2017.

Mécanisme	DIP	Fonction	Références
	CUC2	Nombre d'ovules	(Barro-Trastoy et al., 2022)
	ABI3 et 5	Germination des graines	(Lim et al., 2013)
Transactivation	ARR1	Taille méristème racinaire et dé-étiolation	(Marín-de la Rosa et al., 2015)
avec FT	IDD2/GAF1	Germination des graines et élongation	(Fukazawa et al., 2014)
	IDD3, 4, 5, 9 et IDD10/JKD	Inconnue	(Fukazawa et al., 2014; Hirano et al., 2017)
Transactivation avec RT*	BOIs	Germination des graines, transition juvénile-adulte, floraison	(Park et al., 2013)
Transactivation et séquestration de RT*	SPL9	Floraison	(Yu et al., 2012 ; Zhang et al., 2020)
Séquestration CRC	PKL	Skotomorphogenèse	(Zhang et al., 2014)
Séquestration Co-chaperone PFD5		Organisation des microtubules	(Locascio et al., 2013)
	BBX24	Evitement de l'ombre	(Crocco et al., 2015)
Séquestration de RT*	JAZ1	Croissance racinaire	(Hou et al., 2010)
	JAZ9	Défense et croissance	(Hou et al., 2010)
	NF-YA2 et NF-YB2	Floraison	(Hou et al., 2014)
Inconnu	NF-YC3, 4 et 9	Germination des graines et floraison	(Hou et al., 2014)
meonnu	IDD1/ENY	Maturation et germination des graines	(Feurtado et al., 2011)
	SWI3C	Inconnue	(Sarnowska et al., 2013)
	FLC	Floraison	(Li et al., 2016)

**Tableau S1. Protéines interagissant avec les DELLA (DIP) chez** *Arabidopsis*, partie 2. DIP : DELLA interacting protein ; FT : facteur de transcription ; RT\* : régulateur transcriptionnel ; CRC : complexe de remodelage de la chromatine. Le code couleur orange correspond aux DIP récemment caractérisés ne figurant pas dans la publication de Van De Velde., 2017. Adapté de Van De Velde., 2017.

Nom du mutant <i>zfhd</i>	Numéro d'accession du gène ciblé	Nom de la lignée T-DNA	NASC ID	Lieu d'insertio n du T- DNA	Statut	Type de mutant
hb23	AT5G39760	SALK_059288.53 .75.x	N559288	CDS	Homozygote mutant	Mutant nul
hb25	AT5G65410	SALK_133857C	N661156	CDS	Homozygote mutant	Mutant nul
hb28	AT3G50890	SALK_117668	N617668	3' UTR	Homozygote mutant	Mutant hypomorphe
hb29	AT1G69600	SAIL_818_D10	N877090	CDS	Homozygote mutant	Expression non affectée
hb29.2	AT1G69600	GK-408H11	N439167	CDS	Homozygote mutant	Expression probablement non affectée
hb30.1	AT5G15210	GABI_363F04	N434816	5' UTR	Homozygote mutant	Mutant hypomorphe
hb30.2	AT5G15210	SM3.3405		CDS	Homozygote mutant	Mutant hypomorphe
hb31	AT1G14440	SALKseq_11359 1.1	N927066	CDS	Homozygote mutant	Mutant nul
hb33	AT1G75240	SALK_097388.45 .35.x	N597388	CDS	Homozygote mutant	Expression non affectée
hb34	AT3G28920	SALK_085482C	N656708	CDS	Homozygote mutant	Mutant nul

## Tableau S2. Récapitulatif des mutants zfhd.

Tableau récapitulatif des mutants *zfhd* répertoriés par le laboratoire, regroupant les informations sur le statut et la caractérisation de ces mutants. Il s'agit de mutants d'insertion T-DNA obtenus auprès de la collection du Nottingham Arabdopsis Stock Centre (NASC). La colonne de gauche indique le nom de chaque mutants analysé, et le numéro de l'allèle lorsqu'il y en plusieurs (exemple : les mutants *hb30.1* et *hb30.2*).

# Matériels et méthodes

## 1. Matériels

## 1.1. Matériel végétal

## 1.1.1. Mutants d'insertion T-DNA

Les mutants d'insertion T-DNA utilisés dans cette étude proviennent des collections du Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC), (https://arabidopsis.info/), ont pour fond génétique Columbia-0 (Col-0). La liste complète des mutants utilisés dans cette étude est disponible dans le Tableau S2. Tous les mutants *zfhd* ont été caractérisés à l'état homozygote.

## 1.1.2. Lignées transgéniques

Pour des expériences préliminaires de Co-immunoprécipitation, la lignée *p35S:GFP-RGA* a été utilisée (Tai-ping Sun / Silverstone et al., 2001) et elle a été également transformée avec la construction *p35S:RFP-HB30* (Fig. S3B). J'ai généré toutes les autres lignées transgéniques nécessaires à mes travaux de thèse, sélectionnées à l'état homozygote, ainsi regroupées dans le tableau ci-dessous (fond génétique Col-0).

Construction intégrée chez Arabidopsis	Stratégie de transformation
pHB23:HB23-GFP, pHB30:HB30-GFP	
pHB23:GUS, pHB30:GUS,	
pHB23:HB23-GUS, pHB29:HB29-GUS,	
pHB30:HB30-GUS	
p35S:HB30-SRDX, pHB30:HB30-SRDX,	
pXVE:HB30-SRDX	Immersion florale
p35S:HB23-GFP, p35S:HB25-GFP, p35S:HB29-GFP,	
p35S:HB30-GFP, p35S:HB34-GFP	
pHB23:gai-RFP	
p35S:amiRHB30	
Guides ARN ciblant HB30 et HB33 en tandem avec le	
système Cas9	

## 1.2. Souches bactériennes et levures

1.2.1. Escherichia coli

- Souche TOP10 (Invitrogen) : Cette couche est utilisée pour amplifier les plasmides du système Gateway, après recombinaison.
- Souches Survival et DB3.1 (Invitrogen) : Ces souches servent pour amplifier des plasmides non-recombinés.

## 1.2.2. Agrobacterium tumefaciens

- Souche GV3101 : Cette souche est utilisée pour exprimer des protéines de manière transitoire chez *Nicotiana benthamiana* ou pour transformer *Arabidopsis thaliana*. Cette souche comporte un gène de résistance à la rifampicine sur son chromosome, ainsi qu'un plasmide Ti désarmé contenant un gène de résistance à la gentamycine. Le plasmide contient également les gènes de virulence *Vir* permettant d'intégrer dans le génome végétal un fragment d'ADN, situé entre les frontières droites et gauches de l'ADN de transfert.
- Souche GV3101 + pSOUP : Cette souche s'utilise pour permettre la réplication des plasmides pGREEN. Cette souche a été utilisée pour pouvoir réaliser les tests d'activité transcriptionnelle, à l'aide du système luciférase, nécessitant l'utilisation du plasmide pGREENii-0800.

## 1.2.3. Saccharomyces cerevisae

 Souche AH109 : Cette souche est requise pour la co-transformation de plasmides dans les expériences en double-hybride chez la levure. La souche AH109 est auxotrophe pour l'adénine (A) et l'histidine (H), qui sont apportés par les plasmides pGADT7 et pGBKT7 après co-transformation (son génotype est référencé dans le tableau IX, du manuel de Clontech : PT3024-1 (PR13103).

## 2. Méthodes

## 2.1. Techniques relatives à la culture d'Arabidopsis thaliana

## 2.1.1. Cultures in vitro

La stérilisation de surface des s'effectue par une solution d'éthanol 70%, pendant 15 min, puis par 2 lavages successifs à l'éthanol 100%, pendant 2 min chacun. Les graines séchées en condition stérile peuvent être semées sur boites de Pétri contenant du milieu 1x Murashige-Skoog (MS) standard (Duchefa Biochemical),1% sucrose et 1% d'agar (Sigma-Aldrich). Tous les milieux sont tamponnés à un pH 5,8, avec du KOH 1N. Après une stratification des graines pendant au moins 2 jours, à 4°C et à l'obscurité, les boîtes sont transférées en logette de culture *in vitro* avec une photopériode de 16h lumière / 8h obscurité (21°C/17°C) ou dans des armoires de cultures (Sanyo), sous une photopériode de 16h de lumière (85 µmol photons m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>) et 8h à l'obscurité, à une température de 22°C. Les armoires de cultures (Sanyo) ont été utilisées pour les analyses phénotypiques des mutants *zfhd* (hypocotyle et développement du système racinaire) et pour la culture des plantules Col-0 et *pHB30:HB30-GFP* destinées aux expériences de co-immunoprécipitation.

## 2.1.2. Culture *in vitro* avec induction à l'œstradiol (lignées HB30-SRDX)

Les graines sont semées sur milieu MS (1% agar), puis les plantules sont transférées après 9 jours de culture, dans un milieu MS liquide additionné d'œstradiol (50  $\mu$ M, dilué dans du DMSO) pendant 24 h, avant d'être récoltées. Les plantules contrôles (non-induites) sont quant à elles transférées en milieu MS liquide + DMSO, pendant 24h, avant d'être récoltées.

## 2.1.3. Cultures en sol

Les plantes cultivées en pots de 7cm de diamètre remplis de terreau (LAT-Terra Standard P – Hawita-Gruppe), sont placées en logette en conditions contrôlées sous une photopériode de 16h lumière / 8h obscurité (21°C/18°C). Un suivi quotidien requiert l'arrosage des pots et des traitements antiparasites effectués régulièrement, afin de maintenir les plantes dans un état sanitaire sain.

## 2.1.4. Transformation stable d'Arabidopsis thaliana

Les divers plasmides binaires issus des clonages (100ng) ont été introduits dans *Agrobacterium* GV3101 par électroporation (résistance : 400 Ohms – capacité : 25  $\mu$ Fahrad - voltage : 2 Volts, GenePulser®, Bioarad). Les agrobactéries transformées sont alors incubées 2 h, à 28°C, dans du milieu LB, puis étalées sur boîtes LB en présence de rifampicine (50  $\mu$ g/mL), gentamicine (50  $\mu$ g/mL), ainsi qu'un ou plusieurs antibiotiques nécessaires à la sélection du plasmide. Les colonies individuelles issues d'une transformation sont isolées après 3 jours d'incubation à 28°C.

Une colonie d'agrobactéries ayant intégrées le plasmide portant la construction d'intérêt est inoculée dans 20 mL de LB (avec antibiotiques appropriés) pour obtenir une pré-culture. La

veille de la transformation, 4 mL de pré-culture sont inoculés dans 300 mL de milieu LB (avec antibiotiques), et la culture est incubée sur la nuit, à 28°C, avec une agitation de 180 rpm. Après centrifugation (4000 rpm, 15 min et à température ambiante (RT) ou 21°C), le culot d'agrobactéries est repris dans 500 mL de tampon (50 g/L de sucrose, 500 µL/L de silwet) requis pour l'immersion florale des plants d'*Arabidopsis thaliana*. Les plantes transformées sont mises sous mini-serre et à l'obscurité pendant 48 h, pour favoriser le développement des agrobactéries. Puis, les plantes retrouvent les conditions standards de culture à la lumière. Après plusieurs semaines, les plantes sont mises en sachets pour faciliter la récolte des graines. Les graines récoltées, sont ensuite semées sur des plateaux de terreau, et après environ une semaine de culture (stade plantules ayant 2 feuilles), deux traitements BASTA sont appliqués à intervalle de 48 h. Une semaine après, les plantules résistantes, repiquées individuellement, constituent nos plantes T1. Les étapes suivantes de la sélection s'effectuent en cultures *in vitro*, en présence de glufosinate. Les lignées homozygotes 100% résistantes obtenues en 3<sup>ème</sup> génération (T3), et ne n'hébergeant qu'une seule insertion de la construction (ségrégation ¾ résistantes contre ¼ sensibles, en 2<sup>ème</sup> génération (T2)), sont analysées.

#### 2.2. Techniques relatives à l'ADN

#### 2.2.1. Extraction de l'ADN

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

Pour un grand nombre d'échantillons : Les échantillons sont récoltés dans un bloc en polypropylène de 96 puits (ABgene). Une bille métallique (3,5 mm de diamètre) est ajoutée dans chaque puit, ainsi que 500 µL de tampon « Magic Buffer » (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 300 mM sucrose). Les puits sont fermés en utilisant des capuchons spéciaux pour microtubes (Collection Microtube Caps (120 x 8), Qiagen). Les échantillons sont ensuite broyés à l'aide du TissueLyser II, à une fréquence de 30 rpm/sec pendant 2 min. L'opération est répétée en changeant l'orientation des blocs en polypropylène contenant les échantillons.

Les blocs sont ensuite centrifugés pendant 1 min à 1000 g (RT), pour éviter de contaminer les échantillons en retirant les capuchons. Enfin, 100 µL du surnageant sont transférés dans une nouvelle plaque, puis conservés à -20°C.

### 2.2.2. Purification de l'ADN

Après amplification d'un gène d'intérêt par PCR à partir de l'ADN génomique, une étape de purification est nécessaire avant séquençage. Des billes magnétiques sont ajoutées à la réaction PCR (v/v). Bien homogénéiser et attendre 5 min à RT. Les tubes sont placés sur un portoir magnétique pour séparer les billes de la solution (1 min). En laissant les tubes sur le portoir magnétique, récupérer le surnageant pour le jeter, puis ajouter 200  $\mu$ L d'éthanol 70% (fraichement préparé) par tube. Après 30 sec à RT, l'éthanol est récupéré pour être jeté. Le lavage à l'éthanol 70% est répété une secondaire fois, en laissant toujours les tubes sur le portoir magnétique, puis laisser sécher les tubes 10 min à RT. Après avoir enlevé les tubes du portoir magnétique, ajouter 20  $\mu$ L d'eau et resuspendre doucement, puis laisser les tubes pendant 2 min à RT. Les tubes sont ensuite replacés sur le portoir magnétique et après 1 min d'attente le surnageant est transféré, dans un nouveau tube, en prenant soin de ne pas pipeter de billes magnétiques.

#### 2.2.3. Purification de plasmide

Les bactéries sont cultivées dans 4 mL de milieu LB (lysogeny broth) avec l'antibiotique de sélection, pendant 1 nuit, à 37°C, sous agitation à 200rpm. L'ADN plasmidique est extrait des bactéries par lyse alcaline à l'aide du kit de miniprépraparation NucleoSpin® Plasmid EasyPure (Macherey-Nagel), selon les indications fournies par le fabricant. Lorsque des concentrations plus importantes en plasmides sont nécessaires, notamment pour les plasmides utilisés pour l'expression de protéine en système Wheat germ, un kit de midipréparation (NucleoBond® Xtra Midi) est alors utilisé.

#### 2.2.4. La PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) permet d'amplifier *in vitro* un fragment d'ADN d'intérêt grâce à l'ADN polymérase thermostable de Thermus aquaticus (Taq). Les amorces utilisées sont décrites dans les annexes 1 à 11. Les PCR de contrôle et de génotypage ont été réalisées avec la Taq Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific) ou avec une Taq produite au sein de l'institut pour les génotypages conséquents (HomeTaq). Les PCR d'amplifications

de fragments avant clonage ont été effectuées avec la Taq Phusion High-Fidelity (Thermo Scientific). D'après les indications préconisées par le fabricant, nous avons utilisé les mélanges réactionnels suivants :

<b>Phire Hot Start II</b> (20 μL de volume réactionnel)		<b>Phusion High-Fidelity</b> (50 μL de volume réactionnel)		<b>HomeTaq</b> (15 μL de volume réactionnel)	
Matrice d'ADN	100 ng	Matrice d'ADN	100 ng	Matrice d'ADN	1 µL
Amorce sens (10µM)	0,5 μL	Master Mix 2X	25 µL	Tampon de l'enzyme 10X	1,5 µL
Amorce antisens (10µM)	0,5 μL	Amorce sens (10µM)	1 μL	dNTP (10µM)	0,3 μL
dNTP (10µM)	0,4 μL	Amorce antisens (10µM)	1 µL	Amorce sens (10µM)	0,5 μL
Tampon de l'enzyme 5X	4 μL	QSP H <sub>2</sub> O	50 µL	Amorce antisens (10 $\mu$ M)	0,5 μL
ADN polymérase	0,2 μL			BSA (10mg/mL)	1,5 µL
QSP H₂O	20 µL			PVP (5%)	3 μL
				Tampon de chargement 10X	1,5 μL
				ADN polymérase	0,3 μL
				QSP H₂O	15 μL

Le protocole d'amplification après une étape de dénaturation des brins d'ADN à 95°C, comprend 30 cycles (et jusqu'à 35 cycles pour les RT-PCR), composés d'une dénaturation à 95°C, de l'hybridation des amorces sur la matrice d'ADN à une température définie d'après la température de fusion (Tm) des deux amorces, d'une étape d'élongation à 72°C, et d'une dernière étape finale de 5 min à 72°C terminant l'élongation des brins. En fonction de l'enzyme utilisée, le programme de PCR est le suivant :

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

La révélation de l'amplification se fait sous UV après électrophorèse sur gel d'agarose 1% (pouvant varier suivant la taille des amplicons) (Agarose A9539-500G, SIGMA-ALDRICH) contenant du bromure d'ethydium (BET), dans du tampon TAE (40mM Tris-acétate, 0,1mM EDTA).

## 2.2.5. Purification des produits de PCR

Les fragments à cloner sont amplifiés à l'aide d'amorces spécifiques par PCR à partir d'ADN génomique de Col-0, puis séparés par migration sur gel d'agarose 1% (SeaKem® GTG® Agarose, Lonza). Le fragment d'intérêt est découpé du gel à la taille attendue et purifié à l'aide du kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel), selon les indications fournies par le fabricant.

## 2.2.6. Clonage par le système Gateway

Cette technique permet de transférer efficacement des fragments d'ADN entre des plasmides, en utilisant des séquences recombinantes nommées « att ». Les fragments purifiés sont insérés dans le vecteur d'entrée pDONR207 ou pDONR221 (Invitrogen) par réaction enzymatique BP (BP Clonase II, Invitrogen), une nuit à 22°C, et la réaction est arrêtée par une incubation de 10 min à 37°C, avec 1  $\mu$ L de protéinase K (Invitrogen). 5  $\mu$ L de la réaction BP sont ajoutés aux bactéries compétentes TOP10, avant de réaliser un choc thermique de 1 min, à 42°C. Les bactéries transformées sont incubées 45 min, à 37°C dans du milieu LB, avant d'être étalées sur boîtes LB agar en présence de l'antibiotique nécessaire à la sélection du plasmide. Les boites sont incubées une nuit à 37°C. Les plasmides sont purifiés selon la méthode décrite en partie 2.2.3. La séquence codante du gène d'intérêt inséré dans le plasmide est vérifiée par séquençage. Ensuite, par réaction enzymatique LR (LR Clonase II, Invitrogen) en présence du vecteur d'entrée et du vecteur de destination une nuit à 22°C, le gène d'intérêt est introduit par recombinaison homologue (au niveau des sites attB) dans le vecteur binaire adapté. Le vecteur est amplifié dans E. coli en suivant le même protocole que dans l'étape précédente, en utilisant cette fois les antibiotiques nécessaires à la sélection du plasmide de destination, puis introduit dans Agrobacterium tumefaciens d'après le protocole décrit partie 2.1.4.

Le système Gateway a été utilisé pour une majorité des clonages effectués tout au long de mes travaux de thèse, l'ensemble des clonages sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Insert	Plasmide
HB21, HB22, HB23, HB24, HB25, HB26,	pDONR221, pGADT7
HB27, HB28, HB29, HB30, HB31, HB32,	
HB33, HB34	
HB23-stop, HB25-stop, HB29-stop,	pDONR221, pB7FWG2, pB7RWG2
HB30-stop, HB34-stop	

pHB23:HB23, pHB29:HB29, pHB30:HB30	pDONR221, pGWB655
$\Delta$ HD et $\Delta$ ZF pour HB30,	pDONR221, pGADT7
$\Delta$ HD et $\Delta$ ZF pour HB34	
HB34	pB7WGR2
RGA	pB2GW7
HB30, RGA, GFP	pHM6WA
	(Vecteur de destination pour expression des
	protéines en wheat germ, promoteur TNT,
	tag FLAG et HIS)
pHB23, pHB30, pHB23:HB23,	pDONR221, pGWB633
pHB29:HB29, pHB30:HB30	
HB30-SRDX	pDONR221, pB2GW7, pMDC7 (Vecteur de
	destination avec promoteur inductible à
	l'œstradiol)
pHB30:HB30-SRDX	pDONR207, pGWB1
pHB23:gai	pB7RWG2 (Digestion du promoteur <i>p35S</i>
	au préalable)
amirRHB30	pB2GW7
Guides Crispr-Cas9 ciblant HB30 et HB33	pENchemira2x (Vecteur d'entrée pour les
	guides), pYAO:hSpCas9 (Vecteur de
	destination avec le système Cas9)

2.2.7. Clonage par enzyme de restriction

• Modification d'un promoteur dans un plasmide de destination

Le promoteur *p35S* a été digéré du plasmide pB7RWG2 pour être remplacé par le promoteur *pHB23*. Les sites de restriction spécifiques à HindIII et Spel sont ajoutés par PCR aux extrémités de *pHB23* pour permettre l'insertion du fragment dans le pJET1.2. Le protocole suivant a été utilisé :

1. Ligation du promoteur *pHB23* dans le PJET1.2 à l'aide du kit CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific).

Dans 10 $\mu$ L VF : 1 $\mu$ L de produit PCR purifié (entre 30 et 50ng/ $\mu$ L)

1µL de pJET1.2 (résistance ampicilline)

1µL de T4 DNA ligase

1µL de tampon de réaction 10X

#### QSP 10µL H<sub>2</sub>O

2. Ligation à 22°C, pendant 4 h (aucun arrêt de réaction n'est nécessaire).

3. Transformation directe des bactéries thermo-compétentes TOP10, avec le produit de ligation, avant d'être étalées sur boîtes LB en présence d'ampicilline.

4. Les plasmides sont alors amplifiés et purifiés selon la méthode décrite en partie 2.2.3.

5. Analyse PCR avec des amorces spécifiques à l'insert ou au pJET1.2. Sélection des clones présentant une bonne amplification (la plus forte et la plus spécifique des amplifications, une absence totale de bandes parasites est attendue).

5. Digestion du plasmide de destination de l'insert (pour ôter le promoteur p35S) + digestion du pJET1.2 avec insert (*pHB23*). Les enzymes de restriction FastDigest (Thermo Scientific) ont été utilisées.

Pour une digestion :

2µL de tampon FastDigest

0,25µL de l'enzyme de restriction 1

0,25µL de l'enzyme de restriction 2

 $5\mu$ L du pJET1.2 contenant l'insert d'intérêt ou du plasmide de destination QSP  $20\mu$ L H<sub>2</sub>O

6. Incuber la réaction à 37°C, pendant 30 minutes (l'inactivation n'est pas obligatoire), puis vérification des digestions par électrophorèse sur gel d'agarose (1%).

7. Ligation du promoteur *pHB23* dans le plasmide de destination digéré.

Dans 10µL VF : 1µL de T4 ligase (2ème étage) 10X

1µL de tampon de réaction 10X

2µL de l'insert

1µL du plasmide digéré

QSP 10µL H<sub>2</sub>O

8. Ligation à RT pendant 2 h.

9. Transformation des bactéries thermo-compétentes Survival ou DB3.1 avec le produit de ligation, avant d'être étalées sur boîtes LB, en présence des antibiotiques nécessaires à la sélection du plasmide de destination.

10. Les plasmides sont alors amplifiés et purifiés selon la méthode décrite en partie 2.2.3. Une PCR de vérification et permet de vérifier la bonne insertion du fragment (pHB23) dans les plasmides sélectionnés (pB7RWG2).

11. Les nouveaux plasmides de destination peuvent alors être utilisés pour un clonage classique à l'aide du système Gateway (réaction LR).

• Clonages pour les tests d'activité transcriptionnelle à l'aide du système luciferase

La construction synthétisée par l'entreprise Genscript : (TTCAT<u>TAAT</u>TACGTAAAAAA ou TTCAT<u>GGG</u>TTACGTAAAAAA)x6-*pCAMV35S*-activateur de la traduction  $\Omega$ , est insérée dans le plasmide pUC57. Les sites de restriction des enzymes Pstl et Ncol sont présents aux extrémités de la construction synthétique. Le fragment est digéré à l'aide des enzymes Pstl et Ncol FastDigest (Thermo Scientific), puis introduit dans le plasmide pGREENii-0800. Le protocole utilisé pour les étapes de digestion/ligation est identique à celui détaillé ci-dessus, selon les recommandations du fabricant. Une étape supplémentaire de déphosphorylation, après digestion de la construction synthétique, a été nécessaire pour ce clonage. L'enzyme thermosensible FastAP (Thermo Scientific) a été utilisée (déphosphorylation pendant 10 min à 37°C, puis inactivation de l'enzyme pendant 5 min à 75°C).

## 2.2.8. Génotypage des mutants d'insertion T-DNA

Extraction de l'ADN génomique chez les mutants *zfhd* (selon le protocole décrit partie 2.2.1.), puis caractérisation par PCR (à l'aide du protocole décrit en partie 2.2.4.), en utilisant un couple d'amorces spécifiques (Annexe 4) à chaque gène *ZFHD*, ainsi que l'amorce LBb1 spécifique au T-DNA (5' gcgtggaccgcttgctgcaact 3').

## 2.3. Analyse de l'expression génique

## 2.3.1. Extraction des ARN

100mg de matériel végétal est introduit dans un tube Eppendorf de type « safe lock » contenant des billes de verres (Ø 0,5mm) stériles, puis congelé dans de l'azote liquide. Le matériel est réduit en poudre à l'aide du broyeur Precellys®. Les ARN totaux sont extraits à l'aide du kit NucleoSpin® RNA Plant de Macherey Nagel, en suivant le protocole fourni. La concentration en ARN est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm (Nanodrop 2000, Thermo Scientific).

Suivant les expériences, les ARN totaux sont extraits avec un second protocole. Après le broyage du matériel végétal, la poudre est homogénéisée dans 1 mL de TRI Reagent® (Molecular Research Center). Après un 2<sup>nd</sup> broyage, 200  $\mu$ L de chloroforme (Carlo ERBA) sont ajoutés, puis les échantillons sont incubés 5 min, dans la glace. Après une centrifugation 4°C, à 21 000 g, pendant 7 min, la phase aqueuse (400  $\mu$ L) est prélevée, puis mélangée à 400  $\mu$ L d'isopropanol (v/v). Après agitation, les ARN sont précipités pendant 30 min à RT. Après

centrifugation à 4°C, à 21 000 g, pendant 15 min, le surnageant est enlevé et le culot contenant les ARN est lavé avec 1 mL d'éthanol 70%. Après évaporation de l'éthanol, les ARN sont resuspendus dans 100  $\mu$ L d'H<sub>2</sub>O RNA-free. La concentration en ARN est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm (Nanodrop 2000, Thermo Scientific).

#### 2.3.2. Transcription inverse des ARN

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

#### 2.3.3. PCR quantitative

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

#### 2.3.4. Analyse RNA-seq

Les lignées surexpresseurs *HB30* utilisées pour cette expérience (âgées de 10 jours) ont été cultivées en armoire de culture selon les conditions décrites partie 2.1.1. Pour les lignées inductibles HB30-SRDX (âgées de 10 jours), selon les conditions décrites partie 2.1.2. Le matériel végétal, préalablement congelé dans de l'azote liquide, est réduit en poudre à l'aide d'un mortier et un pilon. Les ARN totaux sont extraits à l'aide du kit RNeasy Plant Mini Kit de Quiagen, en suivant le protocole fourni. L'analyse RNA-seq est réalisée par l'entreprise Microsynth.

#### 2.4. Analyse des protéines

## 2.4.1. Extraction des protéines totales

100 mg de matériel végétal préalablement congelés dans de l'azote liquide sont réduits en poudre à l'aide de billes en verre et de l'utilisation du broyeur Precellys®. Les protéines sont extraites en présence d'un tampon dénaturant (Tris-base 62,5 mM, Urée 4 M, SDS 3% (p/v), dithiothréitol (DTT) 100 mM, Glycérol 10% (v/v), Bleu de bromophénol 0,1% (p/v), pH 6.8) en suivant une étape de dénaturation à 95°C pendant 5 min, et une centrifugation à 21 000 g, pendant 15 min. Le surnageant contenant les protéines totales est collecté, puis conservé à - 20°C.

## 2.4.2. Quantification des protéines

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

## 2.4.3. Séparation et détection des protéines par SDS-PAGE.

Entre 5 et 15 µg de protéines totales par extrait sont séparées par migration électrophorétique dans un gel acrylamide de 8% à 10% dénaturant SDS-PAGE (préparé selon Sambrook et Russel, 2001). Les protéines séparées selon leur taille apparente par migration pendant 2 h à 110V dans un tampon Tris-Glycine (Tris- Base 25 mM, Glycine 250 mM, SDS 10%). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane en PVDF (PolyFluorure de Vinyldène) Immobilon-P (Millipore) dans un système Mini Trans Blot Cell (Biorad), pendant 2 h à 100 V, dans un tampon de transfert (25 mM Tris-base, 192 mM Glycine, 15% éthanol technique (v/v)). Après transfert, la membrane est bloquée pendant 1 h, dans du TBS-T (Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, Tween 20 0,1% (v/v)), contenant 5% de lait en poudre, ou 2% de BSA (si l'anticorps

primaire est dilué dans le BSA). Après blocage, la membrane est incubée une nuit, à 4°C, avec l'anticorps primaire, ensuite, lavée 3 fois avec du TBS-T, pendant 10 min, puis incubée avec l'anticorps secondaire à température ambiante, pendant 2 h. Après 3 nouveaux lavages de 10 min dans du TBS-T, la révélation s'effectue par chimiluminescence, avec du Luminata Forte Western HRP (Millipore) ou Clarty Max<sup>™</sup> Western ECL (Biorad). Les anticorps primaires utilisés sont l'anti-RGA (dilué au 1000<sup>ème</sup>, Agrisera), l'anti-GFP (dilué au 2000<sup>ème</sup>, JL8, Clontech), l'anti-RFP (dilué au 2000<sup>ème</sup>, 6G6 α-red, Chromotek), l'anti-MYC (dilué au 2000<sup>ème</sup>, 1A1, Euromedex) et l'anti-HA couplé à la HRP (dilué au 2000<sup>ème</sup>, Sigma-aldrich). Les anticorps secondaires utilisés correspondent au 'goat anti-rabbit IgG' et au 'goat anti-mouse IgG' (dilué au 10000ème, Molecular Probe), couplés à la HRP (Horseradish peroxidase). Le contrôle de charge consiste en la coloration de la membrane au bleu de Coomassie (450 mL méthanol, 450 mL H<sub>2</sub>O, 100 mL acide acétique, 2,5 g Brillant blue R250 (Sigma-Aldrich)), pendant 20 min, suivie de plusieurs lavages à l'eau distillée, puis séchage de la membrane.

## 2.4.4. Observation de la fluorescence GFP et RFP par microscopie confocale

La fluorescence GFP (excitation max à 488 nm/émission max à 510 nm) et la fluorescence RFP (excitation max à 555 nm/émission max à 584 nm) s'observent à l'aide du microscope confocal Zeiss LSM780 avec un objectif 20X. Toutes les images pour une expérience donnée, ont été réalisées avec les mêmes modifications et selon les mêmes paramètres d'intensité.

## 2.4.5. Expression transitoire de protéines chez *Nicotiana benthamiana*

La veille de l'infiltration, une colonie d'agrobactéries transformées est inoculée dans 20 mL de LB (avec antibiotiques, dans des tubes Falcon 50 mL). Une colonie d'agrobactéries *p35S:P19* est également inoculée dans 20 mL (rifampicine (50 µg/mL) et gentamicine (50 µg/mL)), cette lignée s'utilise comme suppresseur d'extinction de gènes, pour les expériences d'expression transitoire. Après centrifugation (3000 rpm, 20 min et à température ambiante), le culot d'agrobactéries est repris dans 15 mL de tampon d'infiltration, puis elles sont placées à 28°C sous agitation, pendant une heure. Pour 200 mL de tampon d'infiltration (9 plants) : 0,39 g de MES, 2 mL de MgCl2 1 M, puis ajuster le pH à 5,8 et rajouter ensuite 200 µL d'acétosyringone 200 mM. La DO à 600nm des cultures d'agrobactéries est mesurée, afin de déterminer le volume nécessaire pour arriver aux concentrations en agrobactéries souhaitées dans les 5 mL de tampon d'infiltration (0,15 de DO pour P19 et 0,10 de DO pour les agrobactéries portant le plasmide d'intérêt). L'infiltration se fait dans les cellules de la face abaxiale des jeunes feuilles de *Nicotiana benthamiana*. Les plantes infiltrées sont alors

placées en logette de culture (16h lumière / 8h obscurité), pendant 48 h, à 21°C, avant analyse au microscope confocal ou extraction protéique.

## 2.5. Analyses histochimiques

## 2.5.1. Coloration GUS

Le matériel végétal est infiltré sous vide (0,8 bar) pendant 15 min dans une solution GUS (5bromo- 4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D- glucuronide (X-Gluc) 250  $\mu$ g/mL, 50 mM sodium phosphate pH 7,2 mM potassium ferrycyanide, 2 mM potassium ferrocyanide, 10 mM EDTA, 0,01% Triton X-100 (v/v)). Après une nuit d'incubation, à 37°C, la réaction est arrêtée par immersion des plantules dans de l'éthanol 70% (v/v).

## 2.6. Techniques relatives aux interactions protéine-protéine

## 2.6.1. Double-hybride

Les couples d'amorces, spécifiques de chacun des 14 membres ZFHD sont référencés en annexe 1. Les CDS de chacun des gènes ZFHD sont fusionnés au domaine d'activation GAL4 du vecteur double hybride de levure pGADT7 (Clontech). Le laboratoire disposait des constructions ADNc de RGA et GAI, fusionnés au domaine de liaison GAL4 du vecteur pGBKT7 (Clontech). La souche de levure AH109 a été co-transformées avec les constructions BD-DELLA et AD-ZFHD ou vecteurs vides, selon la méthode utilisant l'acétate de lithium, protocole fourni par la compagnie Clontech (www.clontech.com protocole #PT3020-1 (PR13103). Les tests d'interactions sont évalués par croissance des levures sur milieu sélectif, milieu minimum (SD) déplété de 4 acides aminés SD-LWAH (Leucine, Tryptophane, Alanine et Histidine), après incubation à 30°C, pendant 5 jours.

Pour vérifier l'expression des protéines d'intérêts (ZFHD ou DELLA) dans les levures cotransformées, une extraction de protéines totales a été conduite, selon le protocole décrit ciavant pour les plantes, à partir de 5 mL de culture de levures cultivées sur la nuit. Les protéines sont analysées par Western blots et révélées grâce aux anticorps, d'une part, anti-HA couplé à la HRP (Sigma) pour les ZFHD, et autre part, un anticorps primaire anti-MYC (1A1, Euromedex), suivi d'un anticorps secondaire anti-HRP (Molecular Probe), pour les DELLA, respectivement.

#### 2.6.2. FRET-FLIM

48h après infiltration, des disques foliaires sont prélevés à partir de feuilles de *Nicotiana benthamiana* agro-infiltrées avec les différentes constructions d'intérêts en combinaison (selon le protocole décrit dans la partie 2.4.5.) et observés avec un microscope confocal inversé Zeiss LSM510 avec un objectif x20. Le Fluorescence-lifetime imaging microscopy (FLIM) est mesuré grâce au microscope Nikon TE2000 connecté au système LiFA FLIM. La demi-vie de la fluorescence se mesure grâce au logiciel LiFLIM version 1.2.8., sur des feuilles de *Nicotiana benthamiana*, exprimant RFP-HB30, RFP-HB34 et GFP-RGA-GFP (contrôle) seuls ou combinés. Le pourcentage de FRET est déterminé selon l'équation suivante :



Dans cette équation, GFP représente le temps de demi-vie de la GFP, GFPRFP représente le temps de demi-vie de la GFP en présence de la RFP, et ngfp, ainsi que ngfprfp représentent le nombre de noyaux analysés pour chaque combinaison de constructions lors de l'étude FLIM FRET. Le pourcentage issu de ces données, nous indique la force d'interaction des deux protéines testées. Si ce dernier est >7%, une interaction entre les deux protéines est confirmée. Pour chacune des combinaisons expérimentées, entre 50 et 80 noyaux sont analysés.

#### 2.6.3. Co-immunoprécipitation (Co-IP)

Des expériences de Co-IP pour les protéines RGA et HB30 ont été conduites à partir des lignées stades d'*Arabidopsis thaliana* exprimant la construction *pHB30:HB30-GFP*. Le protocole suivi est décrit en détails dans la publication Davière et al., 2014. Le kit µMACS GFP-tagged beads (Miltenyi Biotec), ainsi que les colonnes M columns (Miltenyi Biotec) ont été utilisés en suivant les recommandations du fournisseur. Lors de cette expérience, 100 µL de protéines avant passage sur colonne (INPUT), ainsi que 80 µL de protéines purifiées issues de la Co-IP, ont été recueillis. Les protéines captées par l'immunoprécipitation, ainsi que les protéines associées, sont analysées par Western Blot et révélées à l'aide d'anticorps spécifiques. Les expériences préliminaires de Co-IP présentées dans cette étude, à partir de protéines accumulées de manière transitoire chez *Nicotiana benthamiana* (selon le protocole

décrit dans la partie 2.4.5.) ou en utilisant des lignées stables d'*Arabidopsis thaliana* exprimant *HB30* sous un promoteur constitutif, ont été conduites en suivant le même protocole.

## 2.7. Techniques relatives aux interactions protéines-ADN

## 2.7.1. Retard sur gel (EMSA, Electro-Mobility Shift Assay)

Les protéines HB30 et RGA ont été produites *in vitro*, en utilisant un extrait de germe de blé (kit TnT coupled wheat germ extract system de Promega), qui permet de coupler transcription et traduction en une seule réaction. Deux sondes ADN ont été utilisées, une sonde sauvage (WT) comprenant l'élément *cis* consensus défini en Fig. 52 et de séquence : TTCATTAATTACGT, et une version mutée de la sonde (MUT) : TTCAT<u>GGG</u>TTACGT, où le motif TAAT a été remplacé par GGGT. Les séquences complètes des oligonucléotides sont disponibles en annexe 6. Les sondes oligonucléotidiques ont été radiomarquées au <sup>32</sup>P-dCTP au niveau des leurs extrémités avec l'enzyme Klenow (Fermentas). La réaction EMSA a été conduite avec les sondes radiomarquées au <sup>32</sup>P, 2 µg de compétiteur poly(dl-dC) et environ 100 ng de la protéine HB30 seule ou en combinaison avec RGA, puis incubée à RT pendant 20 min. Les réactions d'interactions ont été analysées par électrophorèse avec un gel d'acrylamide 6% (conditions natives) dans du tampon 0,5 X TBE. Après séchage, le gel a été autoradiographé à -80°C, pendant une nuit.

# 2.7.2. Mesure de l'activité transcriptionnelle du complexe HB30-DELLA *in planta* à l'aide du système luciferase/renilla

Des disques foliaires sont prélevés, à partir de feuilles de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltrées avec les différentes constructions d'intérêts en combinaison (ainsi que la construction *p35S:P19,* toujours présente, qui est un suppresseur d'extinction de gène ou 'silencing') et congelés dans de l'azote liquide. Le matériel végétal est broyé à l'aide de billes en verre (Ø 0,5mm) dans des tubes Eppendorf SafeLock 1,5mL. Entre deux broyages, 150 µL de tampon de lyse sont ajoutés. Le broyat est centrifugé à 13000 rpm, pendant 5 min, à 4°C. Dans une plaque 96 puits (Nunc®, Thermo Scientific), 3 µL du surnageant de l'extrait sont ajoutés à 40 µL de Luciferase, puis la plaque est centrifugée 1 min, à 500 rpm. Après 10 min d'attente minimale, (pour permettre la lyse des cellules), à l'obscurité, la luminescence de la firefly est mesurée à l'aide d'un luminomètre (FLUOstar Omega, BMG LABTECH) utilisant le logiciel Omega - Control (version 5.70 R2). Ensuite, 40 µL de Dual-Glo sont ajoutés dans chaque puits, puis la plaque est de nouveau centrifugée 1 min à 500 rpm. Après 10 min d'attente minimale, à l'obscurité, la luminescence de la renilla est mesurée. Les valeurs des activités luciférases sont obtenues à l'aide du logiciel Mars (version 4.00 R2). Le ratio firefly/renilla des activités luciférases mesurées, permet de normaliser les valeurs de notre condition par rapport à un contrôle interne (d'après le protocole utilisé dans Resentini et al., 2015).

## 2.8. Clonage des lignées transgéniques

## 2.8.1. Les micro-ARN artificiels

Nous avons suivi le protocole « Cloning of artificial microRNAs » de Rebecca Schwab, MPI for Developmental Biology Tuebingen, 2005 avec le plasmide pRS300 comme matrice. Les amorces ont été dessinées à l'aide du logiciel http://wmd3.weigelworld.org, pour les différents couples de gènes ciblés, et sont référencées dans l'annexe 8. Après clonage et vérification par séquençage, les constructions ont été intégrées à l'aide du système Gateway (décrit partie 2.2.6.), dans le plasmide pB2GW7 (promoteur 35S). La séquence de l'amiR ciblant spécifiquement *HB30* est la suivante : TACTGACTAAACTTCGTGCTG.

2.8.2. Fusion d'un domaine SRDX, afin de convertir un facteur de transcription en répresseur

Nous avons fusionné un domaine SRDX (Hiratsu et al., 2003) « GGGCTGGATCTG GATCTAGAACTCCGTTTGGGTTTCGCTTAA » en 3' de la séquence codante pour HB30. Après clonage et séquençage, la construction *HB30-SRDX* a été intégrée à l'aide du système Gateway dans le plasmide pMDC7 (sous le contrôle d'un promoteur *pXVE*, inductible à l'œstradiol). La construction *HB30-SRDX* a également été introduite dans le plasmide pB2GW7 et la construction *pHB30:HB30-SRDX* dans le plasmide pGWB1, respectivement. Les amorces utilisées pour cette expérience sont référencées dans l'annexe 9.

## 2.8.3. Stratégie CRISPR-Cas9

Deux ARN guides ont été sélectionnés pour chaque gène cible (*HB30* et *HB33*) et intégrés dans le plasmide pEnchemira2X (Chakrabarti et al., 2019). Ce plasmide pouvant accepter 2 ARN guides, l'un ciblant *HB30* et l'autre ciblant *HB33*, ont été intégrés en combinaison. Les guides sont ensuite transférés dans un second plasmide contenant, entre autre, le gène codant pour l'enzyme Cas9 : pYAO:hSpCas9. Le quadruple mutant *hb23 hb25 hb31 hb34*, ainsi que des plantes Col-0, ont été transformées avec ce plasmide (d'après le protocole décrit dans la partie 2.1.4).

## Guides ciblant *HB30* : ATTGCGTTAGTGAAGCGGGGTCAT et ATTGCTCGCACTCTCTGGAGGAAG Guides ciblant *HB33* : ATTGAATGGACGGCGTTGGAAGCT et ATTGCACTCACGGTATCTTACGGT

Les graines ayant intégrées la construction, qui expriment alors la GFP, sont sélectionnées à l'aide du microscope Axiozoom, puis, semées et les plantes cultivées en logette de culture en conditions contrôlées sous une photopériode de 16h lumière / 8h obscurité (21°C/18°C). Après floraison des plantes, une étape de sélection est alors conduite à l'aide d'un séquençage des gènes ciblés par les ARN guides, à partir des ADN génomiques (extraits puis purifiés selon les protocoles détaillés dans les parties 2.2.1. et 2.2.2., respectivement). Les graines issues de ces plantes sont à nouveau analysées à l'aide du microscope Axiozoom en veillant cette fois à sélectionner uniquement celles qui n'expriment pas de GFP, signe que le gène codant pour la Cas9 n'est plus intégré dans le génome de la plante.

## 2.9. Analyses phénotypiques chez Arabidopsis thaliana

## 2.9.1. Cultures in vitro

## 2.9.1.1. Mesure de la longueur des hypocotyles

Les plantules analysées dans cette expérience sont âgées de 7 jours et ont été cultivées dans des armoires de cultures (Sanyo) (d'après le protocole 2.1.1.), sous une photopériode de 8h de lumière (faible intensité) et 16h à l'obscurité, à une température de 22°C. Les plantules sont scannées, ensuite, la longueur des hypocotyles a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ.

## 2.9.1.2. Mesure de la longueur des racines

Les plantules analysées dans cette expérience sont âgées de 14 jours et ont été cultivées dans des armoires de cultures (Sanyo) (d'après le protocole 2.1.1.), sous une photopériode de 16h de lumière (85 µmol photons m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>) et 8h à l'obscurité, à une température de 22°C. Après le scan des plantules, la longueur des racines primaires et secondaires a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ.

#### 2.9.2. Cultures en sol

Les conditions de cultures en sol sont détaillées dans la partie 2.1.3.

#### Matériels et méthodes

## 2.9.2.1. Mesure de la surface foliaire

La surface foliaire de chaque plante est mesurée chaque jour, à partir du 11<sup>ème</sup> jour après germination et jusqu'au 24<sup>ème</sup> jours après germination, (avant initiation de la hampe florale). Ces mesures ont pu être réalisées grâce à un script, développé avec l'aide de Jérôme Mutterer (IBMP), utilisable sur le logiciel ImageJ.

## 2.9.2.2. Analyse du temps de floraison

Le temps de floraison pour un génotype est validé dès lors que la hampe florale a émergé chez au moins 50% de la population analysée, au cours d'observations quotidiennes.

## 2.9.2.3. Mesure de la hauteur des plantes

La hauteur de la hampe florale principale est mesurée après la fin du développement des inflorescences, les plantes sont âgées d'au moins 8 semaines.

## 2.9.2.4. Analyse de la ramification des parties aériennes

Comme ci-avant, les différents paramètres sont mesurés après la fin du développement des inflorescences, chez des plantes âgées d'au moins 8 semaines.

## 2.10. Analyses statistiques

Pour les expériences de FRET-FLIM et les études phénotypiques, les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel RStudio (Version 1.1.463 – © 2009-2018 RStudio, Inc.). Plusieurs tests statistiques ont été utilisés dans cette étude : le test de Kruskal-Wallis, le test Anova à 2 facteurs, suivi d'une comparaison de Tukey (au risque inférieur à 1 ou 5%), ou le test de Welch.

Pour les analyses qRT-PCR, l'erreur standard qui est représentée est calculée à partir des valeurs ΔCT des réplicats techniques, valeurs obtenues à l'aide du logiciel LightCycler480 1.5.0 SP3.
Pour les tests d'activité transcriptionnelle, l'erreur standard (ou erreur type) indique la variabilité technique entre les réplicats. Les différences significatives sont calculées à l'aide d'un test t de Student (p < 0.05).

2.11. Autres constructions utilisées dans cette étude

Les constructions utilisées dans cette étude, préalablement obtenues par le laboratoire, sont regroupées dans le tableau ci-dessous.

Insert	Plasmide
M5RGA, M5GAI, M5RGL1, M5RGL2,	pGBKT7
M5RGL3	
RGA	pB7WGF2
del1RGA, del2RGA, F1RGA, ReligRGA	pGBKT7
RGA-HA	pB2GW7
gai	pDONR221

# Bibliographie

Aach, H., Bse, G., and Graebe, JanE. (1995). ent-Kaurene biosynthesis in a cell-free system from wheat (Triticum aestivum L.) seedlings and the localisation of ent-kaurene synthetase in plastids of three species. Planta *197*.

Aach, H., Bode, H., Robinson, D.G., and Graebe, J.E. (1997). ent-Kaurene synthase is located in proplastids of meristematic shoot tissues. Planta *202*, 211–219. https://doi.org/10.1007/BF00202655.

Abu-Romman, S. (2014). Molecular cloning and expression analysis of zinc fingerhomeodomain transcription factor TaZFHD1 in wheat. South African Journal of Botany *91*, 32– 36. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.11.014.

Achard, P., Gong, F., Cheminant, S., Alioua, M., Hedden, P., and Genschik, P. (2008). The Cold-Inducible CBF1 Factor–Dependent Signaling Pathway Modulates the Accumulation of the Growth-Repressing DELLA Proteins via Its Effect on Gibberellin Metabolism. The Plant Cell *20*, 2117–2129. https://doi.org/10.1105/tpc.108.058941.

Achard, P., Gusti, A., Cheminant, S., Alioua, M., Dhondt, S., Coppens, F., Beemster, G.T.S., and Genschik, P. (2009). Gibberellin Signaling Controls Cell Proliferation Rate in Arabidopsis. Current Biology *19*, 1188–1193. https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.05.059.

Aguilar-Martínez, J.A., Poza-Carrión, C., and Cubas, P. (2007). *Arabidopsis BRANCHED1* Acts as an Integrator of Branching Signals within Axillary Buds. The Plant Cell *19*, 458–472. https://doi.org/10.1105/tpc.106.048934.

An, F., Zhang, X., Zhu, Z., Ji, Y., He, W., Jiang, Z., Li, M., and Guo, H. (2012). Coordinated regulation of apical hook development by gibberellins and ethylene in etiolated Arabidopsis seedlings. Cell Res *22*, 915–927. https://doi.org/10.1038/cr.2012.29.

Ariel, F.D., Manavella, P.A., Dezar, C.A., and Chan, R.L. (2007). The true story of the HD-Zip family. Trends in Plant Science *12*, 419–426. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.08.003.

Ariizumi, T., Lawrence, P.K., and Steber, C.M. (2011). The Role of Two F-Box Proteins, SLEEPY1 and SNEEZY, in Arabidopsis Gibberellin Signaling. Plant Physiology *155*, 765–775. https://doi.org/10.1104/pp.110.166272.

Arnaud, N., Girin, T., Sorefan, K., Fuentes, S., Wood, T.A., Lawrenson, T., Sablowski, R., and Østergaard, L. (2010). Gibberellins control fruit patterning in *Arabidopsis thaliana*. Genes Dev. *24*, 2127–2132. https://doi.org/10.1101/gad.593410.

von Arnim, A., and Deng, X.-W. (1996). LIGHT CONTROL OF SEEDLING DEVELOPMENT. Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. 47, 215–243. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.215.

Bai, M.-Y., Shang, J.-X., Oh, E., Fan, M., Bai, Y., Zentella, R., Sun, T., and Wang, Z.-Y. (2012). Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in Arabidopsis. Nat Cell Biol *14*, 810–817. https://doi.org/10.1038/ncb2546.

Bao, S., Hua, C., Shen, L., and Yu, H. (2020). New insights into gibberellin signaling in regulating flowering in *Arabidopsis*. J. Integr. Plant Biol *62*, 118–131. https://doi.org/10.1111/jipb.12892.

Barbier, F.F., Dun, E.A., and Beveridge, C.A. (2017). Apical dominance. Current Biology *27*, R864–R865. https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.024.

Barro-Trastoy, D., Gomez, M.D., Blanco-Touriñán, N., Tornero, P., and Perez-Amador, M.A. (2022). Gibberellins regulate ovule number through a DELLA–CUC2 complex in *Arabidopsis*. The Plant Journal *110*, 43–57. https://doi.org/10.1111/tpj.15607.

Bartlett, A., O'Malley, R.C., Huang, S.C., Galli, M., Nery, J.R., Gallavotti, A., and Ecker, J.R. (2017). Mapping genome-wide transcription-factor binding sites using DAP-seq. Nat Protoc *12*, 1659–1672. https://doi.org/10.1038/nprot.2017.055.

Bashyal, B.M. (2018). Etiology of an emerging disease: bakanae of rice. Indian Phytopathology *71*, 485–494. https://doi.org/10.1007/s42360-018-0091-2.

Ben-Targem, M., Ripper, D., Bayer, M., and Ragni, L. (2021). Auxin and gibberellin signaling cross-talk promotes hypocotyl xylem expansion and cambium homeostasis. Journal of Experimental Botany *72*, 3647–3660. https://doi.org/10.1093/jxb/erab089.

Bernardo-García, S., de Lucas, M., Martínez, C., Espinosa-Ruiz, A., Davière, J.-M., and Prat, S. (2014). BR-dependent phosphorylation modulates PIF4 transcriptional activity and shapes diurnal hypocotyl growth. Genes Dev. 28, 1681–1694. https://doi.org/10.1101/gad.243675.114.

Binenbaum, J., Weinstain, R., and Shani, E. (2018). Gibberellin Localization and Transport in Plants. Trends in Plant Science *23*, 410–421. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.02.005.

Blanco-Touriñán, N., Legris, M., Minguet, E.G., Costigliolo-Rojas, C., Nohales, M.A., Iniesto, E., García-León, M., Pacín, M., Heucken, N., Blomeier, T., et al. (2020). COP1 destabilizes DELLA proteins in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *117*, 13792–13799. https://doi.org/10.1073/pnas.1907969117.

Bollier, N., Sicard, A., Leblond, J., Latrasse, D., Gonzalez, N., Gévaudant, F., Benhamed, M., Raynaud, C., Lenhard, M., Chevalier, C., et al. (2018). At-MINI ZINC FINGER2 and SI-INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY, a Conserved Missing Link in the Regulation of Floral Meristem Termination in Arabidopsis and Tomato. Plant Cell *30*, 83–100. https://doi.org/10.1105/tpc.17.00653.

Bollier, N., Gonzalez, N., Chevalier, C., and Hernould, M. (2022). Zinc Finger-Homeodomain and Mini Zinc Finger proteins are key players in plant growth and responses to environmental stresses. Journal of Experimental Botany erac194. https://doi.org/10.1093/jxb/erac194.

Brian, P.W., and Hemming, H.G. (1955). The Effect of Gibberellic Acid on Shoot Growth of Pea Seedlings. Physiol Plant *8*, 669–681. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1955.tb07760.x.

Bueso, E., Muñoz-Bertomeu, J., Campos, F., Brunaud, V., Martínez, L., Sayas, E., Ballester, P., Yenush, L., and Serrano, R. (2014). *ARABIDOPSIS THALIANA HOMEOBOX25* Uncovers a Role for Gibberellins in Seed Longevity. Plant Physiol. *164*, 999–1010. https://doi.org/10.1104/pp.113.232223.

Bürglin, T.R., and Affolter, M. (2016). Homeodomain proteins: an update. Chromosoma *125*, 497–521. https://doi.org/10.1007/s00412-015-0543-8.

Camut, L. Rôle des gibbérellines dans l'adaptation des plantes à la disponibilité en azote.

Camut, L., Davière, J.-M., and Achard, P. (2017). Dynamic Regulation of DELLA Protein Activity: SPINDLY and SECRET AGENT Unmasked! Molecular Plant *10*, 785–787. https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.05.003.

Camut, L., Gallova, B., Jilli, L., Sirlin-Josserand, M., Carrera, E., Sakvarelidze-Achard, L., Ruffel, S., Krouk, G., Thomas, S.G., Hedden, P., et al. (2021). Nitrate signaling promotes plant

growth by upregulating gibberellin biosynthesis and destabilization of DELLA proteins. Current Biology *31*, 4971-4982.e4. https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.09.024.

Chaiwanon, J., Wang, W., Zhu, J.-Y., Oh, E., and Wang, Z.-Y. (2016). Information Integration and Communication in Plant Growth Regulation. Cell *164*, 1257–1268. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.044.

Chakrabarti, A.M., Henser-Brownhill, T., Monserrat, J., Poetsch, A.R., Luscombe, N.M., and Scaffidi, P. (2019). Target-Specific Precision of CRISPR-Mediated Genome Editing. Molecular Cell *73*, 699-713.e6. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.11.031.

Cheng, H., Qin, L., Lee, S., Fu, X., Richards, D.E., Cao, D., Luo, D., Harberd, N.P., and Peng, J. (2004). Gibberellin regulates *Arabidopsis* floral development via suppression of DELLA protein function. Development *131*, 1055–1064. https://doi.org/10.1242/dev.00992.

Chiba, Y., Shimizu, T., Miyakawa, S., Kanno, Y., Koshiba, T., Kamiya, Y., and Seo, M. (2015). Identification of Arabidopsis thaliana NRT1/PTR FAMILY (NPF) proteins capable of transporting plant hormones. J Plant Res *128*, 679–686. https://doi.org/10.1007/s10265-015-0710-2.

Ciftci-Yilmaz, S., and Mittler, R. (2008). The zinc finger network of plants. Cell. Mol. Life Sci. *65*, 1150–1160. https://doi.org/10.1007/s00018-007-7473-4.

Colebrook, E.H., Thomas, S.G., Phillips, A.L., and Hedden, P. (2014). The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. Journal of Experimental Biology *217*, 67–75. https://doi.org/10.1242/jeb.089938.

Crocco, C.D., Locascio, A., Escudero, C.M., Alabadí, D., Blázquez, M.A., and Botto, J.F. (2015). The transcriptional regulator BBX24 impairs DELLA activity to promote shade avoidance in Arabidopsis thaliana. Nat Commun *6*, 6202. https://doi.org/10.1038/ncomms7202.

Croker, S.J., Hedden, P., Lenton, J.R., and Stoddart, J.L. (1990). Comparison of Gibberellins in Normal and Slender Barley Seedlings. Plant Physiol. *94*, 194–200. https://doi.org/10.1104/pp.94.1.194.

Curtis, P. J., & Cross, P. E. Gibberellic acid: A new metabolite from the culture filtrates of Gibberella fujikuroi. Chem. Ind. 1066 (1954).

Davière, J.-M., and Achard, P. (2013). Gibberellin signaling in plants. Development *140*, 1147–1151. https://doi.org/10.1242/dev.087650.

Davière, J.-M., and Achard, P. (2016). A Pivotal Role of DELLAs in Regulating Multiple Hormone Signals. Molecular Plant *9*, 10–20. https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.09.011.

Davière, J.-M., Wild, M., Regnault, T., Baumberger, N., Eisler, H., Genschik, P., and Achard, P. (2014). Class I TCP-DELLA Interactions in Inflorescence Shoot Apex Determine Plant Height. Current Biology *24*, 1923–1928. https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.07.012.

Dill, A., and Sun, T. (2001). Synergistic Derepression of Gibberellin Signaling by Removing RGA and GAI Function in *Arabidopsis thaliana*. Genetics *159*, 777–785. https://doi.org/10.1093/genetics/159.2.777.

Dill, A., Thomas, S.G., Hu, J., Steber, C.M., and Sun, T. (2004). The Arabidopsis F-Box Protein SLEEPY1 Targets Gibberellin Signaling Repressors for Gibberellin-Induced Degradation[W]. The Plant Cell *16*, 1392–1405. https://doi.org/10.1105/tpc.020958.

Domagalska, M.A., and Leyser, O. (2011). Signal integration in the control of shoot branching. Nat Rev Mol Cell Biol *12*, 211–221. https://doi.org/10.1038/nrm3088.

Dror, I., Zhou, T., Mandel-Gutfreund, Y., and Rohs, R. (2014). Covariation between homeodomain transcription factors and the shape of their DNA binding sites. Nucleic Acids Research *42*, 430–441. https://doi.org/10.1093/nar/gkt862.

Dugardeyn, J., Vandenbussche, F., and Van Der Straeten, D. (2007). To grow or not to grow: what can we learn on ethylene-gibberellin cross-talk by in silico gene expression analysis? Journal of Experimental Botany *59*, 1–16. https://doi.org/10.1093/jxb/erm349.

Elliott, R.C., Ross, J.J., Smith, J.J., Lester, D.R., and Reid, J.B. (2001). Feed-Forward Regulation of Gibberellin Deactivation in Pea. Journal of Plant Growth Regulation *20*, 87–94. https://doi.org/10.1007/s003440010004.

Eom, J.-S., Chen, L.-Q., Sosso, D., Julius, B.T., Lin, I., Qu, X.-Q., Braun, D.M., and Frommer, W.B. (2015). SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation. Current Opinion in Plant Biology *25*, 53–62. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.04.005.

Felipo-Benavent, A., Úrbez, C., Blanco-Touriñán, N., Serrano-Mislata, A., Baumberger, N., Achard, P., Agustí, J., Blázquez, M.A., and Alabadí, D. (2018). Regulation of xylem fibers differentiation by gibberellins through DELLA-KNAT1 interaction. Development dev.164962. https://doi.org/10.1242/dev.164962.

Feng, S., Martinez, C., Gusmaroli, G., Wang, Y., Zhou, J., Wang, F., Chen, L., Yu, L., Iglesias-Pedraz, J.M., Kircher, S., et al. (2008). Coordinated regulation of Arabidopsis thaliana development by light and gibberellins. Nature *451*, 475–479. https://doi.org/10.1038/nature06448.

Feurtado, J.A., Huang, D., Wicki-Stordeur, L., Hemstock, L.E., Potentier, M.S., Tsang, E.W.T., and Cutler, A.J. (2011). The *Arabidopsis* C2H2 Zinc Finger INDETERMINATE DOMAIN1/ENHYDROUS Promotes the Transition to Germination by Regulating Light and Hormonal Signaling during Seed Maturation. The Plant Cell *23*, 1772–1794. https://doi.org/10.1105/tpc.111.085134.

Fleet, C.M., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kawaide, H., David, C.J., Kamiya, Y., and Sun, T. (2003). Overexpression of *AtCPS* and *AtKS* in Arabidopsis Confers Increased *ent* -Kaurene Production But No Increase in Bioactive Gibberellins. Plant Physiology *132*, 830–839. https://doi.org/10.1104/pp.103.021725.

Fletcher, J.C. (2020). Recent Advances in Arabidopsis CLE Peptide Signaling. Trends in Plant Science *25*, 1005–1016. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.04.014.

Fonouni-Farde, C., Diet, A., and Frugier, F. (2016). Root Development and Endosymbioses: DELLAs Lead the Orchestra. Trends in Plant Science *21*, 898–900. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.012.

Fu, X., and Harberd, N.P. (2003). Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. Nature *421*, 740–743. https://doi.org/10.1038/nature01387.

Fukazawa, J., Teramura, H., Murakoshi, S., Nasuno, K., Nishida, N., Ito, T., Yoshida, M., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., and Takahashi, Y. (2014). DELLAs Function as Coactivators of GAI-ASSOCIATED FACTOR1 in Regulation of Gibberellin Homeostasis and Signaling in *Arabidopsis*. The Plant Cell *26*, 2920–2938. https://doi.org/10.1105/tpc.114.125690.

Furutani, M., Sakamoto, N., Yoshida, S., Kajiwara, T., Robert, H.S., Friml, J., and Tasaka, M. (2011). Polar-localized NPH3-like proteins regulate polarity and endocytosis of PIN-FORMED auxin efflux carriers. Development *138*, 2069–2078. https://doi.org/10.1242/dev.057745.

Gallego-Bartolome, J., Minguet, E.G., Marin, J.A., Prat, S., Blazquez, M.A., and Alabadi, D. (2010). Transcriptional Diversification and Functional Conservation between DELLA Proteins in Arabidopsis. Molecular Biology and Evolution *27*, 1247–1256. https://doi.org/10.1093/molbev/msq012.

Gallego-Bartolomé, J., Arana, M.V., Vandenbussche, F., Žádníková, P., Minguet, E.G., Guardiola, V., Van Der Straeten, D., Benkova, E., Alabadí, D., and Blázquez, M.A. (2011). Hierarchy of hormone action controlling apical hook development in Arabidopsis: Gibberellins and apical hook development. The Plant Journal *67*, 622–634. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04621.x.

Gamsjaeger, R., Liew, C., Loughlin, F., Crossley, M., and Mackay, J. (2007). Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs. Trends in Biochemical Sciences *32*, 63–70. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.12.007.

Ganss, B., and Jheon, A. (2004). Z inc F inger T ranscription F actors in S keletal D evelopment. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine *15*, 282–297. https://doi.org/10.1177/154411130401500504.

Gao, X., Zhang, Y., He, Z., and Fu, X. (2017). Gibberellins. In Hormone Metabolism and Signaling in Plants, (Elsevier), pp. 107–160.

Garber, R.L., Kuroiwa, A., and Gehring, W.J. (1983). Genomic and cDNA clones of the homeotic locus Antennapedia in Drosophila. The EMBO Journal *2*, 2027–2036. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1983.tb01696.x.

Gastaldi, V., Lucero, L.E., Ferrero, L.V., Ariel, F.D., and Gonzalez, D.H. (2020). Class-I TCP Transcription Factors Activate the *SAUR63* Gene Subfamily in Gibberellin-Dependent Stamen Filament Elongation. Plant Physiol. *182*, 2096–2110. https://doi.org/10.1104/pp.19.01501.

Gehring, W.J., Affolter, M., and Bürglin, T. (1994). HOMEODOMAIN PROTEINS. Annu. Rev. Biochem. *63*, 487–526. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.63.070194.002415.

Greb, T., Clarenz, O., Schäfer, E., Müller, D., Herrero, R., Schmitz, G., and Theres, K. (2003). Molecular analysis of the *LATERAL SUPPRESSOR* gene in *Arabidopsis* reveals a conserved control mechanism for axillary meristem formation. Genes Dev. *17*, 1175–1187. https://doi.org/10.1101/gad.260703.

Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z.-L., Powers, S.J., Gong, F., Phillips, A.L., Hedden, P., Sun, T., et al. (2007). Genetic Characterization and Functional Analysis of the GID1 Gibberellin Receptors in *Arabidopsis*. The Plant Cell *18*, 3399–3414. https://doi.org/10.1105/tpc.106.047415.

Han, M., Jin, X., Yao, W., Kong, L., Huang, G., Tao, Y., Li, L., Wang, X., and Wang, Y. (2017). A Mini Zinc-Finger Protein (MIF) from Gerbera hybrida Activates the GASA Protein Family Gene, GEG, to Inhibit Ray Petal Elongation. Front. Plant Sci. *8*, 1649. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01649.

Hedden, P. (2003). The genes of the Green Revolution. Trends in Genetics *19*, 5–9. https://doi.org/10.1016/S0168-9525(02)00009-4.

Hedden, P. (2020). The Current Status of Research on Gibberellin Biosynthesis. Plant and Cell Physiology *61*, 1832–1849. https://doi.org/10.1093/pcp/pcaa092.

Hedden, P., and Sponsel, V. (2015). A Century of Gibberellin Research. J Plant Growth Regul *34*, 740–760. https://doi.org/10.1007/s00344-015-9546-1.

Hedden, P., and Thomas, S.G. (2012). Gibberellin biosynthesis and its regulation. Biochemical Journal *444*, 11–25. https://doi.org/10.1042/BJ20120245.

Hedden, P. and Thomas, S. G. (ed.) 2016. Annual Plant Reviews, Volume 49: The Gibberellins (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd). https://doi.org/10.1002/9781119210436.

Helliwell, C.A., Sheldon, C.C., Olive, M.R., Walker, A.R., Zeevaart, J.A.D., Peacock, W.J., and Dennis, E.S. (1998). Cloning of the *Arabidopsis ent*-kaurene oxidase gene *GA* 3 . Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *95*, 9019–9024. https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.9019.

Helliwell, C.A., Poole, A., James Peacock, W., and Dennis, E.S. (1999). Arabidopsis *ent* - Kaurene Oxidase Catalyzes Three Steps of Gibberellin Biosynthesis. Plant Physiology *119*, 507–510. https://doi.org/10.1104/pp.119.2.507.

Helliwell, C.A., Chandler, P.M., Poole, A., Dennis, E.S., and Peacock, W.J. (2001a). The CYP88A cytochrome P450, *ent* -kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellin biosynthesis pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *98*, 2065–2070. https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.2065.

Helliwell, C.A., Sullivan, J.A., Mould, R.M., Gray, J.C., Peacock, W.J., and Dennis, E.S. (2001b). A plastid envelope location of Arabidopsis ent-kaurene oxidase links the plastid and endoplasmic reticulum steps of the gibberellin biosynthesis pathway: Localization of GA biosynthesis enzymes. The Plant Journal *28*, 201–208. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01150.x.

Hirano, K., Asano, K., Tsuji, H., Kawamura, M., Mori, H., Kitano, H., Ueguchi-Tanaka, M., and Matsuoka, M. (2010). Characterization of the Molecular Mechanism Underlying Gibberellin Perception Complex Formation in Rice. The Plant Cell *22*, 2680–2696. https://doi.org/10.1105/tpc.110.075549.

Hirano, K., Kouketu, E., Katoh, H., Aya, K., Ueguchi-Tanaka, M., and Matsuoka, M. (2012). The suppressive function of the rice DELLA protein SLR1 is dependent on its transcriptional activation activity: Transactivation activity of SLR1. The Plant Journal no-no. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05000.x.

Hirano, Y., Nakagawa, M., Suyama, T., Murase, K., Shirakawa, M., Takayama, S., Sun, T., and Hakoshima, T. (2017). Structure of the SHR–SCR heterodimer bound to the BIRD/IDD transcriptional factor JKD. Nature Plants *3*, 17010. https://doi.org/10.1038/nplants.2017.10.

Hiratsu, K., Matsui, K., Koyama, T., and Ohme-Takagi, M. (2003). Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in *Arabidopsis: Dominant repression by EAR-motif chimeric repressor*. The Plant Journal *34*, 733–739. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01759.x.

Holland, P.W., Booth, H.A.F., and Bruford, E.A. (2007). Classification and nomenclature of all human homeobox genes. BMC Biol *5*, 47. https://doi.org/10.1186/1741-7007-5-47.

Hong, G.-J., Xue, X.-Y., Mao, Y.-B., Wang, L.-J., and Chen, X.-Y. (2012). *Arabidopsis* MYC2 Interacts with DELLA Proteins in Regulating Sesquiterpene Synthase Gene Expression. Plant Cell *24*, 2635–2648. https://doi.org/10.1105/tpc.112.098749.

Hong, S.-Y., Kim, O.-K., Kim, S.-G., Yang, M.-S., and Park, C.-M. (2011). Nuclear Import and DNA Binding of the ZHD5 Transcription Factor Is Modulated by a Competitive Peptide Inhibitor

in Arabidopsis. Journal of Biological Chemistry 286, 1659–1668. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.167692.

Hoogendoorn, J., Rickson, J.M., and Gale, M.D. (1990). Differences in Leaf and Stem Anatomy Related to Plant Height of Tall and Dwarf Wheat (Triticum aestivum L.). Journal of Plant Physiology *136*, 72–77. https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81618-4.

Hori, S. (1898). Some observations on 'Bakanae' disease of the rice plant. Agric. Res. Stn. 12: 110-119.

Hou, X., Lee, L.Y.C., Xia, K., Yan, Y., and Yu, H. (2010). DELLAs Modulate Jasmonate Signaling via Competitive Binding to JAZs. Developmental Cell *19*, 884–894. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.10.024.

Hou, X., Zhou, J., Liu, C., Liu, L., Shen, L., and Yu, H. (2014). Nuclear factor Y-mediated H3K27me3 demethylation of the SOC1 locus orchestrates flowering responses of Arabidopsis. Nat Commun *5*, 4601. https://doi.org/10.1038/ncomms5601.

Hu, W., and Ma, H. (2006). Characterization of a novel putative zinc finger gene *MIF1*: involvement in multiple hormonal regulation of Arabidopsis development. The Plant Journal *45*, 399–422. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02626.x.

Hu, J., Mitchum, M.G., Barnaby, N., Ayele, B.T., Ogawa, M., Nam, E., Lai, W.-C., Hanada, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., et al. (2008a). Potential Sites of Bioactive Gibberellin Production during Reproductive Growth in *Arabidopsis*. The Plant Cell *20*, 320–336. https://doi.org/10.1105/tpc.107.057752.

Hu, W., dePamphilis, C.W., and Ma, H. (2008b). Phylogenetic Analysis of the Plant-specific *Zinc Finger-Homeobox* and *Mini Zinc Finger* Gene Families. Journal of Integrative Plant Biology *50*, 1031–1045. https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00681.x.

Hu, W., Feng, B., and Ma, H. (2011). Ectopic expression of the Arabidopsis MINI ZINC FINGER1 and MIF3 genes induces shoot meristems on leaf margins. Plant Mol Biol *76*, 57–68. https://doi.org/10.1007/s11103-011-9768-y.

Hu, Y., Zhou, L., Huang, M., He, X., Yang, Y., Liu, X., Li, Y., and Hou, X. (2018). Gibberellins play an essential role in late embryogenesis of Arabidopsis. Nature Plants *4*, 289–298. https://doi.org/10.1038/s41477-018-0143-8.

Huang, H., Gong, Y., Liu, B., Wu, D., Zhang, M., Xie, D., and Song, S. (2020). The DELLA proteins interact with MYB21 and MYB24 to regulate filament elongation in Arabidopsis. BMC Plant Biol *20*, 64. https://doi.org/10.1186/s12870-020-2274-0.

Huerta-Ocampo, J.A., León-Galván, M.F., Ortega-Cruz, L.B., Barrera-Pacheco, A., De León-Rodríguez, A., Mendoza-Hernández, G., and Barba de la Rosa, A.P. (2011). Water stress induces up-regulation of DOF1 and MIF1 transcription factors and down-regulation of proteins involved in secondary metabolism in amaranth roots (Amaranthus hypochondriacus L.): Proteomic and transcriptomic analysis of amaranth roots under drought stress. Plant Biology *13*, 472–482. https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2010.00391.x.

Hyun, Y., Richter, R., Vincent, C., Martinez-Gallegos, R., Porri, A., and Coupland, G. (2016). Multi-layered Regulation of SPL15 and Cooperation with SOC1 Integrate Endogenous Flowering Pathways at the Arabidopsis Shoot Meristem. Developmental Cell *37*, 254–266. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.04.001.

Ingram, G.C., and Waites, R. (2006). Keeping it together: co-ordinating plant growth. Current Opinion in Plant Biology *9*, 12–20. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.11.007.

Jin, S., Kanagaraj, A., Verma, D., Lange, T., and Daniell, H. (2011). Release of Hormones from Conjugates: Chloroplast Expression of  $\beta$ -Glucosidase Results in Elevated Phytohormone Levels Associated with Significant Increase in Biomass and Protection from Aphids or Whiteflies Conferred by Sucrose Esters. Plant Physiol. *155*, 222–235. https://doi.org/10.1104/pp.110.160754.

Kanno, Y., Hanada, A., Chiba, Y., Ichikawa, T., Nakazawa, M., Matsui, M., Koshiba, T., Kamiya, Y., and Seo, M. (2012). Identification of an abscisic acid transporter by functional screening using the receptor complex as a sensor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *109*, 9653–9658. https://doi.org/10.1073/pnas.1203567109.

Kanno, Y., Oikawa, T., Chiba, Y., Ishimaru, Y., Shimizu, T., Sano, N., Koshiba, T., Kamiya, Y., Ueda, M., and Seo, M. (2016). AtSWEET13 and AtSWEET14 regulate gibberellin-mediated physiological processes. Nat Commun *7*, 13245. https://doi.org/10.1038/ncomms13245.

Kasahara, H., Hanada, A., Kuzuyama, T., Takagi, M., Kamiya, Y., and Yamaguchi, S. (2002). Contribution of the Mevalonate and Methylerythritol Phosphate Pathways to the Biosynthesis of Gibberellins inArabidopsis. Journal of Biological Chemistry *277*, 45188–45194. https://doi.org/10.1074/jbc.M208659200.

Katsumi, M., Foard, D.E., and Phinney, B.O. (1983). Evidence for the Translocation of Gibberellin  $A_3$  and Gibberellin-Like Substances in Grafts between Normal, Dwarf<sub>1</sub> and Dwarf<sub>5</sub> Seedlings of Zea mays L.<sup>1</sup>. Plant and Cell Physiology https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076527.

Keller, T., Abbott, J., Moritz, T., and 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. https://doi.org/10.1105/tpc.105.038588.

Kieffer, M., Master, V., Waites, R., and Davies, B. (2011). TCP14 and TCP15 affect internode length and leaf shape in Arabidopsis: *TCP14/15 affect internode length and leaf shape*. The Plant Journal *68*, 147–158. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04674.x.

Kim, J.-B., Kang, J.-Y., Park, M.Y., Song, M., Kim, Y.C., and Kim, S.Y. (2019). Arabidopsis zinc finger homeodomain protein ZHD5 promotes shoot regeneration and confers other cytokinin-related phenotypes when overexpressed. Plant Cell Tiss Organ Cult *137*, 181–185. https://doi.org/10.1007/s11240-018-01546-7.

King, K.E., Moritz, T., and Harberd, N.P. (2001). Gibberellins Are Not Required for Normal Stem Growth in *Arabidopsis thaliana* in the Absence of GAI and RGA. Genetics *159*, 767–776. https://doi.org/10.1093/genetics/159.2.767.

Koornneef, M., and van der Veen, J.H. (1980). Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in Arabidopsis thaliana (L.) heynh. Theoret. Appl. Genetics *58*, 257–263. https://doi.org/10.1007/BF00265176.

Kosugi, S., and Ohashi, Y. (1997). PCF1 and PCF2 specifically bind to cis elements in the rice proliferating cell nuclear antigen gene. Plant Cell *9*, 1607–1619. https://doi.org/10.1105/tpc.9.9.1607.

Koyama, T., Mitsuda, N., Seki, M., Shinozaki, K., and Ohme-Takagi, M. (2010). TCP Transcription Factors Regulate the Activities of ASYMMETRIC LEAVES1 and miR164, as Well as the Auxin Response, during Differentiation of Leaves in *Arabidopsis*. The Plant Cell *22*, 3574–3588. https://doi.org/10.1105/tpc.110.075598.

Krouk, G., Lacombe, B., Bielach, A., Perrine-Walker, F., Malinska, K., Mounier, E., Hoyerova, K., Tillard, P., Leon, S., Ljung, K., et al. (2010). Nitrate-Regulated Auxin Transport by NRT1.1 Defines a Mechanism for Nutrient Sensing in Plants. Developmental Cell *18*, 927–937. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.05.008.

Kurosawa, E. (1926). Experimental studies on the nature of the substance excreted by the 'bakanae' fungus. Trans. Nat. Hist. Soc. Formosa 16: 213-227.

Lacombe, B., and Achard, P. (2016). Long-distance transport of phytohormones through the plant vascular system. Current Opinion in Plant Biology *34*, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.06.007.

Lange, T. (1998). Molecular biology of gibberellin synthesis. Planta *204*, 409–419. https://doi.org/10.1007/s004250050274.

Lange, M.J.P., and Lange, T. (2015). Touch-induced changes in Arabidopsis morphology dependent on gibberellin breakdown. Nature Plants *1*, 14025. https://doi.org/10.1038/nplants.2014.25.

Lange, M.J.P., and Lange, T. (2016). Ovary-derived precursor gibberellin A9 essential for cucumber female flower development. Development dev.135947. https://doi.org/10.1242/dev.135947.

Lee, S., Cheng, H., King, K.E., Wang, W., He, Y., Hussain, A., Lo, J., Harberd, N.P., and Peng, J. (2002). Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via *RGL2*, a *GAI/RGA* -like gene whose expression is up-regulated following imbibition. Genes Dev. *16*, 646–658. https://doi.org/10.1101/gad.969002.

Lehti-Shiu, M.D., Panchy, N., Wang, P., Uygun, S., and Shiu, S.-H. (2017). Diversity, expansion, and evolutionary novelty of plant DNA-binding transcription factor families. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms *1860*, 3–20. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2016.08.005.

Lei, W., Li, Y., Yao, X., Qiao, K., Wei, L., Liu, B., Zhang, D., and Lin, H. (2020). NAP is involved in GA-mediated chlorophyll degradation and leaf senescence by interacting with DELLAs in Arabidopsis. Plant Cell Rep *39*, 75–87. https://doi.org/10.1007/s00299-019-02474-2.

Li, M., An, F., Li, W., Ma, M., Feng, Y., Zhang, X., and Guo, H. (2016). DELLA proteins interact with FLC to repress flowering transition: DELLAs-FLC interactions in regulating flower time. J. Integr. Plant Biol. *58*, 642–655. https://doi.org/10.1111/jipb.12451.

Li, Q.-F., Wang, C., Jiang, L., Li, S., Sun, S.S.M., and He, J.-X. (2012). An Interaction Between BZR1 and DELLAs Mediates Direct Signaling Crosstalk Between Brassinosteroids and Gibberellins in *Arabidopsis*. Sci. Signal. *5*. https://doi.org/10.1126/scisignal.2002908.

Li, X., Zheng, Y., Xing, Q., Ardiansyah, R., Zhou, H., Ali, S., Jing, T., Tian, J., Song, X.S., Li, Y., et al. (2020). Ectopic expression of the transcription factor CUC2 restricts growth by cell cycle inhibition in *Arabidopsis* leaves. Plant Signaling & Behavior *15*, 1706024. https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1706024.

Li, Y., Wang, H., Li, X., Liang, G., and Yu, D. (2017). Two DELLA-interacting proteins bHLH48 and bHLH60 regulate flowering under long-day conditions in Arabidopsis thaliana. Journal of Experimental Botany *68*, 2757–2767. https://doi.org/10.1093/jxb/erx143.

Liang, M., Deng, L., Liu, J., He, A., and Chen, L. (2008). Interaction between the eui gene and thermo-sensitive genic male sterility in rice. Euphytica *164*, 637–643. https://doi.org/10.1007/s10681-008-9657-x.

Lim, S., Park, J., Lee, N., Jeong, J., Toh, S., Watanabe, A., Kim, J., Kang, H., Kim, D.H., Kawakami, N., et al. (2014). ABA-INSENSITIVE3, ABA-INSENSITIVE5, and DELLAs Interact to Activate the Expression of *SOMNUS* and Other High-Temperature-Inducible Genes in Imbibed Seeds in *Arabidopsis*. The Plant Cell *25*, 4863–4878. https://doi.org/10.1105/tpc.113.118604.

Liu, K., Li, Y., Chen, X., Li, L., Liu, K., Zhao, H., Wang, Y., and Han, S. (2018). ERF72 interacts with ARF6 and BZR1 to regulate hypocotyl elongation in Arabidopsis. Journal of Experimental Botany *69*, 3933–3947. https://doi.org/10.1093/jxb/ery220.

Locascio, A., Blázquez, M.A., and Alabadí, D. (2013). Dynamic Regulation of Cortical Microtubule Organization through Prefoldin-DELLA Interaction. Current Biology *23*, 804–809. https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.03.053.

Lucas, W.J., Groover, A., Lichtenberger, R., Furuta, K., Yadav, S.-R., Helariutta, Y., He, X.-Q., Fukuda, H., Kang, J., Brady, S.M., et al. (2013). The Plant Vascular System: Evolution, Development and Functions <sup>F</sup>. Journal of Integrative Plant Biology *55*, 294–388. https://doi.org/10.1111/jipb.12041.

de Lucas, M., Davière, J.-M., Rodríguez-Falcón, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J.M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blázquez, M.A., Titarenko, E., and Prat, S. (2008). A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. Nature *451*, 480–484. https://doi.org/10.1038/nature06520.

Ma, Z., Hu, X., Cai, W., Huang, W., Zhou, X., Luo, Q., Yang, H., Wang, J., and Huang, J. (2014). Arabidopsis miR171-Targeted Scarecrow-Like Proteins Bind to GT cis-Elements and Mediate Gibberellin-Regulated Chlorophyll Biosynthesis under Light Conditions. PLoS Genet *10*, e1004519. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004519.

MacMillan, J., and Suter, P.J. (1958). The occurrence of gibberellin A1 in higher plants: Isolation from the seed of runner bean (Phaseolus multiflorus). Naturwissenschaften *45*, 46–46. https://doi.org/10.1007/BF00635028.

Macmillan, J., and Takahashi, N. (1968). Proposed Procedure for the Allocation of Trivial Names to the Gibberellins. Nature *217*, 170–171. https://doi.org/10.1038/217170a0.

Magome, H., Nomura, T., Hanada, A., Takeda-Kamiya, N., Ohnishi, T., Shinma, Y., Katsumata, T., Kawaide, H., Kamiya, Y., and Yamaguchi, S. (2013). *CYP714B1* and *CYP714B2* encode gibberellin 13-oxidases that reduce gibberellin activity in rice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *110*, 1947–1952. https://doi.org/10.1073/pnas.1215788110.

Marín-de la Rosa, N., Pfeiffer, A., Hill, K., Locascio, A., Bhalerao, R.P., Miskolczi, P., Grønlund, A.L., Wanchoo-Kohli, A., Thomas, S.G., Bennett, M.J., et al. (2015). Genome Wide Binding Site Analysis Reveals Transcriptional Coactivation of Cytokinin-Responsive Genes by DELLA Proteins. PLoS Genet *11*, e1005337. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005337.

Marth, P.C., Audia, W.V., and work(s):, J.W.M.R. (1956). Effects of Gibberellic Acid on Growth and Development of Plants of Various Genera and Species. Botanical Gazette *118*, 106–111.

Martin, DavidN., Proebsting, WilliamM., Parks, T.D., Dougherty, WilliamG., Lange, T., Lewis, MervynJ., Gaskin, P., and Hedden, P. (1996). Feed-back regulation of gibberellin biosynthesis and gene expression in Pisum sativum L. Planta *200*. https://doi.org/10.1007/BF00208304.

Martín-Fontecha, E.S., Tarancón, C., and Cubas, P. (2018). To grow or not to grow, a powersaving program induced in dormant buds. Current Opinion in Plant Biology *41*, 102–109. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.10.001. Martín-Trillo, M., and Cubas, P. (2010). TCP genes: a family snapshot ten years later. Trends in Plant Science *15*, 31–39. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.003.

McGinnis, K.M., Thomas, S.G., Soule, J.D., Strader, L.C., Zale, J.M., Sun, T., and Steber, C.M. (2003). The Arabidopsis *SLEEPY1* Gene Encodes a Putative F-Box Subunit of an SCF E3 Ubiquitin Ligase[W]. The Plant Cell *15*, 1120–1130. https://doi.org/10.1105/tpc.010827.

Mitchum, M.G., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kuwahara, A., Yoshioka, Y., Kato, T., Tabata, S., Kamiya, Y., and Sun, T. (2006). Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in Arabidopsis development. The Plant Journal *45*, 804–818. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02642.x.

Mukherjee, K., Brocchieri, L., and Burglin, T.R. (2009). A Comprehensive Classification and Evolutionary Analysis of Plant Homeobox Genes. Molecular Biology and Evolution *26*, 2775–2794. https://doi.org/10.1093/molbev/msp201.

Müller, D., Schmitz, G., and Theres, K. (2006). *Blind* Homologous *R2R3 Myb* Genes Control the Pattern of Lateral Meristem Initiation in *Arabidopsis*. The Plant Cell *18*, 586–597. https://doi.org/10.1105/tpc.105.038745.

Murase, K., Hirano, Y., Sun, T., and Hakoshima, T. (2008). Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. Nature *456*, 459–463. https://doi.org/10.1038/nature07519.

Nakajima, M., Shimada, A., Takashi, Y., Kim, Y.-C., Park, S.-H., Ueguchi-Tanaka, M., Suzuki, H., Katoh, E., Iuchi, S., Kobayashi, M., et al. (2006). Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors. The Plant Journal *46*, 880–889. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02748.x.

Nakazawa, M., Ichikawa, T., Ishikawa, A., Kobayashi, H., Tsuhara, Y., Kawashima, M., Suzuki, K., Muto, S., and Matsui, M. (2003). Activation tagging, a novel tool to dissect the functions of a gene family: *Activation tagging of* AS2/Lateral Organ Boundaries *gene family*. The Plant Journal *34*, 741–750. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01758.x.

Nomura, T., Magome, H., Hanada, A., Takeda-Kamiya, N., Mander, L.N., Kamiya, Y., and Yamaguchi, S. (2013). Functional Analysis of Arabidopsis CYP714A1 and CYP714A2 Reveals That They are Distinct Gibberellin Modification Enzymes. Plant and Cell Physiology *54*, 1837–1851. https://doi.org/10.1093/pcp/pct125.

Nour-Eldin, H.H., Andersen, T.G., Burow, M., Madsen, S.R., Jørgensen, M.E., Olsen, C.E., Dreyer, I., Hedrich, R., Geiger, D., and Halkier, B.A. (2012). NRT/PTR transporters are essential for translocation of glucosinolate defence compounds to seeds. Nature *488*, 531–534. https://doi.org/10.1038/nature11285.

Ogawa, M., Kusano, T., Katsumi, M., and Sano, H. (2000). Rice gibberellin-insensitive gene homolog, OsGAI, encodes a nuclear-localized protein capable of gene activation at transcriptional level. Gene *245*, 21–29. https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00018-4.

Ogawa, M., Hanada, A., Yamauchi, Y., Kuwahara, A., Kamiya, Y., and Yamaguchi, S. (2003). Gibberellin Biosynthesis and Response during Arabidopsis Seed Germination[W]. The Plant Cell *15*, 1591–1604. https://doi.org/10.1105/tpc.011650.

Oh, E., Zhu, J.-Y., Bai, M.-Y., Arenhart, R.A., Sun, Y., and Wang, Z.-Y. (2014). Cell elongation is regulated through a central circuit of interacting transcription factors in the Arabidopsis hypocotyl. ELife *3*, e03031. https://doi.org/10.7554/eLife.03031.

Okushima, Y., Mitina, I., Quach, H.L., and Theologis, A. (2005). AUXIN RESPONSE FACTOR 2 (ARF2): a pleiotropic developmental regulator: ARF transcription factors. The Plant Journal *43*, 29–46. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02426.x.

Olszewski, N., Sun, T., and Gubler, F. (2002). Gibberellin Signaling: Biosynthesis, Catabolism, and Response Pathways. Plant Cell *14*, S61–S80. https://doi.org/10.1105/tpc.010476.

Otsuga, D., DeGuzman, B., Prigge, M.J., Drews, G.N., and Clark, S.E. (2001). REVOLUTA regulates meristem initiation at lateral positions. Plant J *25*, 223–236. https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.00959.x.

Park, H.C., Kim, M.L., Lee, S.M., Bahk, J.D., Yun, D.-J., Lim, C.O., Hong, J.C., Lee, S.Y., Cho, M.J., and Chung, W.S. (2007). Pathogen-induced binding of the soybean zinc finger homeodomain proteins GmZF-HD1 and GmZF-HD2 to two repeats of ATTA homeodomain binding site in the calmodulin isoform 4 (GmCaM4) promoter. Nucleic Acids Research *35*, 3612–3623. https://doi.org/10.1093/nar/gkm273.

Park, J., Nguyen, K.T., Park, E., Jeon, J.-S., and Choi, G. (2013). DELLA Proteins and Their Interacting RING Finger Proteins Repress Gibberellin Responses by Binding to the Promoters of a Subset of Gibberellin-Responsive Genes in *Arabidopsis*. The Plant Cell *25*, 927–943. https://doi.org/10.1105/tpc.112.108951.

Park, J., Oh, D.-H., Dassanayake, M., Nguyen, K.T., Ogas, J., Choi, G., and Sun, T. (2017). Gibberellin Signaling Requires Chromatin Remodeler PICKLE to Promote Vegetative Growth and Phase Transitions. Plant Physiol. *173*, 1463–1474. https://doi.org/10.1104/pp.16.01471.

Pearce, S., Saville, R., Vaughan, S.P., Chandler, P.M., Wilhelm, E.P., Sparks, C.A., Al-Kaff, N., Korolev, A., Boulton, M.I., Phillips, A.L., et al. (2011). Molecular Characterization of *Rht-1* Dwarfing Genes in Hexaploid Wheat. Plant Physiology *157*, 1820–1831. https://doi.org/10.1104/pp.111.183657.

Peng, J., Carol, P., Richards, D.E., King, K.E., Cowling, R.J., Murphy, G.P., and Harberd, N.P. (1997). The *Arabidopsis GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. Genes Dev. *11*, 3194–3205. https://doi.org/10.1101/gad.11.23.3194.

Perrella, G., Davidson, M.L.H., O'Donnell, L., Nastase, A.-M., Herzyk, P., Breton, G., Pruneda-Paz, J.L., Kay, S.A., Chory, J., and Kaiserli, E. (2018). ZINC-FINGER interactions mediate transcriptional regulation of hypocotyl growth in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *115*. https://doi.org/10.1073/pnas.1718099115.

Phinney, B.O. (1956). GROWTH RESPONSE OF SINGLE-GENE DWARF MUTANTS IN MAIZE TO GIBBERELLIC ACID. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *42*, 185–189. https://doi.org/10.1073/pnas.42.4.185.

Phinney, B.O., West, C.A., Ritzel, M., and Neely, P.M. (1957). EVIDENCE FOR "GIBBERELLIN-LIKE" SUBSTANCES FROM FLOWERING PLANTS. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *43*, 398–404. https://doi.org/10.1073/pnas.43.5.398.

Plackett, A.R.G., Powers, S.J., Fernandez-Garcia, N., Urbanova, T., Takebayashi, Y., Seo, M., Jikumaru, Y., Benlloch, R., Nilsson, O., Ruiz-Rivero, O., et al. (2012). Analysis of the Developmental Roles of the *Arabidopsis* Gibberellin 20-Oxidases Demonstrates That *GA20ox1*, *-2*, and *-3* Are the Dominant Paralogs. Plant Cell *24*, 941–960. https://doi.org/10.1105/tpc.111.095109.

Poethig, R.S. (2003). Phase Change and the Regulation of Developmental Timing in Plants. Science *301*, 334–336. https://doi.org/10.1126/science.1085328.

Porri, A., Torti, S., Romera-Branchat, M., and Coupland, G. (2012). Spatially distinct regulatory roles for gibberellins in the promotion of flowering of *Arabidopsis* under long photoperiods. Development *139*, 2198–2209. https://doi.org/10.1242/dev.077164.

Poza-Carrión, C., Aguilar-Martínez, J.A., and Cubas, P. (2007). Role of TCP Gene *BRANCHED1* in the Control of Shoot Branching in Arabidopsis. Plant Signaling & Behavior *2*, 551–552. https://doi.org/10.4161/psb.2.6.4811.

Proebsting, W.M., Hedden, P., Lewis, M.J., Croker, S.J., and Proebsting, L.N. (1992). Gibberellin Concentration and Transport in Genetic Lines of Pea: Effects of Grafting. Plant Physiol. *100*, 1354–1360. https://doi.org/10.1104/pp.100.3.1354.

Pysh, L.D., Wysocka-Diller, J.W., Camilleri, C., Bouchez, D., and Benfey, P.N. (1999). The GRAS gene family in Arabidopsis: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. Plant J *18*, 111–119. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00431.x.

Qi, T., Huang, H., Wu, D., Yan, J., Qi, Y., Song, S., and Xie, D. (2014). *Arabidopsis* DELLA and JAZ Proteins Bind the WD-Repeat/bHLH/MYB Complex to Modulate Gibberellin and Jasmonate Signaling Synergy. The Plant Cell *26*, 1118–1133. https://doi.org/10.1105/tpc.113.121731.

Rademacher, W. (2017). Chemical Regulators of Gibberellin Status and Their Application in Plant Production. In Annual Plant Reviews Online, J.A. Roberts, ed. (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), pp. 359–403.

Ragni, L., Nieminen, K., Pacheco-Villalobos, D., Sibout, R., Schwechheimer, C., and Hardtke, C.S. (2011). Mobile Gibberellin Directly Stimulates *Arabidopsis* Hypocotyl Xylem Expansion. The Plant Cell *23*, 1322–1336. https://doi.org/10.1105/tpc.111.084020.

Rameau, C., Bertheloot, J., Leduc, N., Andrieu, B., Foucher, F., and Sakr, S. (2015). Multiple pathways regulate shoot branching. Front. Plant Sci. *5.* https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00741.

Ravid, T., and Hochstrasser, M. (2008). Diversity of degradation signals in the ubiquitinproteasome system. Nat Rev Mol Cell Biol *9*, 679–689. https://doi.org/10.1038/nrm2468.

Regnault, T. Biosynthèse et transport des gibbérellines chez Arabidopsis thaliana.

Regnault, T., Davière, J.-M., Heintz, D., Lange, T., and Achard, P. (2014). The gibberellin biosynthetic genes *AtKAO1* and *AtKAO2* have overlapping roles throughout *Arabidopsis* development. Plant J *80*, 462–474. https://doi.org/10.1111/tpj.12648.

Regnault, T., Davière, J.-M., Wild, M., Sakvarelidze-Achard, L., Heintz, D., Carrera Bergua, E., Lopez Diaz, I., Gong, F., Hedden, P., and Achard, P. (2015). The gibberellin precursor GA12 acts as a long-distance growth signal in Arabidopsis. Nature Plants *1*, 15073. https://doi.org/10.1038/nplants.2015.73.

Resentini, F., Felipo-Benavent, A., Colombo, L., Blázquez, M.A., Alabadí, D., and Masiero, S. (2015). TCP14 and TCP15 Mediate the Promotion of Seed Germination by Gibberellins in Arabidopsis thaliana. Molecular Plant *8*, 482–485. https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.11.018.

Rieu, I., Ruiz-Rivero, O., Fernandez-Garcia, N., Griffiths, J., Powers, S.J., Gong, F., Linhartova, T., Eriksson, S., Nilsson, O., Thomas, S.G., et al. (2007). The gibberellin biosynthetic genes AtGA20ox1 and AtGA20ox2 act, partially redundantly, to promote growth and development throughout the Arabidopsis life cycle: GA20ox function in Arabidopsis. The Plant Journal *53*, 488–504. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03356.x.

Rieu, I., Eriksson, S., Powers, S.J., Gong, F., Griffiths, J., Woolley, L., Benlloch, R., Nilsson, O., Thomas, S.G., Hedden, P., et al. (2008). Genetic Analysis Reveals That C19-GA 2-Oxidation Is a Major Gibberellin Inactivation Pathway in *Arabidopsis*. The Plant Cell *20*, 2420–2436. https://doi.org/10.1105/tpc.108.058818.

Rizza, A., and Jones, A.M. (2019). The makings of a gradient: spatiotemporal distribution of gibberellins in plant development. Current Opinion in Plant Biology *47*, 9–15. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.08.001.

Robert, H.S., Quint, A., Brand, D., Vivian-Smith, A., and Offringa, R. (2009). BTB and TAZ domain scaffold proteins perform a crucial function in Arabidopsis development: Arabidopsis BT proteins and gametophyte development. The Plant Journal *58*, 109–121. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03764.x.

Rombolá-Caldentey, B., Rueda-Romero, P., Iglesias-Fernández, R., Carbonero, P., and Oñate-Sánchez, L. (2014). *Arabidopsis* DELLA and Two HD-ZIP Transcription Factors Regulate GA Signaling in the Epidermis through the L1 Box *cis* -Element. The Plant Cell *26*, 2905–2919. https://doi.org/10.1105/tpc.114.127647.

la Rosa, N.M. -d., Sotillo, B., Miskolczi, P., Gibbs, D.J., Vicente, J., Carbonero, P., Onate-Sanchez, L., Holdsworth, M.J., Bhalerao, R., Alabadi, D., et al. (2014). Large-Scale Identification of Gibberellin-Related Transcription Factors Defines Group VII ETHYLENE RESPONSE FACTORS as Functional DELLA Partners. PLANT PHYSIOLOGY *166*, 1022–1032. https://doi.org/10.1104/pp.114.244723.

Sakamoto, T., Miura, K., Itoh, H., Tatsumi, T., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Agrawal, G.K., Takeda, S., Abe, K., et al. (2004). An Overview of Gibberellin Metabolism Enzyme Genes and Their Related Mutants in Rice. Plant Physiology *134*, 1642–1653. https://doi.org/10.1104/pp.103.033696.

Sakr, S., Wang, M., Dédaldéchamp, F., Perez-Garcia, M.-D., Ogé, L., Hamama, L., and Atanassova, R. (2018). The Sugar-Signaling Hub: Overview of Regulators and Interaction with the Hormonal and Metabolic Network. IJMS *19*, 2506. https://doi.org/10.3390/ijms19092506.

Sarnowska, E.A., Rolicka, A.T., Bucior, E., Cwiek, P., Tohge, T., Fernie, A.R., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., Franzen, R., Schmelzer, E., et al. (2013). DELLA-Interacting SWI3C Core Subunit of Switch/Sucrose Nonfermenting Chromatin Remodeling Complex Modulates Gibberellin Responses and Hormonal Cross Talk in Arabidopsis. Plant Physiol. *163*, 305–317. https://doi.org/10.1104/pp.113.223933.

Sasaki, A., Itoh, H., Gomi, K., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Jeong, D.-H., An, G., Kitano, H., Ashikari, M., et al. (2003). Accumulation of Phosphorylated Repressor for Gibberellin Signaling in an F-box Mutant. Science *299*, 1896–1898. https://doi.org/10.1126/science.1081077.

Sawada, K. (1912). Diseases of agricultural products in Japan. Form Agric Rev 63: 10-16.

Schneider, G., and Schliemann, W. (1994). Gibberellin conjugates: an overview. Plant Growth Regul *15*, 247–260. https://doi.org/10.1007/BF00029898.

Schneider, G., Jensen, E., Spray, C.R., and Phinney, B.O. (1992). Hydrolysis and reconjugation of gibberellin A20 glucosyl ester by seedlings of Zea mays L. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *89*, 8045–8048. https://doi.org/10.1073/pnas.89.17.8045.

Schomburg, F.M., Bizzell, C.M., Lee, D.J., Zeevaart, J.A.D., and Amasino, R.M. (2003). Overexpression of a Novel Class of Gibberellin 2-Oxidases Decreases Gibberellin Levels and Creates Dwarf Plants. Plant Cell *15*, 151–163. https://doi.org/10.1105/tpc.005975.

Seo, P.J., Hong, S.-Y., Kim, S.-G., and Park, C.-M. (2011). Competitive inhibition of transcription factors by small interfering peptides. Trends in Plant Science *16*, 541–549. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.06.001.

Shani, E., Weinstain, R., Zhang, Y., Castillejo, C., Kaiserli, E., Chory, J., Tsien, R.Y., and Estelle, M. (2013). Gibberellins accumulate in the elongating endodermal cells of *Arabidopsis* root. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *110*, 4834–4839. https://doi.org/10.1073/pnas.1300436110.

Shi, B., Felipo-Benavent, A., Cerutti, G., Galvan-Ampudia, C., Jilli, L., Brunoud, G., Mutterer, J., Vallet, E., Sakvarelidze-Achard, L., Davière, J.-M., et al. (2021). A quantitative gibberellin signalling biosensor reveals a role for gibberellins in internode specification at the shoot apical meristem (Plant Biology).

Shimada, A., Ueguchi-Tanaka, M., Nakatsu, T., Nakajima, M., Naoe, Y., Ohmiya, H., Kato, H., and Matsuoka, M. (2008). Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1. Nature *456*, 520–523. https://doi.org/10.1038/nature07546.

Silverstone, A.L., Mak, P.Y.A., Martinez, E.C., and Sun, T. (1997a). The New *RGA* Locus Encodes a Negative Regulator of Gibberellin Response in *Arabidopsis thaliana*. Genetics *146*, 1087–1099. https://doi.org/10.1093/genetics/146.3.1087.

Silverstone, A.L., Chang, C., Krol, E., and Sun, T. (1997b). Developmental regulation of the gibberellin biosynthetic gene GA1 in Arabidopsis thaliana. Plant J *12*, 9–19. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.12010009.x.

Silverstone, A.L., Ciampaglio, C.N., and Sun, T. (1998). The Arabidopsis *RGA* Gene Encodes a Transcriptional Regulator Repressing the Gibberellin Signal Transduction Pathway. Plant Cell *10*, 155–169. https://doi.org/10.1105/tpc.10.2.155.

Silverstone, A.L., Jung, H.-S., Dill, A., Kawaide, H., Kamiya, Y., and Sun, T. (2001). Repressing a Repressor: Gibberellin-Induced Rapid Reduction of the RGA Protein in Arabidopsis. Plant Cell *13*, 1555–1566. https://doi.org/10.1105/TPC.010047.

Smith, V.A. (1992). Gibberellin A 1 Biosynthesis in *Pisum sativum* L.: II. Biological and Biochemical Consequences of the *le* Mutation. Plant Physiol. *99*, 372–377. https://doi.org/10.1104/pp.99.2.372.

Steber, C.M., Cooney, S.E., and McCourt, P. (1998). Isolation of the GA-Response Mutant sly1 as a Suppressor of ABI1-1 in Arabidopsis thaliana. Genetics *149*, 509–521. https://doi.org/10.1093/genetics/149.2.509.

Stodola, F. H., Raper, K. B., Fennell, D. I., Conway, H. F., Sohns, V. E., Langford, C. T., and Jackson, R. W. The microbial production of gibberellin A and X. Arch. Biochem. Biophys.54, 240-245 (1955).

Strader, L.C., Ritchie, S., Soule, J.D., McGinnis, K.M., and Steber, C.M. (2004). Recessiveinterfering mutations in the gibberellin signaling gene *SLEEPY1* are rescued by overexpression of its homologue, *SNEEZY*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *101*, 12771–12776. https://doi.org/10.1073/pnas.0404287101.

Takahashi, N., Kitamura, H., Kawarada, A., Seta, Y., Takai, M., Tamura, S., and Sumiki, Y. (1955). Biochemical Studies on "Bakanae" Fungus: Part XXXIV. Isolation of Gibberellins and Their PropertiesPart XXXV.Relation between Gibberellins, A  $_1$ , A  $_2$  and Gibberellic Acid.

Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan *19*, 267–281. https://doi.org/10.1080/03758397.1955.10856832.

Takatsuji, H. (1998). Zinc-finger transcription factors in plants. Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS) *54*, 582–596. https://doi.org/10.1007/s000180050186.

Takehara, S., Sakuraba, S., Mikami, B., Yoshida, H., Yoshimura, H., Itoh, A., Endo, M., Watanabe, N., Nagae, T., Matsuoka, M., et al. (2020). A common allosteric mechanism regulates homeostatic inactivation of auxin and gibberellin. Nat Commun *11*, 2143. https://doi.org/10.1038/s41467-020-16068-0.

Tal, I., Zhang, Y., Jørgensen, M.E., Pisanty, O., Barbosa, I.C.R., Zourelidou, M., Regnault, T., Crocoll, C., Erik Olsen, C., Weinstain, R., et al. (2016). The Arabidopsis NPF3 protein is a GA transporter. Nat Commun *7*, 11486. https://doi.org/10.1038/ncomms11486.

Talon, M., Koornneef, M., and Zeevaart, J.A. (1990). Endogenous gibberellins in Arabidopsis thaliana and possible steps blocked in the biosynthetic pathways of the semidwarf ga4 and ga5 mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *87*, 7983–7987. https://doi.org/10.1073/pnas.87.20.7983.

Tan, Q.K.-G., and Irish, V.F. (2006). The Arabidopsis Zinc Finger-Homeodomain GenesEncode Proteins with Unique Biochemical Properties That Are Coordinately Expressed duringFloralDevelopment.PlantPhysiology140,1095–1108.https://doi.org/10.1104/pp.105.070565.

Tan, W., Han, Q., Li, Y., Yang, F., Li, J., Li, P., Xu, X., Lin, H., and Zhang, D. (2021). A HAT1-DELLA signaling module regulates trichome initiation and leaf growth by achieving gibberellin homeostasis. New Phytol *231*, 1220–1235. https://doi.org/10.1111/nph.17422.

Thomas, S.G., Phillips, A.L., and Hedden, P. (1999). Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2- oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *96*, 4698–4703. https://doi.org/10.1073/pnas.96.8.4698.

Tian, C., Zhang, X., He, J., Yu, H., Wang, Y., Shi, B., Han, Y., Wang, G., Feng, X., Zhang, C., et al. (2014). An organ boundary-enriched gene regulatory network uncovers regulatory hierarchies underlying axillary meristem initiation. Mol Syst Biol *10*, 755. https://doi.org/10.15252/msb.20145470.

Tran, L.-S.P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Osakabe, Y., Qin, F., Simpson, S.D., Maruyama, K., Fujita, Y., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Co-expression of the stressinducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the ERD1 gene in Arabidopsis: ZFHD and NAC in drought stress response. The Plant Journal *49*, 46–63. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02932.x.

Tucker, S.C., and Wisdom, R. (1999). Site-specific Heterodimerization by Paired Class Homeodomain Proteins Mediates Selective Transcriptional Responses. Journal of Biological Chemistry *274*, 32325–32332. https://doi.org/10.1074/jbc.274.45.32325.

Tyler, L., Thomas, S.G., Hu, J., Dill, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Sun, T. (2004). DELLA Proteins and Gibberellin-Regulated Seed Germination and Floral Development in Arabidopsis. Plant Physiology *135*, 1008–1019. https://doi.org/10.1104/pp.104.039578.

Ubeda-Tomás, S., Swarup, R., Coates, J., Swarup, K., Laplaze, L., Beemster, G.T.S., Hedden, P., Bhalerao, R., and Bennett, M.J. (2008). Root growth in Arabidopsis requires

gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. Nat Cell Biol *10*, 625–628. https://doi.org/10.1038/ncb1726.

Ubeda-Tomás, S., Federici, F., Casimiro, I., Beemster, G.T.S., Bhalerao, R., Swarup, R., Doerner, P., Haseloff, J., and Bennett, M.J. (2009). Gibberellin Signaling in the Endodermis Controls Arabidopsis Root Meristem Size. Current Biology *19*, 1194–1199. https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.06.023.

Ueguchi-Tanaka, M., Fujisawa, Y., Kobayashi, M., Ashikari, M., Iwasaki, Y., Kitano, H., and Matsuoka, M. (2000). Rice dwarf mutant d1, which is defective in the  $\alpha$  subunit of the heterotrimeric G protein, affects gibberellin signal transduction. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *97*, 11638–11643. https://doi.org/10.1073/pnas.97.21.11638.

Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T., Hsing, Y.C., Kitano, H., Yamaguchi, I., et al. (2005). GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. Nature *437*, 693–698. https://doi.org/10.1038/nature04028.

Ueguchi-Tanaka, M., Nakajima, M., Katoh, E., Ohmiya, H., Asano, K., Saji, S., Hongyu, X., Ashikari, M., Kitano, H., Yamaguchi, I., et al. (2007). Molecular Interactions of a Soluble Gibberellin Receptor, GID1, with a Rice DELLA Protein, SLR1, and Gibberellin. The Plant Cell *19*, 2140–2155. https://doi.org/10.1105/tpc.106.043729.

Ulmasov, T., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (1999). Activation and repression of transcription by auxin-response factors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *96*, 5844–5849. https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5844.

Van De Velde, K., Ruelens, P., Geuten, K., Rohde, A., and Van Der Straeten, D. (2017). Exploiting DELLA Signaling in Cereals. Trends in Plant Science *22*, 880–893. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.07.010.

Varbanova, M., Yamaguchi, S., Yang, Y., McKelvey, K., Hanada, A., Borochov, R., Yu, F., Jikumaru, Y., Ross, J., Cortes, D., et al. (2007). Methylation of Gibberellins by *Arabidopsis* GAMT1 and GAMT2. The Plant Cell *19*, 32–45. https://doi.org/10.1105/tpc.106.044602.

Vision, T.J., Brown, D.G., and Tanksley, S.D. (2000). The Origins of Genomic Duplications in *Arabidopsis*. Science *290*, 2114–2117. https://doi.org/10.1126/science.290.5499.2114.

Vollbrecht, E., Veit, B., Sinha, N., and Hake, S. (1991). The developmental gene Knotted-1 is a member of a maize homeobox gene family. Nature *350*, 241–243. https://doi.org/10.1038/350241a0.

Wai, A.H., and An, G. (2017). Axillary meristem initiation and bud growth in rice. J. Plant Biol. *60*, 440–451. https://doi.org/10.1007/s12374-017-0088-x.

Wang, Y., and Jiao, Y. (2018). Axillary meristem initiation — a way to branch out. Current Opinion in Plant Biology *41*, 61–66. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.09.001.

Wang, B., Smith, S.M., and Li, J. (2018). Genetic Regulation of Shoot Architecture. Annu. Rev. Plant Biol. *69*, 437–468. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040422.

Wang, J.-W., Czech, B., and Weigel, D. (2009). miR156-Regulated SPL Transcription Factors Define an Endogenous Flowering Pathway in Arabidopsis thaliana. Cell *138*, 738–749. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.014.

Wang, L., Hua, D., He, J., Duan, Y., Chen, Z., Hong, X., and Gong, Z. (2011). Auxin Response Factor2 (ARF2) and Its Regulated Homeodomain Gene HB33 Mediate Abscisic Acid

Response in Arabidopsis. PLoS Genet 7, e1002172. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002172.

Wang, L., Sun, S., Jin, J., Fu, D., Yang, X., Weng, X., Xu, C., Li, X., Xiao, J., and Zhang, Q. (2015). Coordinated regulation of vegetative and reproductive branching in rice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *112*, 15504–15509. https://doi.org/10.1073/pnas.1521949112.

Weston, D.E., Elliott, R.C., Lester, D.R., Rameau, C., Reid, J.B., Murfet, I.C., and Ross, J.J. (2008). The Pea DELLA Proteins LA and CRY Are Important Regulators of Gibberellin Synthesis and Root Growth. Plant Physiology *147*, 199–205. https://doi.org/10.1104/pp.108.115808.

Wild, M., Davière, J.-M., Cheminant, S., Regnault, T., Baumberger, N., Heintz, D., Baltz, R., Genschik, P., and Achard, P. (2012). The *Arabidopsis* DELLA *RGA* - *LIKE3* Is a Direct Target of MYC2 and Modulates Jasmonate Signaling Responses. Plant Cell *24*, 3307–3319. https://doi.org/10.1105/tpc.112.101428.

Wild, M., Davière, J.-M., Regnault, T., Sakvarelidze-Achard, L., Carrera, E., Lopez Diaz, I., Cayrel, A., Dubeaux, G., Vert, G., and Achard, P. (2016). Tissue-Specific Regulation of Gibberellin Signaling Fine-Tunes Arabidopsis Iron-Deficiency Responses. Developmental Cell *37*, 190–200. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.03.022.

Wilson, R.N., Heckman, J.W., and Somerville, C.R. (1992). Gibberellin Is Required for Flowering in *Arabidopsis thaliana* under Short Days. Plant Physiol. *100*, 403–408. https://doi.org/10.1104/pp.100.1.403.

Windhövel, A., Hein, I., Dabrowa, R., and Stockhaus, J. (2001). Characterization of a novel class of plant homeodomain proteins that bind to the C4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene of Flaveria trinervia. Plant Molecular Biology *45*, 201–214. https://doi.org/10.1023/A:1006450005648.

Wolberger, C. (1996). Homeodomain interactions. Current Opinion in Structural Biology *6*, 62–68. https://doi.org/10.1016/S0959-440X(96)80096-0.

Wu, G., Park, M.Y., Conway, S.R., Wang, J.-W., Weigel, D., and Poethig, R.S. (2009). The Sequential Action of miR156 and miR172 Regulates Developmental Timing in Arabidopsis. Cell *138*, 750–759. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.031.

Xia, X., Dong, H., Yin, Y., Song, X., Gu, X., Sang, K., Zhou, J., Shi, K., Zhou, Y., Foyer, C.H., et al. (2021). Brassinosteroid signaling integrates multiple pathways to release apical dominance in tomato. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *118*, e2004384118. https://doi.org/10.1073/pnas.2004384118.

Xing, S., Qin, G., Shi, Y., Ma, Z., Chen, Z., Gu, H., and Qu, L.-J. (2007). GAMT2 Encodes a Methyltransferase of Gibberellic Acid That is Involved in Seed Maturation and Germination in Arabidopsis. J Integrative Plant Biology *49*, 368–381. https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00471.x.

Xu, F., Li, T., Xu, P.-B., Li, L., Du, S.-S., Lian, H.-L., and Yang, H.-Q. (2016). DELLA proteins physically interact with CONSTANS to regulate flowering under long days in *Arabidopsis*. FEBS Lett *590*, 541–549. https://doi.org/10.1002/1873-3468.12076.

Xu, Y., Wang, Y., Long, Q., Huang, J., Wang, Y., Zhou, K., Zheng, M., Sun, J., Chen, H., Chen, S., et al. (2014). Overexpression of OsZHD1, a zinc finger homeodomain class homeobox transcription factor, induces abaxially curled and drooping leaf in rice. Planta *239*, 803–816. https://doi.org/10.1007/s00425-013-2009-7.

Xue, H., Gao, X., He, P., and Xiao, G. (2022). Origin, evolution, and molecular function of DELLA proteins in plants. The Crop Journal *10*, 287–299. https://doi.org/10.1016/j.cj.2021.06.005.

Yabuta, T., and Hayashi, T. (1939). Biochemistry of the "bakanae" fungus (2). Isolation of gibberellin, a metabolic product of Gibberella fujikuiroi Wr. which promotes the growth of rice seedlings. Jour. Agr. Chem. Soc. Japan 15:25 7.

Yabuta, T. et Sumiki, T. (1937). Studies on the Chemical Constituents of "Inekoji" Part IV. J. Agric. Chem. Soc. Japan 13: 103-105.

Yamaguchi, S. (2008). Gibberellin Metabolism and its Regulation. Annu. Rev. Plant Biol. *59*, 225–251. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092804.

Yamaguchi, S., Sun, T., Kawaide, H., and Kamiya, Y. (1998). The *GA2* Locus of *Arabidopsis thaliana* Encodes *ent* -Kaurene Synthase of Gibberellin Biosynthesis. Plant Physiology *116*, 1271–1278. https://doi.org/10.1104/pp.116.4.1271.

Yang, M., and Jiao, Y. (2016). Regulation of Axillary Meristem Initiation by Transcription Factors and Plant Hormones. Front. Plant Sci. 7. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00183.

Yang, B., Song, Z., Li, C., Jiang, J., Zhou, Y., Wang, R., Wang, Q., Ni, C., Liang, Q., Chen, H., et al. (2018). RSM1, an Arabidopsis MYB protein, interacts with HY5/HYH to modulate seed germination and seedling development in response to abscisic acid and salinity. PLoS Genet *14*, e1007839. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007839.

Yoshida, H., Hirano, K., Sato, T., Mitsuda, N., Nomoto, M., Maeo, K., Koketsu, E., Mitani, R., Kawamura, M., Ishiguro, S., et al. (2014). DELLA protein functions as a transcriptional activator through the DNA binding of the INDETERMINATE DOMAIN family proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *111*, 7861–7866. https://doi.org/10.1073/pnas.1321669111.

Yu, S., Galvão, V.C., Zhang, Y.-C., Horrer, D., Zhang, T.-Q., Hao, Y.-H., Feng, Y.-Q., Wang, S., Schmid, M., and Wang, J.-W. (2012). Gibberellin Regulates the *Arabidopsis* Floral Transition through miR156-Targeted SQUAMOSA PROMOTER BINDING–LIKE Transcription Factors. Plant Cell *24*, 3320–3332. https://doi.org/10.1105/tpc.112.101014.

Zentella, R., Zhang, Z.-L., Park, M., Thomas, S.G., Endo, A., Murase, K., Fleet, C.M., Jikumaru, Y., Nambara, E., Kamiya, Y., et al. (2007). Global Analysis of DELLA Direct Targets in Early Gibberellin Signaling in *Arabidopsis*. The Plant Cell *19*, 3037–3057. https://doi.org/10.1105/tpc.107.054999.

Zhang, D., Jing, Y., Jiang, Z., and Lin, R. (2014). The Chromatin-Remodeling Factor PICKLE Integrates Brassinosteroid and Gibberellin Signaling during Skotomorphogenic Growth in *Arabidopsis*. Plant Cell *26*, 2472–2485. https://doi.org/10.1105/tpc.113.121848.

Zhang, L., Chen, L., and Yu, D. (2018a). Transcription Factor WRKY75 Interacts with DELLA Proteins to Affect Flowering. Plant Physiol. *176*, 790–803. https://doi.org/10.1104/pp.17.00657.

Zhang, Q., Wang, J., Wang, L., Wang, J., Wang, Q., Yu, P., Bai, M., and Fan, M. (2020). Gibberellin repression of axillary bud formation in *Arabidopsis* by modulation of DELLA-SPL9 complex activity. J. Integr. Plant Biol. *62*, 421–432. https://doi.org/10.1111/jipb.12818.

Zhang, X., Feng, B., Zhang, Q., Zhang, D., Altman, N., and Ma, H. (2005). Genome-wide expression profiling and identification of gene activities during early flower development in Arabidopsis. Plant Mol Biol *58*, 401–419. https://doi.org/10.1007/s11103-005-5434-6.

Zhang, Y., Liu, Z., Wang, X., Wang, J., Fan, K., Li, Z., and Lin, W. (2018b). DELLA proteins negatively regulate dark-induced senescence and chlorophyll degradation in Arabidopsis through interaction with the transcription factor WRKY6. Plant Cell Rep *37*, 981–992. https://doi.org/10.1007/s00299-018-2282-9.

Zhang, Z.-L., Ogawa, M., Fleet, C.M., Zentella, R., Hu, J., Heo, J.-O., Lim, J., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., and Sun, T. (2011). SCARECROW-LIKE 3 promotes gibberellin signaling by antagonizing master growth repressor DELLA in Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *108*, 2160–2165. https://doi.org/10.1073/pnas.1012232108.

Zhu, Y., Nomura, T., Xu, Y., Zhang, Y., Peng, Y., Mao, B., Hanada, A., Zhou, H., Wang, R., Li, P., et al. (2006). *ELONGATED UPPERMOST INTERNODE* Encodes a Cytochrome P450 Monooxygenase That Epoxidizes Gibberellins in a Novel Deactivation Reaction in Rice. The Plant Cell *18*, 442–456. https://doi.org/10.1105/tpc.105.038455.

# Annexes

Annexe 1. Amorces utilisées pour le clonage des régions codantes Les séquences soulignées correspondent aux séquences attB1 (amorce F) et attB2 (amorce R), nécessaires pour le clonage par système Gateway.

Gène	Informations	Amorces 5' 3' F = sens et R = antisens
HB21-F		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAGATTGCAAGTCAAGAAG
HB21-R		GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTAAGGATTAGTAGAAGCAAG
HB22-F		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAATTTTGAGGATCAAGAAG
HB22-R		GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTAGGGTTTCTTACCAAGAGA
HB23-F		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGATGGATATGACTCCTAC
HB23-R		GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCGACGACGATGATCCGTTAA
HB24-F		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAAGTTAGAGAGAAGAAAG
HB24-R		GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTACAAATCCTTCTTCTTGC
HB25-F		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAGTTTGAAGACAACAAC
HB25-R		GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCATGGTTGGT
HB26-F		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGAGCTCGTTATCAAAACC
HB26-R		GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTACAACTTCAAATTCAAAGAC
HB27-F		<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC</u> ATGGATGAGATAAAACCAAAG
HB27-R		GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCATTCATCAATTATAATTTT
HB28-F		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGGAGCTTGGAGGAAAATGC
HB28-R		GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTATTCACTAATGTTACTATTG
HB29-F		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGGATTTGTCTTCCAAACC
HB29-R		<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT</u> TCAAGAAGATGAAGACCCATC
HB30-F		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGGATGTAATAGCTACTAC
HB30-R		<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT</u> CGTCGAAGAAAACGACCCAT
HB31-F		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAAATTGCAAGTCAAGAAG
HB31-R		<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT</u> TCATGGGACGATCTTAGTCAT
HB32-F		<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC</u> ATGCAGAGTACTTGTGTCTAC
HB32-R		<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT</u> TTAGTGATAAAACTTTTTATTA
HB33-F		<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC</u> ATGGATATGAGAAGCCATGAA
HB33-R		<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT</u> TTAGAGAGTAGTTGTTGGTGT
HB34-F		<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC</u> ATGCTTGTTAGATCAATGG
HB34-R		<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT</u> CGACGAAGACGACGAGGCG
HB30-R	Avec codon	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT</u> TCACGTCGAAGAAAACGACC
	STOP	
HB33-R	Sans codon	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT</u> GAGAGTAGTTGTTGGTGTTGG
	STOP	
HB25-R	Sans codon	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT</u> TGGTTGGTCTTGTTCATGATG
	STOP	
HB29-R	Sans codon	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT</u> AGAAGATGAAGACCCATCACC
	STOP	

AITIERE Z. AITIOICES UII		
Gène	Informations	Amorces 5' 3' F = sens et R = antisens
HB21-F		AGCCTCTCTCTATTCTCAGAACCTT
HB21-R		AGAGCACATACCCACAACCA
HB22-F		GGTGAGGGAGCCACATCTAGT
HB22-R		CGCTCCAACTCCTTTACTCCT
HB23-F		TGTCGGAGGAGGAGGAGAG
HB23-R		CCGCCGCTATCACTATCAA
HB24-F		TGACAAGAAGAAAATCATCAGCTC
HB24-R		GGCGGTTTGGGAGTAAGTG
HB25-F		CCATCGACGCTCTAAAATGC
HB25-R		TAATTCCTTGCGGTGGAAGT
HB26-F		GACCCTCCGTCCCTTAGGT
HB26-R		GAAGGACTACGACGGTGGAA
HB27-F		TGGAAAAAGCGAAGGAAAGA
HB27-R		ATCGGATCCCCTCCATAACT
HB28-F		TCATCAATATCAATCTCATCTTCCA
HB28-R		GGGATTATAGAGATGCTGCTTATTG
HB29-F		TCTTCTCCCTCCGGCACT
HB29-R		GCTGAGGTGTAGTAAGAGCAAGG
HB30-F		CGCCGATCTCGTCTTCTTA
HB30-R		ATTGGAACCGCCGTGTTA
HB31-F		CCACACCGAAAACTCATGC
HB31-R		CATTTGGTGTGGCATAGCTG
HB32-F		AACGGCTGAGGAAAGAAATG
HB32-R		TCTTCCGTCGAAGTCTCCTC
HB33-F		CCGATTCACCACCACAAGTA
HB33-R		CTCATCGGCGTCACCATT
HB34-F		CCGTGAAACTGACGATTCCT
HB34-R		GGTTGTTGTTGAAGATGGAAGA
HB23qPCR-F	Analyse des mutants	CCAACTTCTCTCAAATGTGCTG
HB23qPCR-R	Analyse des mutants	GGGATTTGGGAAGAGTCGTT
HB31qPCR-F	Analyse des mutants	TTGCCACAGGAACTTCCATA
HB31qPCR-R	Analyse des mutants	TGTTGGTGGTAAGGGGACAT
HB33qPCR-F	Analyse des mutants	GGATATGAGAAGCCATGAAATGA
HB33qPCR-R	Analyse des mutants	CACCATTGTTGTTGCCATTG

Annexe 2. Amorces utilisées pour les gRT-PCR

#### Annexe 3. Amorces utilisées pour les RT-PCR (PCR sur ADNc)

Gène	Informations	Amorces 5' 3' F = sens et R = antisens
HB23F-rtPCR		GCTGCCACCGTAATTTCCAC
HB23R-rtPCR		ATCACGGCGGTTAAAGGTGT

HB25F-rtPCR		GGAGTTTGAAGACAACAACAAC
HB25R-rtPCR		CGGAACACCAGTCTCCTGAC
HB28F-rtPCR		CACGTGTCGACCAAGGAGC
HB28R-rtPCR		CAATCAAAACATACAAGATTCCAC
HB29F-rtPCR	Mutants hb29.1 et hb29.2	AAACTCTCTTCCCATCGCCG
HB29R-rtPCR	Mutants hb29.1 et hb29.2	TTGGATCTTGATCTGACGGTC
HB31F-rtPCR		TCAGTTCAATGTTCAAGAACCTG
HB31R-rtPCR		GGAGGAGCAGAATTAGCAGC
HB33F-rtPCR		GGATATGAGAAGCCATGAAATGA
HB33R-rtPCR		GCTTGTTCATCCTCCACCCT
HB34F-rtPCR		GCAACATTCATCAACCAGAGC
HB34R-rtPCR		ATCTGAGAACGGTGCGGTTT
HB30.1F-rtPCR	Mutant hb30.1	TTCAACCGTTGGATTTAGAGC
HB30.1R-rtPCR	Mutant hb30.1	AACTCGAAATCTTTGGGATGG
HB30.2F-rtPCR	Mutant <i>hb30.2</i>	CGCCGATCTCGTCTTCTTA
HB30.2R-rtPCR	Mutant hb30.2	GATTTTTGCCGTGAGATCGG
EF1-F		TTGCTCCCACAGGATTGACCACTG
EF1-R		TCACTTCGCACCCTTCTTGACG

Annexe 4. Amorces utilisées pour le génotypage des mutants *zfhd* 

NASC ID	Mutant zfhd	Amorces 5' 3' F = sens et R = antisens
N559288-F	hb23	CCACCACCACCATCCTCTCC
N559288-R	hb23	CGTGGTAAAGAACATTAAAT
N661156-F	hb25	CCTAGTGTGTTTTAAGATGAGCCC
N661156-R	hb25	AAACTCACCACAACCATCGAC
N617668-F2	hb28	CACGTGTCGACCAAGGAGC
N617668-R2	hb28	CTAAATCTGCTCCTTACGATGG
N877090-F	hb29.1 et hb29.2	AAATGCAGGGGTGATACAGTG
N877090-R	hb29.1 et hb29.2	TTGGATCTTGATCTGACGGTC
N434816-F	hb30.1	TTCAACCGTTGGATTTAGAGC
N434816-R	hb30.1	AACTCGAAATCTTTGGGATGG
SM3.3405-F	hb30.2	GCAACATTCATCAACCAGAGC
SM3.3405-R	hb30.2	GATTTTTGCCGTGAGATCGG
N927066-F	hb31	TCAGTTCAATGTTCAAGAACCTG
N927066-R	hb31	ATCTTTTGGTGGTTGAGCATG
N597385-F	hb33	GCAAAAACTGGGTTTTTCCTC
N597385-R	hb33	TGGTGTTGGTGGTTTCTTAGC
N656708-F	hb34	GCAACATTCATCAACCAGAGC
N656708-R	hb34	GATTTTTGCCGTGAGATCGG
LBb1	T-DNA	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT

Annexe 5. Amorces utilisées pour le clonage des fusions transcriptionnelles e	t
traductionnelles	

Gène	Informations	Amorces 5' 3' F = sens et R = antisens
attB1-		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGTGCAATAACCCGGCCC
pHB23-F		
attB2-		<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT</u> AGCTTAAAACATTAATATAACCA
pHB23-R		
attB2-		<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT</u> CGACGACGATGATCCGTTA
HB23-R		
attB1-		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCTTTGCGGGATGCGCGTGC
pHB29-F		
attB2-		GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTAGAAGATGAAGACCCATCAC
HB29-R		
attB1-		<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC</u> GTGCGGTAACAATAAGACC
pHB30-F		
attB2-		<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT</u> GACAACTCAAAACATTTAGGG
pHB30-R		
attB2-		<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT</u> CGTCGAAGAAAACGACC
HB30-R		

Annexe 6. Oligonucléotides utilisés dans les expériences de retard sur gel

Gène	Informations	Amorces 5' 3' F = sens et R = antisens
EMSA-WT-F2		GGGGTTCATTAATTACGTAA
EMSA-WT-R2		GGGGTTACGTAATTAATGAA
EMSA-MUT-F2		GGGGTTCATGGGTTACGTAA
EMSA-MUT-R2		GGGGTTACGTAACCCATGAA
EMSA-WT-F	Expérience préliminaire	GGGGTTCATTAATTACGTAAAAAATTCATTAATTACGT
EMSA-WT-R	Expérience préliminaire	GGGGACGTAATTAATGAATTTTTTACGTAATTAATGAA
EMSA-MUT-F	Expérience préliminaire	GGGGTTCATGGGTTACGTAAAAAATTCATGGGTTACGT
EMSA-MUT-R	Expérience préliminaire	GGGGACGTAACCCATGAATTTTTTACGTAACCCATGAA

$\pi$	Annexe 7	7. Amorces	utilisées p	oour le c	lonage des	versions	délétées	de HB30	et HB34
-------	----------	------------	-------------	-----------	------------	----------	----------	---------	---------

Gène	Informations	Amorces 5' 3' $F$ = sens et $R$ = antisens
30-ZF-F2		GAAGCGGTTGCGGTTGCGACTGAGGAGGATCCATCTTCTCTCTC
30-ZF-R		GAGAGAAGATGGATCCTCCTCAGTCGCAACCGCAACCGCTTC
30-HD-F		TAACACGGCGGTTCCAATGTCTGCTAACGGCGGAGTAGTAGTAG
30-HD-R		CTACTACTACTCCGCCGTTAGCAGACATTGGAACCGCCGTGTTA
34-ZF-F		CACCACAACAACAACAAAGTCACTGAAACTGACGATTCCTCCGCC
34-ZF-R		GGCGGAGGAATCGTCAGTTTCAGTGACTTTGTTGTTGTTGTGGTG
34-HD-F		CTCCGCCACGCCTGGCTCGGCAACCACCGTGCAGAGAAAC
34-HD-R		GTTTCTCTGCACGGTGGTTGCCGAGCCAGGCGTGGCGGAG

Gène	Informations	Amorces 5' 3'
amiR-I-30		gaTACTGACTAAACTTCGTGCTGtctctcttttgtattcc
amiR-II-30		gaCAGCACGAAGTTTAGTCAGTAtcaaagagaatcaatga
amiR-III-30		gaCAACACGAAGTTTTGTCAGTTtcacaggtcgtgatatg
amiR-IV-30		gaAACTGACAAAACTTCGTGTTGtctacatatattcct
mir-A		CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC
mir-B		GCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAG

#### Annexe 8. Amorces utilisées pour le clonage de l'amiR ciblant HB30

#### Annexe 9. Amorces utilisées pour le clonage des lignées SRDX

Gène	Informations	Amorces 5' 3' F = sens et R = antisens
attB1- <mark>HB30</mark> -F		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT <u>TC</u> ATG
		GATGTAATAGCTACTACAACT
SRDX-HB30-stop-R1		TTAAGCGAAACCCAAACGGAGTTCTAGATCCAGA
		TCCAGCCCCGTCGAAGAAAACGACCCA
attB2-SRDX-R2		GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT <u>T</u> TTAA
		GCGAAACCCAAACGGAGTTC
SRDX-HB29-stop-R1		TTAAGCGAAACCCAAACGGAGTTCTAGATCCAGA
		TCCAGCCCAGAAGATGAAGACCCATC

## Annexe 10. Amorces utilisées pour le clonage des constructions nécessaires aux tests d'activité transcriptionnelle (système luciférase)

Gène	Informations	Amorces 5' 3' F = sens et R = antisens	
pUC57-F		GTAAAACGACGGCCAGTG	
pUC57-R		GGAAACAGCTATGACCATG	
pGREEN-R		CGGTAGGCTGCGAAATGCCC	

#### Annexe 11. Amorces diverses

Gène	Informations	Amorces 5' 3' F = sens et R = antisens
GFP-F450	Séquençage	GCCGACAAGCAGAAGAACG
GFP-R200	Séquençage	GTGGTCGGGGTAGCGGC
attb1-GFP		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATG
		GTGAGCAAGGGCGAGGAG
GFP-R		GGTGGGCCAGGGCACGG
pHB23-F1seq	Séquençage	CAACTTTACCATTAATCTCTAC
pHB23-F2seq	Séquençage	ATTTTCCGTCGAATATCACCC
pHB23-R1seq	Séquençage	GAGCATGTAAGAGGAAGAGAT
pHB29-F1seq	Séquençage	GCCATGCAGTTTGATCTTACC
pHB29-F2seq	Séquençage	TTTCACTAGAACACGTAATACC
pHB29-R1seq	Séquençage	GTAGCCGTGGGACTCGGC
pHB30-F1seq	Séquençage	GGATTTGCAAACGATCTTAGG
pHB30-F2seq	Séquençage	TTGTCAACGTCATGGAGATAC
pHB30-R1seq	Séquençage	CGAGATCGGCGGTGGAGA

#### Résultats obtenus ayant été publiés dans des articles scientifiques

En parallèle de mes travaux de thèse, j'ai eu l'opportunité de prendre part aux projets des autres membres de l'équipe, dont les résultats ont pu être publiés dans 2 articles distincts (Annexe 12 et 13). J'ai contribué à diverses expériences pour chacun de ces articles.

#### Annexe 12. Article 1.

# Nitrate signaling promotes plant growth by up regulating gibberellin biosynthesis and destabilization of DELLA proteins.

Lucie Camut, Barbora Gallova, Lucas Jilli, Mathilde Sirlin-Josserand, Esther Carrera, Lali Sakvarelidze-Achard, Sandrine Ruffel, Gabriel Krouk, Stephen G Thomas, Peter Hedden, Andrew L Phillips, Jean-Michel Davière & Patrick Achard. Current biology, 2021 Nov 22;31(22):4971-4982.e4. doi: 10.1016/j.cub.2021.09.024.

J'ai réalisé plusieurs analyses qRT-PCR visant à suivre, au cours d'une cinétique en présence de nitrate, l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des GA (biosynthèse et signalisation). Ces résultats ont notamment permis de confirmer que le nitrate réduit l'abondance des protéines DELLA, en favorisant l'accumulation de GA, à travers l'activation de l'expression des gènes du métabolisme des GA.

#### Annexe 13. Article 2.

# A quantitative gibberellin signalling biosensor reveals a role for gibberellins in internode specification at the shoot apical meristem.

Bihai Shi, Amelia Felipo-Benavent, Guillaume Cerutti, Carlos Galvan-Ampudia, Lucas Jilli, Geraldine Brunoud, Jérome Mutterer, Lali Sakvarelidze-Achard, Jean-Michel Davière, Alejandro Navarro-Galiano, Ankit Walia, Shani Lazary, Jonathan Legrand, Roy Weinstein, Alexander M. Jones, Salomé Prat, Patrick Achard & Teva Vernoux. 2022, 10.1101/2021.06.11.448154, article en invitation à resoumission.

J'ai contribué aux résultats présentés dans cet article en réalisant plusieurs colorations GUS chez les lignées *GID1A*, *GID1B* et *GID1C*, au stade plantule. Ces résultats ont permis de préciser les profils d'expression de *GID1A*, *GID1B* et *GID1C*, notamment au niveau de l'hypocotyle.

Par ailleurs, j'ai aussi testé l'interaction entre Can2, la protéine DELLA mutante, intégrée au senseur des GA développé par le laboratoire, et les protéines PIF4 et BZR1 connues pour

interagir avec la protéine DELLA RGA. J'ai pu confirmer, à l'aide d'expériences en doublehybride chez la levure, que Can2 n'interagit pas avec PIF4 et BZR1, contrairement à RGA sauvage.

Dans le but de confirmer ces résultats *in planta*, le laboratoire a croisé une lignée surexpresseur *p35S:BZR1-myc* avec le senseur (contentant Can2), afin de réaliser des expériences de Co-immunoprécipitation. J'ai pu vérifier en amont, par western blot, la forte accumulation de la protéine BZR1-myc chez la lignée *p35S:BZR1-myc*.

# **Current Biology**

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

#### **Highlights**

- Nitrate promotes plant growth in a DELLA-dependent manner
- Nitrate promotes root elongation via DELLA-dependent action on cell proliferation
- Nitrate signaling modulates DELLA protein accumulation
- Nitrate supply enhances GA synthesis in Arabidopsis and wheat

#### **Authors**

Lucie Camut, Barbora Gallova, Lucas Jilli, ..., Andrew L. Phillips, Jean-Michel Davière, Patrick Achard

#### Correspondence

patrick.achard@ibmp-cnrs.unistra.fr

#### In brief

Nitrate is one of the main nitrogen sources for plants. Camut et al. demonstrate genetically that nitrate supply promotes plant growth through the activation of gibberellin biosynthesis, which in turn reduces the accumulation of growth-repressing DELLA proteins.



### Article

## **Current Biology**

#### Article

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

Lucie Camut,<sup>1</sup> Barbora Gallova,<sup>2</sup> Lucas Jilli,<sup>1</sup> Mathilde Sirlin-Josserand,<sup>1</sup> Esther Carrera,<sup>3</sup> Lali Sakvarelidze-Achard,<sup>1</sup> Sandrine Ruffel,<sup>4</sup> Gabriel Krouk,<sup>4</sup> Stephen G. Thomas,<sup>2</sup> Peter Hedden,<sup>2,5</sup> Andrew L. Phillips,<sup>2</sup> Jean-Michel Davière,<sup>1</sup> and Patrick Achard<sup>1,6,\*</sup>

<sup>1</sup>Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, CNRS, University of Strasbourg, 67084 Strasbourg, France

<sup>2</sup>Plant Science Department, Rothamsted Research, Harpenden AL5 2JQ, UK

<sup>3</sup>Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, CSIC-UPV, 46022 Valencia, Spain

<sup>4</sup>BPMP, Univ Montpellier, CNRS, INRAE, Montpellier SupAgro, Montpellier, France

<sup>5</sup>Laboratory of Growth Regulators, Institute of Experimental Botany and Palacky University, 78371 Olomouc, Czech Republic <sup>6</sup>Lead contact

\*Correspondence: patrick.achard@ibmp-cnrs.unistra.fr https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.09.024

#### SUMMARY

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

#### INTRODUCTION

Nitrogen (N) is one of the most important macronutrients limiting plant growth and yield.<sup>1–3</sup> Except for a few plant species that can use atmospheric N<sub>2</sub> gas through symbiotic association with certain soil bacteria, most crops acquire N in the soil from inorganic forms such as nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), the main N source for plants in agricultural lands.<sup>4</sup> Nitrate serves as a source of the essential element found in very diverse macromolecules and a signal molecule regulating global gene expression and modulating both root and shoot system architecture.<sup>2,3,5–7</sup>

The most-studied nitrate-related signaling pathway is called the primary nitrate response (PNR).<sup>8</sup> It is characterized by a fast nitrate-specific (manifested in *nitrate reductase*-null mutant)<sup>5</sup> induction of marker genes (reviewed in Medici and Krouk<sup>6</sup>). These markers include the nitrate transporter families such as the transceptor *NITRATE TRANSPORTER 1 (NRT1)/PEPTIDE TRANS-PORTER (PTR) FAMILY 6.3 (NPF6.3,* also known as *CHLORATE RESISTANT 1, CHL1* or *NRT1.1), NRT2.1* and *NRT2.2,* the nitrate assimilation genes *NITRITE REDUCTASE (NiR)* and *NITRATE REDUCTASE (NIA1* and *NIA2),* and a multitude of transcription factors functioning in diverse signaling pathways.<sup>2,7,9–12</sup> According to the current model of PNR, NRT1.1 perceives nitrate triggering changes in cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> levels,<sup>13</sup> which activate several members of calcium-sensor protein kinases (CPK10/ 30/32)<sup>14</sup> that phosphorylate conserved NIN-LIKE PROTEIN (NLP) transcription factors (NLP6/7)<sup>15</sup> to reprogram nitrate-regulated genes ensuring adaptive growth to nitrate availability.<sup>14,16</sup>

CellPress

Despite sophisticated nitrate uptake, storage, and assimilation mechanisms,<sup>12</sup> the fluctuation of nitrate concentration in both time and space, in part due to its high solubility and predisposition to leaching, requires farmers to supply soil with N-fertilizers to ensure optimal crop yield. Hence, since the 1960s, the application of N-fertilizers associated with mechanization and the adoption of high-yielding semi-dwarf varieties led to substantial yield increases, an intensive agricultural practice known as the "Green Revolution."<sup>17</sup> The resulting semi-dwarf stature prevents lodging and thus enables higher N-fertilizer applications. The semi-dwarfing genes of the rice (semidwarf1, sd1) and wheat (Reduced height 1, Rht-1) varieties were characterized and shown to inhibit the synthesis and action, respectively, of gibberellin (GA) growth hormones.<sup>17</sup> Strikingly, despite that more than 70% of wheat cultivated worldwide carry a GA-insensitive Rht-1 dwarfing allele,<sup>18</sup> little is known about whether and how GA contributes to nitrate-regulated growth processes.

GAs constitute a class of diterpenoid molecules controlling major aspects of plant growth and development. Mutants deficient in GA biosynthesis or responses are dwarfs and late flowering, while



elevated GA signaling results in taller plants and early flowering. Bioactive GA promotes growth by opposing the functions of DELLA growth repressing proteins (DELLAs), members of the GRAS family of transcriptional regulators.<sup>19</sup> While cereals usually harbor a single DELLA paralog, such as SLENDER RICE 1 (SLR1) in rice and REDUCED HEIGHT 1 (RHT-1) in wheat,<sup>20</sup> the Arabidopsis genome encodes five DELLAs, GA-INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR of ga1-3 (RGA), RGA-LIKE1 (RGL1), RGL2, and RGL3.<sup>19</sup> GA-mediated physiological responses are activated by the binding of bioactive GA to the GA receptors GIBBERELLIN INSENSITIVE 1 (GID1) that trigger the destruction of DELLAs through the ubiquitin-dependent 26S proteasome pathway.<sup>19</sup> DELLAs repress GA responses by interacting with and modulating the activity of DELLA-interacting partners (DIP) such as transcription factors or regulators, and chromatin-remodeling complexes.<sup>21</sup> Thereby, DELLAs regulate the expression of a broad array of genes involved in various pathways.

Similar to other phytohormones, GAs act as mediators of environmental signals, allowing plants to respond, often rapidly, to changes in light conditions, temperature, water, and nutrient status.<sup>22-26</sup> Usually, DELLA accumulation reduces growth to prioritize resources to defense mechanisms, whereas GA-mediated DELLA degradation stimulates growth under favorable conditions.<sup>27</sup> Hence, it is now accepted that GA signaling enables appropriate growth in adverse environments.<sup>22,27</sup> Interestingly, recent experiments have shown that physical interactions between the rice DELLA SLR1 and GROWTH-REGULATOR FAC-TOR 4 (GRF4) transcription factor co-regulate growth and the metabolism of carbon and nitrogen.<sup>28</sup> Whereas GRF4 promotes N assimilation, carbon fixation, and plant growth, DELLAs repress these processes. Moreover, a recent study has reported that SLR1, and also GID1, are able to interact with NITROGEN-MEDI-ATED TILLER GROWTH RESPONSE 5 (NGR5), a rice APETALA2domain transcription factor induced by N.<sup>29</sup> SLR1 accumulation competitively inhibits GID1-NGR5 interaction, which in turn enhances NGR5 stability and thereby shoots branching.<sup>29</sup> Thus, although it is apparent that GA signaling regulates growth and nitrogen-use efficiency, at present, it is currently unclear whether GA is a component of the regulatory pathway controlling the nitratedependent growth. Here, we undertook a molecular and genetic approach to evaluate the role of GA metabolism and signaling in nitrate-regulated growth processes in Arabidopsis and wheat. Essentially, we show that nitrate increases bioactive GA levels, thus promoting the degradation of DELLAs. Reduced DELLA accumulation in turn activates cell proliferation and, as a consequence, root and shoot growth. Plant growth adaptation to fluctuating nutrient environment can be understood as a feedforward cycle, where nutrients promote plant growth through regulating hormones biosynthesis and transport, and, in turn, hormonal pathways control nutrient provision to growth rate.<sup>30,31</sup> Our data lead to the proposal that the GA pathway is a major regulator of this feedforward loop interconnecting plant growth to nitrate availability.

#### RESULTS

## Nitrate promotes plant growth in a DELLA-dependent manner

In response to nitrate availability, the root and shoot system architecture undergoes important developmental changes. Thus,

#### Current Biology Article

while adequate nitrate availability increases the length of both primary and lateral roots, low and high nitrate supplies inhibit their growth.<sup>32</sup> Similarly, nitrate limitation reduces shoot growth and delays axillary bud activation and therefore shoot branching.<sup>33</sup> Although well described as growth regulators preventing excessive elongation in response to high N fertilizer supply, it is still unclear whether the GA-regulated DELLA proteins inhibit growth under low N regimes.<sup>17,18</sup> To assess this point, we first investigated the involvement of DELLAs in the regulation of primary root growth in the absence of nitrate (or 0.5 mM glutamine, an alternative N source) and in response to increasing amounts of nitrate. For this purpose, we compared the primary root length of Arabidopsis wild-type and global-DELLA mutant seedlings (lacking all five Arabidopsis DELLAs) grown with nitrate supply ranging from 0 to 50 mM (Figures 1A and 1B). As previously reported,<sup>32</sup> the growth of the primary roots was proportionally correlated with the amount of nitrate, from low to adequate concentrations (10 mM NO3- in our growth conditions) and then inversely correlated under high nitrate supply (50 mM NO<sub>3</sub>). Interestingly, we observed that the primary root growth of 7-day-old global DELLA mutant seedlings was less affected by low and high nitrate supply than that of the wild type (Figure 1B). Whereas the length of global-DELLA mutant seedling roots grown on 0.25, 0.5, 1, and 50 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> was significantly longer than wild-type roots, their differences decreased on adequate nitrate supply (10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Thus, DELLA function inhibits root growth in response to low and high nitrate availability but becomes less critical on optimal nitrate supply (Figures 1A and 1B).

Next, to examine the contribution of DELLAs to nitrate-mediated growth processes during shoot development, we grew Arabidopsis wild-type, global DELLA, and ga20ox1 mutants (a weak GA biosynthesis mutant)<sup>34–36</sup> on a perlite vermiculite soil supplemented with increasing amounts of nitrate (ranging from 2 to 50 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). It is noteworthy that nitrate concentrations used for in vitro experiments (Figures 1A and 1B) may not be directly comparable to those applied in soil. Nevertheless, in a similar way to the above growth responses, we found that whereas the height of 7-week-old wild-type plants increased with the concentration of nitrate present in the soil, the growth response was attenuated in mutants altered in GA pathway (Figures 1C and 1D). Furthermore, while the diameter of wild-type rosettes became larger when nitrate supply was increased, the global-DELLA mutant rosettes were insensitive to a change from 10 to 50 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figure 1E). Taken together, these results demonstrate that nitrate promotes growth in part via a DELLA-dependent mechanism.

There is considerable evidence suggesting that nitrate-dependent regulation of bud activation and elongation are triggered by changes in hormone action.<sup>33</sup> GA has long been known to repress shoot branching; GA-deficient mutants display a high degree of branching.<sup>37</sup> We found that nitrate supply increased the number of primary branches of wild-type and *ga20ox1* mutant plants in contrast to *global-DELLA* mutant plants (Figure 1F). Thus, similar to the above results, nitrate enhances bud outgrowth in a DELLA-dependent manner. At this stage, it remains unclear whether the NGR5-GID1-DELLA competitive binding mechanism controlling shoot branching in rice also operates in *Arabidopsis*.<sup>29</sup>




#### Figure 1. Nitrate regulates plant growth in part in a DELLA-dependent manner

(A) Representative 7-day-old wild-type (Ler) and global DELLA mutant seedlings grown on media containing increasing concentrations of nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), as indicated. Gln, glutamine. Scale bar represents 1 cm.

(B) Root length of 7-day-old wild-type (Ler) and *global DELLA* mutant seedlings grown on increasing concentration of nitrate, measured between day 2 and day 7 post-germination. Different letters denote significant differences (p < 0.05) from the wild type using two-way ANOVA followed by a Tukey's test for multiple comparisons.  $25 \le n \le 61$  seedlings were analyzed for each boxplot. Similar results were obtained in independent experiments.

(C) Representative 7-week-old wild-type (Ler) and global DELLA mutant plants grown on perlite vermiculite soil supplemented once a week with a nutritive solution containing 2, 10, or 50 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

(D-F) Height of 7-week-old (13  $\leq$  n  $\leq$  17 plants) (D), rosette diameter of 5-week-old (16  $\leq$  n  $\leq$  18 plants) (E), and number of primary shoots of 8-week-old (14  $\leq$  n  $\leq$  19 plants) (F) wild-type (Ler), *global DELLA*, and *ga20ox1* mutant plants grown on different nitrate conditions, such as in (C). Different letters denote significant differences (p < 0.05) using two-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons. Similar results were obtained in independent experiments.

## Nitrate promotes root meristem growth via DELLAdependent action on cell proliferation

Plant growth is regulated through the activity of apical and intercalary meristems in which the cells divide before elongating and differentiating. Moreover, GA promotes growth through cell proliferation and cell elongation by stimulating the degradation of nuclear DELLAs.<sup>19,38</sup> Previous works reported a key role for DEL-LAs in controlling root apical meristem (RAM) activity.<sup>39,40</sup> To investigate whether DELLAs play an essential function in regulating RAM activity in response to nitrate availability, we measured the size of the RAM of *Arabidopsis* wild-type and *global-DELLA* mutant seedlings throughout their development (from 3- to 7-day-old) on low (0.5 mM) and adequate (10 mM)  $NO_3^-$  conditions. Root meristem length was represented as the number of cortical cells between the quiescent center (QC) and the first elongated cell.<sup>40</sup> We found that whereas the size of the





# Figure 2. Nitrate promotes root meristem cell division in a DELLA-dependent manner

(A) Root meristem cell number of wild-type (Ler) and *global DELLA* mutant seedlings at 3, 5, and 7 days post-germination (dpg), grown on 0.5 or 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. The number of meristematic cells was determined in the cortex file between the quiescent center and the first differentiated cells. Different letters denote significant differences (p < 0.05) using two-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons.  $20 \le n \le 30$  cortex files from at least 11 roots were analyzed for each boxplot. Similar results were obtained in independent experiments.

(B and C) Effect of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> treatment on CY-CB1;2:Dbox-GUS cell-division marker in wild-type (Col-0) and *gai-t6 rga-24* mutant (lines #7 and #18) roots.

(B) Photographs show representative 5-day-old root seedlings grown without nitrate (0 mM) or with 0.25 or 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. White arrows indicate the distance between the first and last dividing cells in the longitudinal axis of the root meristem as shown by  $\beta$ -glucuronidase staining. Scale bars represent 100  $\mu$ m.

(C) Number of CYCB1;2:Dbox-GUS-expressing cells in root meristems of 5-day-old seedlings, as in (B). Different letters denote significant differences (p < 0.05) using one-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons. 10  $\leq$  n  $\leq$  21 roots were analyzed for each boxplot.

(D) Length of differentiated cortical cells of 7-dayold wild-type (Ler) and global DELLA mutant seedlings grown without nitrate (0 mM) or with 0.5 or 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Different letters denote significant differences (p < 0.05) using two-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons. 51  $\leq$  n  $\leq$ 66 differentiated cortical cells were analyzed for each boxplot. Similar results were obtained in independent experiments.

root meristem of wild-type seedlings grown on  $10 \text{ mM NO}_3^-$  was significantly increased compared to those grown on 0.5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, the *global-DELLA* mutant root meristem was less sensitive to the effect of nitrate (Figure 2A).

To corroborate this finding, we also analyzed the activity of the mitotic CYCLIN B1;2-GUS reporter in wild-type and *gai-t6 rga-24* double mutant (a mutant lacking the two main DELLAs restraining growth).<sup>40</sup> We observed that the number of dividing cells significantly decreased in the RAM of wild-type seedlings grown in nitrate-deficient condition compared with those grown on 10 mM  $NO_3^-$  (Figures 2B and 2C). In contrast, the number of dividing cells in the *gai-t6 rga-24* RAM was less affected by the reduction in nitrate availability. Taken together, these results indicate that DELLAs contribute to the nitrate-induced cell division activity.

Because root growth is the result of both cell division and cell expansion, we next asked whether nitrate and DELLAs jointly regulate root cell elongation. To this end, we measured the length of differentiated cortical cells in the root differentiation zone of 7-day-old wild-type and *global-DELLA* mutant seedlings grown on low (0.5 mM) and adequate (10 mM)  $NO_3^-$  conditions. We found that nitrate increased the length of the cells at a similar level in wild-type and *global-DELLA* mutant seedling roots

(Figure 2D). Thus, despite reports that GA/DELLA regulates cell elongation in root, <sup>38</sup> adequate nitrate supply (10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) enhances cell expansion in a DELLA-independent fashion.

# Low nitrate availability enhances DELLA protein accumulation

In a subsequent experiment, we investigated whether the nitrateregulated growth processes are associated with DELLA protein accumulation. To this end, we used RGApro:GFP-RGA transgenic seedlings expressing a functional GFP-RGA protein visible in nucleus of root cells.<sup>41</sup> We found a significant decrease of the GFP-RGA signal in the RAM of seedlings grown on 1 and 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> compared to those grown on low-nitrate conditions (Figure 3A). By contrast, GFP-RGA signal was increased in RAM of seedlings grown on Gln or ammonium chloride (NH<sub>4</sub>Cl), two alternative N sources, thus confirming that this response is specific to nitrate (Figure S1). Remarkably, consistent with the above growth phenotypes, we also observed an increase in GFP-RGA signal in seedling roots grown on high nitrate conditions (50 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; Figure 3A). Then, we investigated the effect of nitrate supply on GFP-RGA protein accumulation in seedling roots and shoots. Accordingly, we found that nitrate substantially decreases the accumulation levels

## **Current Biology**

Article



## CellPress

# Figure 3. NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-regulated growth processes are associated with DELLA accumulation

(A) GFP fluorescence in root meristem of 7-day-old  $RGA_{pro}$ :*GFP-RGA* seedlings grown on media containing increasing concentration of nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), as indicated. All images were obtained with the same parameters. Gln, glutamine. Scale bars represent 100 µm. More representative images are provided (Figure S1).

(B and C) Immunodetection of GFP-RGA (with an antibody to GFP) in roots (B) and shoots (C) of 7day-old  $RGA_{pro}$ :GFP-RGA seedlings grown on media containing increasing concentration of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, such as in (A). PSTAIR serves as sample loading control. Numbers represent the fold increase in GFP-RGA protein levels relative to PSTAIR levels. Replicate gels are provided (Figures S2A and S2B).

(D–G) Immunodetection of RGA (with an antibody to RGA) in shoots (D and E) and roots (F and G) of 7day-old wild-type (Ler) seedlings transferred from nitrate-deficient conditions to 10 mM  $NO_3^-$  (D and F) or inversely (E and G), for the time indicated. Numbers represent the fold increase in RGA protein levels relative to blue-stained protein signal. Replicate gels are provided (Figures S2C–S2F).

nitrate-deficiency-induced DELLA accumulation was attributable to a decrease in GA biosynthesis. To this end, we determined the endogenous GA contents in 7-day-old wild-type seedlings grown on low (0.5 mM) and adequate (10 mM) nitrate conditions, and 48 h after a transfer from 0.5 to 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. The levels of the major biologically active GA in *Arabidopsis*, GA<sub>4</sub>, as well as intermediate GAs (GA<sub>12</sub> and GA<sub>24</sub>) were significantly increased in seedlings grown with 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> compared with those of seedlings grown on low ni-

of GFP-RGA protein in both roots and shoots, but their sensitivity to nitrate was different. Indeed, while 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> was sufficient to trigger a significant reduction in GFP-RGA level in roots, 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> was required to induce the same response in shoots (Figures 3B, 3C, S2A, and S2B). Finally, to further substantiate the effect of nitrate on DELLA protein abundance, we determined the accumulation levels of endogenous RGA protein in shoots and roots of seedlings transferred from nitrate deficiency to adequate nitrate conditions (10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), and inversely. Time course analysis in seedling shoots revealed that nitrate supply decreases RGA protein abundance and nitrate deficiency increases RGA accumulation within 48 h (Figures 3D, 3E, S2C, and S2D). A similar response was also observed in seedling roots, although the difference was less pronounced (Figures 3F, 3G, S2E, and S2F).

## Nitrate enhances GA synthesis

An increase in the amount of GA induces a reduction in DELLA abundance, which in turn activates plant growth.<sup>41</sup> Moreover, GA metabolism is influenced by various environmental signals including nutrient availability.<sup>23,26,27</sup> We next examined whether

trate (Figures 4A and 4B). Remarkably, the contents in GA<sub>34</sub> (the inactive 2 $\beta$ -hydroxylated product of GA<sub>4</sub>) were also increased in seedlings transferred to 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figure 4B). This last result emphasizes that the increase in GA<sub>4</sub> level is not the consequence of a reduction in the activity of the GA 2-oxidases, which catalyze the conversion of GA<sub>4</sub> into GA<sub>34</sub>.<sup>42</sup>

Subsequently, we investigated whether this increase in GA contents correlated with changes in the expression of GA biosynthetic genes. Surprisingly, most of GA biosynthetic genes did not show any obvious expression trend in response to a transfer from nitrate deficiency to adequate nitrate conditions, except a downregulation for some of the genes, 48 h after the transfer to 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figure S3). However and consistent with the nitrate-induced accumulation of GA<sub>4</sub> and GA<sub>34</sub>, we found that expression of *GA30x1* (which catalyzes the conversion of GA<sub>9</sub> into GA<sub>4</sub>) and *GA20x2* is substantially upregulated by nitrate supply (Figures 4C and S3). When examining the expression of GA signaling genes, such as those encoding the DELLAs and GA receptors GID1, most of them did not react in response to nitrate supply, apart from a downregulation trend

## CellPress



#### Figure 4. Nitrate promotes GA synthesis

(A) Simplified GA biosynthetic pathway. Biosynthetic enzymes are highlighted in red. GGDP, geranyl geranyl diphosphate; CDP, *ent*-copalyl diphosphate; CPS, *ent*-copalyl diphosphate synthase; KS, *ent*-kaurene synthase; KO, *ent*-kaurene oxidase; KAO, *ent*-kaurenoic acid oxidase.

(B) Concentration of GAs (pg g<sup>-1</sup> dry weight) in 7-day-old wild-type (Ler) seedlings grown on 0.5 or 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, or 2 days after a transfer from 0.5 to 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Endogenous GA<sub>9</sub> was analyzed but not detected. The values are means  $\pm$  SD of four biological replicates. Asterisks indicate significant differences (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01) for 10 mM versus 0.5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> growth conditions by Student's t test.

(C) Time course of GA3ox1 transcript accumulation in 7-day-old wild-type (Col-0) seedlings that have been transferred from 0 to 10 mM  $NO_3^-$  for the time indicated. Data are means ± SD of three biological replicates, and different letters denote significant differences (p < 0.05) using one-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons. Expression levels of related GA metabolism and signaling genes are provided (Figure S3).

48 h after transfer, similar to most of GA metabolism genes (Figure S3).

# DELLA abundance is regulated by nitrate-dependent signaling

To test how nitrate controls the GA-DELLA pathway, we first examined the effects of nitrate on RGA protein accumulation in a nitrate reductase (NR)-null mutant (*nia1 nia2*).<sup>5</sup> We found that nitrate decreases substantially the abundance of RGA protein in both wild-type and *nia1 nia2* mutant shoots (Figures 5A and S4A). Thus, DELLA accumulation is regulated by nitrate signaling, independent of nitrate reduction and therefore the N status of the plant. In a subsequent experiment, we analyzed the accumulation of RGA protein in *nrt2.1 nrt2.2 (nrt2.1-2)*, which

## Current Biology Article

is mutated in two linked genes responsible for high-affinity nitrate uptake in *Arabidopsis* roots.<sup>43</sup> As previously reported, the *nrt2.1-2* double mutant displayed a reduction in shoot biomass compared with the wild type, caused by a decrease of nitrate uptake (Figures S4B and S4C). As expected, RGA accumulated to higher levels in *nrt2.1-2* mutant rosettes of 4-week-old plants grown on both low (0.5 mM) and non-limiting (10 mM) nitrate supply, compared with the wild type (Figures 5B and S4D).

Key components of the nitrate-signaling pathway are the NLP6 and NLP7 transcription factors, which control the expression of a large number of early nitrate response genes.<sup>10,14–16</sup> To examine the involvement of the NLP in the nitrate-regulated GA-DELLA pathway, we initially took advantage of previously reported genome-wide analyses performed on wild-type and nlp7 mutant during a short-term nitrate resupply kinetics.<sup>10,15</sup> Remarkably, these analyses revealed that even though NLP7 does not bind the genomic region of GA3ox1 in chromatin immunoprecipitation assay, GA3ox1 is among the list of NLP7-dependent nitrate-inducible genes.<sup>10,15</sup> In agreement with these findings, we confirmed that nitrate-NLP7 pathway regulates the expression of GA3ox1 (Figure 5C). Whereas the expression of GA3ox1 was upregulated in wild-type seedlings upon nitrate supply, its expression was only transiently induced in nlp7 mutant. Consistent with this expression pattern, nitrate supply increased the contents of bioactive GA<sub>4</sub> (product of GA3ox activity) in wild-type seedlings, but not in *nlp7* mutant (Figure 5D). By contrast, nitrate supply increased the levels of GA12 and GA24 in both wild-type and nlp7 mutant, suggesting that nitrate regulates the early GA biosynthetic steps in an NLP7-independent manner (Figure 5D). Finally, we analyzed the accumulation levels of RGA in wild-type and nlp7 mutant seedlings in a time course analysis after a transfer from nitrate deficiency to adequate nitrate conditions. While nitrate supply triggered a reduction of RGA accumulation in the wild type 48 h after transfer, the amount of RGA was relatively stable in nlp7 mutant, in accordance with the levels of GA3ox1 transcripts and GA<sub>4</sub> contents detected in wild-type and nlp7 mutant (Figures 5E and S4E). Overall, these results indicate that nitrate-NLP7 signaling decreases DELLA accumulation through the activation of GA4 synthesis (via upregulation of GA3ox1 gene expression).

# Effect of nitrate on GA metabolism and growth processes in wheat

To examine whether the role of the GA-DELLA pathway in nitrate-mediated growth processes is conserved in diverse angiosperms, we analyzed the effect of nitrate (used as the only N source) on the growth of wheat seedlings (cv. Cadenza) that have altered GA signaling. We compared wild-type (Rht-1 tall) against Rht-D1b (semi-dwarf) and Rht-B1c (severe-dwarf) gain-of-function mutants that express constitutively active DELLA (Rht-1) proteins conferring GA-insensitive dwarfism.<sup>20,44</sup> For this experiment, wild-type, Rht-D1b, and Rht-B1c mutants were grown on a perlite vermiculite soil supplemented 3 times per week with the Letcombe nutrient solution containing nitrate (+N; 1.5 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 5 mM KNO<sub>3</sub>, and 2 mM NaNO<sub>3</sub>) or without N (-N; 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl, 2 mM NaCl), and the length of the primary leaf sheath was measured. As previously reported with other semi-dwarf Rht-1 mutant alleles,<sup>17,18</sup> the Rht-D1b and Rht-B1c mutant wheat was relatively insensitive to nitrate

**Article** 

**Current Biology** 



### Figure 5. DELLA accumulation is regulated by NO3<sup>-</sup>-dependent signaling pathway

(A) Immunodetection of RGA in shoots of 7-day-old wild-type (Col-0) and *nia1 nia2* mutant seedlings transferred from nitrate-deficient conditions (0 mM) to 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> for the time indicated. Replicate gels are provided (Figure S4A).

(B) Immunodetection of RGA in 4-week-old wild-type (Col-0) and *nrt2.1-2* double-mutant plants grown on 0.5 or 5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Replicate gels are provided (Figure S4D).

(C) Relative GA3ox1 expression in 7-day-old wild-type (Col-0) and n/p7-1 mutant seedlings that have been transferred from nitrate-deficient conditions (0 mM) to 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> for 24 or 48 h. Asterisks indicate significant differences (\*p < 0.05) for Col-0 versus n/p7-1 by Student's t test.

(D) GA contents (ng  $g^{-1}$  dry weight) in 7-day-old wild-type (Col-0) and *nlp7-1* mutant seedlings grown on 0 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> or 2 days after a transfer from 0 to 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Different letters denote significant differences (p < 0.05) using two-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons.

(E) RGA protein accumulation in wild-type (Col-0) and *nlp7-1* mutant seedlings transferred from nitrate-deficient conditions (0 mM) to 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> for 24 or 48 h. Numbers represent the fold increase in RGA protein levels relative to blue-stained protein signal. Replicate gels are provided (Figure S4E).

supply. Whereas the length of the primary leaf sheath was substantially longer in 3-week-old wild-type plants grown with nitrate (compared with those grown without N), nitrate supply had, respectively, little or no effect on the primary leaf sheath length of *Rht-D1b* and *Rht-B1c* mutants (Figures 6A and 6B). Thus, nitrate enhances wheat growth in part via a DELLA-dependent mechanism. As a next step, we determined the contents of GA in the first internode of 3-week-old wild-type plants grown with  $NO_3^-$  or without N. In wheat, the 13-hydroxylation pathway leading to active GA<sub>1</sub> is the main GA biosynthetic route<sup>36</sup> (Figure 4A). We found that nitrate supply increases the levels of bioactive GA<sub>1</sub>, GA intermediates (GA<sub>53</sub>, GA<sub>44</sub>, and GA<sub>19</sub>), and inactivation product GA<sub>8</sub> (Figure 6C).

CellPress



Current Biology Article



## Figure 6. Effects of nitrate on GA metabolism and growth in wheat

(A) Leaf sheath length (mean  $\pm$  SD of three biological replicates) of 3-week-old wild-type (cv. Cadenza), *Rht-D1b*, and *Rht-B1c* mutant wheat grown on perite verniculite soil supplemented 3 times per week with a nutritive solution without nitrogen (–N) or containing NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (+N). Different letters denote significant differences (p < 0.05) using two-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons.  $15 \le n \le 20$  plants were analyzed for each biological replicate. (B) Representative 3-week-old wild-type (cv. Cadenza), *Rht-D1b*, and *Rht-B1c* mutant wheat grown as in (A). The arrows indicate the length of the first leaf sheath. Scale bars represent 1 cm.

(C) Concentration of GAs (ng g<sup>-1</sup> dry weight) in the first internode of 3-week-old wild-type (cv. Cadenza) wheat grown as in (A). The values are means ± SD of three biological replicates. Asterisks indicate significant differences (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01) for +N versus –N by Student's t test.

(D-F) Effect of nitrogen withdrawal on internode elongation and GA contents in wheat.

(D) Sections of elongated stem at anthesis. P-1, second internode; P-2, third internode; P-3, P-4, further internodes.

(E) Internode length (mean  $\pm$  SE; n = 15) of 7-week-old wild-type wheat (cv. Cadenza) growing on different nitrogen (N) status. Plants were grown on sand perlite soil supplemented three times in the first week with a nutritive solution containing NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (+N). The plants were then divided into six treatment groups for which N

We also investigated the effect of nitrate on growth and GA synthesis at a later stage, in 7-week-old wheat cv. Cadenza (Rht-1 tall). In this experiment, the plants were grown with nitrate, and then N was sequentially withdrawn week after week, over a timescale of 6 weeks until booting stage. Noteworthy, main tillers were removed from all plants as they appeared, to avoid N resources being redistributed between tillers. In this growth context, we found that the peduncle and first two internodes were gradually shorter as time with N decreases (Figures 6D and 6E). By contrast, there was no significant difference in the lengths of the third and fourth internode across treatment groups when compared to control (Figure 6E). Consistent with these physiological traits, we found that N withdrawal had a gradual effect on endogenous GA contents in the first internode at booting stage. All GA quantified displayed a steady gradual increase with increasing length of time that the plants were supplied with nitrate (Figure 6F). Thus, altogether, and as previously shown with Arabidopsis, these results demonstrate that nitrate enhances wheat growth in part through activation of GA pathway.

## DISCUSSION

Plants are sessile organisms that must perpetually adapt their growth and development to fluctuating nitrate concentrations in the soil. It is now established that GA signaling plays a critical role in modulating plant growth in response to environmental changes including nutrient availability.<sup>22–26</sup> While semi-dwarfing genes that interfere with the action or production of GA contributed to substantial yield increases during the green revolution because they prevent excessive stem elongation in response to high nitrogen fertilizer regimes,<sup>17</sup> the role of GA signaling in adapting plant growth to nitrate availability remained unclear. The experiments described here investigate the connections between the GA pathway and the nitrate-dependent signaling pathway.

Plant root development is strongly influenced by nitrate concentrations in the soil. Whereas limited nitrogen provisions inhibit the primary root length, excess supply of nitrate also leads to a repression of root elongation.<sup>32,45</sup> Remarkably, we observed that low (0.5 mM NO3<sup>-</sup>) and high (50 mM NO3<sup>-</sup>) nitrate provisions promoted the accumulation of RGA in roots and that the growth of global-DELLA mutant roots was less affected by these extreme nitrate concentrations than those of wild-type seedlings. Furthermore, the abundance of RGA in wild-type roots and the difference in root growth between wild-type and global-DELLA mutant seedlings decreased progressively with increase in nitrate supply, from low (0.5 mM NO3-) to adequate (10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) concentrations. Thus, low (and high) nitrate conditions repress root growth in part via a DELLAdependent pathway. Consistent with our findings, a previous work has reported a similar effect of high nitrate supply on plant growth and GFP-RGA accumulation in RGApro:GFP-RGA seedlings roots, except that the range of  $\mathrm{NO}_3^-$  concentrations used by the authors was 10-fold less than in our growth conditions.<sup>46</sup>



This difference in effective  $\mathrm{NO_3^-}$  levels could be attributed to the composition of the N-free medium, which is different between the two works. Interestingly, we also found that seedling shoots had a similar response to roots in terms of RGA accumulation, even though the shoots tend to be less sensitive to nitrate than roots. Consistent with this observation, global gene-expression analyses revealed that, while roots treated with low nitrate have a much wider response than shoots in term of the number of genes altered, the shoots can be as responsive as roots to adequate nitrate concentrations.<sup>5,47</sup> Thus, it is likely that in our growth conditions, 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> supply is the minimal concentration to trigger a decrease in RGA abundance in seedling roots, while 10 mM NO3- is required to observe the same phenomenon in shoots. Moreover, the kinetics of DELLA disappearance in response to a transfer from nitrate deficiency to adequate nitrate conditions (and reciprocally) is similar in both roots and shoots and is visible within a few days after transfer.

Our results also demonstrate that nitrate promotes stem elongation and shoot branching in Arabidopsis and leaf sheath elongation in wheat in part through a DELLA-dependent mechanism. Thus, nitrate-mediated regulation of DELLA accumulation is a general mechanism that is conserved among flowering plants and throughout plant development. Consistent with this finding, we found that nitrate enhances the accumulation of bioactive GAs in both Arabidopsis and wheat. At this stage, it remains unclear whether nitrate enhances the accumulation of bioactive GA<sub>1</sub> in wheat through the NLP-dependent signaling pathway, such as in Arabidopsis. Interestingly, not only the bioactive GAs increased in response to nitrate supply but also GA12 and GA53 in Arabidopsis and wheat, respectively, and later intermediate GAs. This implies increased activity of the earlier part of the GA biosynthetic pathway and enhanced metabolic flux through the pathway (Figure 4A). Overexpression of ent-copalyl diphosphate synthase (CPS) and ent-kaurene synthase (KS) in Arabidopsis massively increases the supply of GA12, but this has almost no effect on the levels of bioactive GAs.<sup>48</sup> Thus, although it is likely that nitrate regulates the GA pathway at multiple levels, it enhances the production of bioactive GAs via its effect on the final steps of GA biosynthesis. It is worth noting that, while our results in Arabidopsis indicate that nitrate induces the expression of GA3ox1, we cannot exclude the possibility of post-translational regulation of GA biosynthetic enzymes (e.g., protein turnover) and allosteric control of enzyme activity, two important mechanisms largely understudied. 49,50 Moreover, it is important to emphasize that various other hormones, including cytokinins, also act as second messengers in response to nitrate, adapting plant growth to fluctuating environments.<sup>30,31</sup>

Previous works revealed that bioactive GAs promote root growth through cell division and expansion by stimulating the degradation of DELLAs in endodermal cells of the RAM and root elongation zone, respectively.<sup>38-40</sup> In elongating roots, bioactive GAs are translocated in the endodermis by the

was sequentially withdrawn from the watering solution week by week, as indicated. Asterisks indicate significant difference (p < 0.05) for comparisons within internodes for treatments 1–5 weeks with N compared to control, according to two-way ANOVA followed by least significant difference (LSD) test. (F) Concentration of GAs (ng g<sup>-1</sup> dry weight) in peduncle and peduncle nodes of 7-week-old wild-type wheat grown on different N status, as in (A). Asterisks indicate significant difference (p < 0.05) for comparisons within treatments (1–5 weeks with N compared to control) for each GA, according to residual maximum likelihood (REML) followed by LSD test.



GA transporter NITRATE TRANSPORTER1/PEPTIDE TRANS-PORTER FAMILY 3 (NPF3) localized in the plasma membrane of endodermal cells.<sup>51,52</sup> We also observed that adequate nitrate supply enhances primary root growth by activating both cell proliferation and elongation. However, unexpectedly, whereas nitrate increased the number of cortical cells in root meristem via a DELLA-dependent mechanism, it increased cell elongation in a DELLA-independent manner. DELLAs restrain cell-cycle activity by enhancing the expression of cell-cycle inhibitors.<sup>40</sup> Accordingly, we found that mitotic activity (monitored with the CYCB1;2:Dbox-GUS reporter) was less reduced in the RAM of the DELLA loss-of-function gai-t6 rga-24 mutant grown on lownitrate conditions than those of the wild type. By contrast, low nitrate restrained cell length of both wild-type and global-DELLA mutant seedling roots. Thus, it is likely that nitrate induction of cell size is driven by other hormonal pathways.<sup>31</sup> Of note, it has recently been reported that nitrate promotes cell size by increasing ploidy level.56

It is now well established that the nitrate-signaling pathway activates plant growth by controlling the hormonal status of the plant.<sup>30,31</sup> Reciprocally, hormone-signaling pathways regulate nitrate acquisition and assimilation, constituting a retro-control of growth on N provision. A recent report revealed that *Rht-1* dwarfing genes restrain nitrate uptake and assimilation by interacting with and inhibiting the activity of GRF4, a transcription factor that positively regulates N metabolism.<sup>29</sup> We propose that GA-nitrate interplay provides a highly regulated mechanism permitting flexible and appropriate growth in response to N availability.

## **STAR**\*METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESOURCE AVAILABILITY
  - Lead contact
  - Materials availability
  - Data and code availability
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
- METHOD DETAILS
  - O Plant material and growth conditions
  - Immunoblot analyses
  - Gene expression analyses
  - Observation of GFP fluorescence
  - GUS analyses
  - Root length, root meristem size and cell length analyses
  - O GA determinations
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS
  - Root measurements
  - Statistical tests

### SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at https://doi.org/10.1016/j. cub.2021.09.024.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Tp. Sun for providing seeds of  $RGA_{pro}$ :*GFP-RGA*, J. Leon for *nia1 nia2* mutant, A. Krapp for *nlp7.1* mutant, and the NASC for the *CYCB1;2<sub>pro</sub>*: *Dbox-GUS* and *nrt2.1-2* mutant. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and the French Ministry of Research and Higher Education. B.G. was supported by a studentship from the Lawes Agricultural Trust. A.L.P. and S.G.T. were supported by Institute Strategic Programme grant BBS/E/C/00010220 from the Biotechnology and Biological Sciences Research Council of the UK. P.H. was supported by The Czech Science Foundation (grant nos. 18-10349S and 20-17984S) and the European Regional Developmental Fund Project "Centre for Experimental Plant Biology" no. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000738.

### **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

All the experimental work, except GA quantifications and Figures 6E and 6F, was performed by L.C., L.J., L.S.-A., J.-M.D., and P.A. GA quantifications were performed by B.G., E.C., S.G.T., P.H., and A.L.P. Experimental work shown in Figures 6E and 6F was performed by B.G., S.G.T., P.H., and A.L.P. L.C., L.J., M.S.-J., P.A., J.-M.D., L.S.-A., B.G., S.G.T., P.H., G.K., S.R., and A.L.P. designed the experiments and analyzed the results. P.A., L.C., J.-M.D., G.K., S.R., S.G.T., P.H., and A.L.P. wrote the paper.

### **DECLARATION OF INTERESTS**

The authors declare no competing interests.

Received: October 15, 2020 Revised: August 13, 2021 Accepted: September 8, 2021 Published: October 5, 2021

#### REFERENCES

- O'Brien, J.A., Vega, A., Bouguyon, E., Krouk, G., Gojon, A., Coruzzi, G., and Gutiérrez, R.A. (2016). Nitrate transport, sensing, and responses in plants. Mol. Plant 9, 837–856.
- Fredes, I., Moreno, S., Díaz, F.P., and Gutiérrez, R.A. (2019). Nitrate signaling and the control of Arabidopsis growth and development. Curr. Opin. Plant Biol. 47, 112–118.
- Jia, Z., and von Wirén, N. (2020). Signaling pathways underlying nitrogendependent changes in root system architecture: from model to crop species. J. Exp. Bot. 71, 4393–4404.
- Dechorgnat, J., Nguyen, C.T., Armengaud, P., Jossier, M., Diatloff, E., Filleur, S., and Daniel-Vedele, F. (2011). From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. J. Exp. Bot. 62, 1349–1359.
- Wang, R., Tischner, R., Gutiérrez, R.A., Hoffman, M., Xing, X., Chen, M., Coruzzi, G., and Crawford, N.M. (2004). Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of Arabidopsis. Plant Physiol. *136*, 2512–2522.
- Medici, A., and Krouk, G. (2014). The primary nitrate response: a multifaceted signalling pathway. J. Exp. Bot. 65, 5567–5576.
- Wang, Y.-Y., Cheng, Y.-H., Chen, K.-E., and Tsay, Y.-F. (2018). Nitrate transport, signaling, and use efficiency. Annu. Rev. Plant Biol. 69, 85–122.
- 8. Hu, H.C., Wang, Y.Y., and Tsay, Y.F. (2009). AtCIPK8, a CBL-interacting protein kinase, regulates the low-affinity phase of the primary nitrate response. Plant J. 57, 264–278.
- Canales, J., Moyano, T.C., Villarroel, E., and Gutiérrez, R.A. (2014). Systems analysis of transcriptome data provides new hypotheses about Arabidopsis root response to nitrate treatments. Front. Plant Sci. 5, 22.
- Marchive, C., Roudier, F., Castaings, L., Bréhaut, V., Blondet, E., Colot, V., Meyer, C., and Krapp, A. (2013). Nuclear retention of the transcription factor NLP7 orchestrates the early response to nitrate in plants. Nat. Commun. 4, 1713.

# **Current Biology**

Article

- Brooks, M.D., Cirrone, J., Pasquino, A.V., Alvarez, J.M., Swift, J., Mittal, S., Juang, C.L., Varala, K., Gutiérrez, R.A., Krouk, G., et al. (2019). Network Walking charts transcriptional dynamics of nitrogen signaling by integrating validated and predicted genome-wide interactions. Nat. Commun. 10, 1569.
- Vidal, E.A., Alvarez, J.M., Araus, V., Riveras, E., Brooks, M.D., Krouk, G., Ruffel, S., Lejay, L., Crawford, N.M., Coruzzi, G.M., and Gutiérrez, R.A. (2020). Nitrate in 2020: thirty years from transport to signaling networks. Plant Cell *32*, 2094–2119.
- Riveras, E., Alvarez, J.M., Vidal, E.A., Oses, C., Vega, A., and Gutiérrez, R.A. (2015). The calcium ion is a second messenger in the nitrate signaling pathway of Arabidopsis. Plant Physiol. *169*, 1397–1404.
- Liu, K.H., Niu, Y., Konishi, M., Wu, Y., Du, H., Sun Chung, H., Li, L., Boudsocq, M., McCormack, M., Maekawa, S., et al. (2017). Discovery of nitrate-CPK-NLP signalling in central nutrient-growth networks. Nature 545, 311–316.
- 15. Alvarez, J.M., Schinke, A.L., Brooks, M.D., Pasquino, A., Leonelli, L., Varala, K., Safi, A., Krouk, G., Krapp, A., and Coruzzi, G.M. (2020). Transient genome-wide interactions of the master transcription factor NLP7 initiate a rapid nitrogen-response cascade. Nat. Commun. 11, 1157.
- Krouk, G. (2017). Nitrate signalling: calcium bridges the nitrate gap. Nat. Plants 3, 17095.
- 17. Hedden, P. (2003). The genes of the Green Revolution. Trends Genet. 19, 5–9.
- Thomas, S.G. (2017). Novel Rht-1 dwarfing genes: tools for wheat breeding and dissecting the function of DELLA proteins. J. Exp. Bot. 68, 354–358.
- Davière, J.-M., and Achard, P. (2013). Gibberellin signaling in plants. Development 140, 1147–1151.
- Peng, J., Richards, D.E., Hartley, N.M., Murphy, G.P., Devos, K.M., Flintham, J.E., Beales, J., Fish, L.J., Worland, A.J., Pelica, F., et al. (1999). 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. Nature 400, 256–261.
- Van De Velde, K., Ruelens, P., Geuten, K., Rohde, A., and Van Der Straeten, D. (2017). Exploiting DELLA signaling in cereals. Trends Plant Sci. 22, 880–893.
- Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van Der Straeten, D., Peng, J., and Harberd, N.P. (2006). Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. Science 311, 91–94.
- 23. Jiang, C., Gao, X., Liao, L., Harberd, N.P., and Fu, X. (2007). Phosphate starvation root architecture and anthocyanin accumulation responses are modulated by the gibberellin-DELLA signaling pathway in Arabidopsis. Plant Physiol. 145, 1460–1470.
- 24. de Lucas, M., Davière, J.M., Rodríguez-Falcón, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J.M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blázquez, M.A., Titarenko, E., and Prat, S. (2008). A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. Nature 451, 480–484.
- 25. Achard, P., Gong, F., Cheminant, S., Alioua, M., Hedden, P., and Genschik, P. (2008). The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. Plant Cell 20, 2117–2129.
- Wild, M., Davière, J.-M., Regnault, T., Sakvarelidze-Achard, L., Carrera, E., Lopez Diaz, I., Cayrel, A., Dubeaux, G., Vert, G., and Achard, P. (2016). Tissue-specific regulation of gibberellin signaling fine-tunes Arabidopsis iron-deficiency responses. Dev. Cell *37*, 190–200.
- Colebrook, E.H., Thomas, S.G., Phillips, A.L., and Hedden, P. (2014). The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. J. Exp. Biol. 217, 67–75.
- Li, S., Tian, Y., Wu, K., Ye, Y., Yu, J., Zhang, J., Liu, Q., Hu, M., Li, H., Tong, Y., et al. (2018). Modulating plant growth-metabolism coordination for sustainable agriculture. Nature 560, 595–600.
- Wu, K., Wang, S., Song, W., Zhang, J., Wang, Y., Liu, Q., Yu, J., Ye, Y., Li, S., Chen, J., et al. (2020). Enhanced sustainable green revolution yield via



nitrogen-responsive chromatin modulation in rice. Science 367, eeaz2046.

- Krouk, G., Ruffel, S., Gutiérrez, R.A., Gojon, A., Crawford, N.M., Coruzzi, G.M., and Lacombe, B. (2011). A framework integrating plant growth with hormones and nutrients. Trends Plant Sci. 16, 178–182.
- Krouk, G. (2016). Hormones and nitrate: a two-way connection. Plant Mol. Biol. 91, 599–606.
- 32. Araya, T., Kubo, T., von Wirén, N., and Takahashi, H. (2016). Statistical modeling of nitrogen-dependent modulation of root system architecture in Arabidopsis thaliana. J. Integr. Plant Biol. 58, 254–265.
- 33. de Jong, M., George, G., Ongaro, V., Williamson, L., Willetts, B., Ljung, K., McCulloch, H., and Leyser, O. (2014). Auxin and strigolactone signaling are required for modulation of Arabidopsis shoot branching by nitrogen supply. Plant Physiol. *166*, 384–395.
- 34. Xu, Y.L., Li, L., Wu, K., Peeters, A.J.M., Gage, D.A., and Zeevaart, J.A. (1995). The GA5 locus of Arabidopsis thaliana encodes a multifunctional gibberellin 20-oxidase: molecular cloning and functional expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 6640–6644.
- 35. Rieu, I., Ruiz-Rivero, O., Fernandez-Garcia, N., Griffiths, J., Powers, S.J., Gong, F., Linhartova, T., Eriksson, S., Nilsson, O., Thomas, S.G., et al. (2008). The gibberellin biosynthetic genes AtGA20ox1 and AtGA20ox2 act, partially redundantly, to promote growth and development throughout the Arabidopsis life cycle. Plant J. *53*, 488–504.
- Hedden, P., and Thomas, S.G. (2012). Gibberellin biosynthesis and its regulation. Biochem. J. 444, 11–25.
- Rameau, C., Bertheloot, J., Leduc, N., Andrieu, B., Foucher, F., and Sakr, S. (2015). Multiple pathways regulate shoot branching. Front. Plant Sci. 5, 741.
- 38. Ubeda-Tomás, S., Swarup, R., Coates, J., Swarup, K., Laplaze, L., Beemster, G.T.S., Hedden, P., Bhalerao, R., and Bennett, M.J. (2008). Root growth in Arabidopsis requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. Nat. Cell Biol. 10, 625–628.
- Ubeda-Tomás, S., Federici, F., Casimiro, I., Beemster, G.T.S., Bhalerao, R., Swarup, R., Doerner, P., Haseloff, J., and Bennett, M.J. (2009). Gibberellin signaling in the endodermis controls Arabidopsis root meristem size. Curr. Biol. 19, 1194–1199.
- Achard, P., Gusti, A., Cheminant, S., Alioua, M., Dhondt, S., Coppens, F., Beemster, G.T.S., and Genschik, P. (2009). Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in Arabidopsis. Curr. Biol. 19, 1188–1193.
- Silverstone, A.L., Jung, H.S., Dill, A., Kawaide, H., Kamiya, Y., and Sun, T.P. (2001). Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in Arabidopsis. Plant Cell *13*, 1555–1566.
- Rieu, I., Eriksson, S., Powers, S.J., Gong, F., Griffiths, J., Woolley, L., Benlloch, R., Nilsson, O., Thomas, S.G., Hedden, P., and Phillips, A.L. (2008). Genetic analysis reveals that C19-GA 2-oxidation is a major gibberellin inactivation pathway in Arabidopsis. Plant Cell 20, 2420–2436.
- Cerezo, M., Tillard, P., Filleur, S., Muños, S., Daniel-Vedele, F., and Gojon, A. (2001). Major alterations of the regulation of root NO(3)(-) uptake are associated with the mutation of Nrt2.1 and Nrt2.2 genes in Arabidopsis. Plant Physiol. *127*, 262–271.
- 44. Pearce, S., Saville, R., Vaughan, S.P., Chandler, P.M., Wilhelm, E.P., Sparks, C.A., Al-Kaff, N., Korolev, A., Boulton, M.I., Phillips, A.L., et al. (2011). Molecular characterization of Rht-1 dwarfing genes in hexaploid wheat. Plant Physiol. *157*, 1820–1831.
- 45. Giehl, R.F.H., and von Wirén, N. (2014). Root nutrient foraging. Plant Physiol. 166, 509–517.
- 46. Gras, D.E., Vidal, E.A., Undurraga, S.F., Riveras, E., Moreno, S., Dominguez-Figueroa, J., Alabadi, D., Blázquez, M.A., Medina, J., and Gutiérrez, R.A. (2018). SMZ/SNZ and gibberellin signaling are required for nitrate-elicited delay of flowering time in Arabidopsis thaliana. J. Exp. Bot. 69, 619–631.
- Wang, R., Guegler, K., LaBrie, S.T., and Crawford, N.M. (2000). Genomic analysis of a nutrient response in Arabidopsis reveals diverse expression





patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. Plant Cell *12*, 1491–1509.

- 48. Fleet, C.M., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kawaide, H., David, C.J., Kamiya, Y., and Sun, T.P. (2003). Overexpression of *AtCPS* and *AtKS* in Arabidopsis confers increased *ent*-kaurene production but no increase in bioactive gibberellins. Plant Physiol. *132*, 830–839.
- Lee, D.J., and Zeevaart, J.A.D. (2007). Regulation of gibberellin 20-oxidase1 expression in spinach by photoperiod. Planta 226, 35–44.
- 50. Takehara, S., Sakuraba, S., Mikami, B., Yoshida, H., Yoshimura, H., Itoh, A., Endo, M., Watanabe, N., Nagae, T., Matsuoka, M., and Ueguchi-Tanaka, M. (2020). A common allosteric mechanism regulates homeostatic inactivation of auxin and gibberellin. Nat. Commun. *11*, 2143.
- 51. Tal, I., Zhang, Y., Jørgensen, M.E., Pisanty, O., Barbosa, I.C.R., Zourelidou, M., Regnault, T., Crocoll, C., Olsen, C.E., Weinstain, R., et al. (2016). The Arabidopsis NPF3 protein is a GA transporter. Nat. Commun. 7, 11486.
- 52. David, L.C., Berquin, P., Kanno, Y., Seo, M., Daniel-Vedele, F., and Ferrario-Méry, S. (2016). N availability modulates the role of NPF3.1, a gibberellin transporter, in GA-mediated phenotypes in Arabidopsis. Planta 244, 1315–1328.

- Moreno, S., Canales, J., Hong, L., Robinson, D., Roeder, A.H.K., and Gutiérrez, R.A. (2020). Nitrate defines shoot size through compensatory roles for endoreplication and cell division in *Arabidopsis thaliana*. Curr. Biol. *30*, 1988–2000.e3.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat. Methods 9, 671–675.
- 55. Plackett, A.R.G., Powers, S.J., Fernandez-Garcia, N., Urbanova, T., Takebayashi, Y., Seo, M., Jikumaru, Y., Benlloch, R., Nilsson, O., Ruiz-Rivero, O., et al. (2012). Analysis of the developmental roles of the Arabidopsis gibberellin 20-oxidases demonstrates that GA20ox1, -2, and -3 are the dominant paralogs. Plant Cell 24, 941–960.
- 56. Griffiths, S., Simmonds, J., Leverington, M., Wang, Y., Fish, L., Sayers, L., Alibert, L., Orford, S., Wingen, L., Herry, L., et al. (2009). Meta-QTL analysis of the genetic control of ear emergence in elite European winter wheat germplasm. Theor. Appl. Genet. *119*, 383–395.
- Castillo, M.-C., Costa-Broseta, A., Gayubas, B., and Léon, J. (2021). NINlike protein7 and PROTEOLYSIS6 functional interaction enhances tolerance to sucrose, ABA, and submergence. Plant Physiol. Published online August 10, 2021. https://doi.org/10.1093/plphys/kiab382.



## **STAR**\***METHODS**

## **KEY RESOURCES TABLE**

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER		
Antibodies				
RGA	Agrisera	AS11 1630; RRID: AB_10749442		
GFP	Takara Bio	632380; RRID: AB_10013427		
PSTAIRE (Cdc2 p34)	Santa Cruz Biotechnology	Sc-53; RRID: AB_2074908		
peroxidase-conjugated	Thermo Fisher Scientific	G21234; RRID: AB_2536530		
goat anti-rabbit IgG				
peroxidase-conjugated	Thermo Fisher Scientific	G21040; RRID: AB_2536527		
goat anti-mouse igg		_		
Chemicals, peptides, and recombinant proteins				
Propidium iodide	Sigma Aldrich	Product No.P4170		
Cyber green	Roche	Cat. No. REF 04707516001		
Murashige-Skoog modified medium without nitrogen	bioWorld plant media	Ref 30630200		
NH4-succinate	ChemCruz	SC-493992		
Ultrapure agar	Merck	1.01613.1000		
Agar type A	Sigma Aldrich	A4550-500G		
Potassium nitrate	Sigma Aldrich	P8291-500G		
Letcombe modified nutrient solution	This paper	N/A		
5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D- glucuronide (X-Gluc)	Euromedex	Ref. EU0700-D		
Luminata Forte Western HRP substrate	Millipore	Cat N° WBLUF0100		
Clarity Max Western ECL substrate	Biorad	#1705062		
Potassium ferricyanide	Sigma Aldrich	60299-100G-F		
Potassium ferrocyanide	Sigma Aldrich	60279-250G		
RQ1 RNase-free DNase	Promega	M6101		
deoxynucleotide triphosphate (dNTP)	Promega	U1205		
Superscript III Reverse transcriptase	Invitrogen	Cat N° 18080093		
SYBR Green Master Mix	Roche	Cat N° 04707516001		
Critical commercial assays				
RNeasy Plant Mini Kit	QIAGEN	Cat. No. 74904		
Experimental models: Organisms/strains				
global-DELLA	26	N/A		
ga20ox1	35	N/A		
gai-t6 rga-24	40	N/A		
RGA <sub>pro</sub> :GFP-RGA	41	N/A		
CYCB1,2 <sub>pro</sub> :Dbox-GUS	NASC	N799897		
gai-t6 rga-24 CYCB1,2 <sub>pro</sub> :Dbox-GUS	This paper	Cross between CYCB1,2 <sub>pro</sub> :Dbox-GUS and gai-t6 rga-24		
nia1 nia2	NASC	N2356		
Rht-B1c	This paper and <sup>44</sup>	<i>Rht-B1c</i> allele was introduced from cultivar Mercia		
Rht-D1b	This paper and <sup>44</sup>	Rht-D1b was transferred from cultivar Avalon		
nrt2.1 nrt2.2	NASC	N859604		
nlp7.1	10	N/A		

(Continued on next page)



Continued		
REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Oligonucleotides		
Primers for qPCR, see Table S1	This paper	N/A
Software and algorithms		
ImageJ version 1.53a	54	https://imagej.nih.gov/
Lightcycler 480 software, Release 1.5.0 SP3	Roche	Cat. No. 04994884001
RStudio package Version v.1.2.1335	RStudio, PBC	https://github.com/rstudio/rstudio
GenStat statistical software, 14 <sup>th</sup> edition, 2011	VSN International Ltd., Hemel Hempstead, UK	https://www.vsni.co.uk/software/genstat

## **RESOURCE AVAILABILITY**

## Lead contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact Patrick Achard (Patrick.achard@ibmp-cnrs.unistra.fr).

## **Materials availability**

Transgenic plant seeds generated in this study are available from the Lead Contact on request.

## Data and code availability

- All data reported in this paper will be shared by the lead contact upon request.
- This paper does not report original code.
- Any additional information required to reanalyze the data reported in this paper is available from the lead contact upon request.

## **EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS**

Arabidopsis (Arabidopsis thaliana) lines were in the Columbia-0 (Col-0) and Landsberg *erecta* (Ler) backgrounds, and the wheat near isogenic lines were in the cultivar Cadenza, as detailed in the Key resources table. Arabidopsis and wheat were grown in controlled growth conditions, as described in Method details.

## **METHOD DETAILS**

### **Plant material and growth conditions**

Mutants and transgenic lines in *Arabidopsis* were derived from Landsberg *erecta* (global DELLA; ga20ox1 (formerly ga5); gai-t6 rga-24; RGA<sub>pro</sub>:GFP-RGA) or Columbia-0 (*nia1 nia2*; *nrt2.1-2*; *nlp7-1*; CYCB1,2<sub>pro</sub>:Dbox-GUS) ecotypes. To generate gai-t6 rga-24 CYCB1,2<sub>pro</sub>:Dbox-GUS, the CYCB1,2<sub>pro</sub>:Dbox-GUS (Col-0 ecotype) was crossed to gai-t6 rga-24 (Ler background) to obtain an F1 population. The F3 plant was selected and then backcrossed one time into CYCB1,2<sub>pro</sub>:Dbox-GUS Col-0 genetic background. Two independent gai-t6 rga-24 CYCB1,2<sub>pro</sub>:Dbox-GUS homozygous lines (#7 and #18) were used in the study. Wheat near isogenic lines (cv Cadenza) containing *Rht-D1b* and dwarf *Rht-B1c* alleles were used in this study. The *Rht-B1c* allele was introduced from cultivar Mercia.<sup>55</sup> The *Rht-D1b* allele was transferred from cultivar Avalon.<sup>56</sup> The alleles were selected from homozygous progenies after six backcrosses to cultivar Cadenza (which contains the wild-type *Rht-1* alleles: *Rht-A1a*, *Rht-B1a* and *Rht-D1a*) with recurrent selection for the dwarfing mutation.

*In vitro*, *Arabidopsis* plants were grown in growth chambers (SANYO, MLR-351H) on 1x Murashige-Skoog (MS) modified medium without nitrogen<sup>57</sup> (Ref 30630200; bioWORLD plant media) supplemented with an adequate KNO<sub>3</sub> concentration or 0.5 mM glutamine (as indicated in the figures), 0.5 mM NH<sub>4</sub>-succinate, 1% sucrose and 1% ultrapure agar (Merck) or 1% type A agar (Sigma) under long day photoperiod (16h light at 22°C / 8h dark at 22°C, irradiance conditions of ~70 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), except for the analysis of the expression of GA metabolism genes, for which the plants were grown in continuous light at 22°C. The seeds were surface sterilized in 70% ethanol for 10 min and stratified at 4°C for at least 2 days to synchronize germination before sowing. In soil, plants were grown in pots on a mix perlite/vermiculite (1/2 v/v) completed with 5% soil under long day photoperiod (16h light at 21°C / 8h dark at 18°C). The pots were watered once a week with 5 mL of 1x MS modified medium without N supplemented with KNO<sub>3</sub> as indicated (K<sup>+</sup> were adjusted with KCl).

Wheat *Rht-1* tall, *Rht-B1c* and *Rht-D1b* seeds were stratified at 4°C for four days and sown in pots containing a mix perlite/vermiculite (1/2 v/v) supplemented with 5% soil under long day photoperiod (16h light at 20°C / 8h dark at 15°C). The pots were watered



three times a week with 13 mL of 1x Letcombe modified nutrient solution without N (N-deficiency condition) or with nitrate (N+ condition; 1.5 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 5 mM KNO<sub>3</sub> and 2 mM NaNO<sub>3</sub>). The Letcombe micronutrients 1000x solution encompasses 160  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> 5 H<sub>2</sub>O, 160  $\mu$ M CuCl<sub>2</sub> 2 H<sub>2</sub>O, 9.2 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 3.6 mM MnCl<sub>2</sub> 4 H<sub>2</sub>O, 16  $\mu$ M Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2 H<sub>2</sub>O, 5 mM KCl and 770  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>. The 1x Letcombe modified solution (+N) is set up as following: 1.5 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 4 H<sub>2</sub>O, 5 mM KNO<sub>3</sub>, 2 mM NaNO<sub>3</sub>, 1mM MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25  $\mu$ M FeNaEDTA, and added with 1 mL/L of Letcombe micronutrients 1000x. Meanwhile, the 1x Letcombe modified solution (-N) is set up as following: 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl, 2 mM NaCl, 1mM MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25  $\mu$ M FeNaEDTA and completed with 1 mL/L of Letcombe micronutrients 1000x.

For N withdrawal experiment, the seeds were sown on sand/perlite pots and watered three times per week. The first week, all plants were watered with N+ solution, then with either N+ or N- solution. N was sequentially withdrawn week after week over a time-scale of 6 weeks until booting stage.

## **Immunoblot analyses**

Seedling roots or shoots were ground in 2x SDS-PAGE sample buffer followed by boiling for 5 min. After centrifugation, the protein extracts were fractionated on a 8% or 10% SDS-PAGE gel and blotted onto membrane. Immunoblots were performed using a 2000-fold dilution of anti-RGA (Agrisera) or anti-GFP (Takara Bio), and a 5000-fold dilution of peroxidase-conjugated goat anti-rabbit or mouse IgG (Thermo Fisher Scientific). Signals were detected with Fusion FX (Vilber) using the Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore) or Clarity Max Western ECL substrate (Biorad). The blot was subsequently probed with anti-cdc2 (PSTAIRE) anti-body (Santa Cruz Biotechnology) for loading control or stained with Coomassie blue. Quantification of the signals was performed using ImageJ package version 1.48v (https://imagej.nih.gov/ij/).<sup>54</sup>

## **Gene expression analyses**

Total RNA was extracted using RNeasy Plant mini kit (QIAGEN) according to manufacturer's instructions and quantified with a spectrophotometer NanoDrop 2000/200c (Thermo Scientific). 1  $\mu$ g of total RNA were treated first with 2 units of RQ1 RNase-free DNase (Promega) and then reverse transcribed in a total volume of 40  $\mu$ L with 2  $\mu$ M oligo(dT)<sub>20</sub>, 0.5 mM deoxynucleotide triphosphate (dNTP), 5 mM DTT, and 200 units of Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). qRT-PCR was performed using gene-specific primers (listed in Table S1) in a total volume of 10  $\mu$ L SYBR Green Master mix (Roche) on a Lightcycler LC480 apparatus (Roche) according to manufacturer's instructions. The PCR program was as following: an initial DNA denaturation at 95°C for 5 min; 45 cycles including a denaturation step at 95°C for 10 s, an annealing step at 60°C for 15 s and an extension step at 72°C for 15 s; and a melting curve from 55°C to 95°C. AT4G26410 gene was used as internal reference transcript.<sup>26</sup> The relative expression level of each gene was calculated using Lightcycler 480 software, release 1.5.0 SP3, and averaged over three biolog-ical replicates.

## **Observation of GFP fluorescence**

GFP-RGA fluorescence was determined on 7 day-old  $RGA_{pro}$ :GFP-RGA root tip, with a Zeiss LSM780 inverted confocal laser microscope with x20 objective. The GFP excitation and emission wavelengths were 488 nm and 499-553 nm, respectively. All images were obtained with the same modifications and intensity parameters. Root cell walls were stained with propidium iodide (10  $\mu$ g/mL, Sigma).

### **GUS** analyses

Histochemical detection of GUS activity was carried out on roots of 5-d-old *CYCB1.2<sub>pro</sub>:Dbox-GUS* and *gai-t6 rga-24 CYCB1.2<sub>pro</sub>: Dbox-GUS* seedlings grown in N-deficient or nitrate conditions as indicated. Plant material was infiltrated in GUS solution ( $250 \mu g/ml$  5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide (X-Gluc); 50 mM sodium phosphate pH 7; 1 mM potassium ferricyanide; 1 mM potassium ferrocyanide; 10 mM EDTA; 0.01% Triton X-100) for 15 min and incubated at  $37^{\circ}$ C overnight. Then, the GUS solution was replaced with 100% (v/v) ethanol during 6 h at room temperature and kept in 70% (v/v) ethanol at  $4^{\circ}$ C. For root observations, 70% (v/v) ethanol during 15 min at 57°C. Then, this solution was replaced by 7% NaOH in 60% ethanol during 15 min at 57°C. Then, this solution was replaced by 7% NaOH in 60% ethanol during 5 min each and kept in 5% ethanol 25% glycerol. Roots were observed in 50% glycerol using AxioImager Z1 (Zeiss) microscope.

### Root length, root meristem size and cell length analyses

Seeds of wild-type (Ler) and *global-DELLA* mutant were surface sterilized in 70% ethanol for 10 min and plated on 1x MS modified medium without nitrogen<sup>57</sup> (Ref 30630200; bioWORLD plant media) supplemented with nitrate at the concentration indicated, and placed at 4°C at least 2 days to synchronize germination. Plates were then placed vertically in a growth chamber (22°C; 16h photoperiod). As *global-DELLA* mutant seeds germinate earlier than wild-type, the plates containing wild-type seeds were disposed in the growth chamber 8h before those containing *global-DELLA* mutant seeds. Seeds that have germinated synchronously (protrusion of the radicle) were marked (the other seeds were discarded) and root length was measured 7 days post-germination (DPG). Meristem size was expressed as the number of cells in cortex files from the QC to the first elongated cell exhibiting vacuolization. Measurements were performed at 3, 5 and 7 DPG by microscopy (AxioImager Z1, Zeiss) on at least 50 roots for each genotype. Length of differentiated root cortical cells was measured with ImageJ software version 1.48v (https://imagej.nih.gov/ij/).<sup>54</sup>





## **GA** determinations

GA contents in *Arabidopsis* seedlings grown in liquid MS modified medium without nitrogen and supplemented with indicated nitrate concentrations (Figures 4B and 5D) and in the primary internode of 3-week-old wheat grown perlite/vermiculite supplemented with Letcombe modified nutrient solution (Figure 6C) were determined by ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UHPLC-MS) using a Q-Exactive spectrometer (Orbitrap detector; ThermoFisher Scientific). Dry grounded material was suspended in 80% methanol-1% acetic acid including  $17^{-2}H_2$ -labeled GA internal standards (Olchemim) and mixed by shaking during one hour at 4°C. The extract was kept at  $-20^{\circ}$ C overnight, centrifuged and the supernatant dried in a vacuum evaporator. The dry residue was dissolved in 1% acetic acid and passed through an Oasis HLB column. The dried eluate was dissolved in 5% acetonitrile-1% acetic acid, and the GAs were separated by UHPLC (Accucore RP-MS column 2.6  $\mu$ m, 50 × 2.1 mm; ThermoFisher Scientific) with a 5 to 50% acetonitrile gradient containing 0.05% acetic acid, at 400  $\mu$ L/min over 14 min. The concentrations of GAs in the extracts were analyzed by selected ion monitoring (SIM) using embedded calibration curves and the Xcalibur 2.2 SP1 build 48 and TraceFinder programs.

GA contents in peduncle and peduncle node of 7-week-old wheat grown on different N status (Figure 6F) were determined by gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring (SIM) of endogenous and 17-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>-labeled GA internal standards as described previously.<sup>55</sup>

## **QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS**

### **Root measurements**

Root length and length of differentiated root cortical cells were measured with ImageJ software version 1.48v (https://imagej.nih.gov/ij/<sup>54</sup>

## **Statistical tests**

All graphs, boxplots and histograms, as well as statistical analyses were generated with RStudio package v.1.2.1335 (https://www. rstudio.com/). Phenotypic characterization, quantitative PCR with reverse transcription in wheat and GA quantifications were analyzed using Student's t test (p < 0.01 or 0.05) or by analysis of variance (ANOVA). Tukey's Honest Significant Difference (HSD) was used to compare between genotypes and nitrogen conditions using a significance threshold of 5%. Statistical analyses of the Figures 6E and 6F were performed using the GenStat statistical software (14th edition, 2011, VSN International, Hemel Hempstead, UK).

A quantitative gibberellin signalling biosensor reveals a role for gibberellins in internode specification at the shoot apical meristem

Bihai Shi<sup>1,2\*</sup>, Amelia Felipo-Benavent<sup>3\*</sup>, Guillaume Cerutti<sup>2</sup>, Carlos Galvan-Ampudia<sup>2</sup>, Lucas Jilli<sup>3</sup>, Geraldine Brunoud<sup>2</sup>, Jérome Mutterer<sup>3</sup>, Elody Vallet<sup>3</sup>, Lali Sakvarelidze-Achard<sup>3</sup>, Jean-Michel Davière<sup>3</sup>, Alejandro Navarro-Galiano<sup>4</sup>, Ankit Walia<sup>5</sup>, Shani Lazary<sup>6</sup>, Jonathan Legrand<sup>2</sup>, Roy Weinstain<sup>6</sup>, Alexander M. Jones<sup>5</sup>, Salomé Prat<sup>4</sup>, Patrick Achard<sup>3†</sup>, Teva Vernoux<sup>2†</sup>

<sup>1</sup> College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, 510642, Guangzhou, China

<sup>2</sup> Laboratoire Reproduction et Développement des Plantes, Univ Lyon, ENS de Lyon, CNRS, INRAE, INRIA, F-69342, Lyon, France

<sup>3</sup> Institut de biologie moléculaire des plantes, CNRS, Université de Strasbourg, 67084 Strasbourg, France

<sup>4</sup> Centre for Research in Agricultural Genomics, 08193 Cerdanyola, Barcelona, Spain

<sup>5</sup> Sainsbury Laboratory, Cambridge University, Cambridge CB2 1LR, United Kingdom

<sup>6</sup> Department of Molecular Biology and Ecology of Plants, Tel Aviv University, Tel Aviv 69978, Israel

<sup>\*</sup>These authors contributed equally

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed: T.V. (teva.vernoux@ens-lyon.fr) or P.A. (patrick.achard@ibmp-cnrs.unistra.fr)

## Abstract

Growth at the shoot apical meristem (SAM) is essential for shoot architecture construction. The phytohormones gibberellins (GA) play a pivotal role in coordinating plant growth, but their role in the SAM remains mostly unknown. Here, we developed a ratiometric GA signalling biosensor by engineering one of the DELLA proteins, to suppress its master regulatory function in GA transcriptional responses while preserving its degradation upon GA sensing. We demonstrate that this novel degradation-based biosensor accurately reports on cellular changes in GA levels and perception during development. We used this biosensor to map GA signalling activity in the SAM. We show that high GA signalling is found primarily in cells located between organ primordia that are the precursors of internodes. By gain- and loss-of-function approaches, we further demonstrate that GAs regulate cell division plane orientation to establish the typical cellular organisation of internodes, thus contributing to internode specification in the SAM.



# Lucas JILLI

Caractérisation fonctionnelle du complexe DELLA-Zinc-Finger HomeoDomain dans la régulation du développement des plantes

Éc	ole	doctorale			
Sciences de la vie					
et de la <b>santé</b>   ED 414					
Université de Strasbourg					

## Résumé :

La voie de signalisation des phytohormones gibbérellines (GA) régule divers aspects de la croissance et du développement des plantes, à travers une multitude d'interactions entre les répresseurs nucléaires DELLA et des protéines régulatrices (DIP). Les GA promeuvent la croissance en stimulant la dégradation des répresseurs DELLA. A ce jour, plusieurs dizaines de protéines régulatrices pouvant interagir aux DELLA ont été identifiées, sans toutefois expliquer pleinement l'action pléiotropique des GA, notamment pour le développement des parties aériennes. Lors d'un crible en double-hybride en levure, visant à identifier de nouveaux DIP impliqués dans ces processus développementaux, le laboratoire a identifié le facteur de transcription HB30, appartenant à la famille des Zinc-Finger HomeoDomain (ZFHD). A l'aide d'approches génétiques et moléculaires, réalisées chez Arabidopsis, ce travail de thèse démontre que les ZFHD sont grandement impliqués dans la croissance et le développement des plantes. Nous mettons en évidence, à l'aide d'analyses phénotypiques réalisées chez des multiples mutants zfhd, que ces facteurs de transcription contrôlent, entre autres, l'élongation des entre-nœuds, régulant ainsi la hauteur des plantes et la position des branches latérales. Par ailleurs, nous montrons que les DELLA inhibent l'activité transcriptionnelle des ZFHD, en interagissant à leur homéodomaine (HD), inhibant ainsi, l'expression de gènes cibles impliqués notamment dans la synthèse et l'organisation de la paroi cellulaire. A travers cette étude, la caractérisation fonctionnelle du complexe transcriptionnel DELLA-ZFHD apporte des éléments nouveaux permettant de mieux appréhender l'action pléiotropique des GA sur le développement des plantes.

Mots clés : gibbérellines, signalisation, facteurs de transcription, croissance, développement, Arabidopsis

## Abstract:

Gibberellin (GA) signaling pathway regulates various aspects of plant growth and development through interactions between nuclear localized DELLA repressors and diverse classes of regulatory proteins (DIP). GA promotes growth by inducing the degradation of DELLA proteins by the proteasome pathway. To date, several tens of regulatory proteins interacting with DELLA have been identified, without clearly explaining the whole pleiotropic action of GA, especially for plant shoot development. With the aim of identifying new DIP involved in these developmental processes, the laboratory has performed a yeast two-hybrid screening with a DELLA protein as bait, and has identified the transcription factor HB30, belonging to the Zinc-Finger HomeoDomain (ZFHD) family. Using genetics and molecular approaches performed in Arabidopsis, this thesis work demonstrates that ZFHD are largely involved in plant growth and development. We highlight, with the help of phenotypic analyses performed on *zfhd* multiple mutants, that those transcription factors control, among other parameters, internode elongation and in turn plant height and the position of lateral branches. Furthermore, we show that DELLA proteins inhibit the ZFHD transcriptional activity by interacting with their homeodomain (HD), and as a consequence inhibit the expression of target genes mainly involved in cell-wall synthesis and organization. Through this study, the functional characterization of the DELLA-ZFHD transcriptional complex provides new elements to better understand the pleiotropic action of GA signaling on plant development.

Keywords: gibberellins, signalization, transcription factors, growth, development, Arabidopsis