



HAL
open science

Analyse fonctionnelle de la nouvelle famille de facteur de transcription GeBP/GPL dans le contrôle du développement d'*Arabidopsis thaliana*

Florian Chevalier

► To cite this version:

Florian Chevalier. Analyse fonctionnelle de la nouvelle famille de facteur de transcription GeBP/GPL dans le contrôle du développement d'*Arabidopsis thaliana*. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. NNT: . tel-00352018

HAL Id: tel-00352018

<https://theses.hal.science/tel-00352018>

Submitted on 12 Jan 2009

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

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



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1

Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant



THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : Biologie Cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

Florian CHEVALIER

Le Vendredi 31 Octobre 2008

Analyse fonctionnelle de la nouvelle famille de facteurs
de transcription GeBP/GPL dans le contrôle du
développement d'*Arabidopsis thaliana*

Thèse co-dirigée par

Mr HERZOG Michel et Mr PERAZZA Daniel

Composition du Jury

Mr FAURE Jean-Denis - INRA, Versailles	Président
Mr HERZOG Michel - Université Joseph Fourier	
Mme MONEGER Françoise – ENS, Lyon	Rapporteur
Mr PERAZZA Daniel - Université Joseph Fourier	
Mr ZHOU Dao-Xiu – Université Paris XI	Rapporteur

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Jean-Denis Faure d'avoir accepté de présider mon jury de thèse, ainsi que Madame Françoise Monéger et Monsieur Dao-Xiu Zhou d'avoir accepté d'être mes rapporteurs.

Je remercie chaleureusement tous les membres de mon équipe qui ont partagé avec moi l'aventure GeBP durant ces quatre années de thèse et qui ont largement contribué à l'avancement de ce sujet :

-Je commencerai par remercier les trois « Boss » qui m'ont co-encadré et m'ont apporté une formation scientifique de grande qualité au cours de ma thèse. Michel pour ses conseils et la confiance qu'il m'a accordée en me permettant d'intégrer son équipe. Daniel pour sa sympathie, sa disponibilité et son investissement dans mon encadrement (malgré les enseignements), et tout ce qu'il m'a enseigné sur le plan scientifique et pédagogique. Gilles pour sa gentillesse, sa patience devant mes innombrables questions (qui s'enchaînait parfois en relais avec celles d'autres étudiants), les techniques qu'il m'a apprises, et la rédaction de la publication. Je remercie également beaucoup ces trois personnes pour toute l'aide qu'elles m'ont apportée au cours de ces quatre années notamment lors de ma préparation pour la candidature au poste d'ATER et de la correction de ce présent manuscrit. Je pense être très chanceux d'avoir bénéficié d'un encadrement aussi riche.

-Cette thèse n'aurait pas été la même pour moi sans Fred, mon frère de paillasse. Je le remercie pour toute l'aide qu'il m'a apportée au cours de nombreuses « manipes » (merci également pour les corrections d'orthographe du manuscrit), et surtout pour son soutien moral sa camaraderie, les nombreuses parties de foot etc.... Je ne sais pas si je parviendrai à trouver un aussi bon compère dans mes futurs Jobs, mais je sais en tout cas qu'il me manquera beaucoup.

-Merci à Hanane qui s'est également révélée une excellente collègue thésarde. Nos longues discussions pseudo philosophiques sur le racisme et la religion et son humour me manqueront. Bon courage pour la fin de thèse.

-Je voudrais également remercier ceux qui sont partis : Julien, Nicole et Renaud pour leur sympathie et leur excellent accueil lors de mon arrivée au laboratoire, Patty et Gaëlle pour leur contribution sur le sujet et leur amitié lors de la première année. Je regrette que nous n'ayons pas pu travailler ensemble un peu plus longtemps (peut être dans le futur ?).

Un immense merci à tous les membres du laboratoire que j'ai pu croiser durant les 5 dernières années. Je remercie notamment l'ensemble des doctorants avec qui nous avons pu partager nos angoisses de jeunes chercheurs et nous remonter mutuellement le moral (oui ça fait un peu défaitiste dit comme ça, mais c'est vrai), mais aussi partager de franches rigolades. Merci en particulier à Yech'han et Emilie pour leurs conseils dans plusieurs expériences. Merci à Edouard pour l'initiation au cross golf et les soirées Pink + catch, et à Frank pour sa gentillesse, sa grande générosité, les gâteaux et les nombreuses bières ramenées d'Allemagne. Merci à Gabrielle pour mon « tutoring » de jeune enseignant moniteur. Spécial Thanks pour Anne-Marie (si je n'avais pas cité son nom, elle m'aurait décapité de toute façon), qui a été une vraie mère poule pour moi au labo et m'a fait profiter de nombreux conseils sur les techniques liées aux protéines.

Je n'oublie pas de remercier toute l'équipe « Microtubules du laboratoire PCV » (CEA Grenoble) pour le très bon accueil qu'ils m'ont réservé lors des quelques mois passés chez eux. Merci en particulier à François et Edwidge pour leur aide et leurs conseils dans la mise au point de la technique du SELEXE, et à Manu pour les services qu'il m'a rendu et sa sympathie. Merci à Marilyne Vantard de m'avoir permis d'effectuer cette collaboration.

Pour finir, je remercie ma famille pour m'avoir soutenu et encouragé tout au long de ces années (merci Pousch pour ton aide lors de la mise en page). Tout ceci serait vide de sens sans mes deux petites femmes Pousch et Morganouillou. Je leur dédie ce manuscrit.

La recherche est un processus sans fin dont on ne peut jamais dire comment il évoluera. L'imprévisible est dans la nature même de la science.

François Jacob

La phrase la plus excitante à entendre en science, celle qui annonce de nouvelles découvertes, n'est pas «Eureka», mais plutôt «Tiens, c'est marrant...»

Isaac Asimov

La science est une chose merveilleuse... tant qu'il ne faut pas en vivre !

Albert Einstein

AD : domaine activateur du facteur GAL4
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ARN : acide ribonucléique
BA : 6-benzylaminopurine
BD : domaine de liaison à l'ADN du facteur GAL4
CK : cytokinines
C-ter ou C-terminal : partie carboxy-terminale d'une séquence peptidique
DAPI : 4', 6'-diamidino-2-phenylindole hydrochloride
DEPC : diéthylpyrocarbonate
dNTP : mélange équimolaire des quatre désoxyribonucléotides triphosphate dATP, dCTP, dGTP, et DTTP
DO : densité optique
DTT : dithiothreitol
EDTA : éthylène diamintetra-acetic acid
EMS : ethyl methanesulfonate
IPTG : isopropylthio- β -galactoside
GA : Gibbérellines
GFP : GREEN FLUORESCENT PROTEIN
HA : hemagglutinine
His : histidine
K : kinétine
LB : Luria Broth
MS : sels Murashige et Skoog
Ni-NTA : nickel-nitriotriacétique acid
N-ter ou N-terminal : partie amino-terminale d'une séquence peptidique
pb, kpb : paires de bases, kilo paires de bases
PBS : phosphate buffered saline
PCR : polymerase chain reaction
Poly(dI-dC) : mélange d'oligonucléotides formés de désoxyinosine de désoxycytosine
p/v : poids/volume
rpm : rotations par minute
RT-PCR : reverse transcription-polymerase chain reaction
SAM : shoot apical meristem (méristème apical caulinaire)
SDS: sodium dodécyl sulfate
TBE : tris borate EDTA
TBS-T : tris buffered saline-tween
T-DNA : ADN transféré à la plante par la bactérie *A. tumefaciens*
v/v : volume/volume
YFP : YELLOW FLUORESCENT PROTEIN

Sommaire

Introduction	1
<i>Introduction générale</i>	1
Le développement et la différenciation cellulaire	1
Spécificités du développement des plantes par rapport à celui des animaux	2
<i>I Le développement végétatif aérien des plantes</i>	4
I A. Fonctionnement du méristème apical caulinaire (SAM)	4
I A.1/ Structure du SAM	4
I A.2/ Régulation de l'activité du SAM	6
I B. Différenciation des organes foliaires	10
I B.1/ Régulation de l'organogenèse des feuilles	10
I B.2/ L'endoréplication et la différenciation cellulaire	11
I B.3/ Les trichomes, des cellules modèles de la différenciation épidermique	12
<i>II Les hormones gibbérellines (GA) et cytokinines (CK) contrôlent la balance entre division et différenciation cellulaire</i>	16
II A. Métabolisme et voie de signalisation des GA et des CK	16
II A.1/ Les gibbérellines (GA)	16
II A.2/ Les Cytokinines (CK)	23
II B. La réponse croisée des GA et des CK	31
II C. Rôle des GA et des CK dans le développement végétatif des plantes	34
II C.1/ Implication des hormones dans le développement du SAM	34
II C.2/ Le rôle des GA et des CK dans l'endoréplication et le développement des trichomes	38
<i>III Découverte d'une nouvelle famille multigénique dont les membres pourraient jouer un rôle dans les voie hormonales de développement</i>	41
III A. La découverte du facteur GeBP	41
III B. GeBP appartient à une nouvelle famille multigénique	44
III C. Les protéines GeBP/GPL sont capables de former des dimères	46
<i>Sujet de recherche : Analyse fonctionnelle de la nouvelle famille de facteurs de transcription GeBP/GPL</i>	47
Résultats	
<i>Chapitre I</i>	49
<i>Caractérisation des facteurs GeBP/GPL</i>	49
I A. Adressage des protéines GeBP/GPL	49
I B. Etude fonctionnelle du motif Leucine-Zipper présent dans la région C-Terminale des protéines GeBP/GPL	51
I C. Recherche de la séquence consensus d'ADN reconnu par les protéines GeBP/GPL ...	54
I D. Etude de l'expression des gènes GeBP/GPL	58
<i>Chapitre II</i>	63
<i>Recherche de la fonction des GeBP/GPL</i>	63
II A. Etude de la perte de fonction des GeBP/GPL	63
II A. 1/ Obtention et caractérisation de lignées mutantes <i>gebp/gpl</i>	63
II A. 2/ Construction de lignées multiples mutantes <i>gebp/gpl</i>	66

II A. 3/ Les gènes <i>GeBP</i> , <i>GPL1</i> , et <i>GPL2</i> jouent un rôle redondant dans la réponse physiologique aux CK exogènes	67
II A. 4/ Les <i>GeBP/GPL</i> sont impliqués dans la régulation du signal CK	74
II B. Etude de la surexpression des <i>GeBP/GPL</i>	77
II B.1/ Les lignées <i>35S::VP16::GPL2</i> révèlent une implication importante des <i>GPL2</i> dans les processus de développement et de sénescence des feuilles	77
II B.2/ L'étude des plantes <i>35S::VP16::GPL2</i> démontre que la régulation de l'expression des <i>ARR-A</i> par les <i>GeBP/GPL</i> est indirecte	80
<i>Chapitre III</i>	85
<i>Recherche par analyse transcriptomique des voies contrôlées par les gènes GeBP/GPL</i>	85
III A. Déroulement des expériences Microarray et résultats bruts	85
III B. Analyse et interprétation des résultats de l'analyse transcriptomique	87
III B. 1/ Les voies de réponses aux stress semblent dérégulées chez les lignées <i>gebp gpl1 gpl2 gpl3</i> et <i>35S::VP16::GPL2</i> par rapport à Col	87
III B. 2/ Les voies de réponse aux stress biotiques paraissent fortement dérégulées chez le quadruple mutant et la lignée surexpressueur	89
III B. 3/ Confirmation des résultats des expériences de microarray par RT-PCR Quantitative	91
III B. 4/ Les gènes <i>GeBP/GPL</i> semblent impliqués dans la voie du facteur de réponse aux pathogènes <i>CPR5</i>	94
III C. Vérification des hypothèses suggérées par les résultats d'analyses microarrays	97
Discussion	103
<i>Conclusion</i>	115
Matériels et Méthodes	117
<i>I Matériel biologique et conditions de culture</i>	117
I A. Matériel végétal	117
I A. 1/ Ecotypes, lignées mutantes et transgéniques	117
I A. 2/ Milieux et conditions de culture	119
I A. 3/ Tests de résistance au paclobutrazol	120
I A. 4/ Tests de réponse aux Cytokinines	120
I B. Souches bactériennes et plasmides	121
I B. 1/ Souches utilisées	121
I B. 2/ Milieux et conditions de culture	121
I C. Les levures	122
I C. 1/ Souche utilisée	122
I C. 2/ Milieux et conditions de culture	122
<i>II Manipulations génétiques des plantes</i>	123
II A. Fécondation croisée	123
II B. Transformation Stable	123
II B. 1/ Transformation par « Infiltration d'inflorescences » (Clough and Bent 1998)	123
II B. 2/ Sélection des transformants	124
II C. Transformation transitoire par infiltration de feuilles de tabac	126
<i>III Biologie Moléculaire</i>	127
III A. Techniques de clonage et transformation bactérienne	127
III A. 1/ Clonage classique	127
III A. 2/ Clonage à partir d'un produit PCR	128
III A. 3/ Clonage GATEWAY™	129
III A. 4/ Vecteurs utilisés et constructions réalisées	130

III B. Analyse des acides nucléiques.....	134
III B. 1/ Extraction d'ADN génomique d'Arabidopsis à partir de feuilles de rosettes..	134
III B. 2/Amplification d'un fragment d'ADN par PCR	134
III B. 3/ Génotypage.....	135
III B. 2/ Quantification des transcrits	136
III C. Analyse des protéines	140
III C. 1/ Purification de protéines taggées.....	140
III C. 2/ Détection de protéines taggées	140
III D. Etude de l'interaction des protéines GeBP/GPL chez la levure.....	142
III D. 1/ Mutagenèse dirigée du motif Leucine-Zipper de GeBP.....	142
III D. 2/ Test double hybride.....	144
III E. Recherche du motif d'ADN reconnu par GeBP par SELEXE	145
III E. 1/ Premier cycle de SELEXE.....	145
III E. 2/ Cycles suivants et analyse des séquences obtenues.....	147
<i>IV Biologie Cellulaire</i>	148
IV A. Coloration et préparation des échantillons	148
IV B. Microscopie et imagerie	149
<i>V Bio-Informatique</i>	150
V A. Analyses de séquences	150
V B. Analyse des données microarray	151
V C. Recherche des oligonucléotides pour la PCR semi-quantitative	151
V D. Logiciels de mesure d'intensité et d'analyses statistiques	152
Bibliographie	153
Annexes	167

Introduction

Introduction générale

Le développement et la différenciation cellulaire

Conjointement avec l'apparition des organismes multicellulaires, sont nés les phénomènes de spécialisations cellulaires. Un organisme multicellulaire pourrait être assimilé à une population clonale dérivée d'un seul ancêtre unicellulaire. Pourtant, bien que les cellules qui composent un individu possèdent toutes un génome identique, on peut observer en son sein différents tissus et organes tous spécifiques d'une fonction particulière et composés de cellules morphologiquement différentes. Ces différences proviennent du fait que le génome d'un organisme est exprimé différemment selon le type cellulaire. En effet, seuls les gènes utiles à la fonction de la cellule ou du tissu sont actifs et les protéines synthétisées dans les différents tissus ne sont donc pas les mêmes. Cette spécialisation cellulaire est mise en place au cours du développement d'un organisme grâce à un phénomène appelé différenciation (Gilbert, 2006). Le développement représente l'ensemble des processus qui, à partir d'un pool originel de cellules souches identiques, permettent l'apparition de différents secteurs, où les cellules ont acquis une spécialité grâce à l'expression sélective de certains gènes, et ce jusqu'à l'élaboration d'un organisme complet. Outre la différenciation, il existe un autre processus qui régit le développement : la division cellulaire. La croissance d'un organisme, ainsi que le renouvellement de ses tissus est en effet possible grâce à la la génération permanente et extrêmement contrôlée de nouvelles cellules durant toute son existence.

La précision avec laquelle les processus de division et différenciation cellulaire sont régulés au cours du développement est impressionnante. Les cellules de chaque tissu se divisent ou se différencient toujours de façon adéquate et coordonnée en fonction de leur localisation spatiale, permettant ainsi le bon déroulement de l'organogenèse. Cette régulation très fine est rendue possible grâce au système de communication intercellulaire. Au cours du développement, l'organisme produit en effet des molécules chimiques qui agissent dans des

régions ciblées, où elles informent chaque cellule des gènes qu'elles doivent exprimer en fonction de leur position spatio-temporelle (Cooper and Hausman, 2007). Ces médiateurs biologiques sont appelés facteurs d'induction ou hormones. Leur action sur les cellules passe notamment par l'activation de l'expression de protéines particulières appelées facteurs de transcription. Ces facteurs contrôlent la différenciation ou la division cellulaire en régulant sélectivement l'expression d'un certain nombre de gènes cibles. L'étude des voies hormonales et des facteurs de transcription est donc capitale dans la recherche sur les processus de développement. La compréhension de ces phénomènes très complexes est aujourd'hui devenue l'un des enjeux majeurs de la biologie moderne, et la recherche dans ce domaine amène de plus en plus d'applications spectaculaires dans les secteurs biomédicaux et biotechnologiques telles que le clonage, les Organismes Génétiquement Modifiés (OGM), et les thérapies géniques.

Spécificités du développement des plantes par rapport à celui des animaux

Il existe de grandes différences entre le développement des animaux et celui des plantes. Les animaux réalisent en effet l'essentiel de leur développement, comprenant la mise en place de tous les organes vitaux, au cours de l'embryogenèse même si quelques modifications post embryonnaires peuvent encore apparaître (ex : la métamorphose). Les plantes à l'inverse, élaborent un embryon très peu développé mais après la germination, leurs croissance et organogenèse se poursuivent tout au long de leur vie ce qui leur octroie une grande plasticité d'adaptation aux signaux environnementaux et aux stress subis (Leyser and Day, 2003). Ce développement continu post embryonnaire est organisé au niveau de régions bien spécifiques qui gardent en permanence en leur sein un pool de cellules non différenciées (cellules souches). Ces régions qu'on trouve aux extrémités des zones caulinaires et racinaires sont appelées méristèmes. Une deuxième grande différence entre les deux règnes provient de la capacité des cellules animales à se déplacer tandis que les cellules végétales restent immobilisées par leur paroi cellulaire. Ainsi chez les animaux, la migration cellulaire joue un rôle très important lors de plusieurs étapes clés comme la gastrulation, puis la mise en place des organes, tandis que chez les plantes, la division et l'expansion cellulaire orientées constituent les principaux mécanismes de l'organogenèse (Campbell, 1993).

En dépit de ces différences, les plantes et les animaux ont gardé d'importantes similarités comme l'utilisation des hormones comme moyen de communication intercellulaire et de déclenchement d'un grand nombre de processus physiologiques et cellulaires. Les hormones (du grec hormao, exciter) présentent un mode d'action basé sur trois règles communes aux deux règnes : (1) leur activité ne nécessite que de faibles concentrations et ne présente aucun rôle énergétique ou nutritif, (2) elles sont synthétisées par l'organisme lui-même, et (3) elles sont transportées depuis leur site de synthèse jusqu'au site d'action où elles influencent spécifiquement des cellules cibles. Bien que les hormones végétales (ou phytohormones) présentent un certain nombre de points communs avec les hormones animales (perception, voies de transduction...), elles s'en distinguent tout de même sur plusieurs aspects (Davies, 2004). Tout d'abord, leurs structures chimiques sont différentes (à l'exception des brassinostéroïdes voisins des stéroïdes animaux), et ce sont des molécules de poids moléculaire plus faible, sans doute pour faciliter leur transport de cellule à cellule. Elles sont de plus produites dans différentes régions de l'organisme (même si une zone de production majoritaire est fréquente) et sont actives à la fois au lieu de synthèse et à distance, alors que chez les animaux, la distinction entre le site de production (ex : glande endocrine) et le site d'action est plus claire. Enfin, les hormones végétales agissent fréquemment de façon additive, antagoniste, ou en synergie sur divers phénomènes physiologiques, tandis que chez les animaux, l'action de chaque hormone est plus ciblée. Ce dernier point met l'accent sur les difficultés qui accompagnent l'étude de l'action des hormones végétales. En effet, une phytohormone n'agit généralement pas seule sur un phénomène mais en présence d'autres hormones qui agissent dans le même sens ou de façon antagoniste. C'est ce qu'on appelle le phénomène de réponse croisée des hormones (ou cross talk en anglais). Avec pour objectif de permettre une meilleure compréhension du rôle des phytohormones, l'équipe de recherche au sein de laquelle j'ai effectué mes travaux de thèse a fait le choix d'étudier leurs actions sur les processus de différenciation cellulaire au cours du développement des plantes.

I Le développement végétatif aérien des plantes

Comme on vient de le voir, le développement des plantes se caractérise par un profil de croissance indéterminé qui leur permet une grande capacité d'adaptation, l'organogenèse s'effectuant de manière continue tout au long de leur vie. Cette organisation unique dans le monde du vivant, implique nécessairement une régulation très fine pour réussir l'intégration des processus de division et de différenciation cellulaire au moment de l'organogenèse. Durant la phase végétative de la vie des plantes, tous les organes sont produits à partir de seulement deux régions appelées méristèmes. Les tissus racinaires sont produits par le méristème apical racinaire, tandis que les tissus aériens proviennent tous du méristème apical caulinaire ou Shoot Apical Meristem (SAM) (Fletcher, 2002). Le SAM est initié durant l'embryogenèse et se différencie en méristème végétatif au moment de la germination. Il commence alors à produire des feuilles selon un arrangement spatial et temporel bien défini. Sous l'effet de facteurs environnementaux (photopériode, température, etc...), le développement reproductif est enclenché et le SAM se transforme en méristème d'inflorescence qui commence alors la production de tige, de méristèmes axillaires et de fleurs. L'organogenèse débute dans des régions appelées primordia qui sont initiées lors des phases végétatives et reproductives sur les flans du SAM. La croissance des organes en formation dépend toujours d'un équilibre entre division puis expansion cellulaire.

I A. Fonctionnement du méristème apical caulinaire (SAM)

I A.1/ Structure du SAM

L'organisation du SAM par zones

Des études histologiques et cytologiques basées sur des caractéristiques cellulaires comme la taille ou l'architecture cytoplasmique ont permis de définir chez les angiospermes une organisation du SAM en trois zones distinctes (Steeves and Sussex, 1989) (**Figure 1**). Au sommet du méristème, on trouve un petit groupe de cellules pluripotentes à division lente qui forment la zone centrale (CZ). Ces cellules souches sont essentielles pour la maintenance du méristème. Au fil de leurs divisions successives, elles approvisionnent en cellules deux zones sous jacentes : la zone périphérique (PZ) et la zone médullaire (rib zone, RZ), dans lesquelles les cellules acquièrent un premier stade de différenciation détectable par une

augmentation de la densité cytoplasmique et du taux de division ainsi qu'une perte de la pluripotence (Fletcher, 2002; Grandjean et al., 2004; Carraro et al., 2006). La zone périphérique qui entoure la zone centrale est le site où l'organogenèse des feuilles est initiée selon une phyllotaxie bien particulière. La zone médullaire, située sous la zone centrale est responsable de la formation de la tige.

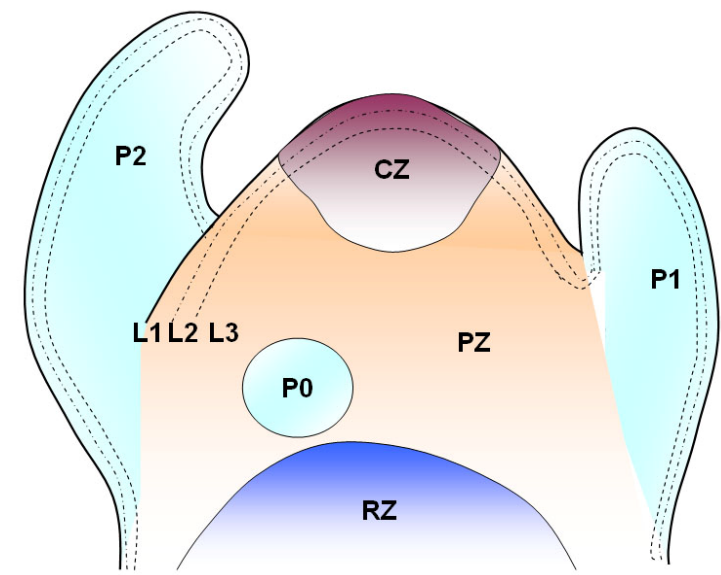


Figure 1 : Schéma de l'organisation du méristème apical caulinaire (SAM) des dicotylédones

Le SAM peut être divisé en trois domaines cytologiques distincts : la zone centrale (CZ), la zone périphérique (PZ), et la zone médullaire (rib zone, RZ). On distingue également 3 niveaux de couches cellulaires, nommés L1, L2, L3 qui se retrouvent également dans les ébauches foliaires. Ce schéma représente un méristème vu de côté, et les primordia en cours de développement sont schématisés d'après leur position théorique, et désignés selon leur stade de développement (Plastochron) depuis le plus âgé (stade P2) jusqu'au plus jeune dont l'initiation n'a pas encore débuté (stade P0).

L'organisation du SAM en couches

Conjointement à ces trois zones, le SAM présente un niveau d'organisation supplémentaire en couches cellulaires distinctes appelées tunique et corpus. Chez la plupart des plantes dicotylédones comme *Arabidopsis thaliana*, la tunique est composée de deux couches d'une seule cellule d'épaisseur : une couche épidermique appelée L1 et une sous-épidermique appelée L2 (**Figure 1**). Les cellules de ces deux couches ne se divisent que de façon anticlinale entraînant ainsi la conservation d'une origine clonale distincte. A l'inverse, le corpus (ou couche L3) qui est protégé par la tunique est formé de cellules capables de se

diviser dans toutes les directions. Les cellules de la couche L1 seront à l'origine de l'épiderme des organes tandis que celles des couches L2 et L3 formeront le mésoderme.

I A.2/ Régulation de l'activité du SAM

Le développement des plantes étant un processus ininterrompu, le SAM doit maintenir en permanence un équilibre subtil entre la production d'organes sur ses flancs et le maintien d'une population cellulaire indifférenciée dans sa région centrale. Cet équilibre est possible grâce à plusieurs facteurs de transcription dont l'action est décrite dans les paragraphes suivants et se trouve schématisée dans la **Figure 2**.

I A.2.1/ L'initiation et le maintien du SAM sont contrôlés par les facteurs KNOX de classe I

Les protéines KNOX de classe I (KNOXI) appartiennent à la grande famille des facteurs de transcription à homéodomaine des plantes. L'homéodomaine est une structure de trois hélices alpha impliquée dans la liaison à l'ADN qu'on retrouve chez de nombreuses protéines végétales et animales impliquées dans le développement. Il existe 4 gènes *KNOXI* chez *Arabidopsis thaliana* : *SHOOTMERISTEMLESS (STM)*, *BREVIPEDICELLUS (BP)*, *KNAT2* et *KNAT6* (Hake et al., 2004).

La perte de fonction des gènes KNOXI entraîne un défaut de maintenance du SAM

Chez *A. thaliana*, les plantes mutées pour le gène *SHOOTMERISTEMLESS (STM)* sont incapables d'initier un SAM lors de l'embryogenèse et leur développement s'arrête au stade des cotylédons (Barton and Poethig, 1993; Long et al., 1996). La mutation de *Knotted1*, l'orthologue de *STM* chez le maïs, entraîne un phénotype similaire bien que moins marqué (Vollbrecht et al., 2000). Les plantes homozygotes pour un allèle mutant faible de *STM* sont également dépourvues de SAM issu du stade embryonnaire, mais permettent tout de même l'initiation de méristèmes secondaires au niveau du pétiole des cotylédons. Ces méristèmes ne sont cependant pas totalement fonctionnels, et ils terminent rapidement leur développement après avoir produit quelques feuilles, tandis que de nouveaux méristèmes secondaires prennent le relais. (Clark et al., 1996; Endrizzi et al., 1996). Toutes ces observations indiquent que *STM* est impliqué dans l'initiation du SAM et dans le maintien des méristèmes aériens.

Une étude approfondie des trois autres gènes *KNOXI* d'*Arabidopsis* : *KNAT2*, *BREVIPEDICELLUS (BP)*, et *KNAT6* révèle que les deux derniers montrent un rôle redondant de *STM*. En effet, bien que les mutations *bp* ou *knat6* n'entraînent aucun défaut visible de maintenance des méristèmes, elles aggravent fortement le phénotype des allèles mutants *stm* faibles (Byrne et al., 2002; Belles-Boix et al., 2006). Contrairement à *STM* dont la fonction est principalement focalisée sur le maintien des méristèmes, *BP* présente un rôle plus diversifié avec notamment une implication importante dans le développement des internœuds et des pédicelles ce qui suggère que la redondance fonctionnelle de ces facteurs s'accompagne de certaines spécificités (Douglas et al., 2002; Venglat et al., 2002).

La surexpression des KNOXI entraîne une altération de la morphologie foliaire

L'étude du profil d'expression des gènes *KNOXI* révèle que ces derniers sont exprimés dans la CZ et la PZ du SAM (Lincoln et al., 1994; Long et al., 1996; Hake et al., 2004). En revanche, leur expression disparaît totalement dans les cellules du méristème qui ont commencé à se différencier au sein de la PZ pour former le futur primordium (stade P0) (**Figure 2**). Leur expression reste ensuite absente des primordia et des feuilles matures sauf chez les espèces à feuilles disséquées telles que la tomate. Cette restriction très nette pose la question de l'importance de cette dérégulation de l'expression des *KNOXI* dans les primordia en cours d'initiation. L'étude de plantes transgéniques surexpresses montre que l'expression ectopique des gènes *KNOXI* n'empêche pas l'initiation des feuilles, mais qu'elle entraîne en revanche des modifications importantes au cours de leur morphogenèse. Chez les plantes à feuilles disséquées, cette expression ectopique entraîne une dissection accentuée des feuilles, tandis que chez les plantes à feuilles simples comme *Arabidopsis* et le tabac, elle entraîne l'apparition de lobes (rappelant la morphologie de feuilles disséquées) au niveau desquels des méristèmes ectopiques sont parfois visibles (Sinha et al., 1993; Chuck et al., 1996; Janssen et al., 1998).

I A.2.2/ Le maintien des cellules souches de la CZ dépend du facteur WUS

La maintenance d'une population de cellules souches dans les couches L1 et L2 de la CZ du SAM dépend d'un mécanisme de rétrocontrôle entre l'activateur de la production de cellules souches *WUSHEL (WUS)*, et les régulateurs négatifs de l'accumulation de ces cellules souches, les gènes *CLAVATA (CLV)* (**Figure 2**) (pour revue : Fletcher, 2002). *WUS* code pour un facteur de transcription à homéodomaine qui est exprimé chez un petit groupe de cellules

appelé centre organisateur du SAM, situé dans la couche L3 de la zone centrale (CZ). Les plantes mutées pour *WUS* sont incapables d'établir des méristèmes viables, les quelques méristèmes émergents s'épuisant après n'avoir produit que quelques organes (Laux et al., 1996; Mayer et al., 1998). La protéine WUS semble agir de façon cellule-autonome puisqu'elle agit dans les couches L1 et L2 de la CZ alors qu'elle est produite dans les tissus sous-jacents. En réponse à l'activité de WUS, les cellules de la CZ expriment CLAVATA3 (CLV3), un ligand qui agit au niveau du centre organisateur via le complexe de récepteurs CLV1-CLV2, en réprimant l'expression de *WUS*, formant ainsi la boucle de rétrocontrôle qui permet d'équilibrer la production de cellules souches. (Baurle and Laux, 2003; Williams and Fletcher, 2005). Si les gènes *KNOXI* et *WUS* présentent une action conjointe dans le maintien du méristème, leur voie d'action n'en reste pas moins bien séparée (Lenhard et al., 2002), bien qu'un certain nombre d'interactions génétiques existent entre ces deux voies. (Clark et al., 1996; Long and Barton, 1998; Mayer et al., 1998).

I A.2.3/ l'initiation des feuilles est possible grâce à l'action des facteurs

AS1, FIL, et YAB3

Les processus d'initiation des feuilles dans la PZ du SAM font intervenir chez plusieurs espèces étudiées un facteur de transcription de type MYB : ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1) chez *A. thaliana*, ROUGHSHEAT2 (RS2) chez le maïs, et PHANTASTICA (PHAN) chez *Antirrhinum majus*. Chez *A. thaliana*, la protéine AS1 est exprimée très précocement dans les ébauches foliaires en cours de formation, et permet conjointement aux protéines HD-ZIPIII PHABULOSA (PHAB), PHAVOLUTA (PHV) et REVOLUTA (REV) la croissance polarisée, l'adaxialisation, et la morphogenèse de la feuille (Veit, 2004; Carraro et al., 2006). Le mutant *as1* présente des lobes au niveau des feuilles qui rappellent ceux observés lors de l'expression ectopique des gènes *KNOXI*, et plusieurs travaux confirment effectivement que le facteur AS1 et ses orthologues RS2 et PHAN sont des répresseurs de l'expression des gènes *KNOXI* (Waites et al., 1998; Timmermans et al., 1999; Tsiantis et al., 1999; Byrne et al., 2000; Ori et al., 2000; Semiarti et al., 2001). Conjointement à l'action d'*AS1*, deux gènes de la famille *YABBY* (*YAB*), *FILAMENTOUS FLOWER* (*FIL*), et *YABBY3* (*YAB3*), caractérisés initialement comme des régulateurs de la polarité des feuilles, entraînent également la répression des gènes *KNOXI* dans les primordia foliaires (Kumaran et al., 2002). Le contrôle de l'initiation et du développement des feuilles passe donc par les gènes *YAB* et *AS1* via la répression des gènes *KNOXI* (**Figure 2**).

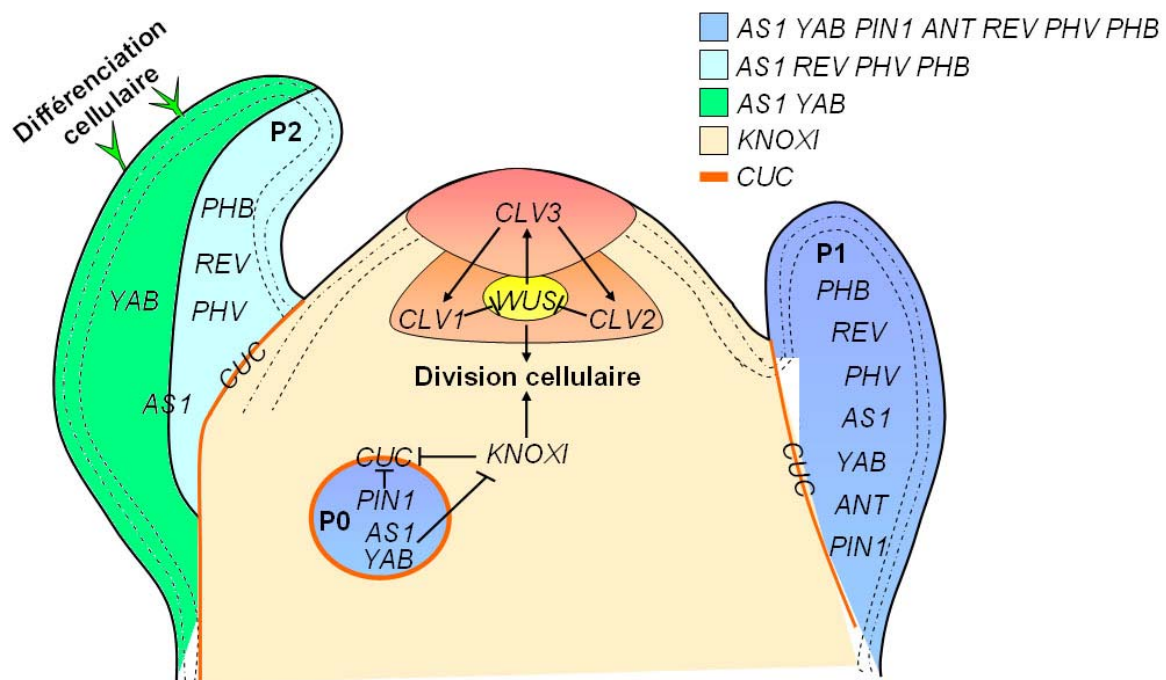


Figure 2 : Modèle Schématique des régulations génétiques impliquées dans la maintenance du SAM et l'organogenèse des feuilles

Les gènes *KNOXI* et *WUS* sont responsables du maintien du SAM grâce à leur action positive sur la division cellulaire. Tandis que l'action de *WUS* est ciblée sur les cellules souches de la CZ, celle des *KNOXI* s'applique sur l'ensemble du reste du SAM. Les gènes *YAB* et *AS1* permettent l'initiation des organes en réprimant l'expression des *KNOXI*, et participent conjointement aux gènes *PHB*, *PHV*, et *REV* à l'établissement de la polarisation dorso-ventrale de la feuille. Les gènes *CUC* contribuent à l'établissement des limites cellulaires entre organes et méristème. Les primordia en cours de développement sont schématisés d'après leur position théorique, et désignés selon leur stade de développement (Plastochron) depuis le plus âgé (Stade P2) jusqu'au plus jeune dont l'initiation n'a pas encore débuté (stade P0).

I A.2.3/ La séparation correcte entre les organes et le SAM dépend des facteurs CUC

Les gènes *CUP-SHAPED COTYLEDONI (CUC1)*, *CUC2* et *CUC3* d'*Arabidopsis*, *NO APICAL MERISTEM (NAM)* de pétunia, et *CUPULIFORMIS* d'*Antirrhinum* appartiennent au groupe de facteurs de transcription à domaine NAC et sont essentiels à la formation du SAM ainsi qu'à l'établissement des frontières cellulaires, qui permettent la séparation entre les organes et le SAM, et entre organes adjacents (Souer et al., 1996; Aida et al., 1997; Takada et al., 2001; Vroemen et al., 2003; Weir et al., 2004). Les mutants correspondants peinent fréquemment à établir un SAM et présentent une fusion des

cotylédons, des feuilles et des fleurs. L'expression de ces gènes débute au niveau de l'apex de l'embryon dès le stade globulaire durant lequel ils activent l'expression de *STM*. Puis, au stade embryonnaire cœur, l'expression des gènes *CUC* est restreinte sous l'action du facteur STM au niveau de la limite cellulaire entre le SAM et les cotylédons (Aida et al., 1999; Aida et al., 2002). Au stade plantule, leur expression reste confinée au niveau d'une fine bande de cellules entourant les primordia en cours de développement, leur expression étant réprimée dans les primordia par le gène *PINFORMED1 (PINI)*, impliqué dans le transport des Auxines. (**Figure 2**) (Vernoux et al., 2000; Aida et al., 2002; Hibara et al., 2003; Aida and Tasaka, 2006).

I B. Différenciation des organes foliaires

I B.1/ Régulation de l'organogenèse des feuilles

L'initiation des organes se déroule sur les flancs du méristème dans la zone périphérique. Au commencement, un petit groupe de cellules de la PZ encore peu éloigné du sommet du SAM atteint un premier stade de différenciation caractérisé par l'expression spécifique des gènes *ZWILLE (ZLL)*, allélique de *PINHEAD* (Moussian et al., 1998; Lynn et al., 1999), *PINI* (Vernoux et al., 2000) et *REVOLUTA (REV)* (Otsuga et al., 2001). A ce stade très précoce, les cellules ont encore la possibilité de se dédifférencier et ne seront pas nécessairement intégrées au futur organe. Cette première étape entraîne ensuite le recrutement des cellules fondatrices du primordium (stade P0) qui subissent un stade de différenciation supplémentaire se traduisant par l'expression de nouveaux marqueurs des primordia dont *AINTEGUMENTA (ANT)* qui est associé à la formation de l'organe (Elliott et al., 1996; Krizek, 1999), et les gènes *ASI* et *YAB* qui comme nous l'avons vu précédemment permettent la répression des gènes *KNOXI*. Cette phase est accompagnée par l'établissement d'une bande de cellules qui crée une limite entre le primordium naissant et le reste du SAM. Les cellules qui composent cette frontière expriment spécifiquement plusieurs facteurs, dont notamment les gènes *CUC* décrits précédemment. Sous l'action d'*ANT* qui stimule la croissance cellulaire, le primordium commence alors à croître sous la forme d'un dôme symétrique par le biais de divisions cellulaires orientées perpendiculairement au SAM. Rapidement après cette initiation, l'organe commence à s'infléchir dans un plan parallèle à l'axe du SAM en même

temps qu'apparaît la polarisation dorso-ventrale (pour revue : Carraro, 2006). Cette polarisation est le résultat d'une distribution asymétrique des types cellulaires, associée à l'expression spécifique des gènes *PHAVOLUTA* (*PHV*), *PHABULOSA* (*PHB*), et *REVOLUTA* (*REV*) au niveau de la région adaxiale du primordium, et des gènes *YAB* dans la région abaxiale (**Figure 2**).

I B.2/ L'endoréplication et la différenciation cellulaire

La croissance de chaque primordium dépend initialement de la division cellulaire, puis lorsque la jeune feuille a atteint quelques millimètres de longueur, les divisions cessent et la croissance de l'organe se poursuit alors principalement par l'augmentation de taille des cellules déjà présentes (Donnelly et al., 1999; De Veylder et al., 2001). Cette expansion cellulaire est généralement accompagnée d'une ou plusieurs endorélications, une variante du cycle cellulaire qui induit des réplifications successives de l'ADN génomique sans division mitotique, conduisant à des cellules au noyau polyploïde. Il y a une forte corrélation entre la taille d'une cellule et le nombre d'endorélications qu'elle a subi (Sugimoto-Shirasu and Roberts, 2003). La taille finale de l'organe dépend donc du nombre de mitoses et d'endorélications qui se sont produites depuis l'initiation du primordium.

L'endoréplication est un phénomène qui a été observé aussi bien chez les animaux que chez les plantes, mais il semble cependant beaucoup plus courant chez ces dernières, certaines espèces végétales comme le maïs montrant des niveaux de polyploïdie pouvant atteindre 192C (Kowles and Phillips, 1985). Le processus d'endoréplication est dérivé du cycle mitotique et fait appel à la même machinerie (pour revue : Inzé, 2006). Le cycle cellulaire classique est composé d'une phase de réplification de l'ADN (phase S) ainsi que d'une phase mitotique (phase M), ces deux étapes étant séparées par des phases de transition (phase G1 et G2). Dans le cas des endorélications, la phase S se déroule normalement, mais la phase M est supprimée, entraînant une fusion des deux phases G. Il a été montré chez plusieurs plantes et notamment chez *A. thaliana* que ce phénomène est lié à une diminution de l'activité des protéines Cyclines et Cyclin Dependant Kinases (CDK) spécifiques de la transition G2/M (Grafi and Larkins, 1995; Joubes et al., 1999; Larkins et al., 2001; Inze and De Veylder, 2006). L'endoréplication est désormais reconnue comme un marqueur important de différenciation et de croissance cellulaire. Ce processus apparaît en effet toujours associé à

des cellules en cours de différenciation, s'accompagnant le plus souvent d'une augmentation de la taille, comme par exemple lors de l'élongation de l'hypocotyle, et du développement des feuilles, des trichomes, et des fruits (Perazza et al., 1999; Kondorosi et al., 2000; Larkins et al., 2001).

I B.3/ Les trichomes, des cellules modèles de la différenciation épidermique

Les trichomes (du grec "trichos", poil) sont de grandes structures épidermiques qui se développent sur les organes aériens chez la plupart des espèces végétales. Ils apparaissent régulièrement espacés sur les feuilles, tiges, et sépales, et sont en revanche absents des cotylédons, pétales et organes reproducteurs (Hülkamp et al., 1994; Hülkamp et al., 1999). On trouve deux classes fonctionnelles de trichomes : les trichomes glandulaires qui sécrètent des substances jouant un rôle attractif pour les insectes pollinisateurs, et les trichomes non glandulaires qui jouent probablement le rôle de barrière physique en limitant l'accès des régions méristématiques aux insectes herbivores. Les trichomes d'*Arabidopsis* qui appartiennent à la deuxième catégorie sont constitués d'une unique cellule épidermique polyploïde de grande taille présentant habituellement 3 branches. Leur développement nécessite généralement 4 endoréplifications, leur nombre de branches étant corrélé au nombre d'endoréplifications subies (Hülkamp et al., 1994).

De nombreux avantages font des trichomes un modèle idéal pour l'étude du contrôle des processus de différenciation épidermique et d'endoréplification (Hülkamp, 2004). Tout d'abord, l'initiation des trichomes est un événement très précoce, observable par des changements morphologiques cellulaires dès le stade primordium. Par ailleurs, leur production est finement régulée et facilement quantifiable, et une anomalie de leur niveau d'endoréplification est facilement décelable par l'observation de leur nombre de branches. Enfin, leur présence n'étant pas essentielle à la plante, de nombreux mutants du développement des trichomes ont pu être obtenus, et en conséquence les processus génétiques contrôlant leur développement sont à présent bien décrits. La distribution des trichomes est finement régulée puisqu'on trouve très rarement deux trichomes adjacents sur une feuille sauvage. Leur initiation n'est pas liée à leur position sur la feuille, mais dépend de la communication intercellulaire qui permet via un système activateur-inhibiteur l'inhibition

latérale de la différenciation des cellules épidermiques entourant chaque nouveau trichome (Larkin et al., 2003; Pesch and Hulskamp, 2004).

L'initiation du développement des trichomes

Plusieurs évidences génétiques et moléculaires suggèrent que l'initiation des trichomes est déclenchée par un complexe activateur formé de trois classes de protéines nucléaires : le facteur R2R3-MYB GLABROUS1 (GL1) (Oppenheimer et al., 1991), les protéines bHLH (basic hélix-loop-hélix) GLABRA3 (GL3) et ENHANCER OF GLABRA3 (EGL3) (Payne et al., 2000; Zhang et al., 2003), et la protéine à domaine WD40 TRANSPARENT TESTA GLABRA (TTG) (Walker et al., 1999). Les mutants *gl1* et *tgt* sont glabres (aucun trichome n'est décelable sur leurs feuilles) (**Figure 3 A**). Le double mutant *gl3 egl3* apparaît également glabre alors que les simples mutants *gl3* et *egl3* ne présentent qu'une réduction partielle du nombre de trichome ce qui suggère une redondance fonctionnelle de ces deux homologues (**Figure 3 B**). Des expériences de double hybride chez la levure et de co-immunoprécipitation suggèrent que ces protéines agissent sous forme de complexes GL1-GL3-TTG ou GL1-EGL3-TTG pour activer leurs gènes cibles (Payne et al., 2000; Zhang et al., 2003; Zhao et al., 2008). Les facteurs de transcription GL2 (HD-Zip), et TTG2 (WRKY) agissent génétiquement en aval du complexe GL1-bHLH-TTG et sont indispensables pour le développement correct du trichome (Rerie et al., 1994; Johnson et al., 2002). Plusieurs travaux récents montrent que les gènes *GL2* et *TTG2* sont des cibles transcriptionnelles directes du complexe GL1-bHLH-TTG (Ishida et al., 2007; Morohashi et al., 2007; Zhao et al., 2008).

Inhibition latérale de la formation des trichomes

Quatre facteurs MYB homologues TRIPTYCHON (TRY), CAPRICE (CPC), ENHANCER OF TRY and CPC1 (ETC1), et ETC2, ont été identifiés comme des répresseurs de l'initiation des trichomes (Wada et al., 1997; Schellmann et al., 2002; Kirik et al., 2004). La surexpression de chacun de ces quatre facteurs entraîne un phénotype glabre. Les mutants *try* présentent des regroupements de trichomes par 2 ou 3, et les mutants *cpc* montrent une légère augmentation du nombre de trichomes, tandis que les mutants *etc1* et *etc2* ne sont pas différents des plantes sauvages. Les doubles et triples mutants *try cpc*, et *try cpc etc1* montrent une aggravation croissante du phénotype *try* (Schellmann et al., 2002; Kirik et al., 2004; Kirik et al., 2004), les groupes de trichomes du triple mutant couvrant presque entièrement la surface foliaire (**Figure 3 C**).

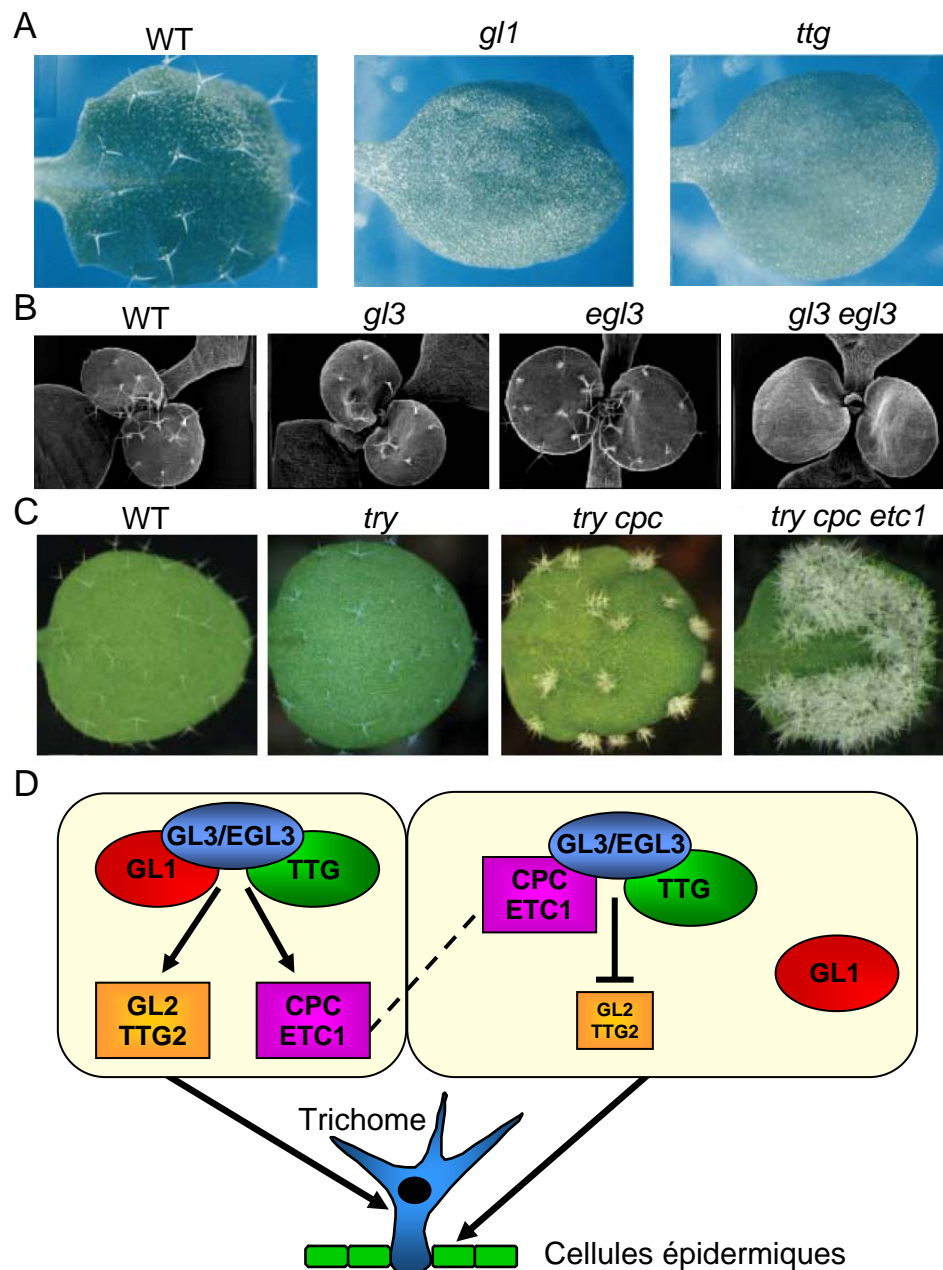


Figure 3 : Contrôle de l'initiation des trichomes par un système activateur-inhibiteur

A, phénotype glabre des mutants *gl1* et *ttg*. B, mise en évidence du rôle redondant des gènes *GL3* et *EGL3* dans l'initiation des trichomes. Les simples mutants *gl3* et *egl3* montrent peu de différence avec le sauvage. En revanche le double mutant entraîne un phénotype glabre. C, mise en évidence du rôle redondant joué par les facteurs MYB TRY, CPC, et ETC1 dans la répression latérale. Le mutant *try* montre des trichomes groupés par deux ou trois. Le croisement de *try* avec les mutants *cpc* et *etc1* aggrave ce phénotype. Les photographies montrées en B et en C sont tirées de Hulskamp (2004). D, modèle schématique de l'initiation et de la répression latérale des trichomes. Le complexe *GL1*-bHLH-*TTG* active l'expression des inducteurs *GL2* et *TTG2* et des répresseurs MYB *CPC* et *ETC1*. Ces derniers migrent dans les cellules voisines et entrent en compétition avec *GL1* pour l'interaction avec les protéines bHLH empêchant ainsi la transcription des gènes *GL2* et *TTG2*. L'expression des gènes inducteurs *GL2* et *TTG2* déclenche la transformation de la cellule en trichome. En leur absence, les cellules se différencient en cellules épidermiques pavementuses.

L'ensemble de ces données indique un rôle fortement redondant de ces facteurs dans l'inhibition latérale des trichomes (pour revue : Hulskamp, 2004). L'expression de *CPC* et *ETC1* est directement activée par le complexe GL1-bHLH-TTG tandis que la régulation de *TRY* et *ETC2* semble dépendre d'une autre voie encore non définie (Morohashi et al., 2007; Zhao et al., 2008). Ces quatre facteurs MYB ne semblent pas contenir de domaine d'activation de la transcription, ce qui suggère qu'ils pourraient agir au niveau moléculaire comme des répresseurs transcriptionnels (Schellmann et al., 2002; Wada et al., 2002; Kirik et al., 2004). Des expériences d'interaction protéique chez la levure montrent notamment que *TRY* et *CPC* sont capables d'inhiber la formation du complexe GL1-bHLH-TTG en rentrant en compétition avec GL1 pour l'interaction avec les protéines GL3 et EGL3 (Esch et al., 2003; Zhang et al., 2003). Le modèle actuel de l'inhibition latérale des trichomes suggère une activation de ces répresseurs MYB dans les cellules ayant débuté leur différenciation en trichome. Les répresseurs migreraient alors dans les cellules voisines via les plasmodesmes où ils empêcheraient la formation du complexe GL1-bHLH-TTG en interagissant avec les protéines bHLH (**Figure 3 D**). Ce modèle a été conforté récemment par la démonstration de la resseurs ou super activatrices!! PAGEREF _Toc208751626 \hues des feuilles (Zhao et al., 2008).

II Les hormones gibbérellines (GA) et cytokinines (CK) contrôlent la balance entre division et différenciation cellulaire

Nous avons vu précédemment que le développement végétatif des plantes dépend de l'équilibre entre la division cellulaire qui permet la production constante de nouvelles cellules et la différenciation des cellules ainsi produites qui permet la mise en place et le bon fonctionnement de chaque organe. Dans cette partie, nous allons étudier le rôle des hormones végétales dans cet équilibre. Chez les végétaux supérieurs, les hormones sont un moyen d'intégrer et de coordonner un grand nombre d'activités biologiques. Ces activités englobent autant des aspects de développement tels que la croissance et l'organogenèse, que des processus énergétiques comme le métabolisme, ou encore physiques comme l'ouverture et la fermeture des stomates. L'ensemble des processus qui ont été décrits en première partie : maintien du SAM, organogenèse, différenciation cellulaire et endoréplication, sont sous le contrôle des hormones végétales. En particulier, les gibbérellines (GA) et les cytokinines (CK) montrent une implication très importante dans la régulation de l'équilibre entre prolifération et différenciation cellulaire au cours de ces différents processus. Dans cette partie, quelques aspects du métabolisme et de la signalisation de ces deux hormones, ainsi que leurs rôles dans ces processus de développement seront décrits.

II A. Métabolisme et voie de signalisation des GA et des CK

II A.1/ Les gibbérellines (GA)

Les hormones gibbérellines (GA) furent découvertes en 1926 au Japon, lors de l'étude d'un champignon ascomycète parasite du riz, *Gibberella fujikuroi* qui entraîne un allongement anormal des entre-nœuds de la plante (Kurosawa, 1926). Chez les plantes, cette classe d'hormones contrôle de nombreux processus de croissance et de développement, tels que la différenciation cellulaire, l'expansion des feuilles, l'initiation des trichomes foliaires, l'élongation de l'hypocotyle et des tiges, la floraison, le développement de la graine ou encore la germination (Davies, 2004; Thomas et al., 2005). On a répertorié aujourd'hui 136 molécules différentes (GA₁, GA₂ ...) naturelles qui diffèrent peu au niveau structural mais

beaucoup au niveau de leur activité biologique. Chez les plantes, seulement 4 d'entre elles sont biologiquement actives : GA₁, GA₃, GA₄ et GA₇. Chez *Arabidopsis*, les molécules GA₁ et GA₄ sont les formes majoritaires.

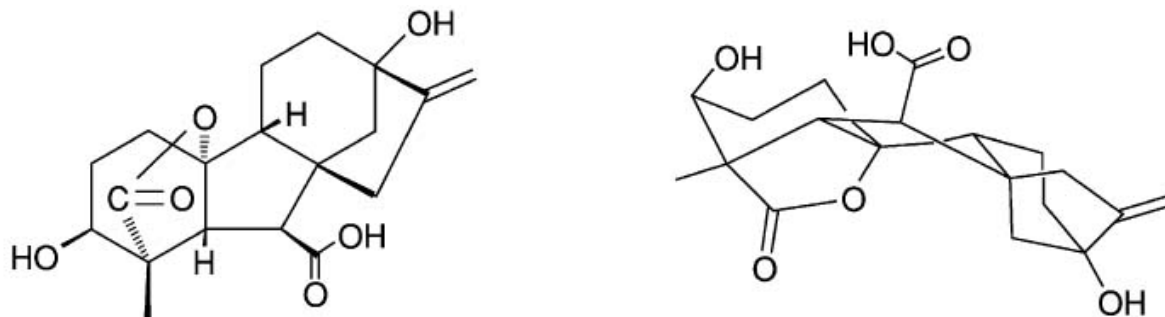


Figure 4 : Structure générale des GA

Exemple de la structure moléculaire d'une gibbérelline (GA₁), présentée en vue 2D et 3D (d'après Thomas, 2005). A ce jour, 136 GA différentes naturellement produites ont été identifiées chez les champignons et les plantes.

II A.1.1/ Le métabolisme des GA

Les GA sont des composés diterpénoïques tétracycliques (**Figure 4**) que l'on peut répartir en 2 classes selon qu'elles sont composées de 19 ou 20 atomes de carbones (C-19 et C-20). Elles peuvent présenter des formes inactives par conjugaison avec un sucre, ce qui permet leur transport ou leur stockage dans la plante. Leur biosynthèse a principalement lieu dans les graines et les jeunes tissus à forte croissance. Elle se déroule en trois étapes dans des compartiments cellulaires différents (Thomas et al., 2005) (**Figure 5**) :

(1) : La première étape a lieu dans les plastes avec la formation de précurseurs isoprénoïdes et d'ent-kaurène. L'unité isoprène de base est l'IPP (Isopentenil di-Phosphate). Elle se forme à partir de glycéraldéhyde-3-phosphate. Deux molécules d'IPP se condensent en une molécule de GPP (Géranyl di-Phosphate). S'ajoute encore une molécule d'IPP pour former le FPP (Farnésyl di-Phosphate), et enfin une quatrième molécule qui donne le GGPP (Géranyl-Géranyl di-Phosphate). Le GGPP subit alors des processus de cyclisation conduisant à la formation de l'ent-kaurène. Cette étape fait intervenir deux enzymes, l'*ent*-copalyl diphosphate synthase (CPS) et l'*ent*-kaurene synthase (KS). LA CPS est codée par le gène *GAI* (Chang and Sun, 2002), et les plantes homozygotes pour l'allèle mutant *gal-3* présentent

une forte réduction de l'activité CPS qui s'accompagne d'un nanisme très prononcé, et l'absence de phase reproductive (Davies, 1995). L'ent-kaurène est ensuite transloqué dans le cytoplasme et transporté jusqu'au réticulum endoplasmique.

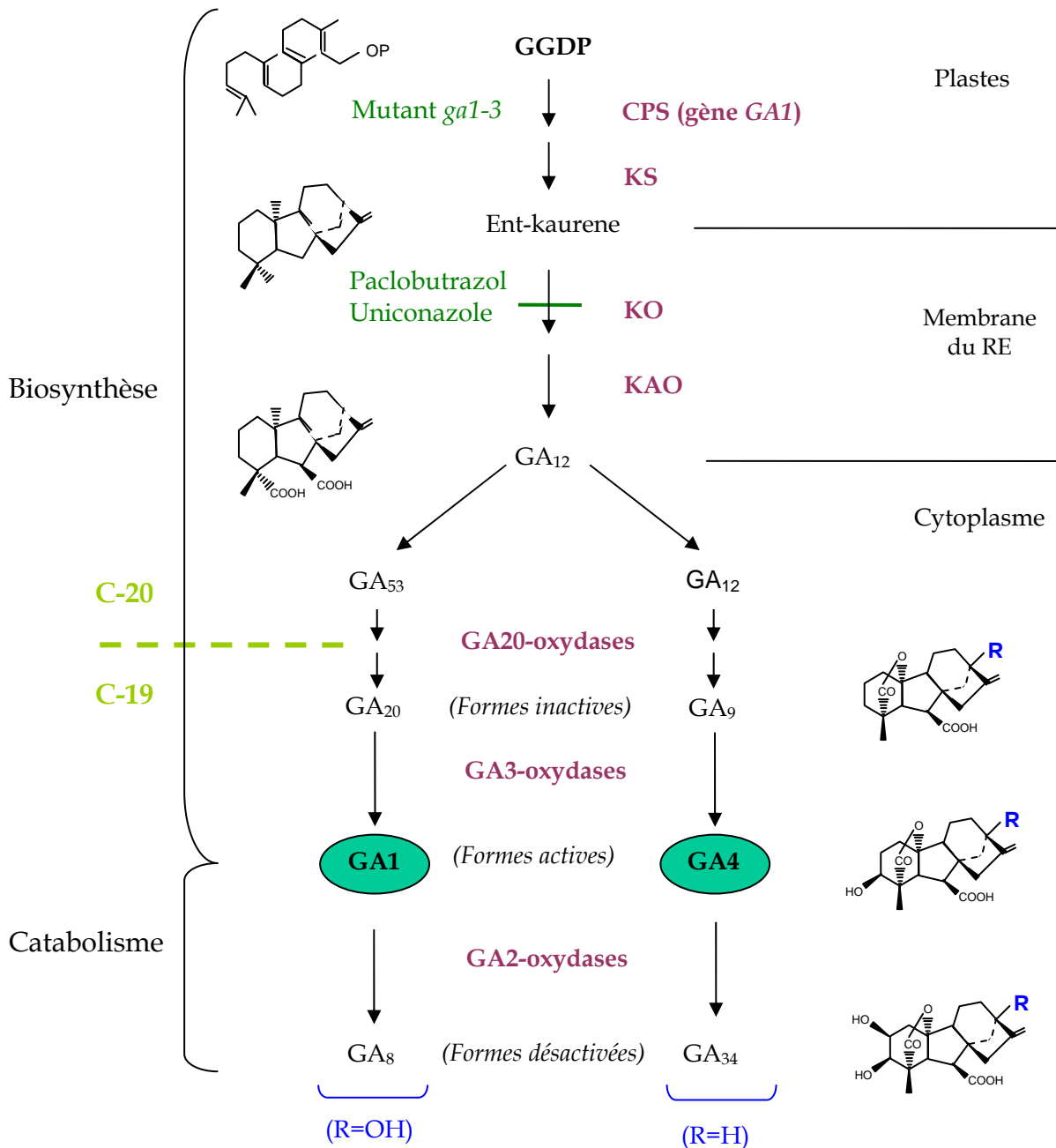


Figure 5 : La voie majoritaire du métabolisme des GA chez les plantes supérieures

Les GA sont synthétisées à partir du Géranyl Géranyl Di-Phosphate (GGDP) qui est converti en Ent-Kaurene au niveau des plastes, puis en GA₁₂ au niveau de la membrane du Réticulum Endoplasmique (RE). La biosynthèse se termine dans le cytoplasme où l'on distingue deux voies différentes, selon la nature du radical « R », faisant intervenir les mêmes enzymes. La famille des GA₂₀ox permet la conversion des molécules C-20 en molécules C-19. Les GA₃ox catalysent la formation des deux formes actives majoritaires chez les végétaux : la GA₁ et la GA₄. Ces deux molécules sont désactivées lors de la première étape du catabolisme par les GA₂oxydases.

(2) : La deuxième étape se déroule au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique. L'ent-kaurène est oxydé par deux enzymes monooxygénases dépendantes du cytochrome P450 associées à la membrane du réticulum, l'*ent*-kaurene oxydase (KO) et l'*ent*-kaurenoic acid oxydase (KAO). Ces réactions conduisent à l'obtention de la GA₁₂, la première gibbérelline, précurseur de toutes les autres. Le paclobutrazol et l'unicodazole sont des inhibiteurs chimiques de la biosynthèse des GA qui bloquent l'activité de la KO, au niveau du cytochrome P450 (Rademacher, 2000).

(3) : La biosynthèse se poursuit alors dans le cytoplasme et se divise en deux voies parallèles, selon la nature du radical R porté par le carbone 13 (R=OH pour GA₅₃ ou R=H pour GA₁₂). Les deux formes libres, GA₁₂ et GA₅₃, subissent une série d'oxydations par deux types de dioxygénase. Tout d'abord, les enzymes de la famille des GA₂₀oxydases catalysent le passage des formes en C-20 aux formes en C-19 aboutissant à la formation des molécules GA₉ (R=H) et GA₂₀ (R=OH). Puis la famille des GA₃oxydases catalyse la dernière étape de la biosynthèse des GA pour former les molécules bio-actives GA₁ (R=OH) et GA₄ (R=H).

La première étape du catabolisme des GA est effectuée par les enzymes de la famille des GA₂₀oxydase (**Figure 5**). Le rôle clé des enzymes GA₂₀, GA₃ et GA₂ oxydases fait souvent d'elles des cibles lors des processus d'inactivation ou de rétrocontrôle des GA (Thomas et al., 2005).

II A.1.2/ Perception et transduction du signal GA

Une déficience dans la transduction du signal GA est facilement détectable car elle se traduit généralement par des phénotypes drastiques de nanisme des plantes et de retard de la floraison. L'étude de mutants induisant ou supprimant ces phénotypes, a permis de comprendre le fonctionnement de cette voie de signalisation, qui repose sur l'induction par les GA de la dégradation de protéines répresseurs de la transcription des gènes de réponse à ces hormones.

Les récepteurs aux GA sont des protéines solubles essentiellement nucléaires

Le premier récepteur au GA n'a été identifié chez le riz que récemment grâce à l'étude d'un mutant nain insensible au GA (*GA-insensitive dwarf1 = gid1*) (Ueguchi-Tanaka et al., 2005).

Trois gènes orthologues de *GID1*, ont été identifiés chez *Arabidopsis* (*GID1a*, *GID1b*, *GID1c*). Les simples mutants correspondant à ces trois gènes ne présentent aucun phénotype observable, mais les doubles et triples mutants *gid1-a,b,c* présentent bien des phénotypes additifs d'insensibilité aux GA (Griffiths et al., 2006; Iuchi et al., 2007; Willige et al., 2007). Cette redondance fonctionnelle explique pourquoi ces récepteurs n'ont pas été identifiés plus tôt chez *Arabidopsis*. Contrairement à ce que les études physiologiques précédant cette découverte laissaient supposer, ces récepteurs ne sont pas transmembranaires mais sont à l'inverse retrouvés majoritairement sous forme soluble dans le noyau, leur distribution intracellulaire n'étant pas affectée par les GA (Ueguchi-Tanaka et al., 2005; Willige et al., 2007). Les différentes études de ces récepteurs chez *Arabidopsis* et le riz démontrent également qu'ils sont capables d'interagir avec les protéines DELLA d'une manière GA-dépendante (Griffiths et al., 2006; Iuchi et al., 2007; Ueguchi-Tanaka et al., 2007; Willige et al., 2007).

Les protéines DELLA sont des répresseurs du signal GA

La perte de fonction des protéines de la famille DELLA, telles que GA-INSENSITIVE (GAI) et REPRESSOR of *gal-3* (RGA) chez *A. thaliana*, ou encore SLENDER RICE1 (SLR1) chez le riz, entraîne la suppression partielle des phénotypes de GA-déficiência liés au blocage de la biosynthèse des GA qu'on peut observer chez des mutant *gal-3* ou des plantes traitées au paclobutrazol (Peng et al., 1997; Silverstone et al., 1997). La mutation simultanée de plusieurs des gènes de cette famille permet de restaurer totalement un phénotype sauvage, et peut entraîner des phénotypes semblables à ceux qu'entraîne un excès en GA (plantes de taille plus élevée et fleurissant plus tôt que les plantes sauvages par exemple) (Dill and Sun, 2001; King et al., 2001). Ces données convergentes suggèrent que ces protéines sont des répresseurs du signal GA, hypothèse renforcée par le fait qu'un traitement en GA exogènes entraîne une dégradation rapide de ces protéines (Silverstone et al., 2001; Willige et al., 2007).

Les protéines DELLA appartiennent à la famille des protéines GRAS, des facteurs de transcription potentiels qui comptent une trentaine de membres chez *Arabidopsis*, et qui se caractérisent par la présence en C-terminal d'un domaine GRAS conservé, composé de deux motifs Leucine-Zipper (LZ), et d'une séquence de localisation nucléaire (NLS) (Pysh et al., 1999). Au sein de cette famille protéique, les DELLA se différencient par deux motifs hautement conservés présents en N-terminal appelés DELLA et VHYNP. Des délétions dans ces deux motifs comme par exemple chez la lignée mutante *gai-1*, entraînent un phénotype GA-déficient qui ne peut plus être complété par l'apport de GA exogènes (Peng et al.,

1997; Dill et al., 2001; Wen and Chang, 2002; Willige et al., 2007). Les protéines DELLA ainsi tronquées ne sont plus dégradées en réponse à l'hormone et s'accumulent, ce qui suggère que ces deux motifs sont essentiels pour que le contrôle post traductionnel par les GA puisse s'effectuer. Des expériences de double hybride chez la levure montrent notamment que l'interaction des récepteurs aux GA avec les répresseurs DELLA se fait via ces deux motifs (Willige et al., 2007). Bien que les protéines DELLA présentent des caractéristiques de facteurs de transcription (localisées au noyau et capables d'activer la transcription en système hétérologue (Ogawa et al., 2000)), aucun gène cible ne leur est pour le moment attribué.

Les GA induisent la dégradation des répresseurs DELLA par la voie du protéasome

Les gènes *SLEEPY1* (*SLY1*) d'*Arabidopsis* et *GID2* du riz codent pour des protéines de type F-box et ont été tous deux isolés sur la base du phénotype qu'entraîne leur mutation : un nanisme doublé d'une insensibilité aux GA (McGinnis et al., 2003; Gomi et al., 2004). Les protéines F-box font partie du complexe enzymatique SCF (SKP1/Cullin/F-box) E3 ubiquitine ligase. Ce complexe joue un rôle clé dans le contrôle de la dégradation des protéines. Il catalyse en effet l'ubiquitination de ses substrats, ce qui conduit par la suite à leur dégradation par le protéasome. La fonction des F-box au sein de ce complexe est importante puisqu'elles sont responsables de la spécificité de son interaction avec le substrat à ubiquitiner (Conaway et al., 2002).

Plusieurs travaux démontrent que les F-box *SLY1* et *GID2* interagissent avec les protéines DELLA au niveau du domaine GRAS (Dill et al., 2004; Fu et al., 2004; Gomi et al., 2004). La force de cette interaction apparaît cependant assez faible même lorsque des GA sont ajoutées au milieu de culture. En revanche il a été démontré en test double hybride chez la levure que la surexpression du récepteur *GID1a* d'*Arabidopsis*, entraîne en présence de GA une interaction beaucoup plus forte des protéines *SLY1* et RGA (Griffiths et al., 2006). Dans le modèle actuel de la voie de signalisation, les GA induiraient donc l'expression de leurs gènes cibles via la dégradation des répresseurs DELLA par le mécanisme suivant (**Figure 6**) : Le récepteur *GID1* activé par sa liaison avec une molécule de GA deviendrait capable d'interagir avec les répresseurs DELLA ce qui augmenterait leur affinité avec l'élément F-box du complexe SCF E3 ubiquitine ligase et entraînerait leur ubiquitination conduisant en quelques heures à leur dégradation par le protéasome.

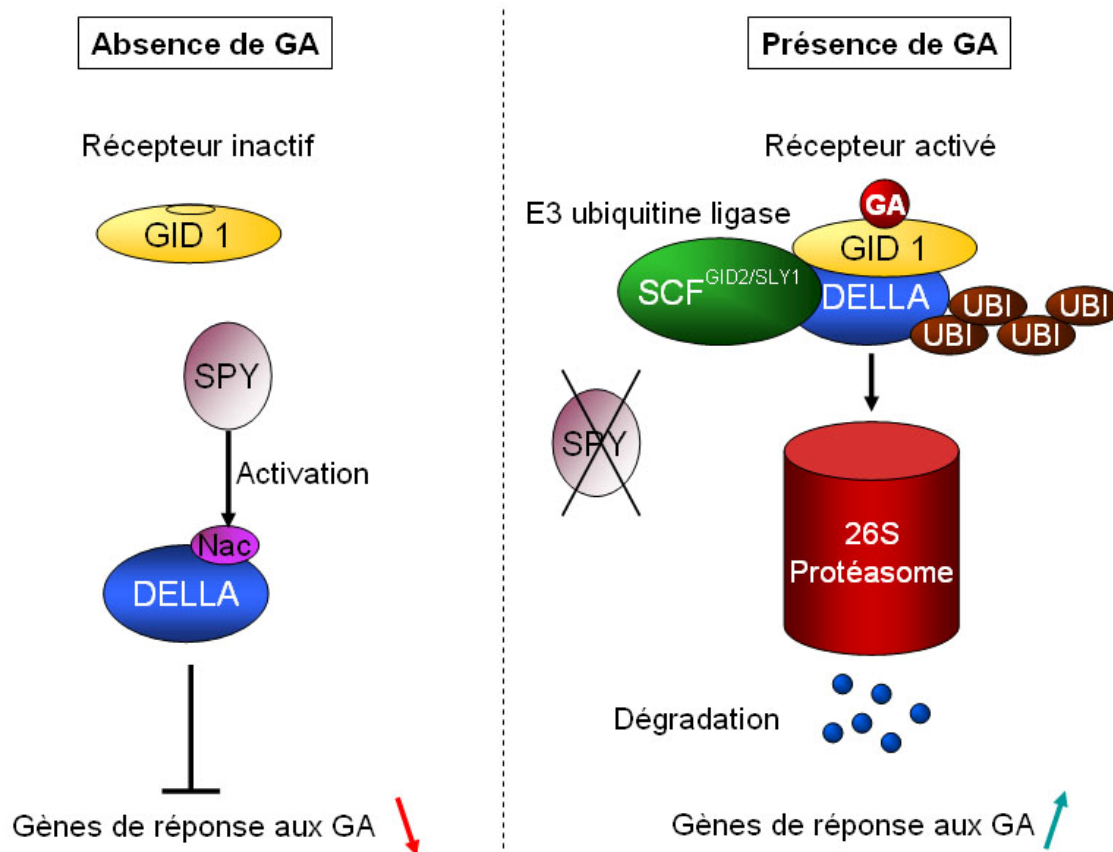


Figure 6 : Modèle schématique de la voie de signalisation des GA

En absence de GA, les récepteurs GID1 sont inactifs, et les protéines DELLA stabilisées par SPY répriment l'expression des gènes de réponse aux GA. Les détails exacts de cette répression ne sont pas encore élucidés. En présence de GA les récepteurs GID1, activés par la liaison avec leur ligand, sont capables d'interagir avec la région contenant les motifs DELLA et VHYNP des protéines DELLA et de faciliter ainsi leur interaction avec le complexe SCF^{GID2/SLY1} via le domaine GRAS. Cette interaction entraîne l'ubiquitination des protéines DELLA et leur dégradation par le protéasome. La disparition de la répression exercée par les facteurs DELLA permet l'expression des gènes de réponse aux GA.

La protéine SPY réprime le signal GA en activant les facteurs DELLA

Les mutants *spindly* (*spy*) ont été identifiés en vertu de leur résistance aux effets entraînés par le paclobutrazol, l'inhibiteur de biosynthèse des GA (Jacobsen and Olszewski, 1993). Plusieurs indications suggèrent que *SPY* est un répresseur du signal GA : Le phénotype du mutant *spy* ressemble à celui des mutants *gai* ou *rga* ou des plantes sauvages traitées par des GA exogènes, et la mutation *spy* est épistatique sur le mutant de biosynthèse *gai-3*. (Jacobsen and Olszewski, 1993; Silverstone et al., 1997). Les mutants *spy* parviennent également à supprimer partiellement les phénotypes d'insensibilité aux GA des mutants de signalisation montrant une accumulation de DELLA tels que *sly1* ou *rga-Δ17*, indiquant que *SPY* doit agir

en amont des facteurs DELLA (Peng et al., 1999; Swain et al., 2002; Shimada et al., 2006). Bien que ces observations suggèrent une baisse du niveau des protéines DELLA chez les mutants *spy*, ces derniers présentent au contraire une élévation du niveau de protéines DELLA, leur dégradation GA-dépendante via le protéasome n'étant pourtant pas affectée (Silverstone et al., 2007). Cette dernière indication implique que l'action de *SPY* sur les protéines DELLA doit se faire indépendamment de leur mécanisme de dégradation par le protéasome.

La protéine SPINDLY (SPY) appartient à la famille des O-linked N-acetylglucosamine transférases (OGT), qui catalysent le transfert d'un résidu O-GlcNAc sur les résidus Ser/Thr de protéines cibles (Jacobsen et al., 1996; Thornton et al., 1999). Les OGT sont caractérisées chez les animaux et la levure comme des protéines régulatrices très importantes, les conséquences de la modification N-acetyl qu'elles produisent sur leur cible pouvant être comparées quantitativement et qualitativement à celles de la phosphorylation des protéines (Wells et al., 2001; Love and Hanover, 2005). La structure des protéines DELLA révèle la présence de régions riches en résidus Ser et Thr qui pourraient constituer des cibles pour OGT (Peng et al., 1997; Silverstone et al., 1998). SPY pourrait donc activer ou stabiliser les protéines DELLA par l'ajout d'un résidu O-GlcNAc (**Figure 6**). L'accumulation des DELLA constatée chez le mutant *spy* serait ainsi une réponse de la plante à l'absence de répresseur DELLA actif (Schwechheimer, 2008). Bien que cette hypothèse semble très probable, aucune modification directe des protéines DELLA par SPY n'a été encore démontrée à ce jour.

II A.2/ Les Cytokinines (CK)

Depuis leur découverte dans les années 1950, il a été clairement établi que les cytokinines (CK) jouent un rôle important dans de nombreux processus tels que la division cellulaire, la régénération de cals, la croissance des racines, le contrôle de l'organogenèse au niveau du méristème apical caulinaire, l'initiation des trichomes au niveau des inflorescences, la balance nutritionnelle, la tolérance au stress, et le retard de la sénescence des feuilles. (Davies, 2004; Muller and Sheen, 2007). Leur découverte provient des travaux concernant la recherche des nutriments nécessaires pour mettre en culture *in vitro* des tissus végétaux

(culture de cals) (Skoog and Miller, 1957). Parmi les nutriments les plus efficaces se trouvaient le lait de noix de coco et l'ADN chauffé.

La kinétine (**Figure 7 A**), la première cytokinine découverte, a été isolée à partir d'ADN de sperme de hareng autoclavé. Bien que cette molécule, qui est le produit d'un réarrangement artéfactuel de l'ADN chauffé, soit l'une des CK les plus biologiquement actives, elle n'a jamais été trouvée à l'état naturel chez les plantes. Ce n'est que trente ans plus tard que le facteur de division cellulaire présent dans le lait de coco a été identifié comme de la trans-zéatine, une cytokinine naturellement produite par les végétaux supérieurs (**Figure 7 B**). Encore récemment, peu d'informations étaient connues sur les CK, mais durant ces dix dernières années, de nombreux travaux ont permis une progression rapide des connaissances sur le métabolisme, la perception et la signalisation de ces phytohormones.

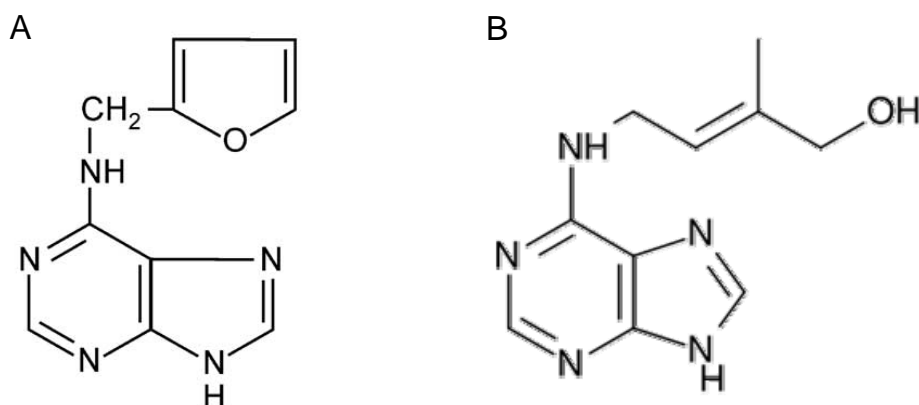


Figure 7 : Structures de la kinétine et de la trans-zéatine

A, la kinétine est la première cytokinine synthétique découverte. **B**, la trans-zéatine est la première cytokinine naturellement produite par les plantes à avoir été isolée.

II A.2.1/ Le métabolisme des CK

Dans la nature, les CK bioactives sont principalement représentées par deux molécules isoprénoides : l'isopentényl adénine (iP) et la trans-zéatine (tZ), les cytokinines aromatiques telles que la kinétine et la benzyladénine (BA) étant très rarement produites dans les tissus vivants. La voie principale proposée pour la biosynthèse des CK isoprénoides est dérivée de la N⁶-prenylation de nucléotides adénine 5'phosphates AMP, ADP ou ATP (**Figure 8**) (pour

revue : Sakakibara, 2006). La première identification des substrats utilisés dans cette voie a été découverte chez *Dictyostelium discoideum* (Taya et al., 1978). Ces travaux ont démontré que chez ce microorganisme, le diméthylallyldiphosphate (DMAPP) et l'adénine mono phosphate (AMP) sont les substrats de la réaction de biosynthèse de l'isopentenyl adénine (iP). Les enzymes catalysant cette réaction appartiennent à la famille des isopentényltransférases (IPT), dont le premier membre fut découvert chez *Agrobacterium tumefaciens*, la bactérie du sol responsable de la galle du collet (Akiyoshi et al., 1984). Chez les plantes, la réaction de biosynthèse des CK isoprénoides a lieu principalement dans les tissus racinaires, et elle est supposée similaire à celle caractérisée chez *Dictyostelium discoideum*, neuf gènes codant pour des IPT ayant été identifiés chez *A. thaliana* (Takei et al., 2001). L'obtention de trans-zéatine (tZ) est réalisée dans cette même voie grâce à l'action de monooxygénases à cytochrome P450 (appelées CYP735A chez *Arabidopsis*) qui catalysent la transformation de l'iPRM(D,T)P en tZRM(D,T)P respectivement (Sakakibara, 2006). L'iP et la tZ sont ensuite obtenues par élimination des phosphates et du ribose (**Figure 8**).

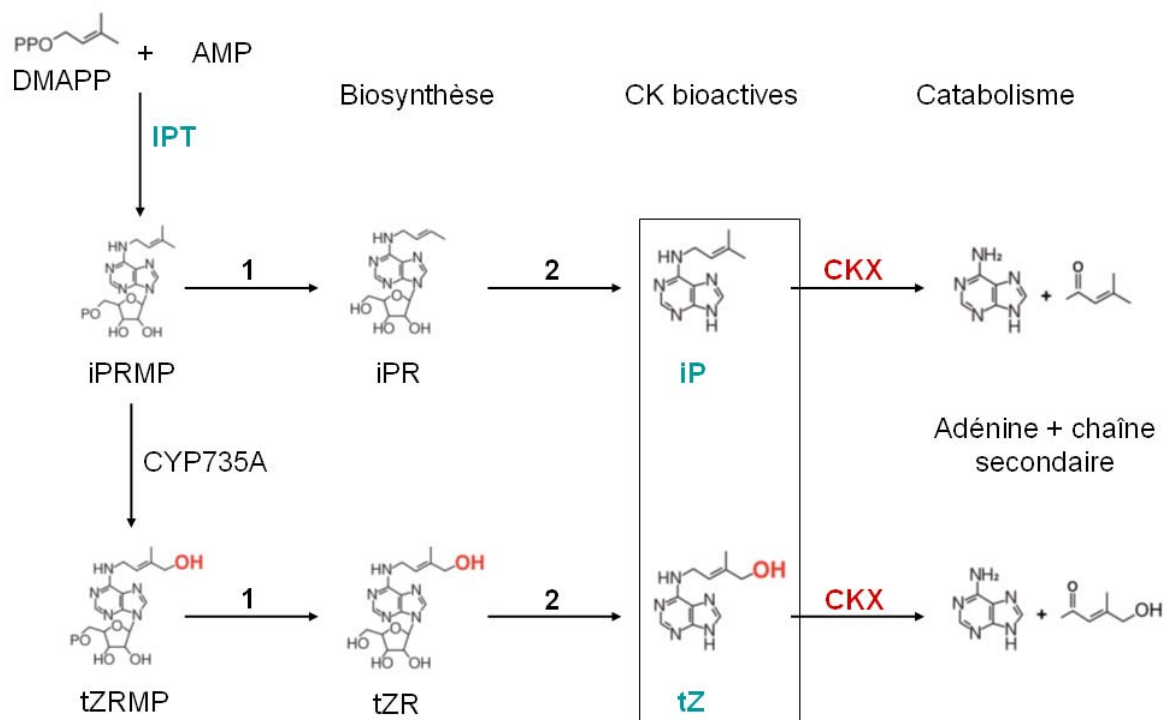


Figure 8 : Voie majoritaire du métabolisme des CK bioactives chez les plantes

Sur ce schéma, la biosynthèse des CK est représentée sur la base du substrat AMP uniquement, mais les IPT peuvent également catalyser la réaction à partir d'ADP ou d'ATP, des phosphatases permettant ensuite d'obtenir l'iPRMP. Les IPT et les CKX jouent un rôle clé dans l'homéostasie des CK. 1, 5'-ribo-nucléotidase. 2, adénosine nucléosidase.

La dégradation des CK bioactives est catalysée par les Cytokinin oxidase/déshydrogénase (CKX). Ces enzymes jouent un rôle clé dans le contrôle de l'homéostasie des CK car elles inactivent les CK de façon irréversible en clivant la chaîne latérale isoprénoïde (**Figure 8**). Les CKX ont été retrouvées chez toutes les espèces végétales étudiées. Chez *A. thaliana*, il existe 7 gènes *CKX* aux profils d'expression différents qui codent pour des enzymes aux affinités variables pour les différentes CK isoprénoïdes (Davies, 2004).

II A.2.2/ Perception et voie de transduction du signal CK : Le système à deux composantes

La découverte relativement récente des récepteurs aux CK chez *Arabidopsis* a permis une avancée rapide dans la compréhension de la voie de signalisation de ces hormones. Le fonctionnement de cette voie est similaire au système à deux composantes multi étapes His-Asp déjà caractérisé chez les bactéries et les levures (To and Kieber, 2008). Ce système consiste en un transfert de phosphates relayé via les résidus conservés histidine (His) ou aspartate (Asp), de senseurs histidine kinase, de protéines histidine de phospho-relais et de régulateurs de réponse.

Les récepteurs aux CK sont des Histidine Kinases

Chez *Arabidopsis*, les membres de la famille de protéines à activité histidine kinase (*Arabidopsis* Histidine Kinase = AHK), montrent des homologies avec le senseur hybride histidine kinase SLN1 du système à deux composantes impliqué dans la réponse au stress osmotique chez la levure (Kakimoto, 2003); (Ferreira and Kieber, 2005). Ce type de senseur est dit hybride car il est la fusion d'un domaine senseur, d'un domaine histidine kinase et d'un domaine receveur aspartate. Chez la levure, ce senseur hybride fonctionne sous forme d'un homodimère transmembranaire. Lorsqu'un signal osmotique est perçu, les domaines kinase déclenchent l'auto-phosphorylation de leurs résidus His, puis le phosphate est relayé vers le résidu Asp du domaine receveur de chaque récepteur. La protéine AHK4 d'*Arabidopsis* (également nommée CRE1 et WOL) découverte lors d'un crible de mutants déficients pour la formation de cals en réponse aux CK, a été la première à être identifiée comme un récepteur aux CK (Inoue et al., 2001). Les auteurs de ces travaux ont notamment démontré que AHK4

est capable de compléter de manière dépendante des CK une mutation du senseur SLN1 (et de rétablir ainsi la transduction du signal chez la levure). La région d'AHK4 responsable de la liaison aux CK a été caractérisée comme un domaine extracellulaire Cyclase/Histidine kinase Associated Sensing Extracellular (CHASE), qu'on retrouve chez les récepteurs d'organismes unicellulaires procaryotes et eucaryotes (Yamada et al., 2001). Deux autres protéines d'*Arabidopsis*, AHK2 et AHK3 présentent également une conservation du domaine CHASE ainsi qu'une activité d'Histidine kinase dépendante des CK (Hwang and Sheen, 2001). L'étude du triple mutant *ahk2 ahk3 ahk4* démontre une redondance fonctionnelle de ces trois récepteurs dans un grand nombre de processus directement reliés à l'activité des CK (Higuchi et al., 2004; Riefler et al., 2006).

Les AHP relaient le signal vers le noyau

Dans les systèmes à deux composantes qui utilisent un senseur hybride comme chez la levure, le signal est transduit grâce à une protéine histidine de phototransfert (HPT) qui relaye le phosphate depuis la région receveuse du senseur jusqu'à un régulateur de réponse (RR) présent dans le noyau. Ce dernier, une fois phosphorylé, se comporte comme un facteur de transcription en déclenchant l'expression de gènes cibles. Chez *Arabidopsis*, 5 protéines Histidine de phosphotransfert (*Arabidopsis* Histidine Phosphotransfert = AHP) ont été identifiées et semblent jouer un rôle redondant dans la transduction du signal CK (Hwang and Sheen, 2001; Tanaka et al., 2004; Hutchison et al., 2006; To and Kieber, 2008). En effet, ces protéines sont transduites vers le noyau en réponse aux CK, les profils d'expression des gènes *AHP* se superposent et la mutation d'au moins trois d'entre eux entraîne des phénotypes d'insensibilité aux CK. Récemment, il a été démontré qu'une sixième protéine AHP, qui présente une mutation au niveau de son résidu His, empêchant ainsi toute phosphorylation, joue un rôle de régulateur négatif du signal CK, probablement en rentrant en compétition avec les AHP fonctionnelles pour l'interaction avec les récepteurs AHK activés et les régulateurs de réponse (Mahonen et al., 2006).

De nombreux régulateurs de réponse de la voie des CK avec un domaine receveur à résidu Asp sont également présents dans le génome d'*Arabidopsis* (*Arabidopsis* Response Regulator = ARR). Ces régulateurs ont été séparés en deux groupes A et B, sur la base de leur similarité de séquence, de leur activation transcriptionnelle par les CK, et de leur fonction (D'Agostino et al., 2000; Mason et al., 2004).

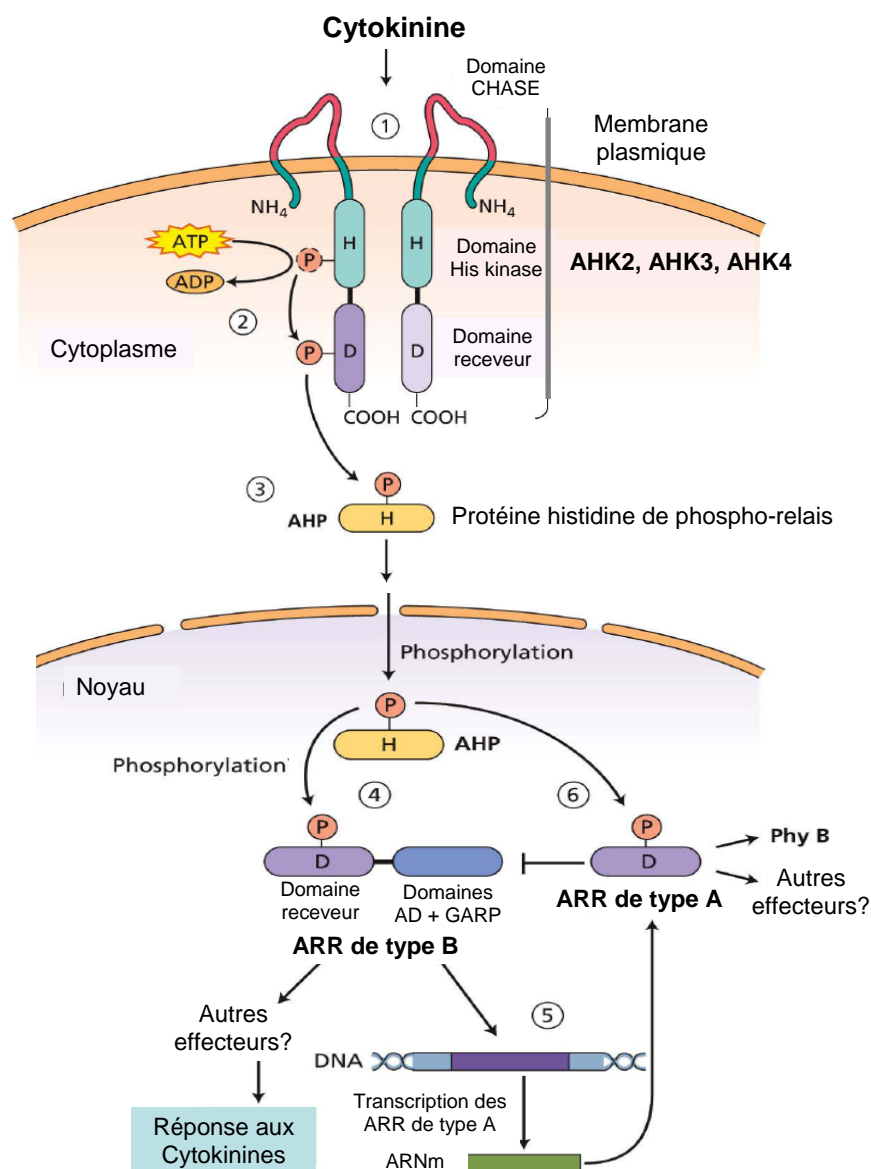


Figure 9 : Modèle de la voie de signalisation des CK chez Arabidopsis

Les événements de phosphorylation sont établis en se basant sur les connaissances des systèmes à deux composantes procaryotiques. Les Cytokinines sont perçues au niveau de la membrane plasmique par les domaines CHASE d'un homo ou hétéro dimère de récepteurs AHK2, 3 ou 4 (1). La liaison des récepteurs avec une molécule de Cytokinine déclenche l'auto-phosphorylation du résidu histidine (H) par le domaine kinase et le transfert du phosphate vers le résidu Aspartate (D) du domaine receveur (2). Un phosphotransfert s'effectue alors depuis le récepteur activé vers le résidu His d'une protéine de relais AHP (3). Les protéines AHP phosphorylées migrent dans le noyau et transfèrent leurs phosphates sur le résidu Asp des régulateurs de réponse (ARR) (4).

Les ARR de type B activent alors la transcription des gènes cibles des CK dont les ARR de type A (5). Ces derniers répriment le signal CK créant ainsi une boucle de rétrocontrôle, et régulent d'autres processus comme le contrôle du cycle circadien par l'activation de la protéine PhyB (6).

Les ARR de type A sont les premiers gènes de réponse aux CK

Les protéines ARR de type A sont composées exclusivement du domaine receveur Asp et d'une courte extension C-terminale. L'expression des gènes *ARR* de type A augmente rapidement en réponse aux CK exogènes et ils sont considérés à l'heure actuelle comme les principaux gènes de réponse aux CK (D'Agostino et al., 2000; Kiba et al., 2002; Rashotte et al., 2003). Plusieurs travaux démontrent que la fonction principale des *ARR-A* semble être la répression du signal CK. En effet, bien que les simples mutants *arr-a* ne présentent aucun phénotype particulier, les plantes dans lesquelles au moins 7 de ces gènes sur 11 sont mutés montrent une forte hypersensibilité aux CK dans de nombreux tests physiologiques incluant les tests d'inhibition de la croissance racinaire, de sénescence des feuilles, et de formation de cals (To et al., 2004). A l'inverse, la surexpression d'un seul de ces gènes est capable d'entraîner une réduction de la sensibilité aux CK (Kiba et al., 2003). Cette forte redondance fonctionnelle des *ARR-A* est en adéquation avec une superposition importante de leurs profils d'expression (Ferreira and Kieber, 2005). Enfin, il a été montré que les *ARR-A* entraînent une régulation négative de leur propre expression. La surexpression de quatre *ARR-A* représentatifs (*ARR4*, *ARR5*, *ARR6*, et *ARR7*) permet en effet d'entraîner la diminution de l'expression d'une construction *pARR6::LUC* quantifiable par une diminution d'activité luciférase (Hwang and Sheen, 2001). Les ARR de type A jouent donc un rôle extrêmement redondant dans la formation d'une boucle de régulation négative du signal CK.

Bien qu'il s'agisse là de leur fonction principale, il semble que ces protéines se partagent également des rôles dans le contrôle d'autres processus. Des travaux montrent par exemple l'implication d'un sous groupe de gènes *ARR-A* dans la modulation du rythme circadien (Hanano et al., 2006; Salome et al., 2006). Cette modulation passe notamment par l'interaction de la protéine *ARR4* avec le photorécepteur *PhyB* qui le stabilise ainsi dans sa forme active (Sweere et al., 2001). D'autres travaux montrent que les gènes *ARR4* et *ARR5* jouent probablement un rôle dans la réponse aux stress. L'étude des mutants des trois récepteurs au CK démontre que le signal CK entraîne la répression de la réponse au stress osmotique (Tran et al., 2007). Il a été démontré que les gènes *ARR4* et *ARR5* sont induits en réponse à ces mêmes stress (Urao et al., 1998). Cette induction doit permettre la répression du signal CK en cas de stress osmotiques. Si la compréhension du rôle des *ARR-A* a progressé, peu d'informations restent en revanche connues sur la façon dont les *ARR-A* agissent d'un point de vue moléculaire.

Les ARR de type B sont les principaux médiateurs du signal CK

Les ARR de type B présentent des caractéristiques biochimiques et fonctionnelles très différentes des ARR-A. En effet, leur expression n'est pas induite par les CK (Imamura et al., 1999; Kiba et al., 1999), et ils possèdent en plus du domaine receveur Asp une longue extension C-terminale portant un domaine GARP qui a été identifié comme un domaine de liaison à l'ADN chez plusieurs espèces (GOLDEN2 du maïs, ARR d'Arabidopsis, et Psr1 de Chlamydomonas). D'un point de vue fonctionnel, les ARR-B sont décrits comme des facteurs de transcription qui activent l'expression des gènes cibles du signal CK. L'activation de l'expression des *ARR-A* par les ARR-B est notamment bien caractérisée (Sakai et al., 2000; Hwang and Sheen, 2001; Sakai et al., 2001; Rashotte et al., 2003). Le domaine GARP leur permet de lier l'ADN via une séquence consensus (G/A)GAT(T/C), tandis qu'une séquence riche en glutamine localisée dans leur région C-terminale est responsable de leur fonction d'activateurs de la transcription.

Etonnamment, en dehors des *ARR-A*, peu de gènes ont été identifiés comme étant induits de façon significative, spécifique et rapidement en réponse à un traitement par CK. Les analyses par micro-array du transcriptome de plantes traitées avec l'hormone présentent une très faible induction de l'expression d'autres gènes et une grande variabilité des résultats d'une expérience à l'autre (Muller and Sheen, 2007). Ceci pourrait être dû à l'effet de la boucle de rétrocontrôle qui s'applique sur le signal des CK, et qui atténuerait l'activation de l'expression des gènes cibles. Il est de plus possible que les résultats des analyses, effectuées sur les plantules entières, soient moyennés par des rôles divergents voir antagonistes des CK selon le tissu étudié. Les CK montrent par exemple une action très fortement opposée entre les tissus racinaires et aériens notamment au niveau du développement des méristèmes (Werner et al., 2003; Dello Ioio et al., 2007). Parmi les principaux gènes qui semblent également répondre aux CK, plusieurs sont reliés au métabolisme et au signal des hormones auxine, éthylène, et GA, tandis que quelques uns montrent une implication dans la résistance aux blessures. Une nouvelle famille de 6 gènes nommés *CYTOKININ RESPONSE FACTORS (CRF)* et codant pour des facteurs de transcription APETALA2-like a également été identifiée (Rashotte et al., 2003; Brenner et al., 2005). Tous ces gènes à l'instar des *ARR-A* portent généralement dans leur promoteur la séquence consensus reconnue par le domaine GARP (Rashotte et al., 2003) ce qui indique que la gamme de gènes contrôlés par les ARR-B en réponse aux CK est large, et que ces protéines sont les effecteurs majoritaires de l'action hormonale.

Modèle de la voie de transduction du signal CK

Un modèle du système à deux composantes du signal CK a été établi en se basant sur ces données expérimentales et le fonctionnement déjà connu chez les bactéries et les levures (**Figure 9**) (To and Kieber, 2008). Le signal est perçu par la liaison de l'hormone à un homo ou hétérodimère AHK2, 3 ou 4. Cette liaison déclenche l'activité de la sous-unité kinase, qui utilise l'ATP comme donneur de phosphates pour phosphoryler son propre résidu His. Le phosphate est alors relayé vers le résidu Asp des domaines receveurs avant d'être transféré sur le résidu His d'une protéine navette AHP. Cette dernière migre ensuite dans le noyau et transfère son phosphate sur le résidu Asp d'un régulateur de réponse de type A ou B. Les ARR-B une fois phosphorylés sont capables d'activer la transcription des gènes cibles des CK et notamment celle des *ARR-A*, les premiers gènes de réponse. Les ARR-A une fois activés par phosphorylation, créent une boucle de rétrocontrôle en réprimant le signal CK probablement via une inactivation des ARR-B (les mécanismes exacts de cette répression ne sont pas encore élucidés), et agissent secondairement sur d'autres processus dépendants ou non des CK comme le contrôle du cycle circadien via la protéine PhyB.

II B. La réponse croisée des GA et des CK

Bien que chaque hormone montre une certaine spécialisation dans une ou plusieurs actions particulières, de nombreux processus prouvent que la règle générale consiste plutôt en une intervention simultanée de plusieurs d'entre elles sur un même processus. Cette intervention qui peut avoir lieu de façon synergique ou antagoniste est appelée réponse croisée des hormones (ou cross talk en anglais). Les hormones GA et CK montrent notamment un effet antagoniste sur de nombreux processus incluant l'élongation des racines et des tiges, la régénération de cals en culture *in vitro*, l'activité méristématique, et la différenciation des cellules épidermiques trichomes (Greenboim-Wainberg et al., 2005; Jasinski et al., 2005; Weiss and Ori, 2007). Les mécanismes impliqués dans cette réponse croisée des GA et des CK commencent à être élucidés et le facteur SPINDLY (SPY) a été récemment identifié comme un médiateur clé de ces processus (Greenboim-Wainberg et al., 2005).

Les GA contrôlent la réponse aux CK par l'intermédiaire de SPY

Comme on l'a vu précédemment, les mutants *spy* présentent des phénotypes qui rappellent ceux de plantes sauvages traitées aux GA exogènes, ce qui est cohérent avec leur supposé rôle d'activateur des protéines DELLA. Cependant, l'étude des mutants *spy* a également permis d'identifier un certain nombre de phénotypes qui suggèrent un rôle du gène *SPY* dans des voies indépendantes de l'activité des GA. Les plantes *spy* présentent en effet des hypocotyles réduits en taille, des feuilles plus petites, et une phyllotaxie anormale, tous ces phénotypes étant absents chez les plantes traitées aux GA (Swain et al., 2001). Greenboim-Wainberg et ses collaborateurs (2005) ont démontré que *SPY* joue un rôle d'activateur du signal CK, ce qui pourrait expliquer la présence de ces phénotypes non reliés aux GA chez le mutant *spy*. Dans cette publication, les auteurs présentent en effet plusieurs résultats qui démontrent une insensibilité des mutants *spy* aux CK dans différents tests physiologiques (inhibition de la croissance racinaire, altération de la morphogenèse foliaire, et inhibition de la sénescence des feuilles), de même qu'une suppression de l'induction du gène *ARR5* (un *ARR* de type A) par les CK. Les auteurs de ce travail démontrent de plus que les GA répriment également la réponse aux CK et que cette répression nécessite l'action de *SPY*. Les mécanismes par lesquels les GA agiraient sur *SPY* pour effectuer cette répression sont en revanche totalement inconnus à l'heure actuelle. La manière dont *SPY* agit dans cette voie hormonale reste également très hypothétique. Il est cependant vraisemblable que cette action devrait faire intervenir l'activité O-GlcNac transférase de cette protéine (pour activer une protéine intervenant dans la cascade de phosphorylation par exemple) comme cela est supposé pour la réponse aux GA.

Les CK contrôlent l'homéostasie des GA

Si les GA peuvent comme on vient de le voir inhiber la réponse aux CK via *SPY*, les CK possèdent un contrôle sur l'homéostasie des GA bioactives. Des analyses micro-arrays réalisées sur des plantes traitées aux CK montrent en effet que ces hormones semblent réprimer l'expression des gènes *GA20ox* et *GA3ox* qui codent pour des enzymes clés de la biosynthèse des GA. (Brenner et al., 2005). De plus, les CK induisent également l'expression du gène *GA2ox2*, codant pour une enzyme de catabolisme des GA bioactives (Jasinski et al., 2005).

L'ensemble de ces données montre que les GA et les CK présentent une action mutuelle antagoniste et que la protéine SPY joue un rôle central dans la réponse croisée de ces deux hormones (**Figure 10**). Les effets cellulaires opposés des CK et des GA (les premières activant la division tandis que les secondes stimulent à l'inverse la différenciation), semblent cohérents avec l'effet antagoniste de ces deux hormones sur la plupart des processus étudiés.

Cependant, l'étude de certaines voies de développement montre que cette règle n'est pas toujours respectée, illustrant ainsi le niveau de complexité de la régulation hormonale. Dans la partie suivante, deux exemples de processus de développement sous le contrôle des GA et des CK seront présentés : le développement du méristème apical caulinaire (SAM) qui montre un antagonisme classique des CK et des GA et celui des cellules épidermiques trichome qui présente une interaction plus complexe de ces deux hormones.

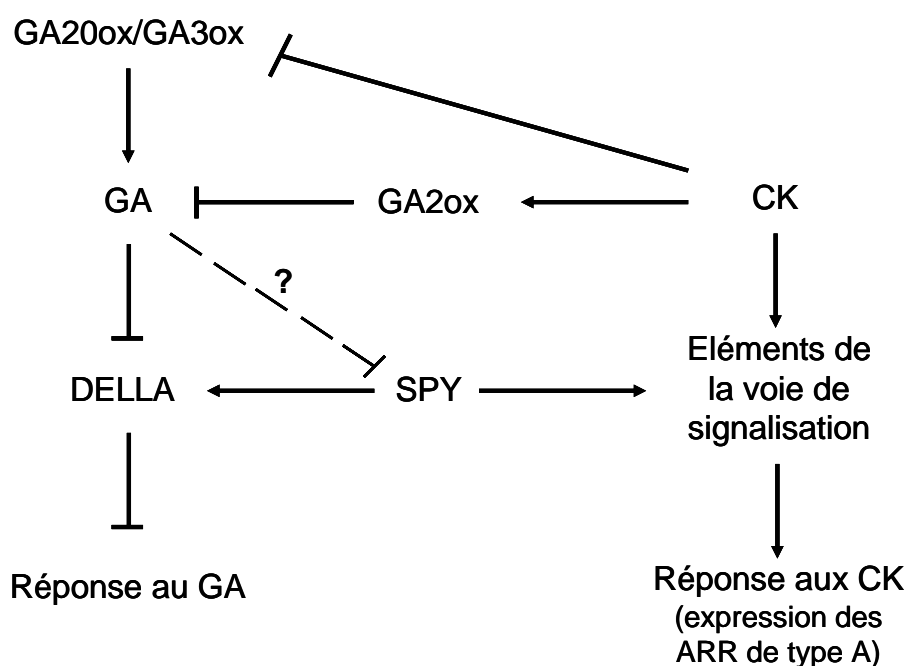


Figure 10 : Modèle schématique du réseau d'interactions connu actuellement entre les GA et les CK

Les CK contrôlent l'homéostasie des GA bioactives par la régulation de gènes du métabolisme. Les GA exercent aussi un contrôle négatif sur le signal CK. Ce contrôle passe par la protéine OGT SPY qui a une action positive sur le signal CK et négative sur le signal GA. Cette figure est adaptée de (Weiss and Ori, 2007).

II C. Rôle des GA et des CK dans le développement végétatif des plantes

II C.1/ Implication des hormones dans le développement du SAM

Nous allons ici décrire le rôle des hormones GA et CK dans le contrôle de la maintenance du SAM et de la production des organes latéraux, ainsi que leur relation avec les facteurs impliqués dans ces processus. En raison de leur importance dans l'organogenèse, le rôle des auxines sera également succinctement décrit. Les informations concernant cette partie sont résumées et illustrées dans la *Figure 11*.

II C.1.1/ Les CK sont impliquées dans la maintenance du SAM

Plusieurs évidences suggèrent depuis de nombreuses années un rôle des CK dans le maintien du SAM conjointement à l'action des facteurs KNOXI. Tout d'abord, les CK sont connues pour leur rôle activateur dans la division et le cycle cellulaire notamment par la régulation des gènes de cyclines (Skoog and Miller, 1957; Riou-Khamlichi et al., 1999). Deuxièmement, la surexpression des gènes de biosynthèse des CK *ISOPENTENYL TRANSFERASE (IPT)* entraîne l'apparition de méristèmes ectopiques au niveau des feuilles conduisant à une modification de leur morphologie, des phénotypes similaires à ceux qu'on peut observer par l'expression ectopique des gènes *KNOXI* (Estruch et al., 1991; Li et al., 1992; Sinha et al., 1993). Pour finir, il a été prouvé que les plantes qui surexpriment des gènes *KNOXI* montrent une élévation de leur niveau en CK (Frugis et al., 2001). Malgré cette abondance d'indices, ce n'est que récemment que des preuves physiologiques de l'implication des CK dans l'organisation du méristème ont pu être enfin obtenues, en particulier grâce à l'étude de mutants du métabolisme et de la voie de signalisation des CK.

La modification de l'activité des CK entraîne des anomalies fonctionnelles du SAM

Le triple mutant des récepteurs aux CK *ahk2 ahk3 ahk4* montre une grande variété de phénotypes parmi lesquels on peut noter une réduction drastique de la taille du méristème et du taux d'initiation de feuilles. (Higuchi et al., 2004; Riefler et al., 2006). De même, la mutation du gène *LONELY GUY (LOG)* qui code pour une enzyme impliquée dans la biosynthèse des CK chez le riz, et la surexpression des enzymes du catabolisme CKX entraînent des phénotypes similaires (Werner et al., 2003; Kurakawa et al., 2007).

A l'inverse, les plantes mutées pour le gène *ALTERED MERISTEM PROGRAM1* (*AMPI*), qui code pour une enzyme impliquée comme les CKX dans la dégradation des CK, présentent un méristème élargi et un taux de production de feuilles anormalement élevé (Helliwell et al., 2001). Il semble donc que l'action des CK, en accord avec leur fonction de contrôle du cycle cellulaire, soit indispensable au maintien du SAM.

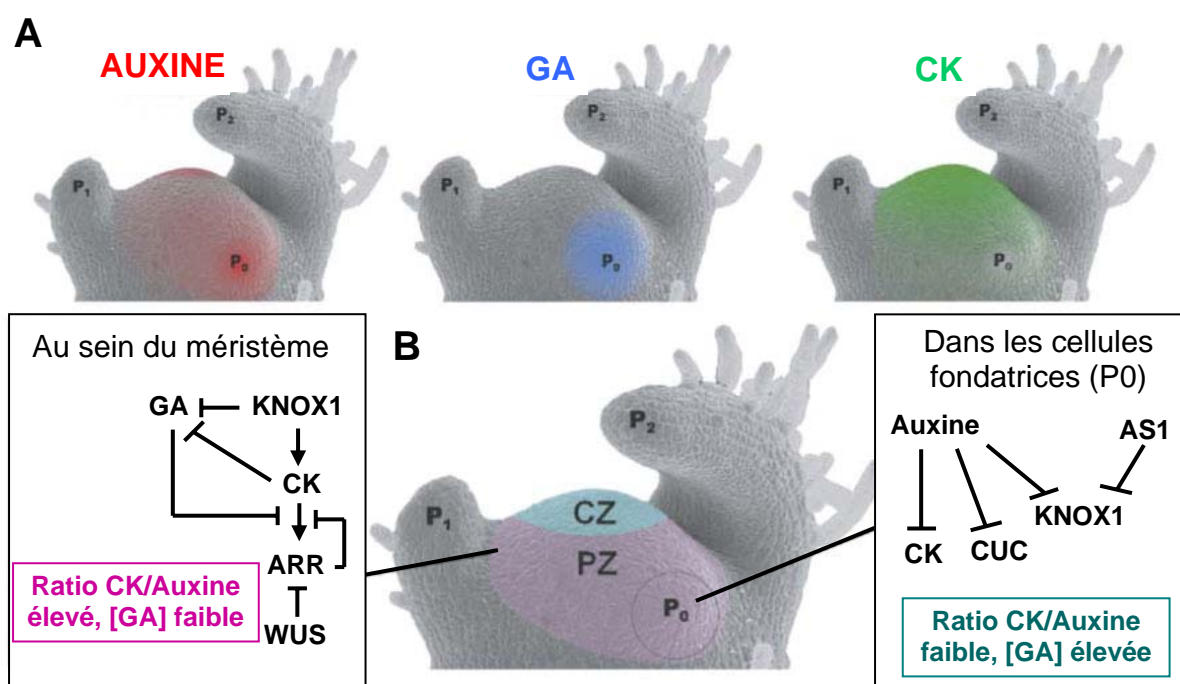


Figure 11 : Représentation schématique des interactions entre hormones et facteurs de transcription nécessaires au développement correct du SAM

A, Distribution supposée des hormones auxines, gibbérellines (GA), et cytokinines (CK) au moment de l'initiation d'un primordium (P0). **B**, Modèle des interactions génétiques et hormonales permettant à la fois le maintien du SAM et l'initiation de nouveaux primordia. Au sein du méristème, les gènes KNOXI stimulent la biosynthèse des CK et répriment la biosynthèse et l'activité des GA. WUS active le signal CK par répression directe des ARR de type A. Le ratio fort CK/Auxine et l'absence de GA ne permettent pas l'initiation d'organes. Dans la zone où se trouvent les cellules fondatrices du futur primordium (stade P0), le ratio CK/Auxine bascule en raison de l'accumulation d'auxine. Les Auxines et AS1 répriment alors l'expression des KNOXI et la biosynthèse des CK, et ils restreignent l'expression des CUC au niveau de la bande cellulaire qui entoure les cellules fondatrices. Ces conditions sont favorables à l'accumulation des GA dans cette zone. Le niveau élevé de GA et le faible ratio CK/Auxine permet alors l'initiation de l'organe. Cette figure est adaptée de (Shani et al., 2006)

L'action des CK dans le SAM est contrôlée par les gènes KNOXI et WUS

Un lien entre les CK et les gènes *KNOXI* a pu être enfin découvert grâce à des travaux récents qui démontrent que ces derniers contrôlent effectivement la production de CK dans le SAM (Jasinski et al., 2005; Yanai et al., 2005). Ces travaux démontrent notamment que l'expression ectopique des gènes *KNOXI* entraîne une augmentation rapide du gène de biosynthèse *IPT7*, qui se traduit par une accumulation de CK dans la plante. Les auteurs montrent de plus que la mutation du gène du récepteur *AHK4* aggrave le phénotype d'un allèle mutant faible *stm*. D'autres travaux ont prouvé que conjointement aux gènes *KNOXI*, le gène *WUSHEL (WUS)* stimule également le signal CK via la répression directe de l'expression des répresseurs *ARR* de type A (Leibfried et al., 2005). Le contrôle des gènes *KNOX* et de *WUS* sur le fonctionnement et le maintien du SAM nécessite donc l'action des CK (**Figure 11 B**).

II C.1.2/ Les GA stimulent le développement des primordia foliaires

On sait désormais que les GA jouent un rôle important dans l'initiation et la morphogenèse des feuilles au niveau du SAM (Hay et al., 2004; Fleet and Sun, 2005). La restriction spatiale de leur accumulation dans la région méristématique est notamment d'une importance cruciale dans la spécification de la frontière séparant le méristème de la zone tissulaire dans laquelle se trouvent les cellules fondatrices qui constitueront le futur primordium (P0). A l'exception de cette zone, l'homéostasie des GA est strictement réprimée dans le SAM (**Figure 11 A**).

Les gènes KNOXI et les CK répriment l'homéostasie des GA dans le SAM

Cette répression est possible grâce à l'action combinée des gènes *KNOX* et des CK qui répriment l'expression des enzymes de biosynthèse GA20-oxidases et ont à l'inverse une action positive sur l'expression des enzymes du catabolisme GA2-oxidases (**Figure 11 B**) (Sakamoto et al., 2001; Hay et al., 2002; Brenner et al., 2005; Jasinski et al., 2005). Jasinski et ses collaborateurs (2005) suggèrent également que les GA2-oxidases dont l'expression est contrôlée par *STM* et les CK seraient exprimées au niveau de la limite cellulaire entre les primordia et le méristème créant ainsi une barrière infranchissable pour les GA bioactives. La nécessité d'une exclusion des GA du méristème des plantes sauvages est illustrée par plusieurs travaux qui montrent qu'une telle action ectopique des GA entraîne de graves dysfonctionnements du méristème. Ainsi, la mutation *spy*, qui confère une augmentation du

signal GA et une diminution du signal CK, renforce le phénotype des mutants *stm*. De même, la surexpression d'une enzyme de désactivation des CK chez un mutant *spy* est capable d'entraîner un phénotype réminiscent de celui de *stm* (Hay et al., 2002; Jasinski et al., 2005). En accord avec leur rôle dans la différenciation cellulaire, les GA semblent donc avoir une action négative sur le maintien du SAM, ce qui met en valeur l'importance du contrôle de leur homéostasie par les gènes *KNOXI* et les CK.

Les GA contrôlent la morphogenèse foliaire

A l'inverse, l'activité des GA est requise pour le développement correct des primordia foliaires. Il a déjà été mentionné précédemment que les plantes transgéniques qui expriment de manière ectopique des protéines KNOXI ou IPT (entraînant une augmentation de la production de CK) présentent des défauts importants du développement foliaire. L'ajout de GA exogènes sur les feuilles de ces plantes ou l'introgession d'une mutation *spy* restaure un phénotype sauvage, ce qui indique que ces anomalies de développement sont probablement dues à une répression de l'action des GA par les CK et les *KNOXI* dans les feuilles (Hay et al., 2002). L'action exacte des GA dans la croissance des primordia est encore peu connue mais l'hypothèse actuelle la plus probable au vu de leurs actions cellulaires, est qu'elles induiraient des divisions et des expansions cellulaires longitudinales orientées perpendiculairement à l'axe du SAM, favorisant ainsi la croissance dirigée du primordium (Hay et al., 2004).

II C.1.3/ Les Auxines déclenchent l'initiation des primordia

Les auxines sont depuis longtemps suspectées de jouer un rôle dans la phyllotaxie (Snow M, 1937). Leur rôle dans le SAM a par conséquent fait l'objet de nombreux travaux et leur action sur l'initiation des organes est désormais bien connue. Des travaux se basant sur l'étude de la localisation du transporteur d'auxine PINFORMED1 (PIN1) et de la distribution de ces hormones ont notamment permis de modéliser les flux d'auxine et leur implication sur la phyllotaxie (Reinhardt et al., 2000; Vernoux et al., 2000; Reinhardt et al., 2003). Les auxines sont synthétisées dans les jeunes tissus de l'apex et sont transportées selon un flux polarisé vers la zone périphérique du SAM où leur accumulation entraîne l'initiation d'un nouveau primordium foliaire (P0) (**Figure 11 A**). Au fur et à mesure que ce jeune primordium se développe, il se comporte comme un puits qui capte les auxines et empêche ainsi l'accumulation de l'hormone à sa périphérie. Ce recrutement des auxines empêche toute

initiation de nouveaux primordia dans l'entourage du primordium en développement et entraîne ainsi une phyllotaxie correcte des différents organes.

De part leur rôle dans l'initiation des organes, l'action des auxines apparaît donc conjointe à celle des GA et opposée à celle des CK et des gènes *KNOXI*. Plusieurs travaux récents confirment cette opposition, et montrent que les auxines répriment l'expression des gènes *KNOXI* et *CUC* dans les primordia, conjointement à *ASI* (**Figure 11 B**). (Vernoux et al., 2000; Furutani et al., 2004; Hay et al., 2006). D'autres travaux montrent également que les auxines répriment la biosynthèse des CK dans les tissus aériens (Nordstrom et al., 2004; Tanaka et al., 2006). Cette répression doit ainsi entraîner la levée de l'inhibition des GA dans les cellules fondatrices du futur primordium conduisant à leur accumulation et au déclenchement du développement de l'organe.

II C.2/ Le rôle des GA et des CK dans l'endoréplication et le développement des trichomes

Les GA activent le développement des trichomes

Les GA sont les premières hormones pour lesquelles un rôle positif dans l'endoréplication et la différenciation des trichomes d'*A. thaliana* a été démontré. Les plantes déficientes en GA telles que le mutant *gal-3* présentent un phénotype glabre, l'ajout de GA exogènes restaurant un phénotype sauvage chez ces plantes. A l'inverse, le mutant *spy*, entraîne une augmentation de la densité, et du nombre d'endoréplication des trichomes foliaires (conduisant à des trichomes sur-branchés) (Chien and Sussex, 1996; Perazza et al., 1998; Perazza et al., 1999). L'action des GA sur les trichomes se fait via la régulation de plusieurs facteurs de transcription. Il a notamment été démontré dans notre équipe que l'hormone stimule l'expression de *GL1* (Perazza et al., 1998), l'un des gènes clés responsables de l'induction des trichomes (voir chapitre I B.3). Plus récemment, le gène *GLABROUS INFLORESCENCE STEMS1 (GIS1)* a été identifié (Gan et al., 2006). Ce gène est spécialisé dans l'initiation des trichomes au niveau des inflorescences et il semble répondre aux GA d'une manière similaire à *GL1*. *GIS1* possède deux homologues chez *Arabidopsis* : *GIS2*, et *ZFP8*. Ces deux gènes présentent une fonction partiellement redondante avec *GIS1* et leur niveau de transcrits est également augmenté en réponse aux GA (Gan et al., 2007). Ces trois gènes *GIS* semblent agir en amont de *GL1*.

Les CK sont impliquées dans l'initiation des trichomes d'inflorescences

Des travaux récents ont démontré un nouveau rôle des CK dans l'initiation des trichomes au niveau des inflorescences. L'application exogène de CK ou l'expression ectopique d'une enzyme IPT (biosynthèse des CK) entraîne en effet une augmentation du nombre de trichomes sur les sépales, les feuilles caulines, et les tiges, cet effet semblant s'accroître à chaque nouvel internoeud (Greenboim-Wainberg et al., 2005; Gan et al., 2007). A l'inverse, la surexpression de l'enzyme CKX2 (inactivation des CK) entraîne une diminution du nombre de trichomes sur les inflorescences par rapport aux plantes sauvages. Gan et ses collaborateurs (2007) ont démontré que l'induction de l'initiation des trichomes d'inflorescence par les CK passe notamment par l'action des gènes *GIS2* et *ZFP8*. Leurs travaux démontrent de plus que les CK activent l'expression de *GIS2* et de *GLI* dans les inflorescences (Gan et al., 2007). Ce rôle des CK dans les inflorescences s'oppose à l'action habituelle de ces hormones. Les CK sont en effet connues pour activer la division cellulaire. Cette action se fait notamment via le contrôle par l'hormone de l'expression des gènes *CYCD3* (Riou-Khamlichi et al., 1999), qui entraînent une inhibition des processus d'endoréplication au profit de la division mitotique chez les cellules épidermiques foliaires incluant les trichomes (Schnittger et al., 2002; Dewitte et al., 2007). Ces observations semblent donc suggérer un rôle opposé des CK entre les feuilles et les inflorescences dans les processus d'endoréplication.

Une interaction inhabituelle des GA et des CK dans le développement des trichomes

La nature exacte de l'interaction entre les GA et les CK dans la régulation des trichomes est encore peu comprise. Leur action qui semble antagoniste sur le développement des trichomes foliaires, se montre à l'inverse synergique au niveau des trichomes d'inflorescences, puisque les deux hormones stimulent l'expression de *GLI* et l'initiation de ces derniers. Cependant, cette synergie apparaît complexe et il semble que les deux hormones continuent à présenter une exclusion mutuelle, puisque l'action des GA est remplacée progressivement par celle des CK à mesure que les inflorescences se développent. De plus, les plantes sauvages traitées avec des GA exogènes ou les plantes mutantes *spy* (signal GA constitutif) présentent dans les deux cas une suppression de l'induction des trichomes en réponse au CK sur les sépales (Greenboim-Wainberg et al., 2005). L'étude du phénotype des mutants de la famille de gènes *GIS* va également dans le sens d'un relais progressif entre l'action des GA et celle des CK. En effet dans leurs travaux sur cette famille, Gan et ses collaborateurs (2007) démontrent que bien que les trois gènes *GIS* présentent une redondance fonctionnelle dans l'initiation des

trichomes d'inflorescence, chaque gène possède une action tissulaire spécifique en réponse aux hormones. *GIS1* répond par exemple uniquement aux GA et présente une spécialisation fonctionnelle au niveau du premier internœud. *ZPF8* semble lui agir en réponse aux deux hormones principalement au niveau de la 3^{ème} feuille cauline. *GIS2* enfin, est le seul des trois gènes dont l'expression est exclusivement régulée par les CK, et il présente une action très forte au niveau des sépales, région où l'action des CK est également très importante. Cet exemple montre bien à quel point l'action des hormones végétales est complexe et combien la modélisation généralisée de leurs interactions est difficile.

III Découverte d'une nouvelle famille multigénique dont les membres pourraient jouer un rôle dans les voie hormonales de développement

III A. La découverte du facteur GeBP

La recherche d'un régulateur direct de GL1

L'équipe de recherche dans laquelle j'ai réalisé ma thèse s'intéresse à l'étude des processus de différenciation contrôlés par les hormones en utilisant comme modèle le développement des cellules épidermiques trichomes d'*Arabidopsis*. Un des premiers résultats marquants de ce travail a été la démonstration du rôle joué par les GA dans l'activation du gène clé de l'induction des trichomes : *GL1* (Perazza et al., 1998). Ce dernier a la particularité de présenter en 3' de sa région codante une séquence enhancer qui est essentielle à son expression correcte. (Larkin et al., 1993) (**Figure 12**).

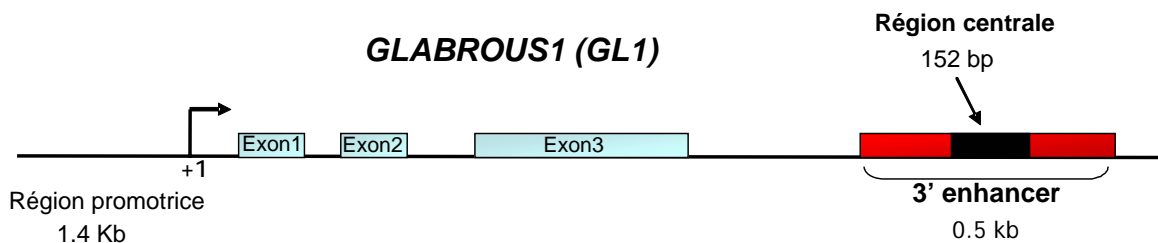


Figure 12 : Locus du gène MYB GL1 d'Arabidopsis.

Le gène *GL1* code pour un facteur de transcription MYB. Il se compose de 3 exons de 139pb, 130pb, et 418pb.

Deux régions régulatrices sont requises pour le contrôle tissu spécifique de son expression par les GA : une région promotrice 5' de 1,4 Kb et une séquence enhancer 3' de 0,5 Kb.

Dans le but d'identifier un facteur impliqué dans le contrôle direct de l'expression de *GL1* et susceptible de répondre au GA, un crible simple hybride dans la levure a été réalisé au laboratoire. Des levures ont été cotransformées avec une fusion entre la région centrale de l'enhancer de *GL1* et le gène rapporteur *His* et une banque d'expression d'ADNc de rosette fusionnée avec le domaine activateur de Gal4 (AD). La sélection des levures, sur un milieu

dépourvu d'histidine, a permis d'identifier 5 clones positifs sur 7.10^6 colonies. Ces 5 clones contenaient tous le même ADNc codant pour une protéine de 35 KDa, de fonction inconnue, baptisée GeBP (pour "GLI enhanBnding Protein") (Curaba et al., 2003).

Les domaines central et C-terminal de GeBP sont nécessaires à sa liaison à l'ADN

La liaison de GeBP à la séquence enhancer de *GLI* a été vérifiée par retard sur gel. Afin de déterminer les régions protéiques responsables de cette liaison, une série de délétions de la protéine GeBP fusionnées au AD a été utilisée pour des expériences de simple hybride chez la levure en se servant de la fusion de l'enhancer de *GLI* avec le gène rapporteur *His3* déjà utilisée lors du crible décrit précédemment. Ces expériences ont permis de démontrer qu'une région centrale de 97 résidus, et une région C-terminale de 79 résidus étaient toutes deux essentielles pour la liaison de GeBP à l'ADN (**Figure 13 A**) (Curaba et al., 2003).

GeBP seul n'est pas suffisant pour contrôler l'expression de GLI

L'analyse de plantes transformées par une fusion transcriptionnelle du promoteur de GeBP avec le gène rapporteur GUS, indique que GeBP est exprimée au niveau du méristème apical caulinaire et des primordia foliaires (**Figure 13 B**). Ce profil d'expression est compatible avec l'hypothèse d'un contrôle précoce de l'initiation des trichomes par GeBP via la régulation de *GLI*. Pourtant, bien que GeBP ait été isolée pour sa capacité à fixer la région régulatrice *GLI*, le contrôle *in vivo* de son expression par GeBP n'a pas pu être démontré. En effet, aucune variation significative du niveau des transcrits *GLI* n'est détectée en PCR-quantitative en temps réel chez les lignées mutantes ou surexpresses de *GeBP*. De plus, ces lignées ne présentent aucun phénotype lié au développement des trichomes. Ces données suggèrent que le contrôle de l'expression de *GLI* pourrait nécessiter d'autres facteurs que GeBP et/ou que son absence pourrait être compensée par des facteurs redondants.

Le facteur KNOXI BREVIPEDICELLUS contrôle l'expression de GeBP

Si le contrôle de *GeBP* sur l'initiation des trichomes reste à prouver, il a en revanche été démontré que l'expression de *GeBP* est régulée par le gène *KNOX* de classe I *BREVIPEDICELLUS* (*BP*). Le niveau des transcrits *GeBP* est en effet diminué dans des mutants *bp* et augmenté dans des lignées surexprimant *BP* (**Figure 13 C**) (Curaba et al.,

2003). La superposition du profil d'expression de *BP* avec celui de *GeBP* au niveau du méristème est en accord avec cette observation. Etant donné le rôle joué par *BP* dans la régulation des voies hormonales GA et CK (Hay et al., 2002; Jasinski et al., 2005), ce résultat renforce l'hypothèse d'une implication de *GeBP* dans les processus de différenciation cellulaire contrôlés par l'une et/ou l'autre de ces hormones.

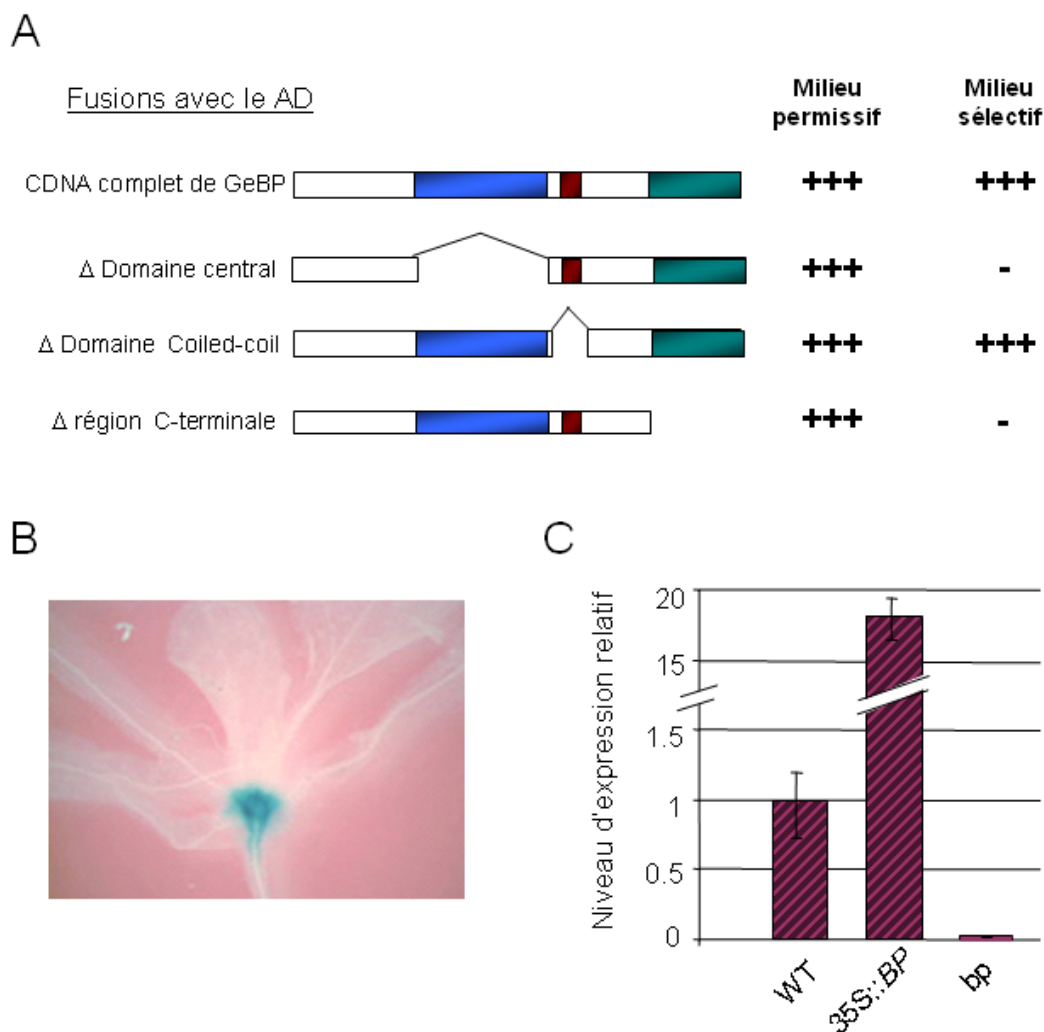


Figure 13 : Résultats des premières études de GeBP

A, Test de la capacité de liaison à l'ADN de différentes délétions de GeBP en simple hybride chez la levure. Les délétions ont été réalisées directement à partir d'une fusion AD:GeBP, et cotransformées avec une fusion de la partie centrale de l'enhancer de *GL1* et du gène rapporteur *His3*. La croissance des levures sur milieu -His indique la liaison à l'ADN. **B**, Analyse de l'expression du promoteur de GeBP fusionné au gène rapporteur *GUS*. Coloration *GUS* d'une rosette âgée de 15 jours, montrant un signal dans la zone méristématique et les ébauches de feuilles. **C**, Régulation des niveaux de transcrits de GeBP chez des plantes 35S::BP et mutantes bp. La détection des transcrits a été réalisée par RT-PCR quantitative en temps réel. (D'après Curaba et al., 2003)

III B. *GeBP* appartient à une nouvelle famille multigénique

L'analyse informatique de la séquence de *GeBP* a révélé la présence de 2 séquences NLS (Nuclear Localisation Signal) bi-partite, suggérant une localisation nucléaire de *GeBP*, compatible avec son activité de liaison à l'ADN (**Figure 14 A**). Trois motifs partiels correspondant à un domaine basique, un domaine coiled coil, et un domaine Leucine-Zipper ont été également détectés. La présence de ces deux derniers motifs suggèrerait que *GeBP* pouvait interagir avec d'autres protéines.

Dans le but de vérifier s'il existait des homologues de *GeBP*, des comparaisons de séquences dans les banques de données ont été effectuées. La région centrale de *GeBP* se retrouve également chez 16 autres protéines d'*Arabidopsis* et 5 protéines du riz, toutes étant de fonctions inconnues. STORE KEEPER (STK), une protéine de *Solanum tuberosum* qui possède également cette région est décrite comme facteur de transcription et régulateur putatif de *PATATIN*, un gène codant pour une protéine majeure du tubercule impliquée dans le stockage de l'amidon. Cette étude décrit la région centrale comme étant le domaine de liaison à l'ADN (Zourelidou et al., 2002). L'analyse de la structure secondaire de ce domaine prédit en effet la présence d'un motif de trois hélices alpha qui ressemble au motif de liaison à l'ADN des protéines HD-Zip, des facteurs à homéodomaine spécifiques du règne végétal (Sessa et al., 1997). Cette structure présente également chez *GeBP* suggère que ce dernier pourrait lier l'ADN via ce même motif (**Figure 14 B**).

La région C-terminale (qui contient le motif Leucine-Zipper putatif) de *GeBP* est également présente chez six autres protéines d'*Arabidopsis*. Seules trois protéines d'*Arabidopsis* ont en commun à la fois le domaine central et le domaine C-terminal avec *GeBP* (**Figure 14 B et C**). Leurs séquences présentent une forte similarité avec celle de *GeBP*. Elles ont par conséquent été appelées GPL pour GeBP Protein Like. Les protéines *GeBP*/*GPL* représentent donc un sous groupe distinct au sein d'une nouvelle famille de protéines spécifiques du règne végétal (**Figure 14 D**). Au vu de l'homologie entre les gènes *GeBP* et *GPL*, l'absence de régulation de *GLI* par *GeBP* pourrait s'expliquer par une redondance fonctionnelle entre ces quatre gènes.

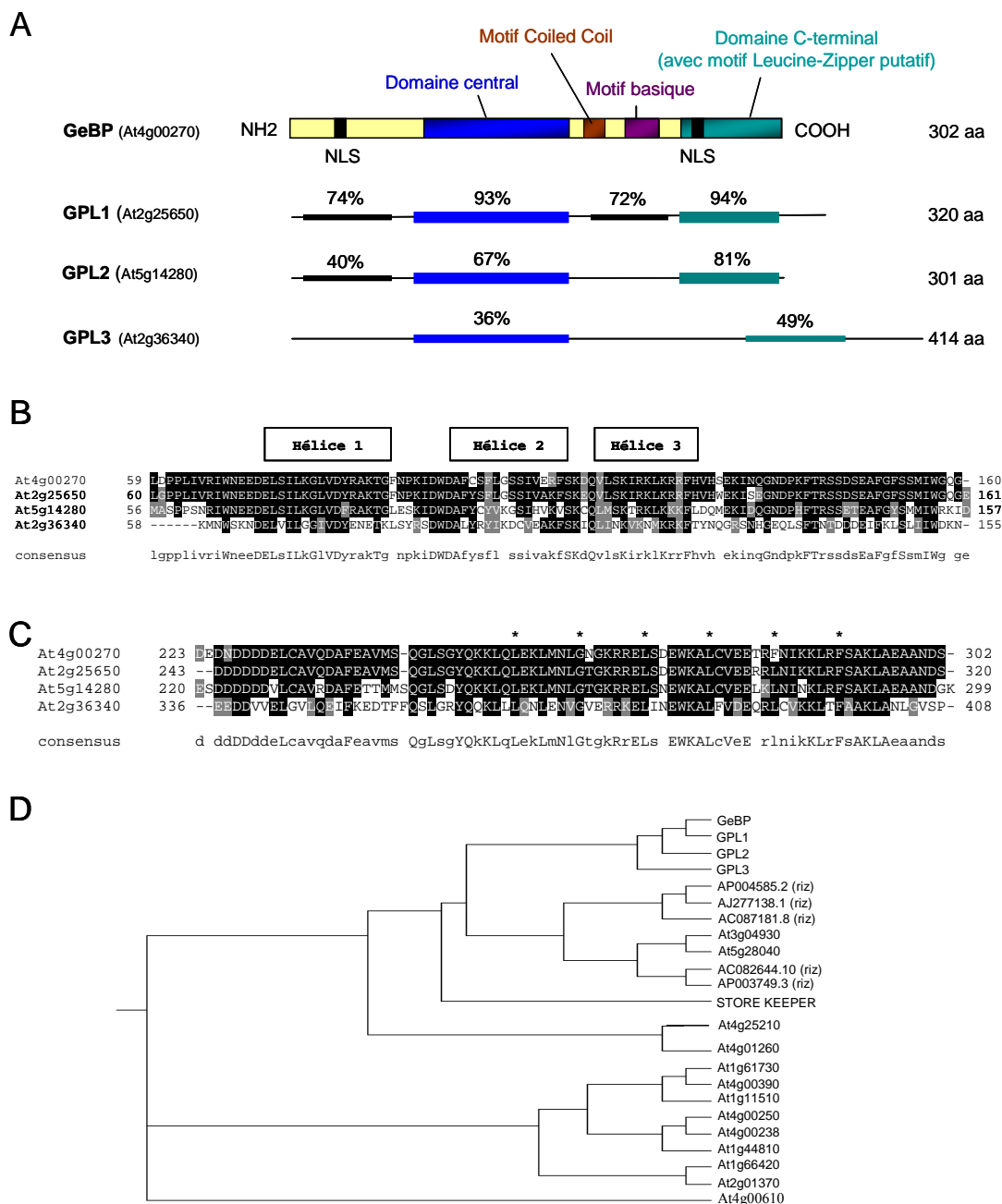


Figure 14 : Structures et homologies des protéines de la famille GeBP/GPL.

A, Représentation schématique de GeBP et ses trois homologues GPL. Les régions présentant des similarités sont indiquées avec les pourcentages d'identité correspondants. Les numéros d'accès des séquences dans la banque de données (Genbank) sont indiqués entre parenthèses. GPL1 est l'homologue qui présente la plus forte identité avec GeBP. **B**, alignement de la région centrale de GeBP et des trois GPL. Les lettres surlignées en noir indiquent les résidus identiques, celles surlignées en gris les résidus équivalents. La position des 3 hélices alpha prédites en structure secondaire est indiquée. **C**, alignement de la région C-terminale des GeBP/GPL. Les résidus du motif Leucine-Zipper putatif sont indiqués par des étoiles. **D**, arbre phylogénique des protéines présentant une homologie avec la région centrale de GeBP. La similarité de deux séquences est inversement proportionnelle au nombre d'embranchements qui séparent les protéines. Les protéines GeBP/GPL forment un groupe distinct au sein de cet arbre. (D'après Curaba et al., 2003).

III C. Les protéines GeBP/GPL sont capables de former des dimères

La présence d'un motif Leucine-Zipper incomplet dans la région C-terminale des GeBP/GPL qui est essentiel pour la liaison à l'ADN de GeBP suggère que ces protéines pourraient fonctionner de la même façon que les facteurs HD-Zip qui lient l'ADN sous la forme d'homodimères (Sessa et al., 1997). Les protéines GeBP/GPL pourraient ainsi interagir avec l'ADN via le motif de 3 hélices alpha du domaine central tandis que le domaine C-terminal stabiliserait cette activité par la formation d'homodimères. Pour tester cette hypothèse, des expériences de dimérisation chez la levure et d'immuno-précipitation ont été réalisées au laboratoire par Gaëlle Le Hénanff dans le cadre de son stage de Master (M2). Ces expériences ont démontré que les GeBP/GPL sont capables de former non seulement des homodimères, mais également des hétérodimères dans toutes les combinaisons possibles. D'autres expériences chez la levure ont montré que le domaine C-terminal de GeBP est indispensable à son homodimérisation et qu'il est capable à lui seul d'interagir avec les quatre protéines GeBP/GPL. Le domaine C-terminal comprenant le motif Leucine-Zipper partiel, il est possible que ce dernier joue un rôle dans la dimérisation. Toutes ces données renforcent l'idée que les protéines GeBP/GPL pourraient agir de façon redondante sous la forme de dimères (ou de plus gros complexes).

Sujet de recherche : Analyse fonctionnelle de la nouvelle famille de facteurs de transcription GeBP/GPL

Les travaux précédents de l'équipe ont permis de définir chez *Arabidopsis* une nouvelle famille de 4 protéines dont le premier membre GeBP a été caractérisé fonctionnellement comme facteur de transcription (Curaba et al., 2003). Ces quatre protéines GeBP/GPL partagent deux régions conservées spécifiques du règne végétal : une région centrale contenant un domaine composé de trois hélices alpha probablement impliqué dans la liaison à l'ADN, et une région C-terminale responsable de la dimérisation de ces protéines. Ces deux régions sont nécessaires à GeBP pour la trans-activation des gènes rapporteurs en expérience de simple hybride chez la levure (Curaba et al., 2003), ce qui suggère que les GeBP/GPL ne peuvent pas lier efficacement l'ADN sous forme monomérique. La région C-terminale comprend un motif Leucine-Zipper partiel qui pourrait être le responsable de ces dimérisations. Toutes ces données suggèrent que les quatre protéines GeBP/GPL pourraient être classifiées comme facteur de transcription à Leucine-Zipper à condition que ce motif partiel soit démontré comme fonctionnel. Dans une **première partie**, nous nous sommes donc intéressés à poursuivre la caractérisation des protéines GeBP/GPL dans le but de confirmer cette hypothèse.

Ayant été isolé comme régulateur potentiel de l'expression de *GLI*, un gène impliqué dans les processus d'endoréplication des cellules épidermiques et dont l'expression est contrôlée par les hormones GA et CK, *GeBP* pourrait jouer un rôle dans la voie de l'une ou de ces deux hormones. Cette hypothèse est renforcée par le lien avec *BP* qui conjointement aux autres gènes *KNOXI* joue un rôle important dans le contrôle de ces voies hormonales. Pourtant, l'expression de *GLI* n'est pas affectée chez le mutant *gebp* qui ne présente par ailleurs aucun phénotype visible pouvant laisser présager une perte du contrôle des endocycles. Ces résultats pourraient s'expliquer par une redondance fonctionnelle entre GeBP et d'autres protéines. Les protéines GPL au vu de leur homologie et de l'interaction protéique avec GeBP sont les candidates qui semblent les plus plausibles pour créer cette redondance. Nous avons donc entrepris dans une **deuxième partie** de réaliser une étude fonctionnelle de l'ensemble de la famille *GeBP/GPL* par l'étude de simples, doubles, et triples mutants des

trois gènes les plus présentant la plus forte similarité (*GeBP*, *GPL1*, *GPL2*), et de lignées surexprimeurs de chacun de ces gènes.

Enfin, pour compléter cette étude génétique, nous avons réalisé récemment une analyse transcriptomique visant à identifier les voies contrôlées par les gènes *GeBP/GPL*. Les résultats apportés, et les questions soulevées par cette analyse feront l'objet d'une **troisième partie**.

Chapitre I

Caractérisation des facteurs GeBP/GPL

Plusieurs arguments présentés en introduction suggèrent que les protéines GeBP/GPL sont des facteurs de transcription capables de former des dimères via leur région C-terminale. Quatre axes de recherche ont été entrepris afin de vérifier cette hypothèse : (1) Nous avons entrepris de vérifier l'adressage des protéines GeBP/GPL au sein de la cellule. (2) Nous avons cherché à caractériser le motif responsable de l'interaction des GeBP/GPL en testant la fonctionnalité du Leucine-Zipper partiel (incomplet) présent dans la région C-terminale. (3) nous avons testé la capacité des GeBP à former des dimères *in vitro*. (4) Aucune information n'étant connue sur le motif d'ADN-cible des GeBP/GPL, nous avons mis au point la technique du SELEX pour tenter de découvrir la séquence consensus reconnue par GeBP. D'autre part, afin d'obtenir des indices sur la fonction des gènes *GeBP/GPL*, nous avons cherché à étudier leur profil d'expression à l'aide de fusions entre leurs promoteurs et le gène rapporteur *GUS*.

I A. Adressage des protéines GeBP/GPL

L'analyse informatique de la séquence des GeBP/GPL à l'aide du logiciel *PROSITE* (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) révèle la présence d'au moins une séquence NLS chez les protéines GeBP (2), GPL1 (1), et GPL2 (2), aucune séquence NLS n'étant en revanche décelée chez GPL3 (**Figure 15 A**). Nous avons voulu vérifier *in planta* la localisation nucléaire de GeBP et des GPL en réalisant des fusions traductionnelles de ces quatre protéines avec la GFP sous le contrôle du promoteur fort constitutif *35S*. Dans ce but, les quatre séquences codantes correspondantes ont été clonées par le système GATEWAY™ en phase en aval de la GFP dans le vecteur de destination pK7WGF2 (cf. Matériel et Méthodes). Ces quatre constructions ainsi que le vecteur d'origine (servant de contrôle *35S::GFP*) ont été introduites de manière stable chez des plantes *Arabidopsis* sauvages d'écotype Columbia. Les cellules de racines et d'épiderme foliaire des lignées transgéniques ainsi obtenues ont été observées au microscope à épifluorescence après coloration au DAPI.

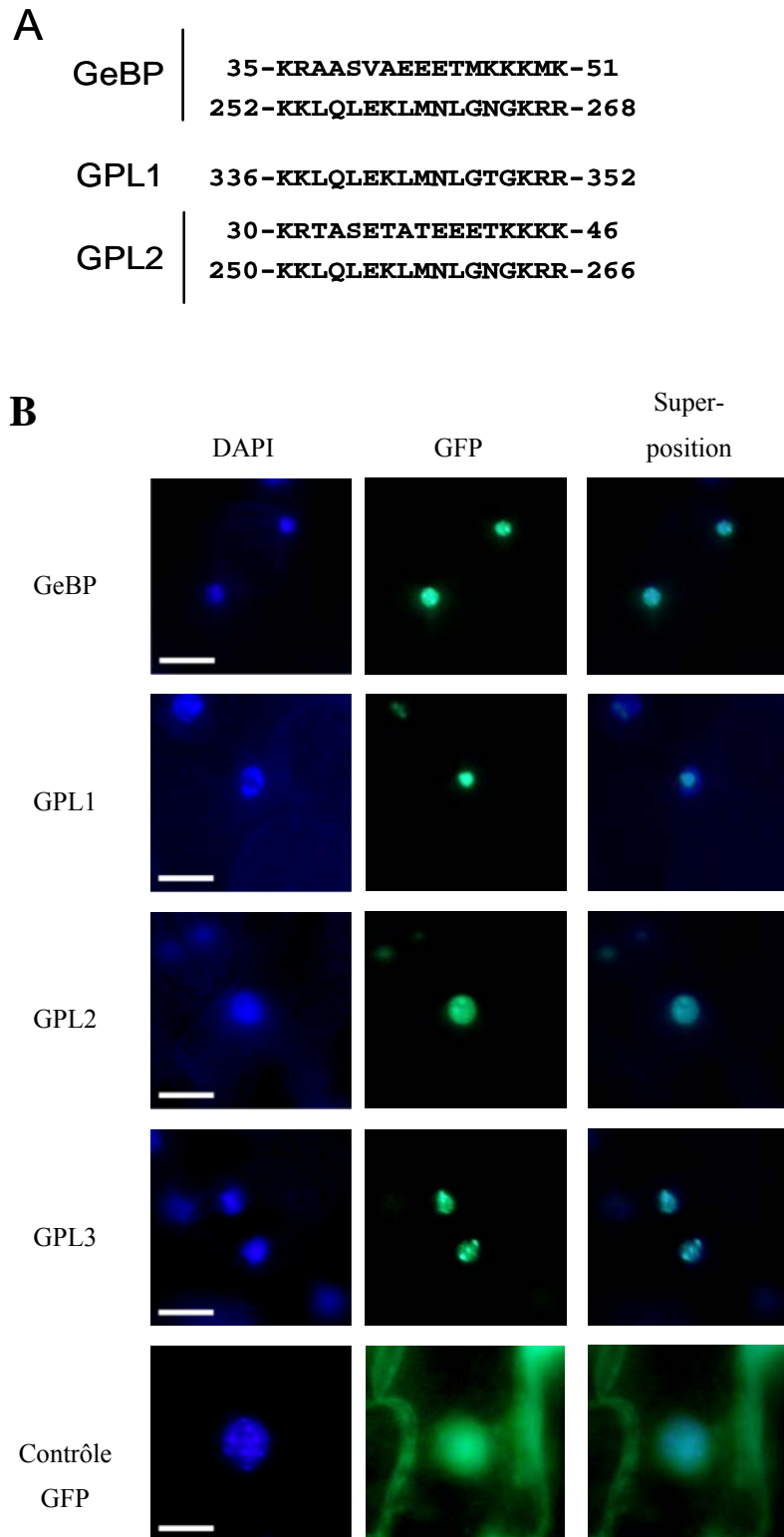


Figure 15 : Motifs NLS et localisation nucléaire des protéines GeBP et GPL

A, Séquences NLS prédites pour les protéines GeBP, GPL1, et GPL2. Aucune NLS n'est détectée dans la séquence de la protéine GPL3. **B**, Localisation intracellulaire des protéines hybrides GFP::GeBP/GPL. La superposition des images DAPI et GFP permet de montrer la colocalisation des deux signaux. Ces photographies ont été réalisées en collaboration avec Daniel Perazza. Barres d'échelles : 20 µm.

Comme attendu, le signal GFP des lignées contrôles *35S::GFP* est observé dans l'ensemble de la cellule sans sous localisation spécifique. Les lignées portant les fusions avec les GeBP/GPL révèlent en revanche une localisation nucléaire des quatre protéines chimériques (**Figure 15 B**). Le signal GFP de chaque fusion apparaît en effet parfaitement colocalisé avec le signal DAPI dans l'ensemble du noyau avec cependant une intensité accrue au niveau des nucléoles. Cette sous-localisation, qui n'est pas incompatible avec un rôle de facteur de transcription, varie selon la cellule observée, et peut se montrer très marquée pour certaines lignées comme celles surexprimant GPL1 (**Figure 15 B**). La protéine GPL3 apparaît donc également adressée au noyau bien qu'aucune NLS ne soit décelable dans sa séquence par analyse bioinformatique.

Lors de l'étude de ces lignées *35S::GFP::GeBP/GPL*, nous avons remarqué qu'au lieu d'être présent de manière ubiquitaire dans le noyau de toutes les cellules de la plante, le signal GFP est restreint au niveau de certains tissus et types cellulaires comme les racines, les trichomes, et les stomates (non montré). Comme le promoteur *35S* entraîne en principe une activation constitutive dans tous les tissus, cette restriction pourrait suggérer une dégradation des ARN messagers, ou des protéines codées par ces constructions, ce qui indiquerait que les protéines *GeBP/GPL* pourraient subir une régulation post transcriptionnelle.

Ces résultats en accord avec la présence de NLS dans la séquence de trois de ces protéines, confirment que les GeBP/GPL doivent être adressées au noyau et que ces quatre protéines pourraient donc bien jouer un rôle de facteur de transcription.

I B. Etude fonctionnelle du motif Leucine-Zipper présent dans la région C-Terminale des protéines GeBP/GPL.

Test de la fonctionnalité du motif Leucine-Zipper en double hybride chez la levure

Dans l'objectif de mieux définir le mécanisme qui permet la dimérisation des protéines GeBP/GPL, nous avons voulu savoir si le motif Leucine-Zipper partiel présent dans leur région C-terminale était fonctionnel. Les motifs Leucine-Zipper conventionnels sont constitués de 4 à 7 résidus Leucine séparés chacun par 6 acides aminés (Bornberg-Bauer et

al., 1998). Ces résidus Leucine peuvent parfois être remplacés par des résidus de même nature (hydrophobes) comme des Phénylalanines. Le motif putatif détecté chez GeBP est constitué de 6 résidus (Leu-256, Gly-263, Leu-270, Leu-277, Phe-284, et Phe-291) dont trois ne sont pas des Leucines (**Figure 16 A**). Pour tester la fonctionnalité de ce motif Leucine-Zipper, nous avons réalisé une mutagenèse dirigée de ces résidus et testé la capacité d'interaction des protéines mutantes avec la protéine GeBP sauvage dans un système double hybride chez la levure (**Figure 16 B**). Les protéines mutées ont été fusionnées au AD, et la protéine GeBP sauvage au BD. Lorsque les trois acides aminés centraux Gly-263, Leu-270, et Leu-277 sont simultanément mutés en résidus Alanine, les levures transformées ne montrent aucune croissance sur milieu sélectif indiquant ainsi que le motif sauvage est bien essentiel à la dimérisation. La fonctionnalité des 6 résidus a ensuite été testée en les mutant individuellement en résidus Ala. Lorsque les deux premiers résidus (Leu-256, Gly-263) sont mutés, la croissance des levures n'est pas affectée sur milieu sélectif. Ces deux résidus ne jouent donc pas un rôle essentiel dans la dimérisation. A l'inverse lorsque les quatre derniers résidus (Leu-270, Leu-277, Phe-284, et Phe-291) sont mutés, les levures ne sont plus capables de croître sur milieu sélectif. Ces quatre résidus semblent par conséquent essentiels à la dimérisation. Ces résultats indiquent donc que GeBP serait capable de former des dimères via le motif Leucine-Zipper non canonique : Leu-270(X)₆Leu-277(X)₆Phe-284(X)₆Phe-291.

Test de dimérisation des GeBP/GPL in planta

Afin de confirmer ces interactions dans les cellules végétales, la formation de dimères a été testée en collaboration avec Gilles Vachon en utilisant la technique de Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC), qui permet de visualiser des interactions protéines-protéines *in vivo* (Walter et al., 2004). Deux types de constructions ont été réalisées par clonage GATEWAYTM dans les vecteurs pBIFP-2 et pBIFP-3 qui permettent respectivement une fusion entre GeBP et la moitié N-terminale de la YFP, et une fusion entre GeBP et la moitié C-terminale de la YFP. Nous avons également fusionné la version mutante de GeBP, comportant le motif Leucine-Zipper muté au niveau des trois résidus centraux, avec les deux moitiés de la YFP par clonage dans les mêmes vecteurs. Pour chacun des deux tests (GeBP sauvage ou mutée), des cellules d'épiderme de feuilles de tabac ont été co-transformées transitoirement avec les deux constructions (*N-YFP::GeBP* et *C-YFP::GeBP*, ou *N-YFP::GeBP_m* et *C-YFP::GeBP_m* respectivement). Afin de mettre en évidence leur noyau, les cellules ont été colorées au DAPI, puis les tissus ont été observés au microscope confocal. Chez les feuilles co-transformées par les constructions portant les fusions avec la protéine

GeBP sauvage, plusieurs cellules épidermiques présentent un signal YFP qui co-localise avec la coloration DAPI, traduisant une homodimérisation des protéines GeBP (**Figure 16 C**). Aucun signal YFP n'est en revanche observable dans le noyau des cellules de feuilles infiltrées avec les deux constructions portant les fusions avec la protéine GeBP mutée (**Figure 16 C**). Ce résultat confirme donc ceux obtenus en test double hybride chez la levure. Par la suite, l'hétérodimérisation entre GeBP et GPL2 a également été testée *in planta* par BiFc, avec succès (non montré).

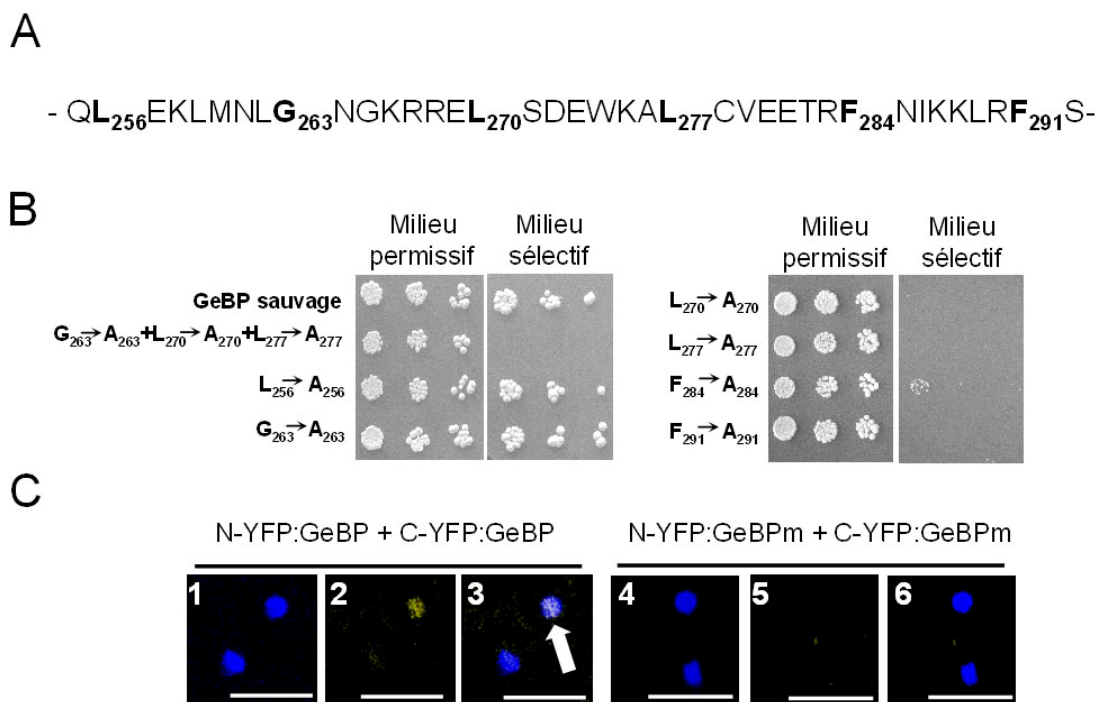


Figure 16 : Fonctionnalité du motif Leucine-Zipper non canonique

A, Séquence du motif Leucine-Zipper putatif de GeBP. Les résidus putatifs du motif sont indiqués en gras. **B**, Mutagenèse du motif Leucine-Zipper putatif. Test par dépôt de gouttes de dilutions en série 5X de cultures liquides ($D_{0,600}=0,2$) sur boîtes de milieu permissif ou sélectif. Les résidus composant le motif putatif qui ont été changés en résidus Alanine sont indiqués. **C**, BiFc réalisé avec les protéines GeBP sauvages et mutées dans des cellules de plantes. Des feuilles de tabac ont été co-infiltrées avec les fusions *N-YFP::GeBP* et *C-YFP::GeBP* (1-3), ou avec les fusions *N-YFP::GeBPm* et *C-YFP::GeBPm* (4-6). La version mutée porte les 3 mutations (Gly-263, Leu-270, et Leu-277) décrites dans le **Figure 16 B**. 1 et 4, signal DAPI montrant les noyaux ; 2 et 5, signal YFP ; 3 et 6, superposition des images DAPI et YFP ou des points blancs (indiqués par la flèche blanche) montrent la colocalisation des deux signaux. La capture d'image en microscopie confocale a été réalisée en collaboration avec Gilles Vachon et Cécile Cottet. Barres d'échelle, 50µm.

L'ensemble de ces résultats indiquent que les protéines GeBP/GPL sont capables de former des dimères *in planta* et que ces protéines forment donc une nouvelle classe de facteurs de transcription à motif Leucine-Zipper non canonique.

I C. Recherche de la séquence consensus d'ADN reconnu par les protéines GeBP/GPL

Puisque les protéines GeBP/GPL sont des facteurs de transcription, elles doivent pouvoir reconnaître spécifiquement une séquence consensus présente dans les séquences régulatrices de leurs gènes cibles. Dans le but de découvrir si une telle séquence existe, la technique de « Systematic Evolution of Ligands by EXponential Environment » (SELEX) a été mise au point sur la protéine GeBP. Cette dernière a été choisie en raison du fait qu'elle est la seule protéine de la famille pour laquelle une interaction avec l'ADN a déjà été démontrée expérimentalement (cf. Introduction).

Le principe de cette technique est basé sur une succession de cycles comprenant chacun quatre étapes (**Figure 17 A**) :

(1) Incubation de la protéine d'intérêt avec un pool d'oligonucléotides d'ADN double brin de 72 pb, comprenant des extrémités connues fixes, et une partie centrale de séquence variable de 21 pb. La séquence de cette partie centrale est aléatoire dans la sonde utilisée lors du premier cycle (**Figure 17 B**).

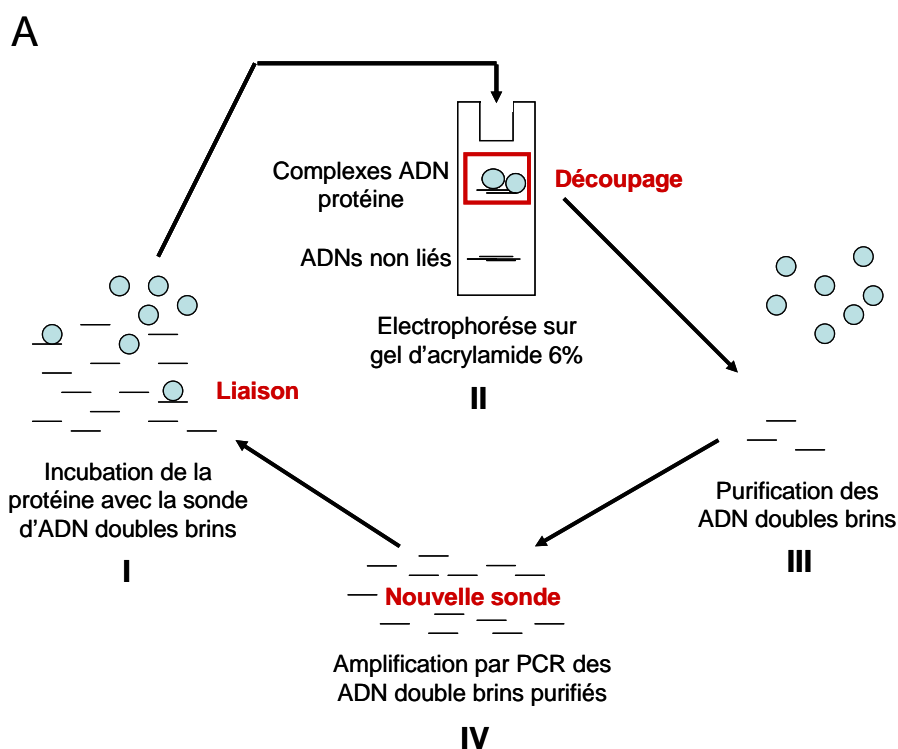
(2) Séparation par électrophorèse des complexes protéine-ADN formés et des ADN non liés.

(3) Purification des ADN complexés aux protéines.

(4) Amplification par PCR de ces ADN purifiés à l'aide d'amorces spécifiques des extrémités connues (**Figure 17 B**).

La nouvelle sonde ainsi obtenue est ensuite utilisée pour le cycle suivant. Si la protéine testée possède une affinité particulière pour un motif précis, on assistera au fil des cycles à un enrichissement progressif en séquences portant ce motif. Cet enrichissement est

délectable sur le gel d'électrophorèse par une augmentation de l'intensité de la bande correspondant aux complexes sonde-protéine. La sonde est conçue pour être détectée directement dans le gel grâce à un marquage TAMRA, l'analyse du gel à l'aide d'un phospho-imager permettant l'excitation et la détection du signal émis par ce fluorophore. Cette technique a fait l'objet d'une collaboration avec l'équipe de François Parcy du laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale (UMR 5168 CNRS CEA UJF INRA) qui maîtrise la technique du SELEXE.



B

Banque aléatoire : 5' TGGAGAAGAGGAGAGATCTAGC NNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNCTCTAGATCTTGTCTCTTCGATTCCGG 3'

Amorce Forward
couplée au TAMRA : 5' TGGAGAAGAGGAGAGATCTAG 3'

Amorce Reverse : 5' CCGGAATCGAAGAAGACAA 3'

Figure 17 : Principe de la technique du SELEXE

A, Schéma représentant les 4 étapes d'un cycle de SELEXE. Les sphères bleues symbolisent les protéines tandis que les traits noirs symbolisent les oligonucléotides double brins. **B**, oligonucléotides utilisés pour le SELEXE. La banque aléatoire est désignée avec une séquence aléatoire de 21 nucléotides (indiqués en violet) entouré par deux séquences fixes en 5' et 3' de 22 et 29 nucléotides respectivement. Les amorces Forward et Reverse sont spécifiques des régions fixes de la banque indiquées en vert. La sonde aléatoire utilisée pour le premier cycle est obtenue en réalisant une PCR avec ces trois oligonucléotides.

La protéine GeBP a été surproduite chez *E. coli* et purifiée en conditions dénaturantes, sa dilution dans le tampon de liaison avec la sonde devant permettre sa renaturation lors de la première étape de chaque cycle de SELEXE. Après avoir déterminé les conditions de liaison optimales (cf. matériels et méthodes), nous avons débuté les cycles de SELEXE. L'intensité des bandes correspondant aux complexes GeBP-ADN a commencé à augmenter à partir du cycle 8 (**Figure 18 A**). Dans le but de découvrir quelles étaient les séquences responsables de cette augmentation, les ADN des sondes utilisées lors des cycles 7, 9, et 10 ont été clonés et séquencés. L'analyse de la partie variable des 19 séquences ainsi obtenues, à l'aide du programme *APACHE* utilisable sur le site internet *BioProspector*, a permis de détecter un motif consensus de 6 paires de bases : TGTGGT (**Figure 18 B et C**). Ce motif est retrouvé 2 fois entièrement conservé, 10 fois avec une base modifiée, et 9 fois avec deux bases modifiées au sein des 19 séquences analysées (**Figure 18 B**). La fréquence d'apparition de la base T en position 6 est relativement faible par rapport aux 5 autres bases du motif (**Figure 18 C**), ce qui suggère que ce nucléotide pourrait jouer un rôle moins important que les autres dans la liaison entre GeBP et ce motif.

Comme contrôle de nos conditions expérimentales, la protéine BP a été produite dans les mêmes conditions que GeBP et testée en parallèle. La séquence consensus reconnue par BP est déjà identifiée sous la forme suivante : TGACAG/CT, les quatre premières bases étant décrites comme les plus importantes pour la liaison (Smith et al., 2002; Mele et al., 2003). Dans nos conditions, l'intensité de la bande de gel correspondant aux complexes BP-ADN a commencé à augmenter à partir du cycle 9. L'analyse par le programme *apache* de 11 séquences d'oligonucléotides issues de la sonde utilisée lors du cycle 11 a permis la détection d'un motif consensus exactement identique à celui publiée par Smith et al., 2002 (**Figure 18 D et E**), les quatre première bases (TGAC) apparaissant également les plus conservées dans nos séquences. Le fait que nous retrouvions le motif publié reconnu par la protéine BP permet de valider nos conditions expérimentales de SELEXE.

L'analyse de séquence de la région centrale de l'enhancer du gène *GLI*, sur laquelle la liaison de GeBP est démontrée chez la levure et *in vitro* (cf. Introduction), révèle la présence de deux motifs TGTGGT et d'un motif TCTGGT. Statistiquement, une séquence donnée de 6 pb apparaît tous les 4096 pb (4^6) d'une séquence aléatoire. La forte représentation de ces motifs dans une séquence d'ADN de seulement 152 pb suggère donc la possibilité que ces motifs répétés jouent un rôle biologique. Cette observation renforce la pertinence du motif

défecté dans nos expériences de SELEX. L'ensemble de ces données suggère donc que la protéine GeBP doit lier les régions régulatrices de ses gènes cibles via le motif consensus TGTGGT.

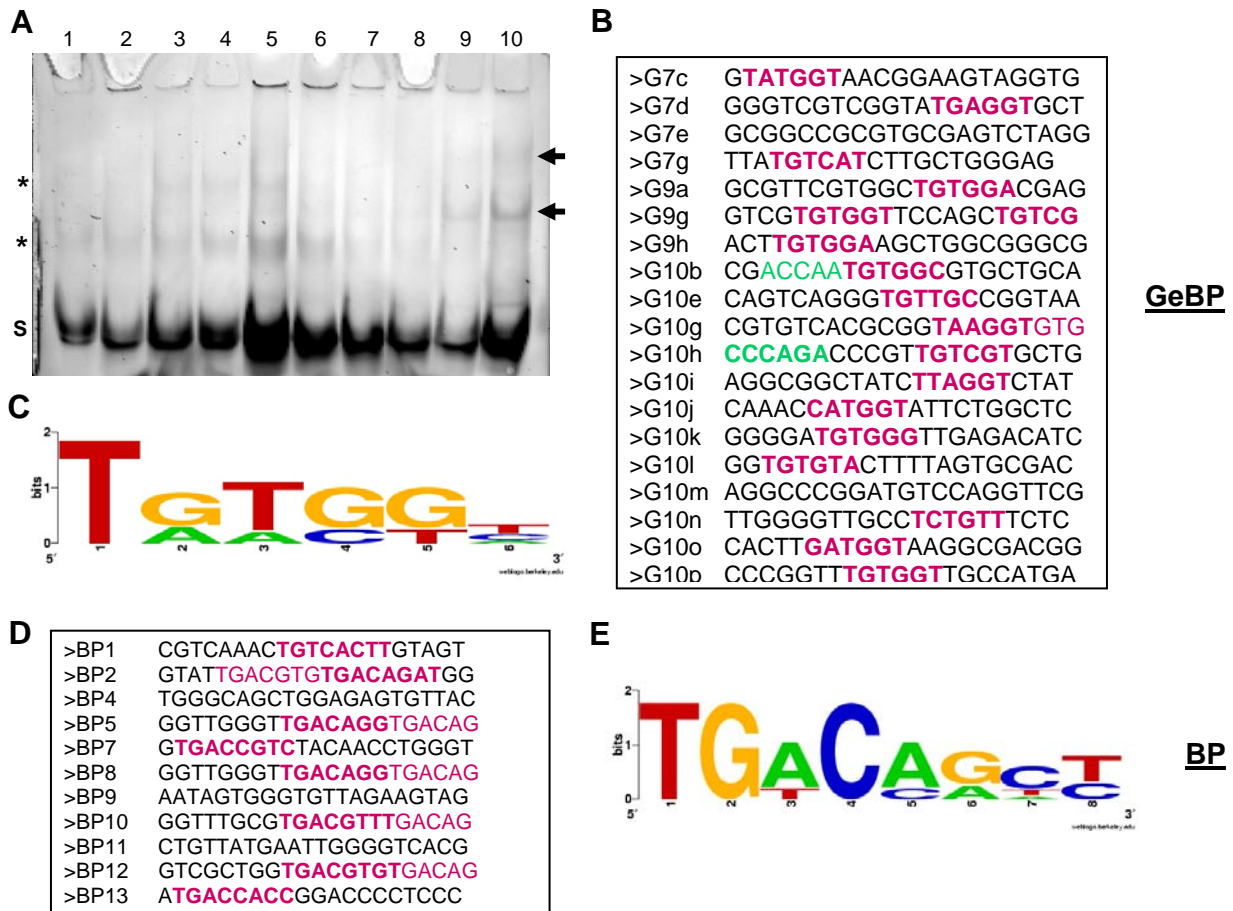


Figure 18 : Détermination des séquences consensus reconnues par les protéines GeBP et BP à l'aide de la technique du SELEX

A, Gel récapitulatif permettant d'observer l'augmentation progressive de la quantité de complexes formés entre les protéines GeBP et l'ADN des sondes utilisées à chaque nouveau cycle de SELEX. Les chiffres indiquent les cycles correspondants. La sonde du cycle 1 qui a été incubée sans protéine permet d'observer les bandes non spécifiques (astérisques) et celle correspondant à la sonde libre (S). Les flèches indiquent les bandes correspondant au complexe GeBP-Sonde dont l'intensité s'accroît dès le cycle 8. B et D, Séquences de la partie variable de 19 oligonucléotides provenant des sondes des cycles 7 (G7), 9 (G9), et 10 (G10) du SELEX réalisé avec la protéine GeBP, ou de 11 oligonucléotides provenant de la sonde du cycle 11 du SELEX réalisé avec la protéine BP. Les motifs similaires détectés par le programme « APACHE » sont indiqués en violet (ou en vert quand le motif est présent sur le brin complémentaire). C et E, Dessin des motifs consensus établi pour GeBP et BP, à partir des motifs présentées en B et en D respectivement, à l'aide du site Internet *weblogo*. La taille des lettres indique la fréquence relative de chaque base à cette position (cf. *weblogo.berkeley.edu*).

I D. Etude de l'expression des gènes *GeBP/GPL*

Afin d'étudier la localisation tissulaire de l'expression des gènes *GeBP/GPL*, nous avons réalisé des fusions transcriptionnelles entre les promoteurs de ces quatre gènes et le gène rapporteur GUS. Les promoteurs amplifiés par PCR ont été introduits par clonage GATEWAY™ dans le vecteur pHGWFS7 (cf. matériel et méthodes) en amont du gène GUS, et les quatre constructions ainsi obtenues ont servi à transformer de façon stable des plantes d'écotype Columbia. Pour chaque construction, le profil d'expression GUS de 3 lignées transgéniques indépendantes au minimum a été analysé. Comme l'expression de *GeBP* est contrôlée par le gène *KNOX* de classe I *BREVIPEDICELLUS (BP)* (cf. introduction), nous avons décidé d'analyser également le profil d'expression d'une lignée $P_{BP}::GUS$ fournie par le Dr Sarah Hake (PMBD, Université de Californie). Ce travail a été réalisé en collaboration avec Patricia Hornitschek, Frédéric Laporte, et Daniel Perazza. Les différentes lignées analysées présentent un profil d'expression GUS très similaire, la lignée $P_{BP}::GUS$ montrant l'expression la plus forte dans la majeure partie des tissus étudiés. Durant la phase végétative, l'expression a lieu principalement au niveau du SAM et des jeunes ébauches foliaires (**Figure 19, 1-15**). Mis à part la lignée $P_{BP}::GUS$, cette expression se montre la plus forte chez les lignées $P_{GeBP}::GUS$ et la plus faible chez les lignées $P_{GPL1}::GUS$, (ces deux gènes présentant la similarité la plus forte au sein de la sous-famille *GeBP/GPL*). A ce stade de développement, on peut également observer une coloration du tissu vasculaire des cotylédons et des feuilles notamment au niveau des hydathodes. Cette coloration apparaît assez faible chez l'ensemble des lignées testées à l'exception des lignées $P_{GPL3}::GUS$ qui présentent un signal très fort dans ces tissus (**Figure 19, 1-5**). Au niveau des tissus racinaires, ces mêmes lignées $P_{GPL3}::GUS$ et la lignée $P_{BP}::GUS$ sont les seules à présenter un signal (**Figure 19, 16-20**). Ce signal est principalement observable au niveau de la région méristématique des racines primaires et secondaires chez les lignées $P_{GPL3}::GUS$ et au niveau de la zone d'émergence des racines secondaires chez la lignée $P_{BP}::GUS$. Au cours de la phase reproductive, les différentes lignées rapporteurs montrent à nouveau un profil d'expression très similaire, avec la présence de coloration GUS au niveau de la partie distale des pédicelles qui forme un renflement vasculaire à la base des fleurs et des siliques (**Figure 19, 21-25**) et au niveau des paraclades (**Figure 19, 26-30**). Les lignées $P_{GPL2}::GUS$ font cependant exception en ne montrant aucune coloration au niveau des paraclades et en présentant uniquement une faible coloration au niveau du septum des siliques.

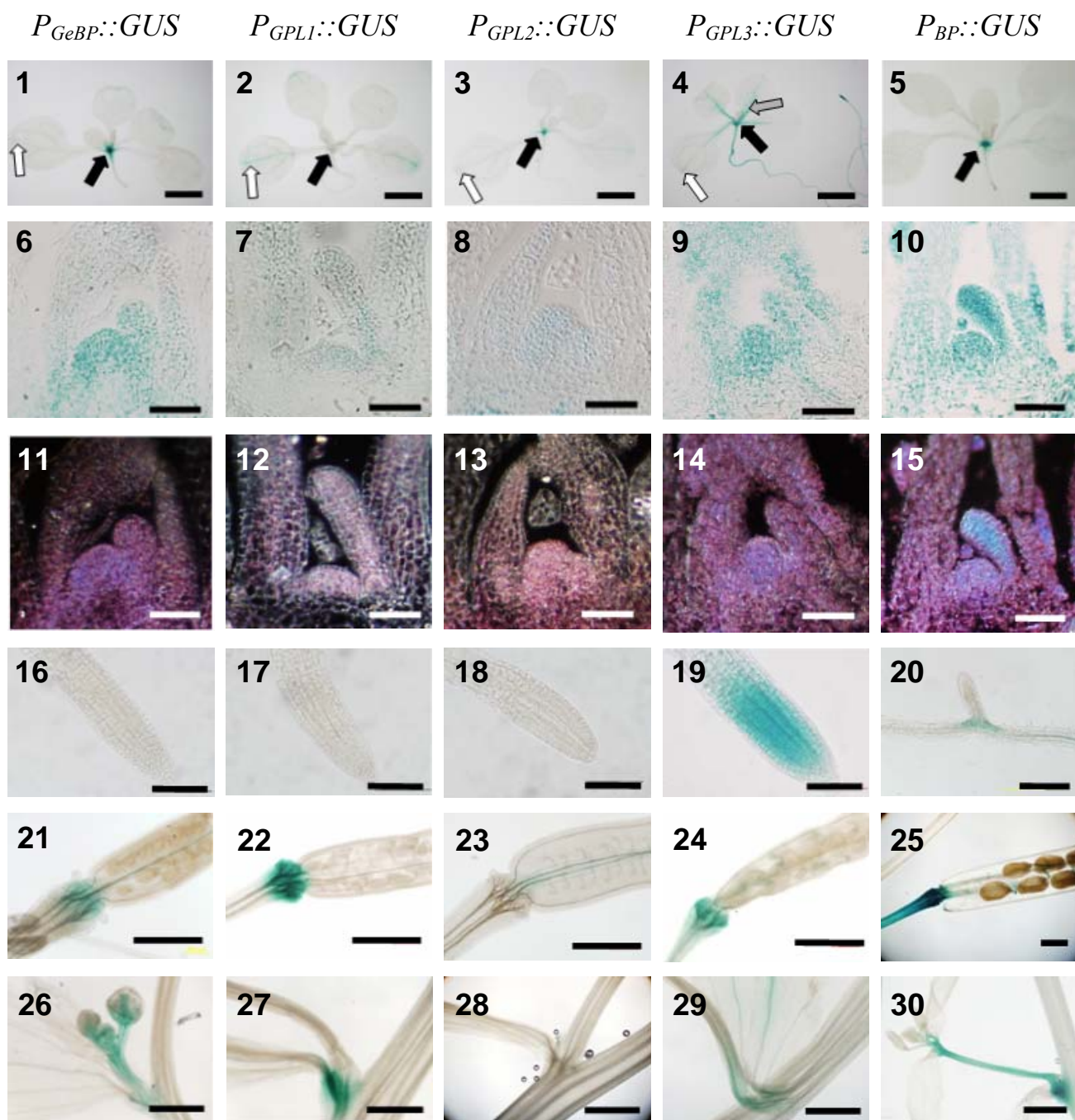


Figure 19 : Analyse de l'expression des promoteurs des gènes *GeBP/GPL* et *BP*

1 -5, coloration de rosettes âgées de 15 jours. Flèches noires, coloration du méristème apical ; flèches blanches, coloration des hydatodes ; flèche grise, coloration du tissu vasculaire ; barre d'échelle : 2mm. **6-10**, coupe longitudinale des méristèmes apicaux de plantes au stade rosettes (Frédéric Laporte); Barre d'échelle : 50µm. **11-15**, les mêmes coupes observées en microscopie en fond noir (la détection du signal GUS est plus sensible) ; barre d'échelle : 50µm. **16-19**, coloration du méristème racinaire ; barre d'échelle : 100µm. **20**, coloration d'une racine secondaire émergente ; barre d'échelle 50µm **21-25**, coloration des pédicelles des siliques ; barre d'échelle : 500µm. **26-30**, coloration des paraclades ; barre d'échelle : 1mm.

L'ensemble de ces résultats nous a amené à conclure que les gènes *GeBP/GPL* et *BP*, présentent des profils d'expression très redondant et sont exprimés principalement au niveau du SAM, des jeunes ébauches foliaires, des paraclades, des pédicelles, et des tissus vasculaires. Cette redondance d'expression est en accord avec l'hypothèse d'une redondance fonctionnelle des protéines GeBP/GPL, déjà suggérée par leur forte identité et leur capacité à former des dimères dans toutes les combinaisons possibles. De plus, la superposition du profil d'expression GUS des *GeBP/GPL* avec celui du gène *BP* suggère, en accord avec la régulation de l'expression de *GeBP* par ce dernier, que les quatre gènes *GeBP/GPL* pourraient jouer un rôle dans les processus contrôlés par le facteur BP.

Conclusion du chapitre I

Les travaux présentés dans ce chapitre ont permis de caractériser moléculairement les gènes et les protéines GeBP/GPL. Notre étude de la surexpression des protéines recombinantes GFP::GeBP/GPL a prouvé la localisation nucléaire de ces protéines, en accord avec la présence de NLS dans les séquences de trois d'entre elles. Les résultats des expériences de double hybride chez la levure et de BiFc ont confirmé la capacité des protéines GeBP/GPL à former des dimères et ont montré que cette dimérisation implique un motif Leucine-Zipper de type non canonique présent dans le domaine C-terminal de ces quatre protéines. Les expériences de SELEX ont permis d'identifier le motif consensus d'ADN « TGTGGT » reconnu par la protéine GeBP. Ce motif est retrouvé dans la séquence de l'enhancer du gène *GLI* qui est sa seule cible moléculaire connue. L'étude des lignées *P_{GeBP/GPL}::GUS* et *P_{BP}::GUS* a permis de démontrer que les *GeBP/GPL* présentent un profil d'expression très similaire avec celui de *BP* dans les tissus aériens incluant le SAM, et les tissus vasculaires des feuilles, des paraclyades, et des siliques. L'ensemble de ces résultats indique donc que les protéines GeBP/GPL sont des facteurs de transcription à Leucine-Zipper non canonique qui pourraient agir de façon redondante dans les voies contrôlées par le gène *KNOXI BREVIPEDICELLUS*.

Chapitre II

Recherche de la fonction des *GeBP/GPL*

L'un des enjeux majeurs de mon travail était de définir le rôle *in planta* des gènes *GeBP/GPL*. Lorsque ce travail a débuté, deux indications fortes laissaient présager un rôle de ces gènes dans la voie des hormones GA et/ou CK. Premièrement, *GeBP* a été identifié comme un régulateur potentiel de *GL1*, un gène jouant un rôle clé dans le contrôle des endoréplications dans les trichomes et activé transcriptionnellement par les GA et les CK. Deuxièmement, le contrôle de l'expression de *GeBP* par le facteur BP (Curaba et al., 2003), et la superposition du profil d'expression des gènes *GeBP/GPL* et *BP* présenté au chapitre I suggèrent une implication de l'ensemble de la famille *GeBP/GPL* dans la voie de ce gène *KNOXI*. Or, l'une des fonctions partagée par les gènes *KNOXI* est le contrôle des voies hormonales GA et CK (Sakamoto et al., 2001; Chen et al., 2004; Jasinski et al., 2005; Yanai et al., 2005). Pour comprendre le rôle des gènes *GeBP/GPL*, et vérifier leur implication dans l'une et/ou l'autre de ces voies hormonales, nous avons étudié les effets de leur perte de fonction par l'étude de lignées mutantes *gebp/gpl*. Puis, nous avons analysé à l'inverse les effets de leur surexpression, par l'obtention et l'étude de lignées surexpresseurs des *GeBP/GPL*.

II A. Etude de la perte de fonction des *GeBP/GPL*

II A. 1/ Obtention et caractérisation de lignées mutantes *gebp/gpl*

La recherche dans les banques de données de mutants d'insertion à l'aide du site Internet *T-DNA Express* (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) nous a permis de disposer de lignées mutantes pour les quatre gènes *GeBP/GPL* (cf. matériels et méthodes). Nous avons identifié *in silico* quatre lignées mutantes *gebp* dont trois dans l'écotype *Ler* (*gebp-1*, *gebp-2*, et *gebp-3* ; insertion de transposon) et une dans l'écotype *Col* (*gebp-4* ; insertion de T-DNA). Nous avons également identifiés deux mutant *gpl1* (*gpl1-1*, *gpl1-2*), un mutant *gpl2* (*gpl2-1*), et un mutant *gpl3* (*gpl3-1*), tous d'écotypes *Col* (insertion de T-DNA). Les caractéristiques et la provenance de ces différentes lignées sont indiquées dans le **Tableau 1**. Les lignées *gebp-1*,

gebp-2, *gebp-3*, *gpl1-1*, et *gpl3-1* présentent toute leur insertion dans un exon. En revanche, les T-DNA des lignées *gebp-4*, *gpl1-2*, et *gpl2-1* sont insérés respectivement 30, 180, et 220 paires de bases en amont du codon initiateur ATG (**Figure 20 A**). Nous avons dans un premier temps isolé par génotypage des lignées homozygotes mutantes pour chacun de ces allèles. Puis afin de vérifier l'absence ou la diminution du niveau de transcrits sauvages *GeBP/GPL* chez ces différentes lignées mutantes, les niveaux de transcrits des gènes correspondant à chaque mutation ont été mesurés par RT-PCR semi-quantitative (pour *GeBP*, seules les lignées *gebp-1* et *gebp-4* ont été analysées). Aucun transcrit *GeBP*, *GPL1*, et *GPL3* n'est détectable chez les mutants *gebp-1*, *gpl1-1*, et *gpl3-1* respectivement (**Figure 20 B**), ce qui indique que ce sont probablement des mutants nuls.

Lignées	Ecotypes	Provenance	Mutation/Insertion
<i>gebp-1</i> (CSHL_GT6658)	Lansberg <i>erecta</i> (Ler)	Cold Spring Harbor Laboratory	Transposon DS
<i>gebp-2</i> (GT_5_108668)			
<i>gebp-3</i> (GT_5_17684)			
<i>gebp-4</i> (SALK_013473)	Columbia (Col-0)	Salk Institute	T-DNA (pROK2)
<i>gpl1-1</i> (WiscDsLox391A04)		University of Wisconsin	T-DNA (pDS-Lox)
<i>gpl1-2</i> (SALK_032610)		Salk Institute	T-DNA (pROK2)
<i>gpl2-1</i> (SALK_054183)			
<i>gpl3-1</i> (SAIL_885_B10)		Syngenta Biotechnology	T-DNA

Tableau 1 : Récapitulatif des différentes lignées mutantes *gebp/gpl* identifiées *in silico*

En revanche, nous avons pu observer chez les mutants *gebp-4*, *gpl1-2*, et *gpl2-1*, la présence de transcrits sauvages des gènes correspondants. La lignée *gebp-4* présente notamment une augmentation du niveau des transcrits *GeBP* par rapport aux plantes sauvages (**Figure 20 B**). Cette augmentation peut s'expliquer de deux manières : (1) Le T-DNA inséré pourrait être tronqué et entraîner une fusion transcriptionnelle entre le promoteur fort 35S qu'il contient et la séquence codante du gène *GeBP*. (2) Le T-DNA pourrait s'être inséré au niveau d'une séquence régulatrice importante responsable de l'inhibition de l'expression de *GeBP*. Au vu de ces résultats, la lignée *gebp-4* a été écartée. Chez la lignée *gpl1-2*, le niveau des transcrits *GPL1* n'est pas différent de celui des plantes sauvages (**Figure 20 B**), et cette lignée a donc également été écartée. Chez la lignée *gpl2-1* en revanche, le niveau des transcrits sauvages *GPL2* présente une diminution d'un facteur 10 environ par rapport à celui des plantes sauvages (**Figure 20 B**).

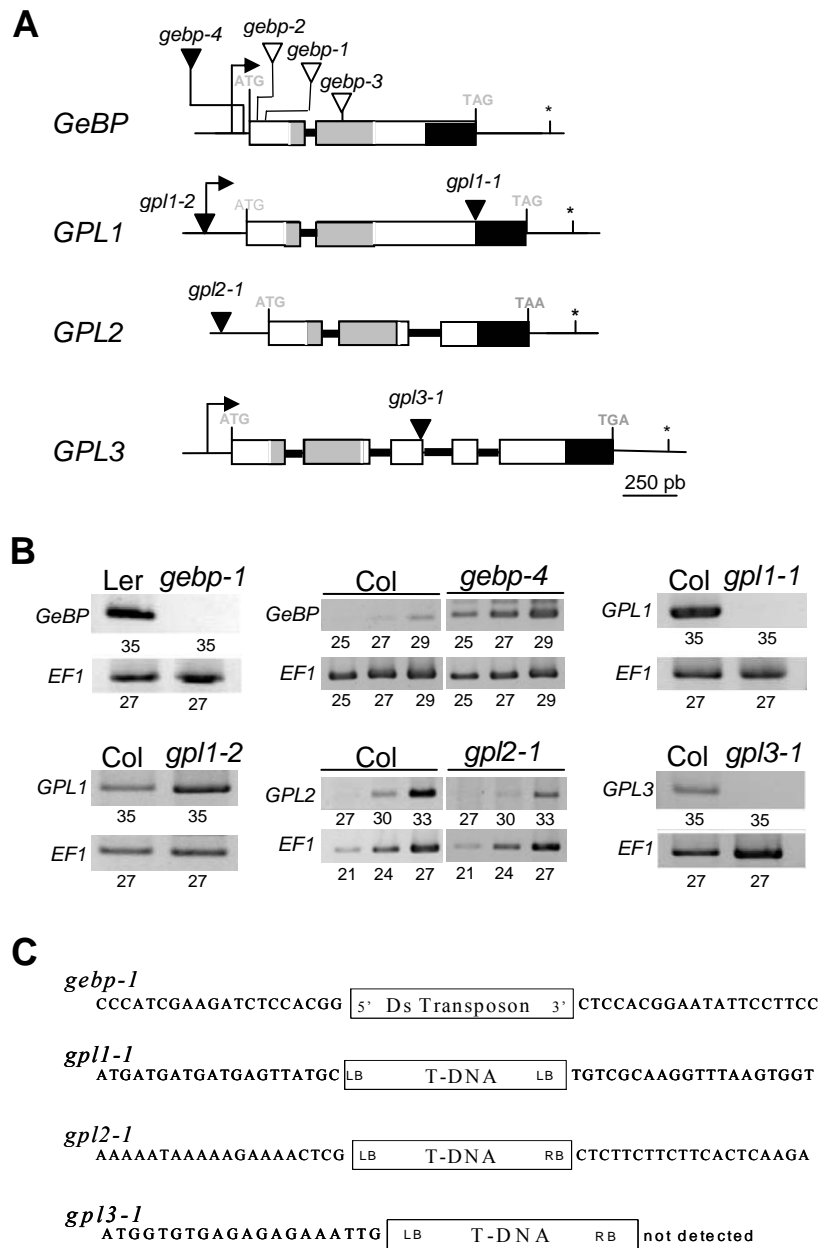


Figure 20 : Caractéristiques des mutants d'insertion *gebp* et *gpl*

A, représentation schématique des gènes *GeBP*/*GPL*. Les exons sont symbolisés par les boîtes et les introns par les lignes noires épaisses. Les régions grises et noires représentent respectivement le domaine de liaison à l'ADN et le domaine C-terminal. La position de l'insertion des transposons et des T-DNA est indiquée par les triangles blancs et noirs respectivement. Les flèches et les étoiles indiquent respectivement les sites putatifs de début et de fin de la transcription basés sur les cDNA complets et les EST annotées par le site TAIR. **B**, mesure des niveaux de transcrits des gènes *GeBP* et *GPL* chez les lignées mutantes et leur contrôle sauvage. Les nombres de cycles de PCR utilisés sont indiqués. Trois cycles sont montrés pour les lignées *gebp-4* et *gpl2-1* afin d'illustrer respectivement l'augmentation et la diminution de transcrits sauvages chez ces deux lignées par rapport au contrôle. **C**, vérification de la position d'insertion des transposons et T-DNA par séquençage. Le T-DNA de la lignée *gpl1-1* présente deux bordures gauches. La bordure droite du T-DNA de la lignée *gpl3-1* n'a pas pu être détectée.

Cette lignée mutante étant la seule disponible pour le gène *GPL2* dans les banques de mutants d'insertion, elle a par conséquent été utilisée dans nos études génétiques. Finalement, nous avons fait le choix de réaliser notre étude génétique principalement à partir des allèles *gebp-1*, *gpl1-1*, *gpl2-1*, et *gpl3-1*. Pour chacun de ces allèles, la position du transposon ou du T-DNA a été vérifiée par séquençage des parties flanquantes (**Figure 20 C**). Ces différents éléments d'insertion se révèlent bien présents dans les régions indiquées par le site Internet *T-DNA Express*.

II A. 2/ Construction de lignées multiples mutantes *gebp/gpl*

Une analyse phénotypique a été menée sur chacune des lignées simples mutantes cultivées en terre ou *in vitro*. Ces simples mutants *gebp* et *gpl* ne présentent aucune différence avec les plantes sauvages. Comme décrit en introduction et dans le chapitre I, plusieurs arguments suggèrent une redondance de fonction des gènes *GeBP/GPL* : ces derniers présentent en effet une forte similarité, leurs profils d'expression se superposent, et les protéines *GeBP/GPL* sont capables de former des dimères dans toutes les combinaisons possibles. Une telle redondance fonctionnelle pourrait expliquer l'absence de phénotype des lignées simples mutantes *gpl*. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons entrepris de construire des doubles mutants et un triple mutant *gebp/gpl* par croisements entre les trois lignées homozygotes *gebp-1*, *gpl1-1*, et *gpl2-1*, qui correspondent aux trois gènes les plus proches de la famille. L'ensemble des croisements et génotypes ayant servi à identifier les lignées doubles et triples mutantes *gebp/gpl* présentées au cours de ces travaux ont fait l'objet d'un travail conduit par Daniel Perazza auquel tous les membres de l'équipe ont participé. Suite au croisement des lignées simples mutantes, les trois combinaisons de lignées doubles mutantes ont été isolées dès la F2 par génotypage. Un nouveau croisement entre les lignées doubles mutantes *gebp-1 gpl2-1* et *gebp-1 gpl1-1* a permis d'obtenir en F2 une lignée homozygote pour les allèles *gebp-1* et *gpl1-1* et hétérozygote pour l'allèle *gpl2-1*. Le génotypage de la descendance F3 de cette lignée a permis d'identifier la lignée triple mutante *gebp-1 gpl1-1 gpl2-1*.

En raison du mélange d'écotypes, toutes les plantes doubles ou triples mutantes issues d'un croisement avec la lignée *gebp-1* (d'écotype *Ler*) ont toujours été comparées aux deux écotypes *Ler* et *Col* dans nos études. Les trois lignées doubles mutantes *gebp-1 gpl1-1*, *gebp-*

l gpl2-1, et *gpl1-1 gpl2-1* ne présentent aucune différence significative par rapport aux deux écotypes *Ler* et *Col*. En revanche, le triple mutant *gebp-1 gpl1-1 gpl2-1* présente un phénotype discret qui est absent chez les lignées doubles mutantes : ses feuilles de rosettes apparaissent légèrement plus pâles que celles des plantes *Col* et *Ler* lorsqu'il est cultivé *in vitro*. Plusieurs arguments déjà présentés précédemment suggèrent un rôle des *GeBP/GPL* dans la voie des hormones GA et/ou CK. Nous avons par conséquent voulu vérifier si ce phénotype discret du triple mutant *gebp-1 gpl1-1 gpl2-1* était révélateur d'une dérégulation dans la voie de l'une ou l'autre de ces deux hormones.

II A. 3/ Les gènes *GeBP*, *GPL1*, et *GPL2* jouent un rôle redondant dans la réponse physiologique aux CK exogènes

Nous avons commencé par tester la réponse physiologique aux GA chez nos différentes lignées mutantes. Les lignées simples et doubles mutantes *gebp/gpl*, la lignée *gebp-1 gpl1-1 gpl2-1* et les contrôles sauvages *Ler* et *Col* ont été cultivés *in vitro* sur des milieux contenant du paclobutrazol (inhibiteur de biosynthèse des GA, cf. Introduction), à différentes concentrations (cf. matériels et méthodes). Le paclobutrazol, à des concentrations de 0,5µM empêche la germination des plantes sauvages. Nos différentes lignées mutantes *gebp/gpl* ne montrent pas de différence significative avec les plantes sauvages sur l'ensemble des ces milieux (non montré). Nous avons ensuite testé la réponse de ces mêmes lignées aux hormones CK.

Le triple mutant *gebp gpl1 gpl2* est moins sensible aux CK exogènes

Un test simple permettant de tester la réponse d'une lignée aux CK consiste à cultiver celle ci sur un milieu contenant des concentrations élevées en CK (supérieur à 1µM). A ces concentrations qui sont très supérieures à son niveau biologique, l'hormone entraîne une toxicité importante sur les plantes sauvages incluant notamment un arrêt du développement végétatif peu de temps après germination, accompagné d'un blanchiment rapide des plantules. Certaines mutations de gènes impliqués dans la voie de signalisation des CK entraînent une insensibilité aux CK exogènes des plantes mutantes qui poursuivent leur développement (Higuchi et al., 2004; To et al., 2004; Hutchison et al., 2006). Nous avons cultivé des plantes simples, doubles, et triples mutantes *gebp/gpl* et des plantes sauvages *Ler* et *Col* sur des milieux contenant des concentrations croissantes en kinétine (une CK de synthèse, cf.

Introduction). Afin de disposer d'un contrôle positif, nous avons inclus dans nos expériences un double mutant *arr1-3 arr12-1* affecté dans deux gènes de la famille des *ARR* de type B. Ces gènes sont impliqués dans la voie de signalisation des CK (cf. Introduction), et cette lignée double mutante est décrite comme présentant un fort dysfonctionnement de la réponse hormonale couplée à une baisse importante de sensibilité aux CK exogènes (Mason et al., 2005). Lors de nos tests physiologiques, le développement des plantes sauvages se révèle fortement affecté sur les milieux contenant 50µM de kinétine (**Figure 21 A**). Comme attendu, la lignée *arr1-3 arr12-1* se montre dans nos conditions beaucoup moins sensible aux CK exogènes que les lignées sauvages à cette même concentration (**Figure 21 A**). A l'instar des plantes sauvages, les plantes simples et doubles mutantes *gebp/gpl* sont également sévèrement affectées par les cytokinines exogènes (**Figure 21 A**). Toutefois, leurs cotylédons restent verts plus longtemps et certaines plantules produisent parfois quelques ébauches de feuilles avant de stopper leur développement (non montré). A l'inverse, les plantes *gebp gpl1 gpl2* sont beaucoup moins affectées par les cytokinines exogènes à cette concentration. Elles continuent leur développement, en produisant des feuilles et gardent une couleur verte (**Figure 21 A**), indiquant une réduction de la sensibilité aux CK exogènes.

Afin de confirmer cette baisse de sensibilité aux CK chez le triple mutant *gebp gpl1 gpl2*, nous avons réalisé d'autres tests physiologiques, permettant de mesurer la réponse de nos lignées mutantes *gebp/gpl*, dans plusieurs processus influencés par les CK.

L'effet des CK sur le contenu en chlorophylle des feuilles est réduit chez le triple mutant *gebp/gpl*

Les CK sont connues pour exercer un contrôle sur le contenu en chlorophylle des feuilles. A des concentrations physiologiques normales (inférieures à 1µM), les CK retardent en effet la sénescence des feuilles et la dégradation de la chlorophylle qui lui est associée (Richmond and Lang, 1957; Gan and Amasino, 1995). A l'inverse, les traitements par des concentrations toxiques en CK exogènes (supérieures à 1µM) entraînent une dégradation du contenu en chlorophylle des feuilles (To et al., 2004; Mason et al., 2005). Nous avons voulu tester l'influence des fortes concentrations en CK exogènes sur le contenu en chlorophylle de nos lignées sauvages et mutantes. Les plantes ont donc été cultivées en présence ou en absence de CK exogènes, et leur contenu en chlorophylle a été dosé (**Figure 21 B**). En absence de CK exogènes, seule la lignée triple mutante *gebp gpl1 gpl2* présente une diminution significative du contenu en chlorophylle par rapport aux lignées sauvages (**Figure 21 A**). Cette diminution

est cohérente avec le phénotype vert pâle de cette lignée triple mutante. Comme les CK retarde la dégradation de la chlorophylle dans les conditions physiologiques normales, cette réduction du contenu en chlorophylle observée chez le triple mutant pourrait être due à une réduction de sensibilité de ce dernier aux CK endogènes.

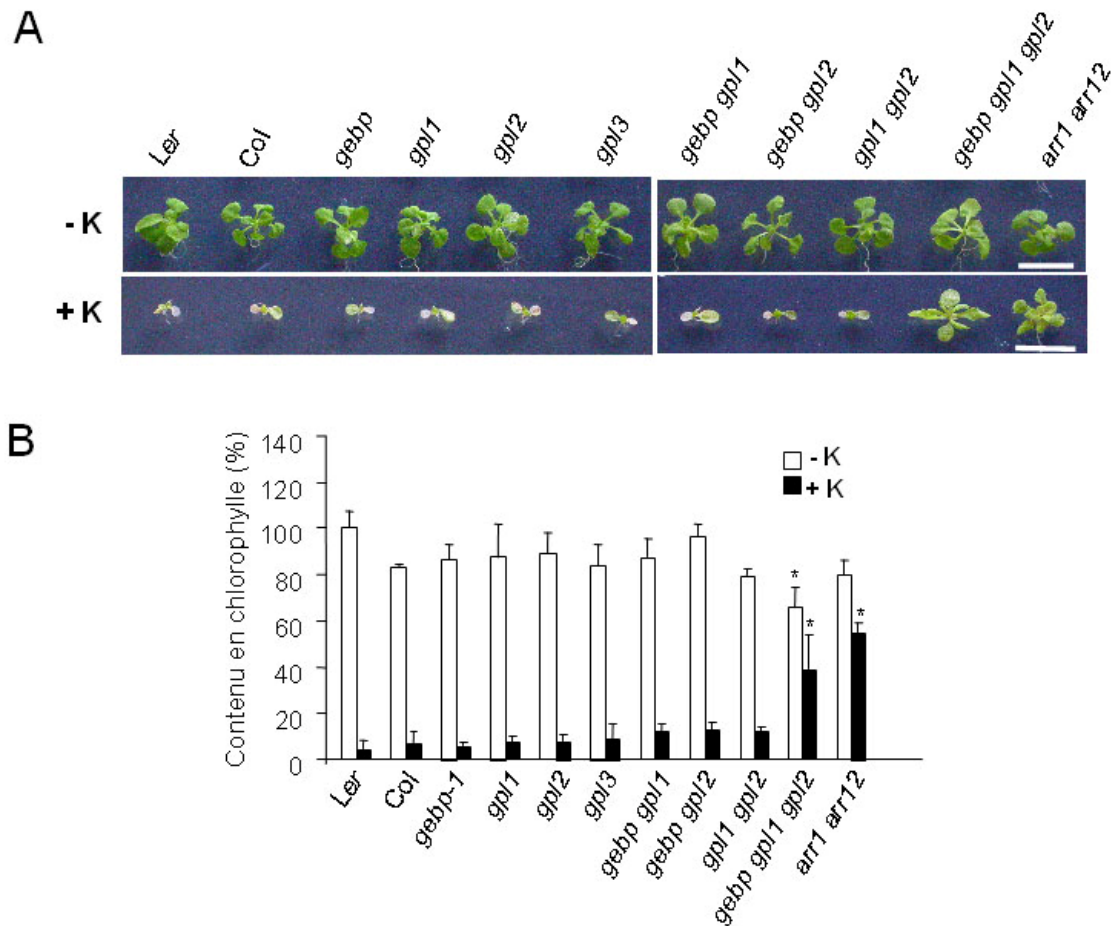


Figure 21 : Réduction de la sensibilité du triple mutant *gebp gpl1 gpl2*, aux hormones cytokinines

A, croissance *in vitro* sur milieu MS en absence (-K) ou en présence (+K) de kinétine (50µM). Barres d'échelles : 1cm. En absence de kinétine, le triple mutant *gebp gpl1 gpl2* présente une légère pâleur par rapport aux plantes sauvages. **B**, contenu en chlorophylle des lignées indiquées cultivées sur milieu MS en absence (barres blanches) ou en présence (barres noires) de kinétine (50µM). Les astérisques indiquent les valeurs correspondant à des changements significatifs par rapport aux contrôles sauvages d'après le test ANOVA. On considère *Ler* comme le niveau 100%. Ces résultats ont été confirmés sur trois expériences indépendantes.

En présence de CK exogènes, le contenu en chlorophylle est sévèrement réduit chez les lignées sauvages. Les simples et doubles mutants ne sont pas différents des plantes sauvages. A l'inverse, chez le contrôle d'insensibilité aux CK *arr1 arr12*, la réduction du contenu en

chlorophylle apparaît peu importante. La lignée *gebp gpl1 gpl2* présente également une réduction beaucoup moins importante du contenu en chlorophylle, suggérant à nouveau une diminution de la sensibilité du triple mutant *gebp/gpl* aux CK exogènes.

L'action des CK sur la sénescence des feuilles diminue chez les mutants *gebp/gpl*

Dans un deuxième temps, nous avons testé l'action des CK sur la sénescence des feuilles chez les lignées mutantes *gebp/gpl*. Dans ce but, nous avons réalisé une expérience d'induction de la sénescence à l'obscurité permettant d'induire artificiellement et de quantifier la sénescence foliaire (Ueguchi et al., 2001; Buchanan-Wollaston et al., 2005). L'incubation de feuilles isolées dans de l'eau à l'obscurité pendant plusieurs jours permet de mimer les processus de sénescence, et entraîne une nécrose des tissus accompagnée d'une chute du niveau de chlorophylle. L'ajout de CK dans la solution permet de retarder cet effet. Nous avons donc détaché des feuilles de plantules de nos différentes lignées contrôles et mutantes *gebp/gpl*, que nous avons placées dans le noir dans des solutions supplémentées ou non par différentes concentrations de CK sous forme de 6-benzyl-adénine (BA, une CK de synthèse). Après dix jours d'induction de la sénescence à l'obscurité, les contenus en chlorophylle des feuilles ont été mesurés.

Comme illustré dans la **Figure 22 A et B**, après dix jours d'incubation à l'obscurité, la quantité de chlorophylle des feuilles sauvages chutent drastiquement. Ce phénomène est atténué par la présence de CK exogènes dans le milieu. Chez le double mutant *arr 1-12*, le niveau de chlorophylle diminue de la même manière en absence de CK, mais à l'inverse de ce qui est observé pour les feuilles sauvages, la présence de CK exogènes ne permet pas d'atténuer cette diminution. En absence de CK exogènes, le contenu en chlorophylle des simples, doubles, et triples mutants *gebp/gpl* est également diminué.

Cependant, chez la plupart de ces lignées mutantes, le niveau de chlorophylle en présence de CK est significativement moins important que chez les lignées sauvages, la différence la plus importante étant observée chez le triple mutant. Ce test confirme donc la sensibilité réduite aux CK exogènes du triple mutant *gebp/gpl* et suggère que les lignées simples et doubles mutantes *gebp/gpl* pourrait également présenter une légère réduction de sensibilité à ces hormones.

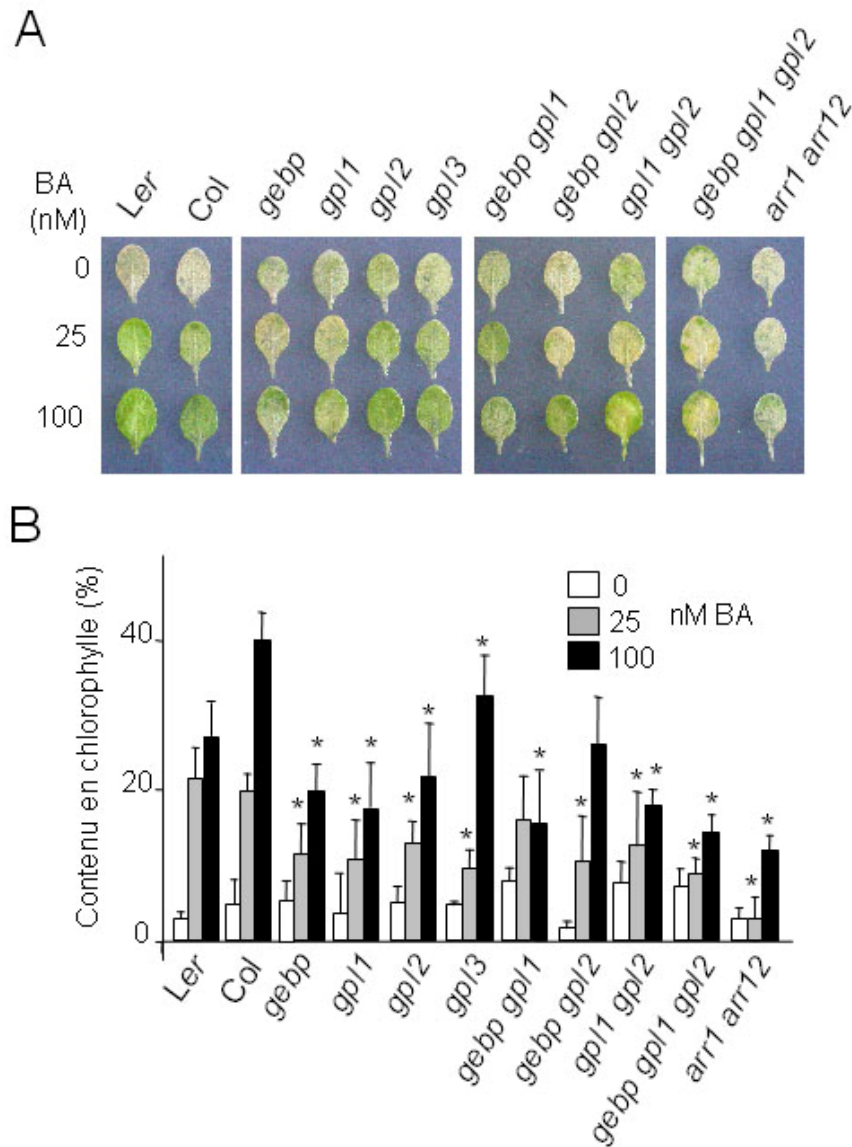


Figure 22 : Test d'induction à l'obscurité de la sénescence de feuilles détachées

A, Feuilles détachées de rosettes sauvages ou mutantes incubées pendant 10 jours à l'obscurité en absence ou en présence de BA aux concentrations indiquées. **B**, Quantification du contenu en chlorophylle des feuilles détachées. Une mesure du contenu en chlorophylle de feuilles détachées le jour de lancement du test permet de déterminer le niveau 100% de chlorophylle de chaque écotype testé. Les astérisques indiquent les valeurs correspondant à des changements significatifs par rapport aux contrôles sauvages aux différentes concentrations en CK, d'après le test ANOVA. Ces résultats sont issus de trois expériences indépendantes.

La formation de cals en réponse aux CK est altérée chez le triple mutant

La stimulation de la division cellulaire constitue l'une des grandes fonctions remplies par les CK. Ces dernières sont notamment connues pour déclencher conjointement aux auxines la production de cals in vitro (Skoog and Miller, 1957). D'après les informations disponibles

dans la banque de données microarrays du logiciel *GeneVestigator* (www.genevestigator.ethz.ch/gv/index/jsp), les gènes *GeBP* et *GPL1* sont fortement exprimés dans les cals. La capacité d'explants racinaires à former des cals en réponse aux CK a donc été testée. Des segments de racines de plantules sauvages, triples mutantes *gebp gpl1 gpl2*, et doubles mutantes *arr1-12*, ont été excisés et cultivés sur MS, et mis en culture sur différents milieux contenant des concentrations croissantes en CK (kinétine) et une concentration fixe d'auxine sous forme d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique. Comme on peut le voir dans la **Figure 23**, après trois semaines de cultures, les segments racinaires des plantes sauvages forment des cals sur les milieux contenant au moins 200 ng/mL de CK. Aux mêmes concentrations, le double mutant *arr 1-12* ne forme pas de cals. Le triple mutant parvient à former quelques cals mais ces derniers ne verdissent pas contrairement aux sauvages. Ces résultats confirment une nouvelle fois la sensibilité réduite du triple mutant aux CK exogènes.

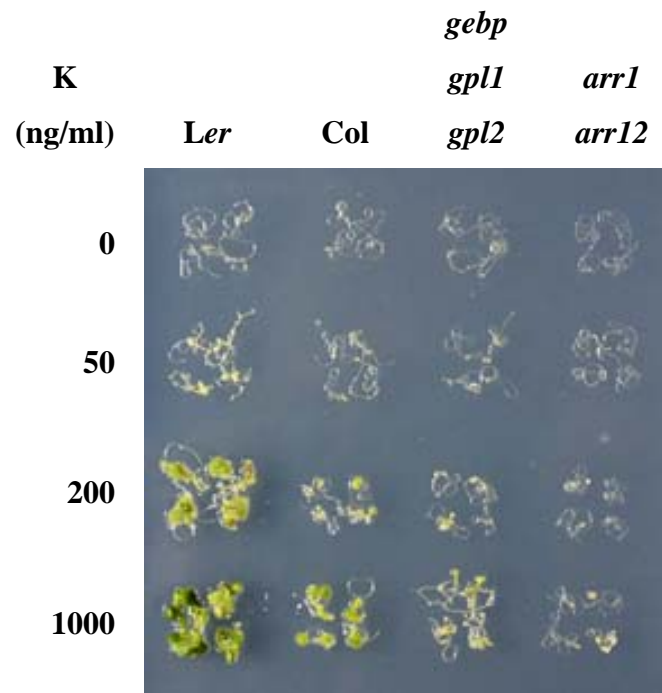


Figure 23 : Essais d'induction de cals

Des segments racinaires de plantes cultivées in vitro pendant 10 jours ont été prélevés et incubés sur des milieux contenant de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique en absence ou en présence de kinétine (K) aux concentrations indiquées. Quatre segments racinaires représentatifs sont montrés pour chaque génotype et chaque concentration d'hormone. Ces résultats ont été retrouvés sur trois expériences indépendantes.

La réponse aux CK du triple mutant n'est pas affectée dans le test d'inhibition de la croissance des racines

Les CK contrôlent également la croissance des racines (Nishimura et al., 2004; Ferreira and Kieber, 2005), et l'addition de CK exogènes à des concentrations de l'ordre de 0,1 μ M entraîne une réduction drastique de leur taille (Higuchi et al., 2004; To et al., 2004). La communauté des scientifiques qui étudient l'effet des CK considère généralement ce test d'inhibition de croissance racinaire comme essentiel pour démontrer une implication dans le signal CK. Bien que l'expression des gènes *GeBP*, *GPL1* et *GPL2* ne soit pas détectable dans les racines, nous avons voulu tout de même vérifier si la lignée triple mutante *gebp gpl1 gpl2* présentait également une baisse de sensibilité aux CK dans ces tissus. Des plantes sauvages (Col et *Ler*), et triples mutantes ont été cultivés *in vitro* en position verticale sur des milieux supplémentés ou non par des CK exogènes (0,1 μ M BA) et la taille de leurs racines a été comparée après 14 jours de culture (**Figure 24**).

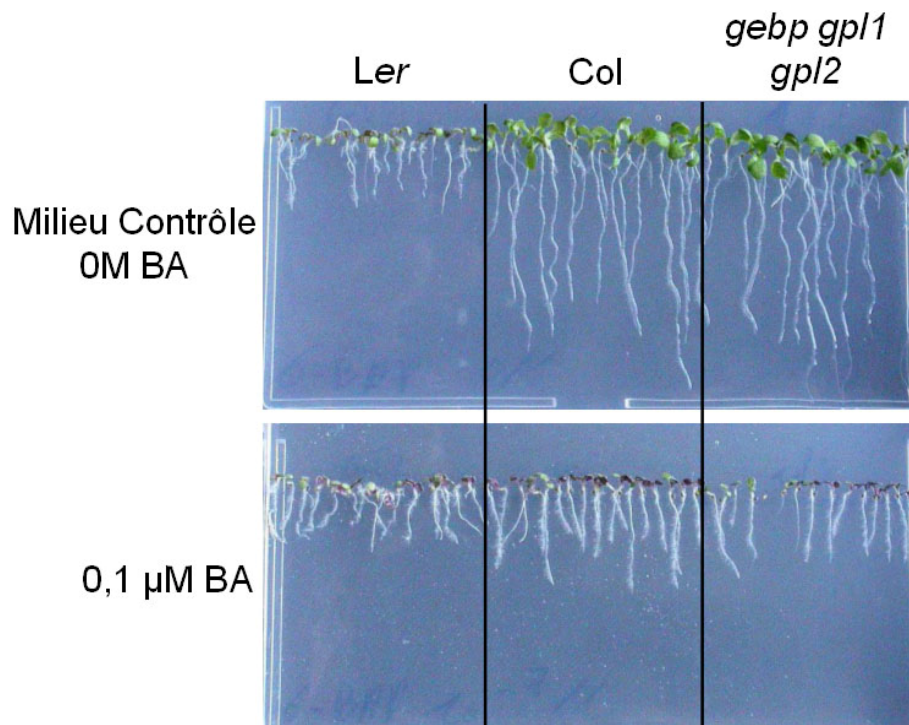


Figure 24 : Test d'inhibition de croissance racinaire par les CK exogènes

Les graines des lignées sauvages et mutantes ont été alignées sur les deux milieux supplémentés en CK aux concentrations indiquées, et les plantes ont été cultivées en position verticale pendant 14 jours. Les racines des plantes Col et triples mutantes *gebp/gpl* sont affectées de la même manière par les CK exogènes. Ces deux lignées montrent également un comportement identique au niveau de leurs racines sur des milieux supplémentés avec des concentrations de 1 μ M ou 10nM de BA (non montré).

En absence de CK exogènes, les racines des plantes Col et *gebp gpl1 gpl2* ne présentent aucune différence de croissance tandis que celles de la lignée sauvage *Ler* montrent une croissance plus réduite. En présence de CK exogènes, les racines des plantes *Ler* ne subissent qu'une légère réduction de taille. Les racines des plantes Col et triples mutantes sont en revanche beaucoup plus affectées, et présentent une réduction de taille supérieure à 50%, cette réduction se montrant comparable chez les deux lignées (**Figure 24**).

Bien que la différence de réponse des deux écotypes sauvages ne facilite pas leur interprétation, ces données semblent montrer une absence d'altération de la sensibilité des racines du triple mutant aux CK exogènes par rapport aux plantes sauvages. Ce résultat qui est contradictoire avec ceux obtenus lors des autres tests de réponse aux CK exogènes, est en revanche en accord avec l'absence d'expression des lignées rapporteurs GUS *GeBP*, *GPL1*, et *GPL2* au niveau des racines (cf. chapitre I, **Figure 19**). Ces données suggèrent par conséquent que les *GeBP/GPL* pourraient n'intervenir dans le signal CK que dans les tissus aériens et non dans la plante entière.

L'ensemble des résultats présentés dans ces paragraphes suggère donc fortement que les gènes *GeBP*, *GPL1*, et *GPL2* pourraient jouer un rôle redondant dans la réponse physiologique aux CK exogènes dans les régions aériennes de la plante.

II A. 4/ Les GeBP/GPL sont impliqués dans la régulation du signal CK

Le fait que les mutants *gebp/gpl* présentent une sensibilité réduite aux CK exogènes indique que le signal CK pourrait être diminué chez ces lignées. Comme on l'a vu en introduction, les *ARR* de type A sont des régulateurs négatifs redondants du signal CK (Taniguchi et al., 1998; D'Agostino et al., 2000; Hwang and Sheen, 2001; To et al., 2004). Ce sont de plus les principaux gènes répondant aux CK, et leur expression est rapidement augmentée en réponse à un traitement par l'hormone (D'Agostino et al., 2000; Kiba et al., 2002; Rashotte et al., 2003). Ces gènes constituent donc des marqueurs moléculaires idéaux pour tester une dérégulation du signal CK chez nos lignées mutantes.

Les niveaux de transcrits des gènes ARR-A sont augmentés chez les mutants *gebp/gpl*

Afin de tester la réponse moléculaire aux CK endogènes chez les mutants *gebp/gpl*, les niveaux de transcrits des gènes *ARR5* et *ARR7* (deux *ARR-A*) ont été mesurés dans les rosettes des plantes sauvages, simples, doubles et triples mutantes en RT-PCR semi-quantitative (en collaboration avec Daniel Perazza). On peut voir dans la **Figure 25 A** que le triple mutant *gebp gpl1 gpl2* présente une augmentation significative du niveau des transcrits des deux gènes *ARR-A* testés, d'un facteur 5 en moyenne par rapport au niveau de base observé chez les plantes sauvages. Les simples et les doubles mutants *gebp/gpl* montrent également une élévation du niveau de transcrits des gènes *ARR5* et *ARR7*, la lignée *gebp-1 gpl2-1* étant celle qui montre la plus forte augmentation après la lignée triple mutante. Ces données indiquent que les gènes *GeBP/GPL* présentent un rôle redondant dans la régulation des niveaux de transcrits des gènes *ARR* de type A.

L'induction des ARR-A par les CK est diminuée chez le triple mutant

Nous avons ensuite voulu étudier la réponse moléculaire aux CK exogènes chez le triple mutant *gebp gpl1 gpl2*. Dans ce but, les niveaux de transcrits de trois *ARR* de type A : *ARR5*, *ARR6*, et *ARR7* ont été mesurés avant et après 1h d'un traitement par des CK exogènes (Trans-zéatine), chez les lignées sauvages *Ler* et *Col*, et la lignée *gebp gpl1 gpl2*. Avant l'induction par les CK, les niveaux de transcrits des trois *ARR-A* se montrent plus élevés chez le triple mutant que chez le sauvage (**Figure 25 B**), confirmant ainsi les résultats précédents. Une heure après traitement par les CK exogènes, les niveaux de transcrits des *ARR-A* augmentent d'un facteur 4 à 10 chez les plantes sauvages, tandis qu'ils n'augmentent que d'un facteur 1 à 3 chez le triple mutant *gebp gpl1 gpl2* (**Figure 25 C et D**). Ce dernier est donc toujours capable de répondre aux CK, mais cette réponse apparaît fortement réduite par rapport à celle des plantes sauvages. Ce résultat est cohérent avec la réduction de la réponse aux CK exogènes présentée par le triple mutant *gebp gpl1 gpl2* dans les différents tests physiologiques décrits précédemment.

Ces différents résultats indiquent donc que les niveaux de transcrits des *ARR* de type A sont régulés de façon redondante par les gènes *GeBP*, *GPL1*, et *GPL2*, et apportent la confirmation de l'implication de ces gènes dans la réponse aux CK.

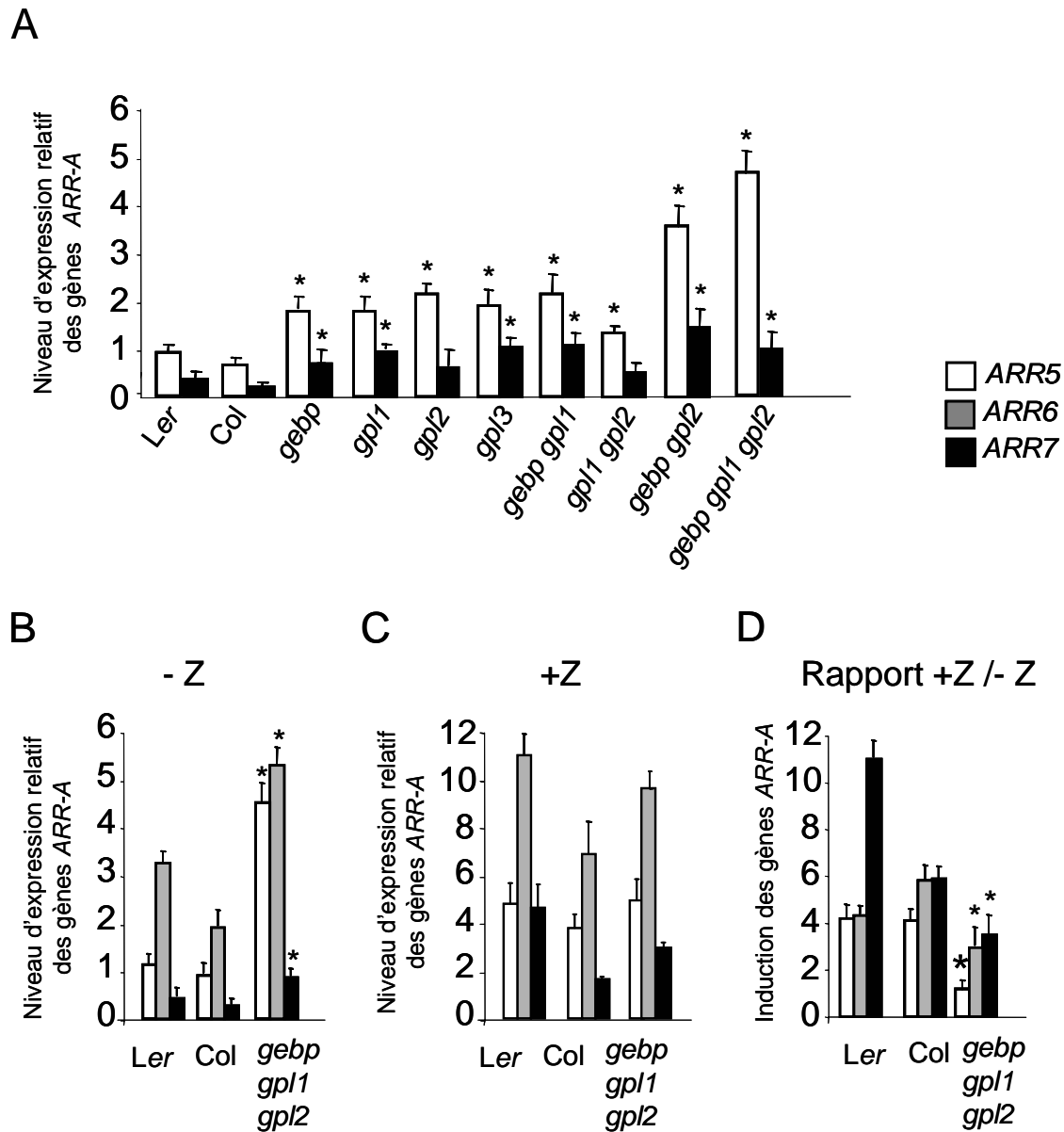


Figure 25 : Etude de la réponse moléculaire aux CK chez les mutants *gebp/gpl*

A, niveaux d'expression relatifs des gènes *ARR5* et *ARR7* chez les sauvages, et les lignées mutantes *gebp/gpl* en absence de CK exogènes. **B à D**, niveaux d'expression relatifs des gènes *ARR5*, *ARR6*, et *ARR7* chez les sauvages et le triple mutant *gebp/gpl*. Les plantes ayant servies à extraire les ARN totaux ont été congelées avant (-Z), ou après 1h d'induction par les CK déclenchée par un spray de trans-zéatine (+Z), et le rapport du niveau des transcrits avant et après induction a été calculé (-Z/+Z). Les astérisques indiquent les valeurs correspondant à des changements significatifs par rapport aux contrôles sauvages d'après le test ANOVA. Ces résultats sont issus d'une moyenne des valeurs de trois expériences indépendantes.

II B. Etude de la surexpression des *GeBP/GPL*

II B.1/ Les lignées 35S::*VP16*::*GPL2* révèlent une implication importante des *GPL2* dans les processus de développement et de sénescence des feuilles

Obtention et caractérisation de lignées surexprimeur

L'analyse des lignées mutantes *gebp/gpl* a révélé chez ces dernières une altération probable de la boucle de rétrocontrôle négatif du signal CK, conduisant à une baisse de sensibilité au CK exogènes. Afin de compléter l'étude fonctionnelle des gènes *GeBP/GPL*, deux types de constructions ont été réalisés:

- (1) Des fusions transcriptionnelles entre les séquences codantes *GeBP/GPL* et le promoteur fort double 35S, visant à surexprimer de manière ectopique les protéines correspondantes.
- (2) Des fusions traductionnelles entre les séquences codantes *GeBP/GPL* et celle du domaine VP16, également sous le contrôle du promoteur double 35S (**Figure 26 A**).

Le domaine VP16 qui a été identifié chez le virus de l'herpès, est capable d'activer très fortement la transcription d'un gène cible chez les plantes (Parcy et al., 1998). Ce deuxième type de construction vise donc à transformer les facteurs *GeBP/GPL* surproduits en activateurs forts de transcription, et ce quelle que soit leur fonction d'origine (activateurs ou répresseurs). Pour faciliter la détection des protéines recombinantes produites dans les plantes transformées, ces deux types de constructions comprennent également une fusion avec un motif 3xHA, utilisable comme épitope en immunodétection. Les huit constructions ainsi que les deux constructions contrôles (vecteurs sans séquence codante *GeBP/GPL*) ont été introduites dans des plantes sauvages d'écotype Col. Pour chaque construction, les extraits protéiques de 10 lignées transformées indépendamment ont été testés par immuno-détection, en utilisant un anticorps anti-HA. La surexpression de *GPL2* est détectable avec les deux types de construction, chez la plupart des lignées testées (**Figure 26 B**). En revanche, pour *GeBP*, *GPL1*, et *GPL3*, aucune des lignées testées n'a permis de détecter une accumulation de protéines recombinantes quelle que soit la construction. Ce résultat surprenant rappelle la faible expression des protéines recombinantes *GFP::*GeBP/GPL** observé chez les lignées *35S::*GFP*::*GeBP/GPL** décrites lors du chapitre I A. Ces observations suggèrent une dégradation post transcriptionnelle affectant les messagers *GeBP*, *GPL1* et *GPL3* ou les

protéines correspondantes. Le gène *GPL2* semble en revanche peu (ou pas) affecté par ce phénomène.

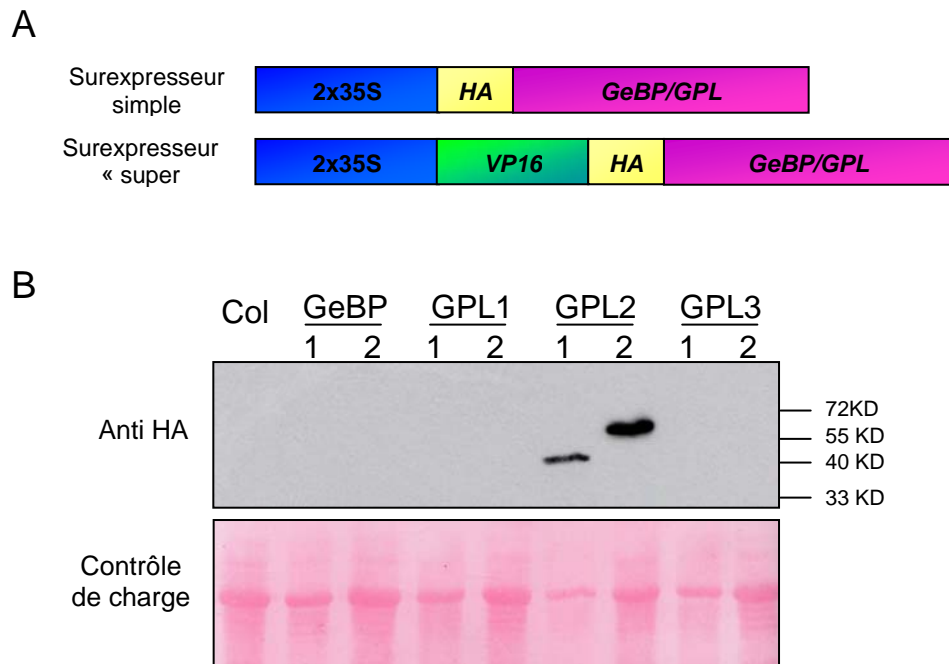


Figure 26 : Détection par western blot des protéines GeBP/GPL de lignées surexprimeuses ou super activatrices

A, représentation schématique des deux types de constructions visant à surexprimer les protéines GeBP/GPL. Le promoteur double 35S (2x35S), le motif 3xHA (HA), le domaine activateur de transcription VP16 (VP16), et la position des cDNAs de GeBP ou des GPL (GeBP/GPL) sont représentés pour chaque fusion. **B**, Immuno-détection des protéines GeBP/GPL de lignées surexprimeur (1) ou « super activatrices » (2). La détection des protéines d'une lignée représentative des 10 lignées indépendantes testées est montrée pour chaque gène. Les échelles de tailles indiquées en légende ont été évaluées à l'aide d'un marqueur de taille protéique déposé en parallèle. Le contrôle de charge correspond à une coloration au rouge ponceau de la membrane sur laquelle les protéines ont été transférées avant l'immuno-détection.

Les lignées 35S::VP16::GPL2 présentent des altérations majeures du développement

En accord avec les résultats de l'immuno-détection du motif 3xHA des différentes lignées, l'analyse des plantes portant les fusions avec les séquences codantes des gènes *GeBP*, *GPL1*, et *GPL3* ne révèle aucun phénotype macroscopique particulier. De la même manière, les plantes *35S::GPL2* ne sont pas différentes des plantes contrôles (non montré). En revanche, 7 des 10 lignées *35S::VP16::GPL2* analysées présentent une différence de phénotype importante avec les lignées contrôles *35S::VP16*. Cette différence se traduit par une

diminution drastique de la taille des feuilles et des pétioles et par une sénescence précoce des feuilles s'accompagnant de lobes et de nécroses (**Figure 27**).

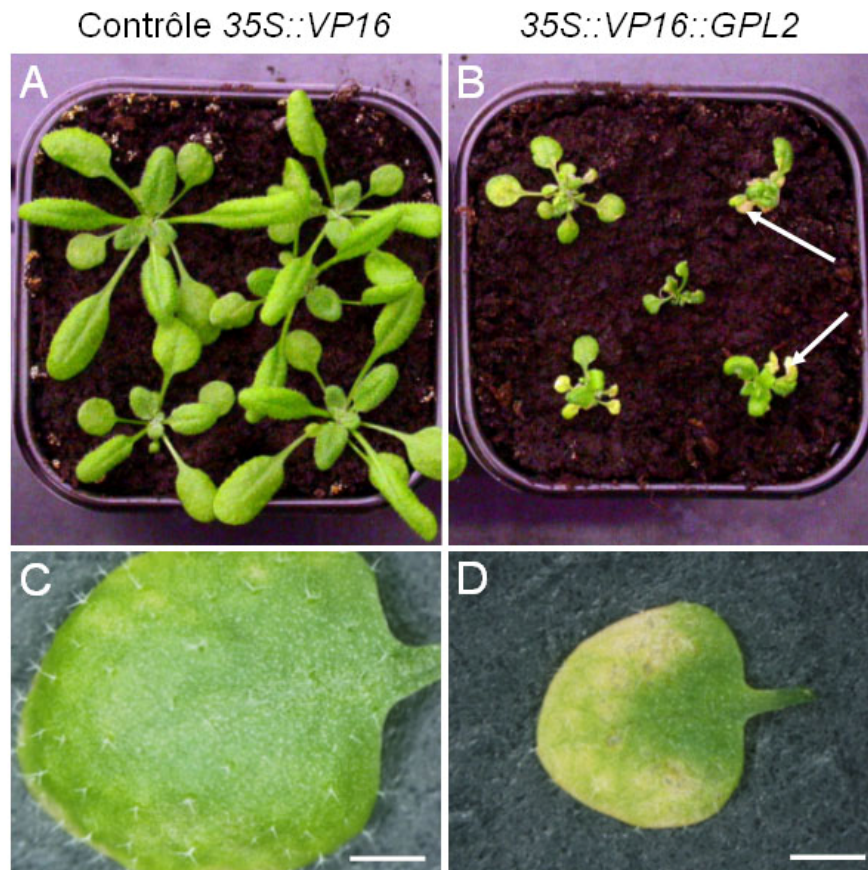


Figure 27 : Phénotypes des lignées 35S::VP16::GPL2

A, Plantes contrôles 35S::VP16 âgées de 3 semaines. **B**, Plantes 35S::VP16::GPL2 âgées de 3 semaines présentant un nanisme marqué, ainsi qu'une sénescence précoce des feuilles (flèches). **C**, feuille de la seconde paire d'une plante contrôle. **D**, feuille de la seconde paire d'une plante 35S::VP16::GPL2. La présence de régions dépigmentées et nécrosées est bien visible. Barres d'échelles : 1mm.

La réduction en taille des feuilles pourrait être due à une diminution de la croissance et/ou de la division cellulaire. Le fait que les lignées 35S::GPL2 ne présentent aucun phénotype, alors que la surexpression de la protéine GPL2 a été confirmée, pourrait s'expliquer de deux façons : (1) L'action de GPL2 sur ses cibles pourrait nécessiter des cofacteurs présents en quantité limitante ou (2) la quantité de protéines GPL2 produite par les plantes sauvages pourrait être déjà saturante, la production de protéines supplémentaires restant sans effet. L'activité régulatrice des protéines recombinantes VP16::GPL2 ne serait en revanche pas

affectée par ce type de paramètres, le domaine VP16 étant théoriquement censé ne nécessiter aucun cofacteur et entraîner une activation constitutive et forte de l'expression des gènes cibles de *GPL2*. Ces observations suggèrent donc que *GPL2* pourrait jouer un rôle dans la croissance et la sénescence des feuilles.

II B.2/ L'étude des plantes 35S::VP16::GPL2 démontre que la régulation de l'expression des ARR-A par les GeBP/GPL est indirecte

Les niveaux de transcrits ARR-A sont diminués chez les lignées 35S::VP16::GPL2

Les cytokinines, comme il est indiqué en introduction et dans le paragraphe II A.2, sont impliquées dans le contrôle de la sénescence des feuilles. Le phénotype de sénescence précoce observé au niveau des feuilles des lignées 35S::VP16::GPL2, suggère une possible modification de la réponse aux CK chez ces plantes surexprimeurs, à l'instar de la lignée triple mutante *gebp gpl1 gpl2*. Dans le but de vérifier cette hypothèse, les niveaux de transcrits des gènes *ARR5* et *ARR6* ont été mesurés chez des lignées 35S::GPL2 et 35S::VP16::GPL2 ainsi que chez les lignées contrôles Col, et 35S::VP16 respectivement (en collaboration avec Daniel Perazza) (**Figure 28 A**). Chez les plantes 35S::GPL2, les niveaux de transcrits des deux gènes *ARR-A* ne varient pas par rapport aux rosettes des plantes sauvages (Col), ce qui est en accord avec l'absence de phénotype chez ces lignées. En revanche, le niveau de ces transcrits diminue significativement chez les plantes 35S::VP16::GPL2 par rapport aux plantes contrôles 35S::VP16. Comme les protéines recombinantes VP16::GPL2 sont supposées être uniquement capable d'activer la transcription de gènes cibles, ce résultat indique que ces dernières doivent activer un intermédiaire inconnu responsable de la répression de l'expression des gènes *ARR5* et *ARR6*. La régulation des gènes *ARR-A* se fait donc via au minimum un répresseur encore inconnu qui agit en aval de *GPL2*.

Les racines des lignées 35S::VP16::GPL2 sont plus sensibles aux CK

Comme déjà mentionné au paragraphe II A.2, le test d'inhibition de la croissance des racines est un critère important pour démontrer le rôle d'un gène dans la réponse aux CK. Ce test n'a pas révélé de différence entre la lignée triple mutante *gebp gpl1 gpl2* et les lignées sauvages, ce qui est cohérent avec l'absence d'expression de ces trois gènes dans la racine. Comme le promoteur 35S entraîne une expression constitutive notamment au niveau des racines, nous

avons soumis nos lignées *35S::GPL2* et *35S::VP16::GPL2* à un test d'inhibition de croissance racinaire, afin de déterminer leur sensibilité aux CK dans ces tissus. Ces deux lignées ainsi que les lignées Col, et *35S::VP16*, ont été cultivées en présence ou non de différentes concentrations en CK exogènes (6-BA) et leurs racines ont été mesurées après 14 jours.

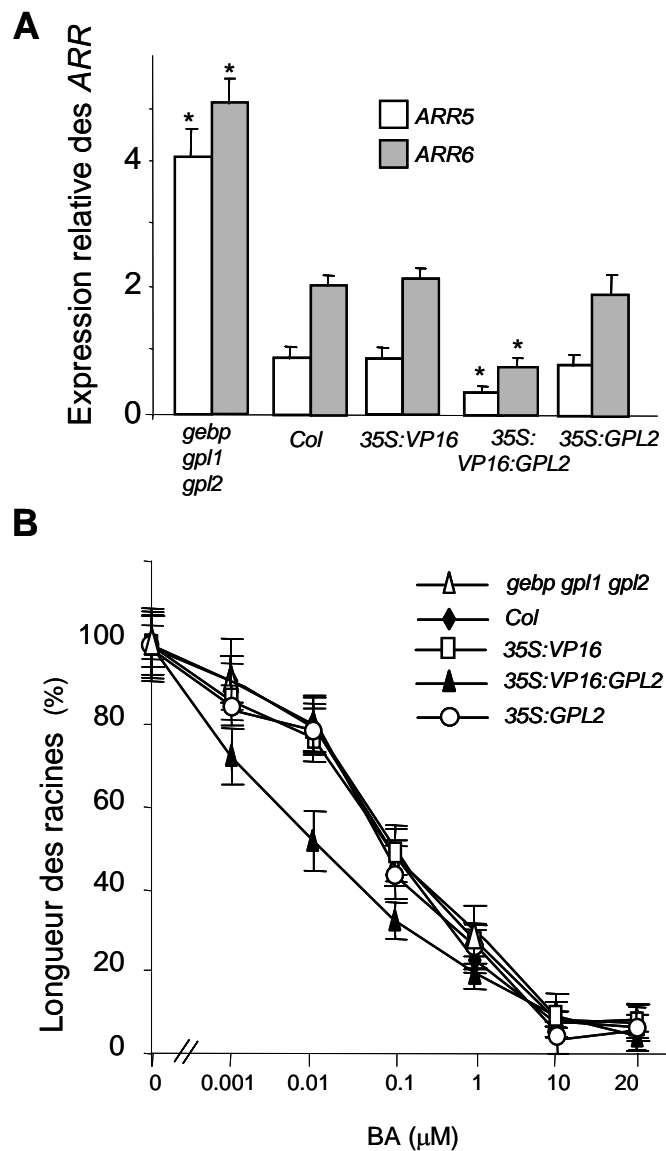


Figure 28 : Niveaux des transcrits de gènes de réponse aux CK *ARR-A* et tests de sensibilité au CK de lignées surexpresseurs de *GPL2*

A, les analyses par RT-PCR ont été réalisées et quantifiées comme cela est décrit dans la *Figure 25*. Les astérisques indiquent les valeurs correspondant à des changements significatifs par rapport aux contrôles sauvages d'après le test ANOVA. La quantification a été réalisée au moins trois fois avec des résultats constants.

B, inhibition de la croissance des racines par les CK exogènes. Les plantes sauvages et transgéniques ont été cultivées sur des milieux supplémentés en CK aux concentrations indiquées pendant 14 jours, puis les racines ont été alignées, prises en photos, et mesurées à l'aide du logiciel *image J*. La longueur des racines est exprimée pour chaque lignée en pourcentage de leur longueur moyenne mesurée sur le milieu sans BA.

Comme on peut le voir dans la **Figure 28 B**, en présence de CK exogènes, les racines des lignées *35S::GPL2* et Col présentent une réduction similaire de leur taille identique à chaque concentration utilisée. Cela confirme conjointement au résultats précédents que la réponse aux CK n'est très probablement pas altérée chez les plantes *35S::GPL2*. En revanche, pour des concentrations en 6-BA n'excédant pas 1µM, les plantes *35S::VP16::GPL2* présentent une réduction de la taille de leur racines significativement plus importante que les plantes contrôles *35S::VP16*. Cela indique donc que la sensibilité aux CK exogènes des plantes *35S::VP16::GPL2* est accrue par rapport aux plantes sauvages.

L'ensemble de ces résultats confirme donc la régulation des *ARR-A* par les *GeBP/GPL* et suggère fortement que cette dernière est indirecte.

Conclusion du chapitre II

Dans ce chapitre, un rôle redondant des gènes *GeBP/GPL* dans le contrôle de la signalisation des hormones CK a été décrit. Ce rôle a notamment été démontré grâce à l'analyse de la perte de fonction des *GeBP/GPL* via les lignées simples, doubles, et triples mutantes des gènes *GeBP*, *GPL1*, et *GPL2*. Lors de plusieurs tests physiologiques caractéristiques de l'action des CK, une partie ou l'ensemble de ces lignées mutantes montre une diminution de la sensibilité aux CK exogènes dans les organes aériens. Cette baisse de sensibilité aux CK est globalement corrélée au nombre de gènes mutés, la lignée triple mutante montrant la réduction de sensibilité la plus importante. Des analyses en RT-PCR semi quantitatives ont démontré une augmentation du niveau des transcrits des gènes *ARR-A* chez ces mêmes lignées mutantes. Ici aussi, cette augmentation se montre proportionnelle avec le nombre de gènes *GeBP/GPL* mutés. Nous avons ensuite confirmé ces résultats par l'étude de la surexpression du gène *GPL2* fusionné au domaine d'activation *VP16*. Les lignées *35S::VP16::GPL2* présentent un phénotype inverse à celui des lignées mutantes *gebp/gpl*, avec une sensibilité accrue aux CK dans le test d'inhibition de la croissance racinaire, et une diminution du niveau des transcrits des gènes *ARR-A*. L'ensemble de ces résultats indique donc que les *GeBP/GPL* contrôlent positivement le signal CK via la répression indirecte des gènes *ARR-A*. Cette fonction des *GeBP/GPL* est cohérente avec l'hypothèse d'une implication dans la voie du gène *KNOXI BREVIPEDICELLUS* puisque l'action de ce dernier passe par le contrôle du signal CK (Jasinski et al., 2005; Yanai et al., 2005).

Chapitre III

Recherche par analyse transcriptomique des voies contrôlées par les gènes GeBP/GPL

Les résultats précédents ont démontré une implication des *GeBP/GPL* dans le contrôle du signal CK via une répression des *ARR-A*. Toutes les combinaisons de lignées triples mutantes *gebp/gpl*, ainsi qu'une lignée quadruple mutante *gebp-1 gpl1-1 gpl2-1 gpl3-1* ont été obtenues récemment au laboratoire. Ces lignées montrent dans l'ensemble un phénotype d'insensibilité aux CK similaire à celui de la lignée triple mutante *gebp gpl1 gpl2* présentée dans le chapitre précédent, confirmant une nouvelle fois le rôle redondant des quatre gènes *GeBP/GPL* dans le signal CK. Ces différentes lignées mutantes ne montrent en revanche aucun phénotype macroscopique qui pourrait donner des indications concernant d'autres voies contrôlées par les *GeBP/GPL*. Certaines fonctions cellulaires pourraient malgré tout être altérées chez ces lignées sans entraîner aucun phénotypique apparent. L'analyse transcriptomique d'une lignée mutante constitue souvent une autre méthode efficace pour obtenir des informations sur la fonction du gène qui est muté. Aussi, afin d'obtenir de nouveaux indices concernant le rôle *in planta* des gènes *GeBP/GPL*, une analyse transcriptomique a été réalisée en collaboration avec la société « *PartnerChip* » via l'utilisation de la technologie des puces à ADN mise au point dans le cadre du projet européen Complete Arabidopsis Transcript MicroArray (CATMA). Cette analyse dont le but est d'identifier les gènes et les voies régulés par la famille de gènes *GeBP/GPL*, a été effectuée sur le quadruple mutant *gebp gpl1 gpl2 gpl3*, et sur la lignée *35S::VP16::GPL2* décrite dans le chapitre précédent. Nous avons analysé les résultats de ces expériences à l'aide de logiciels spécialisés, dans le but de définir les voies biologiques dans lesquelles les *GeBP/GPL* pourraient être impliqués, et d'établir des liens avec d'autres gènes connus.

III A. Déroulement des expériences Microarray et résultats bruts

Les analyses transcriptomiques s'effectuent en comparant le transcriptome d'une lignée d'intérêt avec celui d'une lignée contrôle. Deux comparaisons différentes ont été

réalisées : la comparaison de la lignée quadruple mutante *gebp gpl1 gpl2 gpl3* avec des plantes sauvages d'écotype Col d'une part, et la comparaison de la lignée surexpresser *35S::VP16::GPL2* avec Col d'autre part. Chaque comparaison a été réalisée en triplicats par la société « *PartnerChip* » à partir de trois extractions d'ARN totaux indépendantes effectuées dans notre équipe.

La technique utilisée par *PartnerChip* est le « Dye Swap ». Des ARN antisens cibles (ARNa) sont produits à partir des ARN totaux extraits de chacune des deux lignées à comparer. Ces deux groupes d'ARNa sont marqués différemment, l'un par des molécules fluorescentes Cy3, l'autre par des Cy5 (Dye). Un mélange équimolaire de ces deux types d'ARNa marqués différemment, sert à hybrider une puce CATMA sur laquelle des GST (Gene-specific Séquence Tag) représentant plus de 95% du génome d'*Arabidopsis* sont alignés sous forme de « spots » selon une grille bien précise. Après lavage, les lames sont scannées et l'intensité de fluorescence respective de chacun des deux fluorophores est déterminée pour chaque spot. Comme les deux cyanines utilisées ne s'incorporent pas de la même manière, une seconde hybridation est réalisée en parallèle, en inversant le marquage des deux ARNa cibles (Swap), ceci afin de normaliser les résultats.

Le niveau d'expression relatif de chaque gène pour une condition donnée (Test ou contrôle) est obtenu par la mesure de l'intensité logarithmique (Log2) moyenne observée pour le Dye et le Swap de la condition en question. La valeur ainsi obtenue est désignée IS (Intensité du Signal). Le rapport entre l'IS de la condition Test et l'IS de la condition contrôle donne la différence d'expression entre ces deux conditions. La valeur obtenue est désignée R, et la formule 2^R donne la différence relative d'expression entre condition test et contrôle. Dans notre cas, deux comparaisons ont été effectuées entre les conditions test : lignée *gebp gpl1 gpl2 gpl3*, lignée *35S::VP16::GPL2*, et la condition contrôle : écotype Columbia. L'analyse des résultats a été effectuée par la société « *PartnerChip* » à l'aide d'un algorithme développé par l'INRA. Les résultats bruts de ces comparaisons sont indiqués dans l'**Annexe 2**.

Ces résultats montrent une bonne homogénéité entre les triplicats. L'expression de 88 gènes apparaît significativement dérégulée dans les trois analyses chez le quadruple mutant, contre 333 chez le surexpresser par rapport au contrôle sauvage Col (**Figure 29**). Plus de la moitié des gènes dérégulés chez la lignée *gebp gpl1 gpl2 gpl3* sont réprimés (51 sous

exprimés contre 37 surexprimés), tandis que la lignée *35S::VP16::GPL2* présente le profil inverse (81 sous exprimés contre 252 surexprimés).

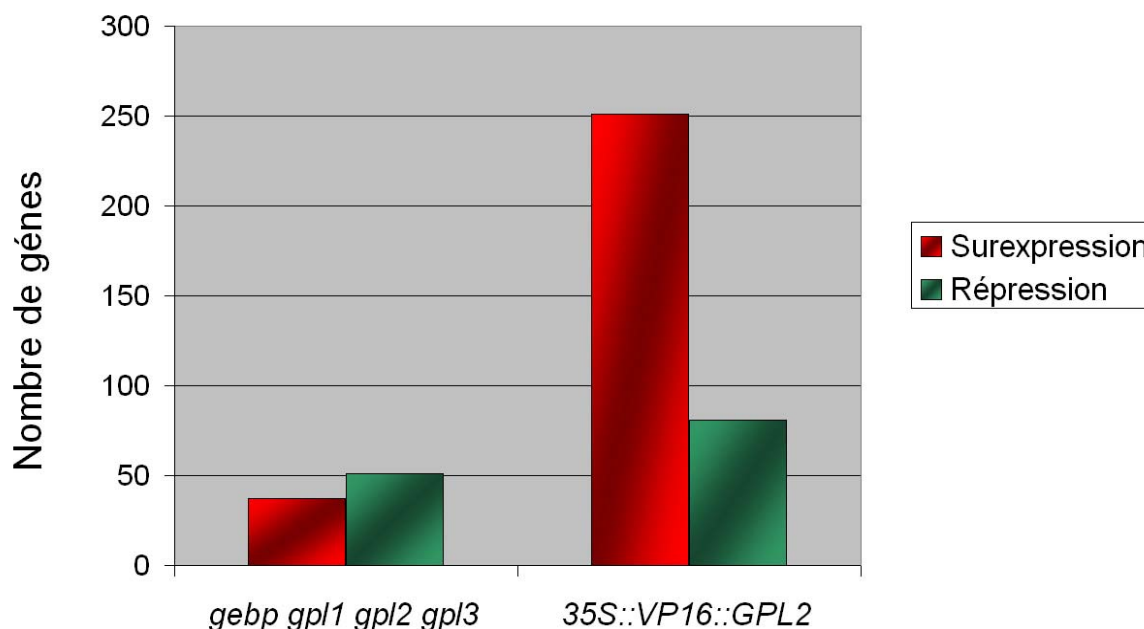


Figure 29 : Nombre de gènes dérégulés chez les lignées *gebp gpl1 gpl2 gpl3* et *35S::VP16::GPL2* par rapport à Col

Les histogrammes rouges représentent le nombre de gènes dont le niveau des transcrits est augmenté (Surexpression), et les verts ceux dont le niveau des transcrits est diminué (Répression). Seuls les gènes qui montrent une dérégulation similaire dans les trois analyses avec une p-value Bonferroni inférieure ou égale à 0,05 sont comptabilisés. Chez le quadruple mutant, 37 gènes sont surexprimés et 51 réprimés par rapport à Col. Chez le surexpresseur, 252 gènes sont surexprimés et 81 réprimés par rapport à Col.

III B. Analyse et interprétation des résultats de l'analyse transcriptomique

III B. 1/ Les voies de réponses aux stress semblent dérégulées chez les lignées *gebp gpl1 gpl2 gpl3* et *35S::VP16::GPL2* par rapport à Col

Nous avons dans un premier temps analysé de façon globale le résultat de nos expériences à l'aide de l'outil « *GO Annotation* » du site Internet « TAIR ». Cet outil permet

de répartir les gènes dérégulés chez les lignées *gebp gpl1 gpl2 gpl3* et *35S::VP16::GPL2* par rapport à Col dans différentes catégories de processus biologiques.

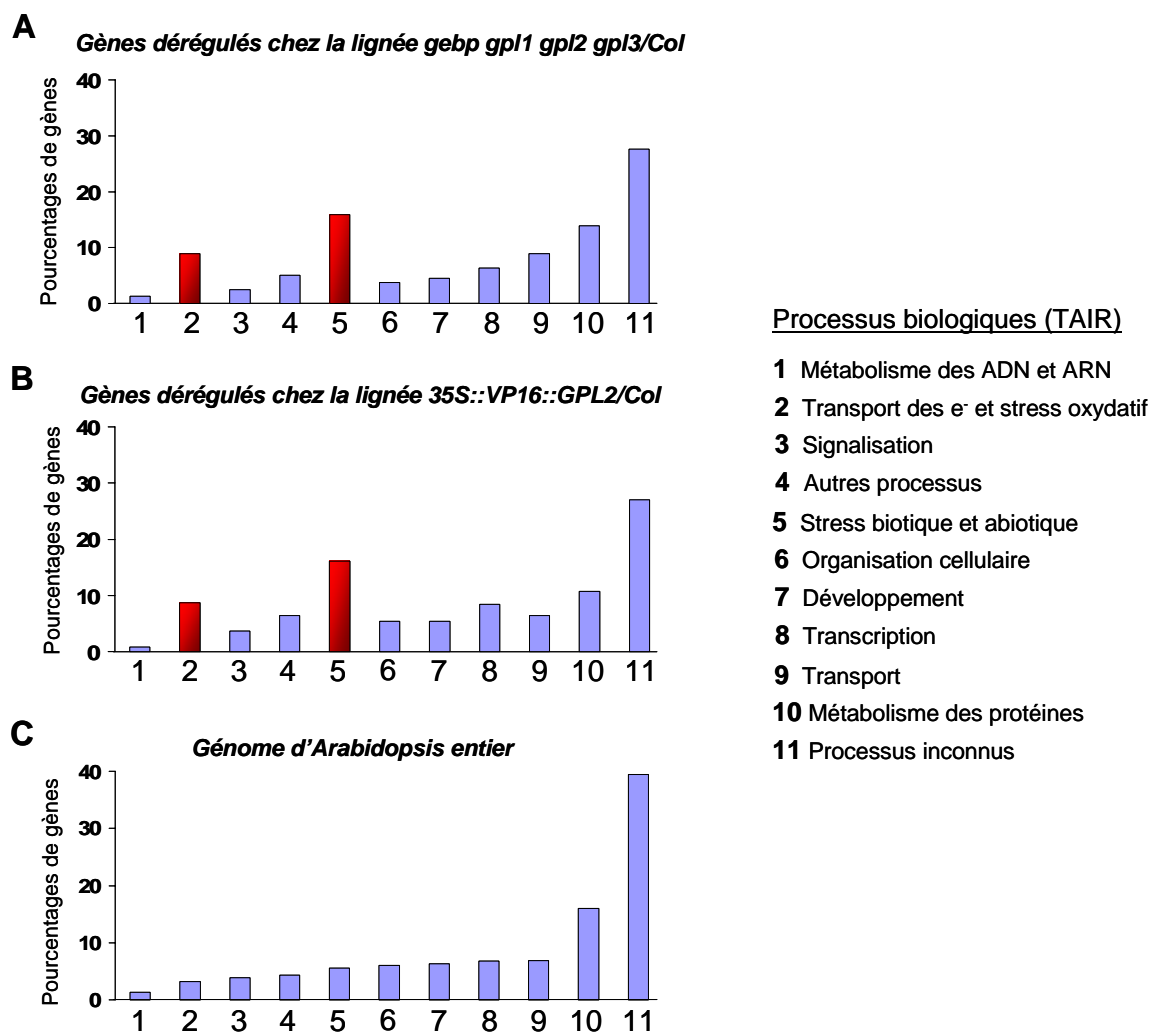


Figure 30 : Répartition des gènes dérégulés chez les deux lignées comparées à Col dans divers processus biologique d'après les annotations du site Internet « TAIR ».

A, répartition en pourcentage, des gènes dérégulés chez la lignée *gebp gpl1 gpl2 gpl3/Col* dans les 11 catégories indiquées en légende (transport des e⁻ = transport des électrons). **B**, répartition en pourcentage des gènes dérégulés chez la lignée *35S::VP16::GPL2/Col* dans les mêmes catégories. **C**, répartition en pourcentage du génome entier d'*Arabidopsis* dans les mêmes catégories. Les histogrammes des figures A et B qui sont colorés en rouge correspondent aux catégories pour lesquelles le pourcentage de gènes dérégulés dans nos deux comparaisons microarray sont plus de deux fois supérieurs au pourcentage du génome entier d'*Arabidopsis* pour ces mêmes catégories. Les graphiques ont été adaptés à partir des résultats fournis par l'outil « *Go Annotation* » du site Internet *TAIR*.

Dans la **Figure 30 A et B**, on peut voir que les répartitions des gènes dérégulés chez les deux lignées testées par rapport à Col sont assez similaires. Environ 30 % de ces gènes sont de fonction biologique inconnue. La catégorie la plus représentée pour chacune des deux comparaisons est celle de la réponse aux stress biotiques et abiotiques (plus de 15 %). Pour comparaison, le génome entier d'*Arabidopsis* a été réparti dans les mêmes catégories (**Figure 30 C**). Son profil de répartition se montre assez proche de celui des gènes dérégulés dans nos deux comparaisons, à l'exception de deux catégories qui montrent un pourcentage de gène trois fois plus important dans nos comparaisons : (1) la réponse aux stress biotiques et abiotiques, et (2) la réponse au stress oxydatif et le transport des électrons. Il semble donc qu'une proportion importante des gènes dérégulés chez les lignées *gebp gpl1 gpl2 gpl3* et *35S::VP16::GPL2* par rapport à Col, soit impliqué dans ces deux voies de stress. Ces analyses suggèrent ainsi que les *GeBP/GPL* pourraient être impliqués dans la réponse au stress.

III B. 2/ Les voies de réponse aux stress biotiques paraissent fortement dérégulées chez le quadruple mutant et la lignée surexpressueur

Les analyses décrites précédemment montrent qu'une part importante de gènes dérégulés chez les lignées *gebp gpl1 gpl2 gpl3* et *35S::VP16::GPL2* par rapport à Col, sont classifiés dans la catégorie stress biotique et abiotique du logiciel *GO Annotation*. Afin d'affiner notre analyse des voies de réponse au stress dérégulées chez ces deux lignées, le logiciel *MapMan* a été utilisé. Ce logiciel qui a été développé dans le cadre du projet d'analyse des banques de données de l'institut Max Plank, est conçu pour permettre la classification d'une sélection de gènes dans différentes voies métaboliques ou développementales (Thimm et al., 2004). Pour chaque voie donnée, le logiciel possède en mémoire une liste de tous les gènes pour lesquels un rôle a été démontré ou suspecté. Les listes sont mises à jour en fonction de l'avancée des connaissances dans les différentes voies. *MapMan* intègre également la valeur R (rapport des niveaux d'expression d'un gène chez la lignée test et chez la lignée contrôle), ce qui permet de comparer le niveau de dérégulation des gènes sur les figures générées par le software. Ce logiciel, comme la plupart des logiciels d'analyse de microarray, ne fonctionne qu'avec des données normalisées selon la codification Affymetrix. Les codes Affymetrix n'existant pas pour tous les gènes présents sur les puces CATMA, nous n'avons pu utiliser qu'une partie de nos données. Les analyses informatiques

sont par conséquent limitées à 69 gènes (sur 88) pour la lignée quadruple mutante et 293 (sur 333) pour la lignée surexprimeur.

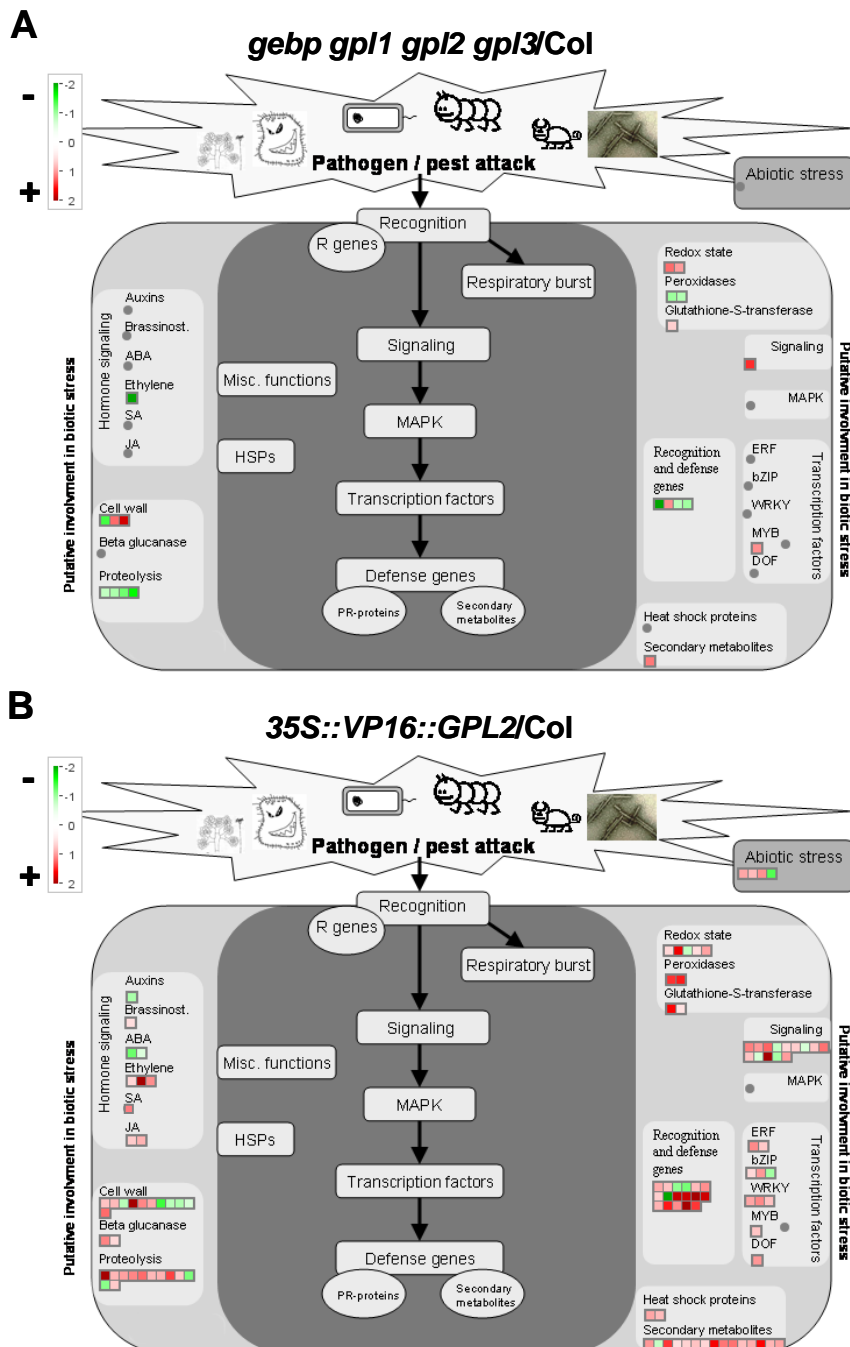


Figure 31 : Cartographie des gènes dérégulés chez les lignées *35S::VP16::GPL2* et *gebp gpl1 gpl2 gpl3* dans la voie de réponse au stress biotique à l'aide du logiciel MapMan

A, cartographie des gènes dérégulés chez la lignée *gebp gpl1 gpl2 gpl3*. Vingt gènes sur 69 (28 %) sont impliqués dans la réponse aux pathogènes d'après *MapMan*. Aucun n'est classé par le logiciel dans la catégorie stress abiotiques. **B**, cartographie des gènes dérégulés chez la lignée *35S::VP16::GPL2*, 100 gènes sur 293 (34 %) sont impliqués dans la réponse aux pathogènes contre 4 seulement dans le stress abiotique (1 %). Chaque gène est représenté par un carré dont la couleur indique la valeur R d'après la légende située en haut à gauche.

Les listes des gènes dérégulés dans les deux comparaisons *gebp gpl1 gpl2 gpl3/Col* et *35S::VP16::GPL2/Col* converties en code Affimetrix, ont été introduites dans *MapMan* avec les valeurs de R correspondantes, moyennées sur les trois expériences. Afin d'étudier la pertinence d'une implication *GeBP/GPL* dans la réponse aux stress biotiques, nous avons utilisé le fichier « *biotic stress* » récemment annoté (Rotter et al., 2007). Ce fichier intègre en plus des gènes directement impliqués dans la réponse aux stress biotiques, une liste de gènes appartenant à d'autres voies reliées à cette réponse, comme le métabolisme de la paroi, et le stress oxydatif. Les gènes impliqués dans le stress abiotique sont également indiqués pour comparaison.

La cartographie de nos données à l'aide de ce fichier révèle que près d'un tiers des gènes dérégulés chez les lignées *gebp gpl1 gpl2 gpl3* et *35S::VP16::GPL2* sont reliés à la réponse au stress biotiques, tandis qu'à l'inverse un faible nombre d'entre eux sont impliqués dans la réponse aux stress abiotiques (**Figure 31**). Ces observations révèlent donc qu'une part importante du transcriptome des *GeBP/GPL* est associée à la réponse au stress biotique, ce qui suggère une implication de ces derniers dans cette voie.

III B. 3/ Confirmation des résultats des expériences de microarray par RT-PCR Quantitative

Choix des gènes testés pour la confirmation

Les résultats fournis par les expériences de microarray ont permis de suggérer un rôle des *GeBP/GPL* dans la réponse au stress biotique. Il est cependant essentiel de confirmer ces résultats. Nous avons dans ce but sélectionné plusieurs gènes reliés au stress biotique d'après l'analyse par le logiciel *MapMan*, et nous avons testé leurs niveaux de transcrits par RT-PCR Quantitative. Cette sélection inclut :

- 2 gènes impliqués dans la réponse aux pathogènes, l'un codant pour une thionine putative, (protéines à activité antibactérienne et antifongique (Loeza-Angeles et al., 2008)), et l'autre pour une peroxydase impliquée dans la défense contre les champignons (Chassot et al., 2007). Ces deux gènes sont dérégulés à la fois chez la lignée *gebp gpl1 gpl2 gpl3* et la lignée *35S::VP16::GPL2*

- 2 gènes *Pathogenesis Related* (*PR1* et *PR5*). Ces gènes sont les principaux marqueurs de la réponse aux pathogènes dans la littérature (Ward et al., 1991; Yalpani et al., 1991). Seul *PR5* est présent sur les puces CATMA et voit son expression augmentée chez la lignée *35S::VP16::GPL2* dans nos expériences de microarray.
- Le gène *Yellow Leaf Senescence 9* (*YLS9*), un marqueur de la sénescence des feuilles relié au stress biotique d'après l'analyse par *MapMan*, et surexprimé chez la lignée *35S::VP16::GPL2* dans les analyses microarrays.
- Le gène *AT2G25450* qui code pour une dioxygénase putative impliquée dans la biosynthèse de l'éthylène. Ce gène a été choisi pour deux raisons : premièrement, il montre l'une des plus fortes dérégulations observées chez le quadruple mutant dans nos analyses microarray. Deuxièmement, l'éthylène est l'une des trois hormones avec le jasmonate et l'acide salicylique à être très impliquée dans la réponse à une infection par un pathogène et à induire l'expression des gènes *PR* (Bouchez et al., 2007).

Résultats des RT-PCR Quantitatives

Les résultats obtenus pour chacun des gènes testés révèlent une dérégulation des niveaux d'expression similaire à celle observée en microarrays, avec toutefois des valeurs globalement plus fortes (**Figure 32**). Le gène *PR1* qui était absent des puces CATMA, suit la tendance générale en voyant son niveau d'expression augmenté chez la lignée surexpresser, et à l'inverse fortement diminué chez la lignée quadruple mutante par rapport aux plantes contrôles.

De manière intéressante, les gènes *YLS9* et *PR-5* dont la dérégulation n'apparaissait pas significative chez le quadruple mutant dans les expériences de microarrays, voient ici leur niveau de dérégulation dépasser le seuil de signification. Ces observations suggèrent premièrement que la technique de RT-PCR quantitative en temps réel serait plus sensible que les analyses par microarrays et deuxièmement qu'il pourrait exister beaucoup plus de gènes dérégulés de façon commune entre la lignée quadruple mutante et la lignée surexpresser.

Ces résultats permettent donc de conforter globalement ceux obtenus par microarrays.

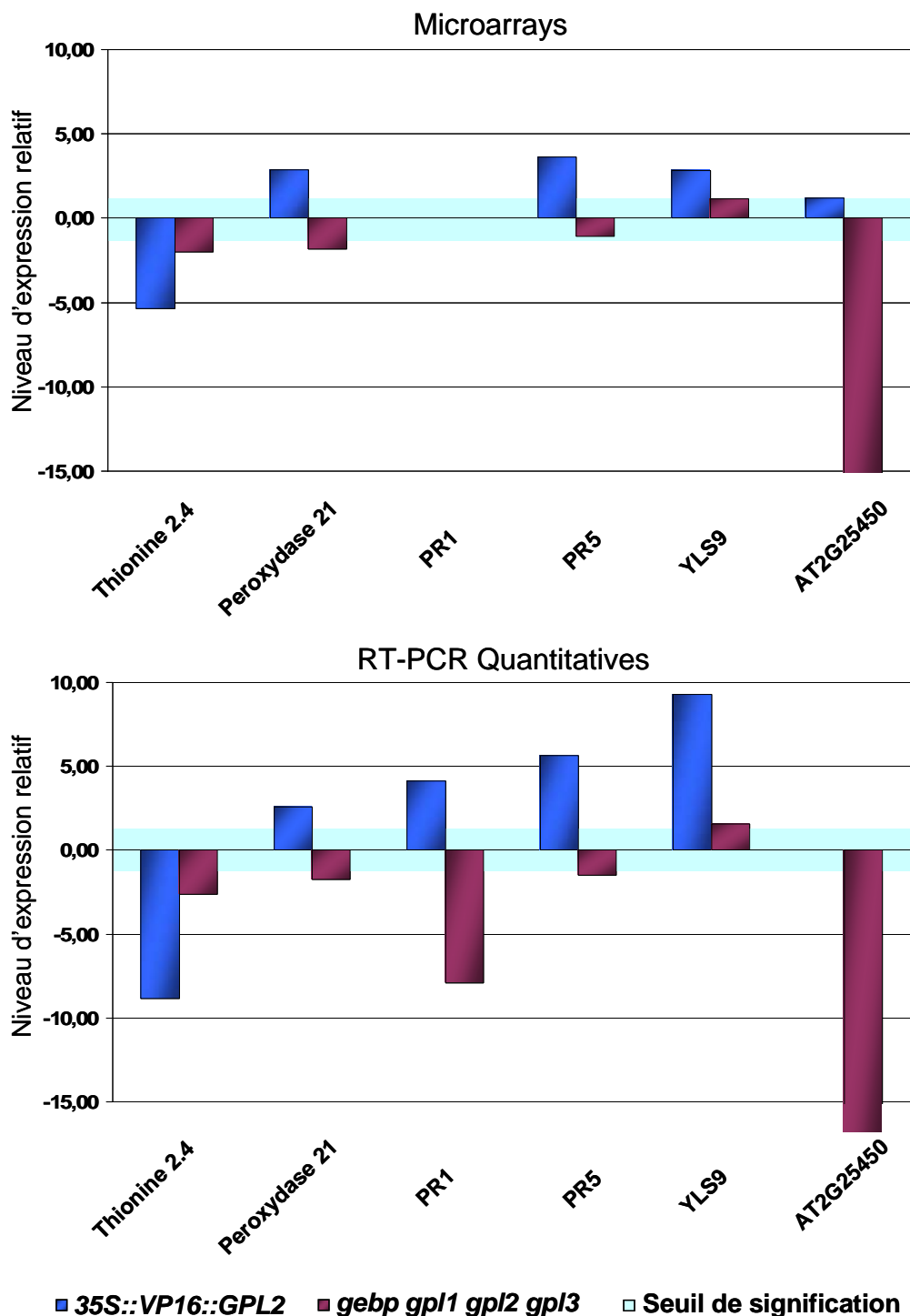


Figure 32 : Vérification du niveau des transcrits des gènes dérégulés dans les analyses microarrays par la technique de RT-PCR Quantitative

Les histogrammes indiquent la différence du niveau d'expression des différents gènes testés chez la lignée *35S::VP16::GPL* (bleu), ou la lignée *gebp gpl1 gpl2 gpl3* (mauve) par rapport au contrôle Columbia. La bande bleu clair indique le seuil à partir duquel la différence d'expression avec le sauvage est considérée significative. Aucune valeur de microarray n'est disponible pour *PR1*, ce dernier étant absent des puces CATMA. Le niveau des transcrits du gène *AT2G25450* n'a pas été mesuré en RT-PCR Quantitative chez la lignée *35S::VP16::GPL*.

Les mesures n'ont été effectuées qu'une seule fois.

III B. 4/ Les gènes *GeBP/GPL* semblent impliqués dans la voie du facteur de réponse aux pathogènes *CPR5*

Les résultats précédents qui se basent sur l'identification des voies dans lesquelles les gènes dérégulés chez les lignées *gebp gpl1 gpl2 gpl3* et *35S::VP16::GPL2* sont impliqués, suggèrent une implication des gènes *GeBP/GPL* dans la réponse au stress biotique. Une deuxième méthode permettant d'exploiter les données de nos analyses par microarrays consiste à rechercher des mutants présentant des similarités transcriptomiques avec le quadruple mutant *gebp/gpl*. En effet, si les processus contrôlés par les *GeBP/GPL* sont également sous le contrôle d'autres gènes connus, ces derniers devraient présenter un recoupement partiel des gènes sous leur contrôle avec les *GeBP/GPL*. Pour effectuer cette recherche, nous avons analysé le résultat des comparaisons microarrays avec le logiciel « *Genevestigator* ». Ce dernier intègre une banque de donnée riche d'un grand nombre d'expériences microarrays effectués sur différents mutants ou traitements (Zimmermann et al., 2004). L'outil « *Cluster Analysis* » du logiciel permet d'intégrer la liste de gènes dérégulés dans chacune de nos lignées et nous montre si ces mêmes gènes subissent ou non des dérégulations dans les analyses transcriptomiques des lignées mutantes qu'il possède en mémoire.

Découverte d'un lien moléculaire entre les *GeBP/GPL* et le gène *CPR5*

L'étude de nos résultats de microarrays avec le logiciel *Genevestigator* révèle qu'environ 30 % du transcriptome des lignées *gebp gpl1 gpl2 gpl3* et *35S::VP16::GPL2* (21 gènes sur 69, et 86 gènes sur 293 respectivement) sont communs avec les transcriptomes issus de plusieurs lignées présentes dans la banque de donnée du logiciel. Ces lignées peuvent être classées en trois groupes principaux qui montrent eux-mêmes une certaine corrélation entre eux (**Figure 33**) : Le premier groupe est composé de lignées ayant toutes en commun une mutation du gène *Constitutive Expressor of Pathogenesis-Related Genes5* (*CPR5*). Ce résultat est extrêmement intéressant à double titre : premièrement, le mutant *cpr5*, comme son nom l'indique, a été identifié pour ses capacités de réponse constitutive aux pathogènes (Bowling et al., 1997). La similitude transcriptomique du mutant *cpr5*, avec les plantes *gebp gpl1 gpl2 gpl3* et *35S::VP16::GPL2* renforce donc l'hypothèse d'une implication des gènes *GeBP/GPL* dans la réponse au stress biotique. Deuxièmement, ce mutant a également été isolé dans notre groupe par Jean-Marc Bonneville sur la base d'une altération du développement des trichomes (Kirik et al., 2001). Ces travaux ont notamment permis d'identifier chez ce mutant

une baisse du niveau d'endoréplication au niveau des feuilles et des trichomes. Comme expliqué en introduction, *GeBP* a été identifié dans notre équipe comme un régulateur putatif de *GL1*, un gène jouant un rôle clé dans les processus d'endoréplication et de développement des trichomes, mais aucune relation moléculaire ou physiologique entre les *GeBP/GPL* et ces processus n'a pu pour le moment être mise en évidence. L'étude de la relation entre *CPR5* et les *GeBP/GPL* pourrait donc permettre d'établir ce lien manquant.

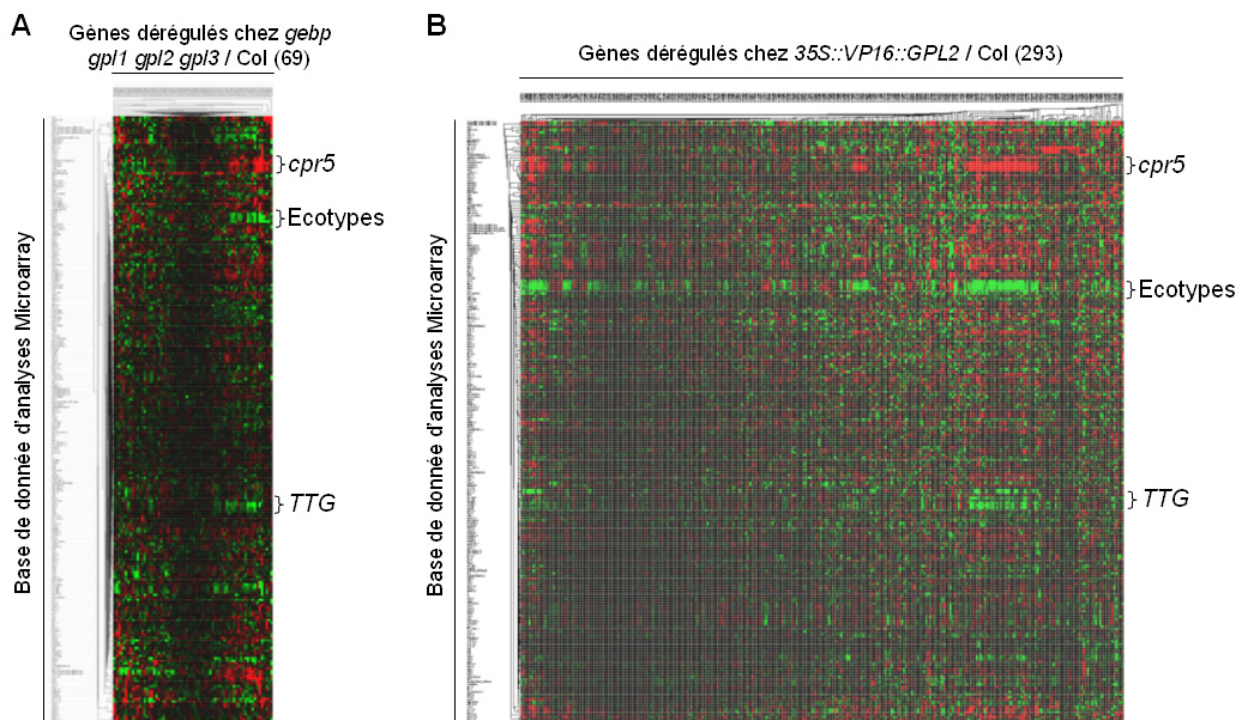


Figure 33 : Comparaison des transcriptomes des lignées *35S::VP16::GPL2* et *gebp gpl1 gpl2 gpl3* avec ceux des lignées présentes dans la base de donnée du logiciel *Genevestigator*

A, Valeurs des analyses microarray de chacune des lignées de la banque de donnée *Genevestigator* pour les 69 gènes dérégulés chez la lignée quadruple mutant. **B**, Valeurs des mêmes analyses pour les 293 gènes dérégulés chez la lignée surexpresser. Le niveau de dérégulation d'un des gènes chez une lignée précise est indiquées par la couleur du carré correspondant : rouge, surexpression ; vert, répression ; noir, pas de différence avec le contrôle. Les valeurs de la dérégulation de ces gènes dans nos propres analyses ne sont pas indiquées. Seul les trois groupes indiqués sont communs aux deux listes. Groupe *cpr5* : lignées ayant toutes en commun une mutation du gène *CPR5*, groupe Ecotypes : écotypes sauvages Hh-0, Bla-1, Se-0, Mir-0, groupe *TTG* : lignées ayant toutes en commun une dérégulation du gène *TTG*.

Le deuxième groupe correspond à quatre écotypes sauvages (Hh-0, Bla-1, Se-0, Mir-0), qui montrent une répression (par rapport à Col) de la plupart des gènes qui apparaissent

surexprimés chez le mutant *cpr5* (**Figure 33**). Ce lien est cohérent car les données concernant ces quatre écotypes proviennent d'analyses microarray effectuées lors d'une étude démontrant l'apparition de réponses auto-immunes similaires à celles observées chez le mutant *cpr-5* chez les plantes F1 correspondant à des croisements entre ces quatre écotypes (Bomblies et al., 2007).

Enfin, le troisième groupe est constitué de lignées chez lesquelles le gène *TTG* est dérégulé. Bien que ce groupe semble montrer également un lien avec les deux précédents, les lignées de ce groupe se distinguent cependant en ne montrant une correspondance qu'avec environ 15 % du transcriptome des lignées *gebp gpl1 gpl2 gpl3* et *35S::VP16::GPL2* (12/69, et 37/293 respectivement). Le gène *TTG* est comme *GLI* impliqué dans l'initiation des trichomes et le contrôle des endorépliquations, et son apparition dans cette analyse est donc cohérente avec la possibilité d'une implication des *GeBP/GPL* dans ces phénomènes.

Les GeBP/GPL agirait en aval de CPR5

La similarité transcriptomique de la lignée *cpr5*, avec les lignées *gebp gpl1 gpl2 gpl3* et *35S::VP16::GPL2* suggère qu'un certain nombre de voies communes pourraient être altérées chez ces trois lignées. En comparant le niveau de dérégulation des gènes dont l'expression est altérée aussi bien chez la lignée *gebp gpl1 gpl2 gpl3* que la lignée *cpr5* (d'après nos valeurs de micro-array et les données de *GeneVestigator*), nous avons remarqué que la plupart de ces gènes (20/21) montrent une dérégulation opposée (**Figure 34**). A l'inverse, 75 des 86 gènes communs aux transcriptomes des lignées *cpr5* et *35S::VP16::GPL2* présentent une dérégulation similaire. Ces observations indiquent que l'action des *GeBP/GPL* pourrait être opposée à celle de *CPR5* au niveau génétique. L'expression du gène *CPR5* n'est pas modifiée chez les lignées *gebp gpl1 gpl2 gpl3* et *35S::VP16::GPL2* d'après nos analyses microarray. En revanche, celle des gènes *GeBP* et *GPL1* est augmentée dans les analyses microarray du mutant *cpr5*, d'après les données du logiciel *Genevestigator* (aucune information n'est disponible pour *GeBP* et *GPL1*, ces deux gènes étant absents des puces *Affymetrix*). Ces données suggèrent donc que les *GeBP/GPL* pourraient être impliqués dans les voies contrôlées par *CPR5*, en agissant en aval de ce dernier.

Ces données dans leur ensemble renforcent donc l'hypothèse d'un rôle des gènes *GeBP/GPL* dans la réponse au stress biotique et suggèrent leur implication dans les voies contrôlées par *CPR5*.

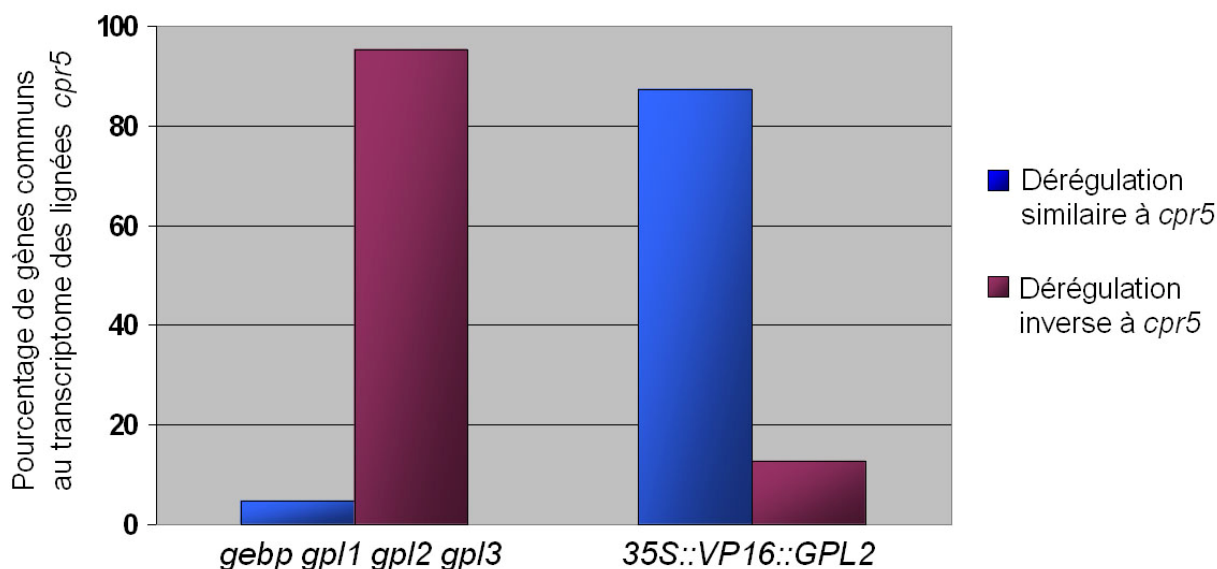


Figure 34 : Comparaison de la dérégulation des gènes communs aux transcriptomes des lignées *cpr5/gebp gpl1 gpl2 gpl3* et *cpr5/35S::VP16::GPL2*.

La comparaison a été réalisée à l'aide des données de nos analyses micro-array et des données du logiciel *GeneVestigator* présentées dans la **Figure 33**. La lignée *gebp gpl1 gpl2 gpl3* présente 21 gènes dérégulés en commun avec la lignée *cpr5*, tandis que la lignée *35S::VP16::GPL2* en présente 86.

III C. Vérification des hypothèses suggérées par les résultats d'analyses microarrays

Les observations précédentes suggèrent que les *GeBP/GPL* pourraient être impliqués dans la même voie que le gène *CPR5*. Les études sur *CPR5* ont montré que la perte de fonction de ce dernier entraîne une réponse constitutive aux pathogènes accompagnée d'une altération importante du développement végétatif qui se traduit par un nanisme marqué, une sénescence précoce des feuilles, et une altération du nombre et de la morphologie des trichomes foliaires (Bowling et al., 1997; Kirik et al., 2001). Ces altérations du développement s'accompagnent d'une réduction du nombre de mitoses et d'endoréplication au niveau des feuilles. Nous avons voulu vérifier si une partie ou l'ensemble de ces processus étaient également perturbés chez les lignées *gebp gpl1 gpl2 gpl3* et *35S::VP16::GPL2*.

Test de l'implication des GeBP/GPL dans la réponse au stress biotique

Notre analyse du résultat des microarrays effectués sur les lignées *gebp gpl1 gpl2 gpl3* et *35S::VP16::GPL2* démontre qu'une part importante de leur transcriptome semble relié à la réponse au stress biotique. Cette observation est cohérente avec le phénotype de résistance constitutive aux pathogènes présenté par le mutant *cpr5* (Bowling et al., 1997) et suggère que la réponse au stress biotique pourrait également être dérégulée chez ces deux lignées.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons entrepris une collaboration avec le Dr Claudine Balagué du laboratoire « Interactions Plantes-Microorganismes » de Toulouse (UMR CNRS/INRA 2594/441) pour tester la résistance des plantes *gebp gpl1 gpl2 gpl3* et *35S::VP16::GPL2* à différentes souches bactériennes virulentes et avirulentes. Les premiers résultats d'une expérience pilote réalisée en juillet dernier semblent indiquer une probable résistance des plantes *35S::VP16::GPL2* à la souche virulente *DC3000* de la bactérie *P. siringae*. La confirmation de ces résultats est attendue d'ici octobre.

Les plantes *cpr5* et *35S::VP16::GPL2* présentent une convergence phénotypique

Le phénotype du mutant *cpr5* rappelle en partie celui que nous avons pu observer chez la lignée *35S::VP16::GPL2* (cf. Chapitre II). Dans le but de vérifier le degré de cette similarité, nous avons mis en culture des plantes *35S::VP16::GPL2* et mutantes *cpr5* (allèle *cpr5-2* d'écotype Col), ainsi que des plantes Col afin de comparer leurs phénotypes dans nos conditions de cultures. Nous avons ainsi pu observer que les lignées *cpr5-2* et *35S::VP16::GPL2* présentent toutes les deux un phénotype très semblable en ce qui concerne l'altération de leur croissance et la sénescence des feuilles par rapport à Col. (**Figure 35 A-D**).

En revanche, tandis que la lignée *cpr5-2* présente comme attendu une réduction du nombre et de la taille des trichomes foliaires, la lignée *35S::VP16::GPL2* ne montre à ce niveau aucune différence avec les plantes contrôles Col (**Figure 35**). Le phénotype du mutant *cpr5* se recoupe donc partiellement avec celui de la lignée *35S::VP16::GPL2*, ce qui renforce l'hypothèse d'une implication des gènes *GeBP/GPL* dans la voie de *CPR5*

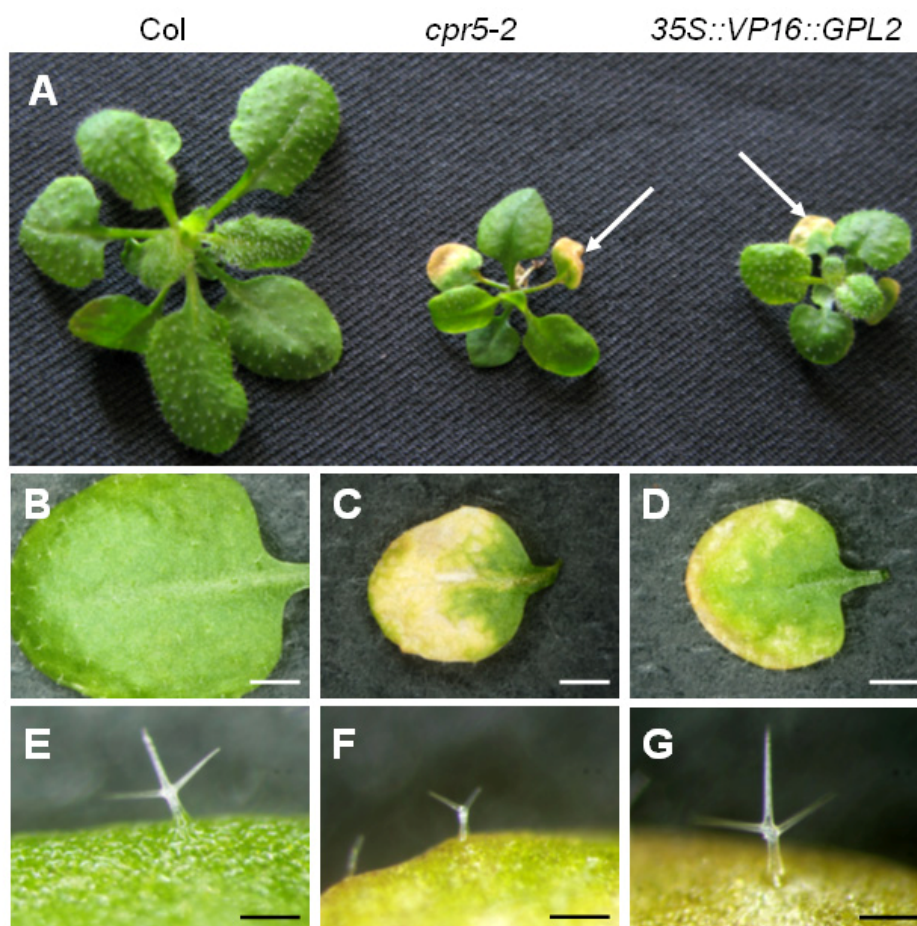


Figure 35 : Comparaison du phénotype des lignées *cpr5-2* et *35S::VP16::GPL2*

A, Comparaison de rosettes âgées de quatre semaines d'une plante sauvage Col (à gauche), d'une plante mutante *cpr5-2* (au centre) et d'une plante *35S::VP16::GPL2* (à droite). Les plantes mutantes *cpr5-2* et *35S::VP16::GPL2* montrent une réduction importante de la taille des feuilles et des pétioles qui s'accompagne d'une sénescence précoce se traduisant par l'apparition de régions dépigmentées et nécrosées au niveau de la surface foliaire (flèches). **B**, **C**, et **D**, feuilles de rang 3 de plantes (âgées de 4 semaines) Col, *cpr5-2* et *35S::VP16::GPL2* respectivement. La présence de régions dépigmentées est bien visible chez les feuilles des plantes *cpr5-2* et *35S::VP16::GPL2*. La feuille *cpr5-2* présente un faible nombre de trichomes par rapport aux feuilles des plantes Col et *35S::VP16::GPL2*. La feuille *cpr5-2* présente un faible nombre de trichomes par rapport aux feuilles des plantes Col et *35S::VP16::GPL2*. Barres d'échelle, 1mm. **E**, **F**, et **G**, trichomes foliaires de plantes Col, *cpr5-2*, et *35S::VP16::GPL2* respectivement. Les trichomes des plantes sauvages et *35S::VP16::GPL2* sont de tailles semblable et possèdent trois branches. En revanche, les trichomes des plantes *cpr5-2* présentent une taille réduite et sont généralement constitués de deux branches seulement. Barres d'échelle, 100µm.

Les GeBP/GPL sont impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire

La mutation du gène *CPR5* est également connue pour entraîner une diminution du nombre de cellules et du taux d'endoréplication au niveau de l'épiderme foliaire, cette diminution étant vraisemblablement responsable de la réduction de taille des feuilles et des trichomes observés chez le mutant *cpr5* (Kirik et al., 2001). Bien que le développement des trichomes foliaires ne

soit pas affecté chez les plantes *35S::VP16::GPL2*, ces dernières présentent cependant une réduction de la taille de leurs feuilles similaire à celle des plantes *cpr5*. Il se pourrait donc que la lignée *35S::VP16::GPL2* présente également une diminution du nombre de division cellulaire et d'endoréplifications. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons fait réaliser des mesures de niveau de ploïdie foliaire par le service de cytométrie en flux de l'Institut des Sciences du Végétal (ISV) de Gif sur Yvette.

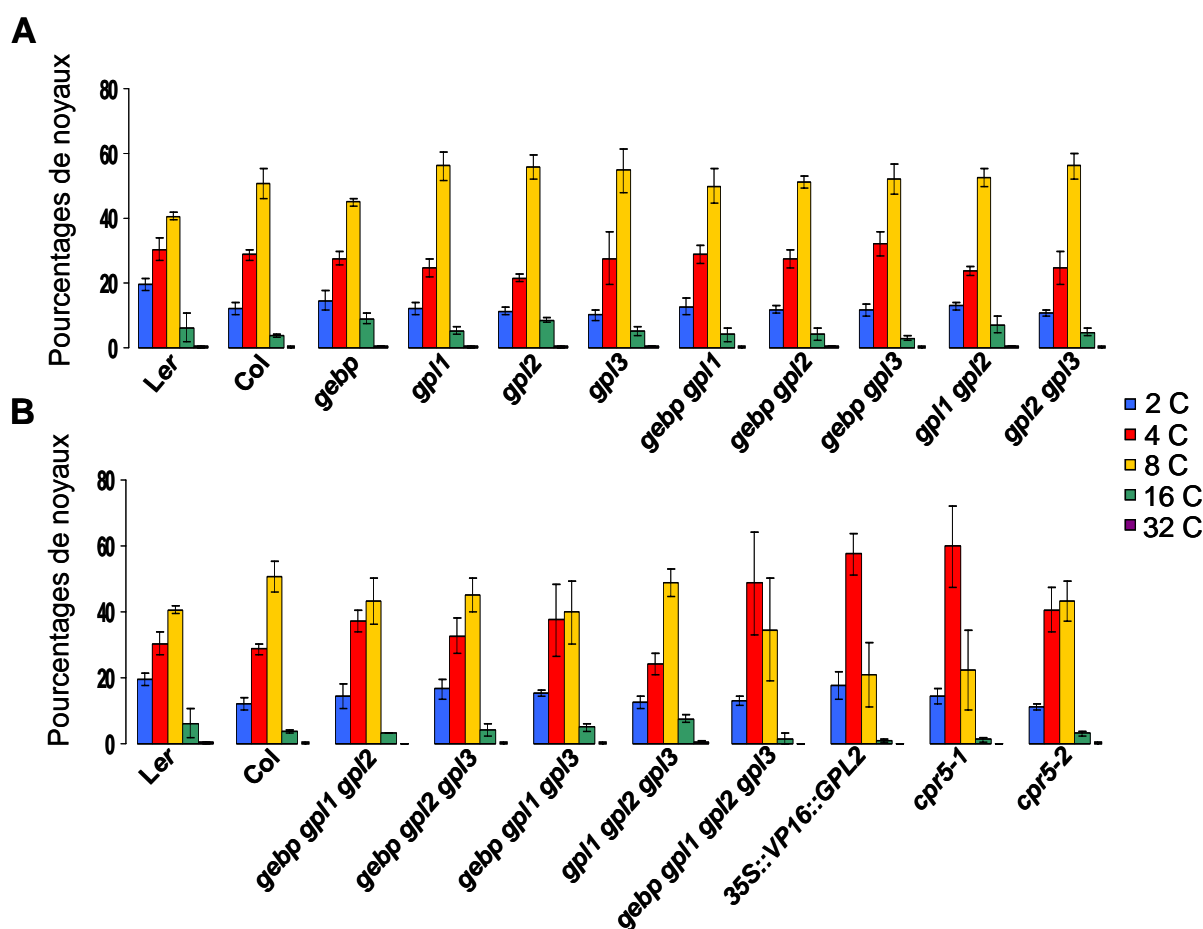


Figure 36 : Mesure du niveau d'endoréplification des cellules de feuilles

A, mesure de la ploïdie des lignées simples et doubles mutantes *gebp/gpl*. **B**, mesure de la ploïdie des lignées triples et quadruple mutantes *gebp/gpl*, simple mutant *cpr5* d'écotype Ler (*cpr5-1*) ou Col (*cpr5-2*), et du surexpresseur *35S::VP16::GPL2*. La proportion de chaque niveau de ploïdie est exprimé en pourcentage du nombre de noyaux total des feuilles. Les mesures pour chaque lignée ont été effectuées sur les feuilles 3 et 4 de trois plantes indépendantes. Seules les lignées *35S::VP16::GPL2* et *cpr5-1* montrent une différence significative du nombre de noyau 4C, 8C, et 16C avec les contrôles sauvages. Les lignée *cpr5-2* et quadruple mutant *gebp gpl1 gpl2 gpl3* montrent toutes les deux une différence significative du nombre de noyaux 4C avec les contrôles.

Les mesures de ploïdie ont été réalisées sur la lignée *35S::VP16::GPL2*, les lignées simples, doubles, triples, et quadruple mutantes *gebp/gpl*, les lignées mutantes *cpr5-1* (*Ler*) et *cpr5-2* (*Col*), et les deux écotypes sauvages *Ler* et *Col*. Comme on peut le voir dans la **Figure 36**, les écotypes sauvages présentent des contenus en ADN allant de 2 à 32C avec une prédominance de noyaux à 8C. Comme attendu, les deux lignées *cpr5* présentent chacune une réduction du niveau de ploïdie par rapport aux contrôles sauvages. Les mesures ne montrent en revanche aucune différence de ploïdie chez les lignées simples, doubles, et triples mutantes *gebp/gpl* par rapport aux deux contrôles sauvages (**Figure 36 A et B**). Cependant, une réduction significative de la ploïdie est observée chez la lignée quadruple mutante *gebp gpl1 gpl2 gpl3* et la lignée *35S::VP16::GPL2* (**Figure 36 B**), la réduction s'avérant plus marquée chez la lignée surexpresser que chez la lignée quadruple mutante. Ce résultat extrêmement important conforte par conséquent le lien entre *CPR5* et les gènes *GeBP/GPL* et suggère leur implication dans les processus de contrôle du cycle cellulaire.

Conclusion du chapitre III

Notre analyse transcriptomique de la lignée quadruple mutante *gebp gpl1 gpl2 gpl3* et de la lignée surexpresseur *35S::VP16::GPL2* a permis une avancée majeure dans la compréhension du rôle des *GeBP/GPL in planta*. Dans un premier temps, la classification fonctionnelle des gènes dérégulés chez ces deux lignées par rapport à Col à l'aide des logiciels *GO Annotation* et *MapMan* a permis de mettre en évidence une implication probable des *GeBP/GPL* dans la réponse aux stress biotiques. Dans un deuxième temps, les analyses à l'aide du logiciel *GeneVestigator* ont permis d'établir un lien entre les *GeBP/GPL* et *CPR5*, un gène impliqué dans la réponse aux pathogènes et le contrôle du cycle cellulaire et des endoréplifications. L'activation transcriptionnelle de *GeBP* et *GPL1* dans le mutant *cpr5* (données transcriptomiques) suggèrent que les *GeBP/GPL* agiraient en aval de *CPR5*. La relation entre les *GeBP/GPL* et *CPR5* a été confirmée par la mise en évidence d'une forte similarité phénotypique entre la lignée mutante *cpr5-2* et la lignée surexpresseur *35S::VP16::GPL2* qui présentent une réduction similaire de la taille de leurs feuilles, associée à une baisse du niveau de ploïdie des cellules foliaires. Des études devront être poursuivies afin de déterminer si les *GeBP/GPL* jouent vraiment un rôle similaire de *CPR5* dans le contrôle du cycle cellulaire et des endoréplifications. L'implication des *GeBP/GPL* dans la réponse aux pathogènes devrait être confirmée prochainement grâce à une collaboration avec le laboratoire « Interactions Plantes-Microorganismes de Toulouse ».

Discussion

L'étude du rôle des hormones végétales et des facteurs de transcription est capitale pour parvenir à comprendre la manière dont fonctionnent les plantes. Les travaux effectués au cours de ma thèse sur la famille GeBP/GPL ont permis de confirmer chez l'ensemble de ces protéines des caractéristiques de facteurs de transcription, et de démontrer leur rôle redondant dans la réponse aux hormones CK. L'analyse transcriptomique des lignées quadruple mutant *gebp gpl1 gpl2 gpl3* et surexpressueur *35S::VP16::GPL2*, et les mesures de ploïdie réalisées pour ces mêmes lignées ont permis de mettre en évidence un lien entre le gène *CPR5* et les *GeBP/GPL* et suggèrent une implication de ces derniers dans la réponse au stress biotique et le cycle cellulaire.

L'adressage nucléolaire des GeBP/GPL a-t-il une signification biologique ?

Les expériences de localisation intracellulaire par fusion avec la GFP nous ont permis de vérifier un adressage nucléaire des protéines GeBP/GPL. Une sous localisation intranucléaire est observée au niveau des nucléoles chez un nombre de cellules qui varie selon la fusion observée. Cette sous-localisation pourrait avoir un rôle biologique. Il est en effet désormais admis que les nucléoles ne constituent pas seulement une zone ayant pour fonction la biogenèse des ribosomes mais qu'ils sont également le site de régulations complexes. Ce type d'adressage a notamment déjà été observé pour des facteurs de transcription, comme par exemple le facteur Nopp140 de la levure (Miau et al., 1997). Chez les animaux, la protéine ARF stabilise le facteur p53 en séquestrant la protéine mdm2 dans les nucléoles (Weber et al., 1999).

Notre observation pourrait cependant aussi résulter d'un artefact. En effet, ce genre de sous localisation peut parfois se produire lors de l'utilisation de promoteurs constitutifs forts comme le 35S, la localisation devenant exclusivement nucléaire lorsque les promoteurs endogènes sont utilisés à la place du 35S. Des plantes transformées par des constructions portant des fusions entre la GFP et les promoteurs des gènes *GeBP/GPL* ont été obtenues au laboratoire, mais leur observation au microscope à épifluorescence ne permet pas la détection du signal GFP. Cette observation suggère que les promoteurs des *GeBP/GPL* entraînent un niveau d'expression trop faible pour permettre une accumulation de GFP suffisante pour être

détectée dans ces conditions. Nous ne sommes en conséquence actuellement pas en mesure de savoir si la sous-localisation nucléolaire observée avec le promoteur 35S est réellement spécifique ou provient d'un artefact.

Spécificités du motif Leucine-Zipper non canonique des GeBP/GPL

Les expériences de BiFc et de double hybride ont permis de vérifier la fonctionnalité du motif Leucine-Zipper présent dans le domaine C-terminal des GeBP/GPL. Le fait que ce motif se distingue de la structure habituelle des Leucine-Zipper explique pourquoi l'analyse informatique de la séquence des protéines GeBP/GPL n'avait pas conduit à leur classification comme facteurs de transcription à Leucine-Zipper dans les banques de données. Les motifs Leucine-Zipper sont en effet habituellement définis comme une séquence coiled-coil, présentant 4 à 7 répétitions de 7 acides aminés notés de a à g (Mason et al., 2006). En principe, les résidus des positions a et d sont hydrophobes, des Leucines étant presque toujours retrouvées à la position d (Bornberg-Bauer et al., 1998), tandis que les résidus des positions e et g sont chargés (**Figure 37**). Le motif Leucine-Zipper des GeBP/GPL est composé de 4 répétitions qui respectent cette définition aux positions d, e et g. Cependant, le résidu d de la quatrième répétition (et de la troisième répétition chez la protéine GeBP) se trouve être une phénylalanine et non une Leucine (**Figure 37**). De plus, pour 3 des 4 répétitions, des résidus chargés au lieu de résidus hydrophobes sont trouvés en position a. Les logiciels de bioinformatique échouent en conséquence à détecter une séquence coiled-coil au niveau de ce motif.

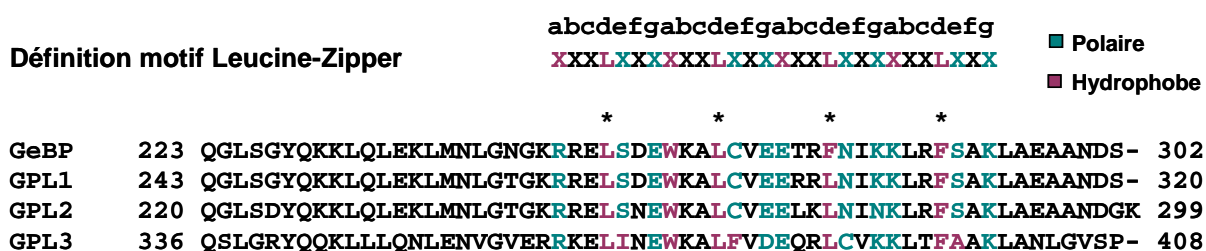


Figure 37 : Originalités du motif Leucine-Zipper des protéines GeBP/GPL

Les séquences protéiques des GeBP/GPL correspondant à la région qui contient le motif Leucine-Zipper sont alignées par rapport à la séquence théorique des motifs Leucine-Zipper définie d'après Mason, 2006. Les résidus importants sont indiqués en couleur correspondant à la légende. Les Leucines des positions d sont indiquées par une étoile. Le motif des GeBP/GPL diffère principalement du modèle au niveau des résidus des positions a (3 sur 4 sont polaires au lieu d'être hydrophobes).

Un autre aspect original de la structure des GeBP/GPL par rapport aux familles de facteurs de transcription à motif Leucine-Zipper déjà connues, est la distance de ce motif au domaine de liaison à l'ADN. En effet, alors que le motif Leucine-Zipper des facteurs de type B-Zip ou HD-Zip est immédiatement adjacent au domaine de liaison à l'ADN, les GeBP/GPL montrent eux une séparation importante des deux domaines (de 92 acides aminés chez GPL2 jusqu'à 200 acides aminés chez GPL3). Ces résultats nous permettent donc de conclure que la structure des GeBP/GPL fait d'eux une classe à part de facteur de transcription à domaine Leucine-Zipper. Ce type de motif se retrouve chez de nombreuses protéines d'Arabidopsis et notamment chez CPR5 (non publié) qui n'était jusque là pas définie comme une protéine à Leucine-Zipper. Cette observation est très intéressante étant donné le lien que nous avons découvert entre les gènes *GeBP/GPL* et *CPR5*, et elle suggère une interaction possible entre les protéines CPR5 et GeBP/GPL. Cette hypothèse devrait être testée prochainement au laboratoire par la technique de double hybride dans la levure.

Recherche de gènes cibles des GeBP/GPL

Les expériences de SELEX nous ont permis d'identifier la séquence consensus TGTGGT comme cible d'ADN préférentielle de la protéine GeBP. Ce résultat doit à présent être confirmé. Des expériences de retard sur gel sont actuellement en cours dans le but de vérifier la spécificité de la liaison de GeBP à cette séquence. Le fait que les facteurs GeBP/GPL présentent une forte similarité ainsi qu'une importante redondance fonctionnelle ne signifie pas nécessairement qu'ils devraient tous reconnaître la même séquence cible. Il pourrait donc s'avérer nécessaire d'appliquer aussi le SELEX aux protéines GPL si leur affinité pour la séquence consensus TGTGGT n'est pas confirmée. Une fois que la séquence consensus reconnue par la protéine GeBP sera confirmée, une analyse informatique ayant pour but de rechercher cette séquence au niveau des régions régulatrices des gènes apparaissant dérégulés chez la lignée quadruple mutante *gebp gpl1 gpl2 gpl3* dans nos analyses par microarray devrait être conduite. L'étape suivante consistera à vérifier que les gènes candidats obéissant à ce critère sont effectivement des cibles directes de GeBP. Pour cela, la technique de Chromatine-ImmunoPrécipitation (ChIP) pourrait être employée. La découverte de cibles directes des GeBP/GPL devrait apporter des éléments supplémentaires pour la compréhension de leur fonction et permettre de confirmer les voies dans lesquelles ils semblent impliqués.

Les GeBP/GPL sont ils régulés via une dégradation post-transcriptionnelle ?

Nous avons rencontré à plusieurs reprises des difficultés pour surexprimer les *GeBP/GPL in planta* à l'aide de constructions utilisant le promoteur constitutif 35S. En effet, comme cela a été décrit au chapitre II, les protéines hybrides censées être produites dans nos différentes lignées surexpresses, se révèlent indétectables par immuno-blot dans la totalité des lignées testées à l'exception des lignées *GPL2*. De plus, l'étude des lignées exprimant les fusions des protéines *GeBP/GPL* avec la GFP décrites dans le chapitre I, révèle qu'au lieu d'être présent de manière ubiquitaire dans la plante, le signal GFP est restreint à certaines régions. Seules les constructions avec *GPL2* se sont montrées moins sensibles à ce problème. Ces observations pourraient être révélatrices d'un phénomène biologique intéressant. Elles pourraient en effet s'expliquer par une régulation post transcriptionnelle importante des *GeBP/GPL*, qui empêcherait toute accumulation ectopique et trop abondante des protéines hybrides ou des transcrits produits par nos constructions.

De manière intéressante, plusieurs facteurs de transcription impliqués dans le cycle cellulaire présentent une régulation qui repose sur une balance entre leur expression et leur dégradation par le protéasome (Bartek and Lukas, 2001; Vodermaier, 2001). Le facteur E2Fc d'*Arabidopsis* qui est impliqué dans la division cellulaire et dégradé par le protéasome en réponse à la lumière, ne peut être surexprimé *in planta* sauf si la région nécessaire à sa dégradation via le protéasome est délétée (del Pozo et al., 2002). L'hypothèse d'une telle régulation post transcriptionnelle des protéines *GeBP/GPL* est donc cohérente avec leur possible implication dans le cycle cellulaire. Afin de vérifier cette hypothèse, des expériences consistant à cultiver *in vitro* les lignées *35S::GeBP/GPL::GFP* sur des milieux contenant des inhibiteurs de protéasome devraient être réalisées au laboratoire. Si ces expériences parvenaient à montrer une meilleure stabilité des protéines *GeBP*, *GPL1* et *GPL3* en présence d'inhibiteurs, il nous resterait encore à comprendre pourquoi la protéine *GPL2* présente une régulation différente des trois autres.

On ne connaît pas, à l'heure actuelle, de motif protéique qui soit responsable de la dégradation par le protéasome. En revanche, les modifications par phosphorylation sont connues pour jouer chez les eucaryotes un rôle dans les processus de dégradation par le protéasome, notamment chez les protéines impliquées dans le cycle cellulaire. Par exemple, la protéine p27 de mammifère qui joue un rôle dans le cycle cellulaire en inhibant les Cyclines Dependant Kinases (CDK), est dégradée par le protéasome dès lors qu'elle est phosphorylée

par la protéine CDK2 (Vlach et al., 1997). L'analyse de la séquence protéique des GeBP/GPL par le logiciel informatique *YinOYang 1.2* révèle que les protéines GeBP, GPL1, et GPL3 présentent en N-terminal des régions riches en résidus Ser/Thr susceptibles de subir des modifications par transfert de résidu O-GlcNac ou par phosphorylation. Très peu de ces résidus sont en revanche retrouvés dans la séquence de la protéine GPL2. Cette spécificité pourrait donc être à l'origine d'une régulation post-traductionnelle différente de GPL2 par rapport aux autres GeBP/GPL. Des constructions visant à surexprimer les protéines GeBP, GPL1, et GPL3 délétées de leur région N-terminale (contenant les résidus Ser/Thr) pourraient être réalisées dans le but de vérifier cette hypothèse.

La Redondance fonctionnelle des GeBP/GPL

La forte similarité des protéines GeBP/GPL, leur capacité à former des dimères dans toutes les combinaisons possibles, et la superposition du profil d'expression *GUS* des gènes *GeBP/GPL* dans plusieurs régions aériennes de la plante suggèrent une redondance fonctionnelle de ces facteurs. Notre étude génétique a largement confirmé cette hypothèse : Tout d'abord, les lignées mutantes *gebp/gpl* présentent une très bonne corrélation entre la baisse de sensibilité aux CK et le nombre de gènes *GeBP/GPL* mutés dans chaque lignée. En effet, alors que les lignées simples mutants montrent dans la plupart des tests une faible différence avec les sauvages, l'insensibilité aux CK apparaît plus importante chez les lignées doubles mutants et atteint son niveau maximal chez la lignée triple mutant. Les expériences de mesures de ploïdie vont également dans ce sens, les lignées triples mutants semblant montrer un phénotype intermédiaire entre la lignée quadruple mutant qui présente une réduction nette du niveau de ploïdie, et les lignées simple et double mutants qui ne sont pas différentes des sauvages. Pour finir, les résultats des analyses transcriptomiques globales montrent également que les voies qui sont principalement affectées chez le quadruple mutant *gebp/gpl* et le surexprimeur de *GPL2* sont sensiblement les mêmes. L'ensemble de ces résultats confirme donc bien une redondance fonctionnelle des *GeBP/GPL* dans la majeure partie de leurs fonctions.

Toutefois, il est peu probable que les quatre gènes montrent une redondance dans la totalité des processus qu'ils contrôlent. Il n'est en effet pas rare que les membres des familles multigéniques remplissent un nombre important de fonctions communes tout en présentant des spécialisations dans certains processus particuliers. Les plantes qui comme *A.thaliana* ont subi plusieurs duplications de leur génome (Simillion et al., 2002) semblent ainsi avoir

développé ce mécanisme de spécialisation fonctionnelle des gènes codant pour des facteurs de transcription paralogues, afin de réguler des programmes de différenciation similaires à différents stades de développement. La famille des *ARR* de type A en est un bon exemple puisque ses membres montrent un rôle redondant dans la création d'une boucle de régulation négative du signal CK, mais que d'autres fonctions ont été démontrées pour certains d'entre eux comme le rôle joué par *ARR4* dans la modulation de la réponse à la lumière rouge (Sweere et al., 2001; Ferreira and Kieber, 2005).

A quel niveau se produit l'action des GeBP/GPL dans la voie de signalisation des CK ?

Les *ARR* de type A sont considérés comme les premiers gènes de réponse aux CK. Ils agissent comme des régulateurs négatifs du signal CK et leur expression est augmentée rapidement en réponse à un traitement aux CK (D'Agostino et al., 2000; Kiba et al., 2002; Rashotte et al., 2003). Nos travaux indiquent que les *GeBP/GPL* jouent un rôle redondant dans la réponse aux hormones CK notamment via la régulation de l'expression des *ARR-A*. En effet, le triple mutant *gebp gpl1 gpl2* s'avère moins sensible aux CK exogènes dans plusieurs tests physiologiques de réponse à ces hormones et il présente une augmentation des transcrits *ARR-A*. Ces résultats sont cohérents avec la similarité du profil d'expression des *GeBP/GPL* et des *ARR-A* au niveau du SAM et des pédicelles (D'Agostino et al., 2000; To et al., 2004). L'induction de l'expression des *ARR-A* en réponse aux CK exogènes est également altérée chez le triple mutant preuve que les *GeBP/GPL* contribuent aussi à la promotion de la réponse aux CK. Enfin, une indication supplémentaire de l'implication des *GeBP/GPL* dans la réponse aux CK provient de l'étude des plantes *35S::VP16::GPL2* qui présentent à l'inverse des plantes triples mutantes, une réduction des transcrits *ARR-A* s'accompagnant d'une hypersensibilité aux CK exogènes.

Deux principales hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer le rôle des *GeBP/GPL* dans la voie des CK (**Figure 38**) : (1) Les facteurs *GeBP/GPL* feraient partie de la voie de signalisation des CK. En absence de CK, les *GeBP/GPL* réprimerait l'expression des *ARR-A*. En présence de CK, l'expression des *GeBP/GPL* serait réprimée par les *ARR-B* ce qui permettrait l'expression des *ARR-A* et l'établissement de la boucle de répression du signal. (2) Les facteurs *GeBP/GPL* seraient extérieurs à la voie de signalisation des CK. Ils réprimerait l'expression des *ARR-A* sans être soumis à une régulation dépendante des CK. Ces deux hypothèses sont cohérentes avec nos résultats. Cependant, la première va à l'encontre du

dogme actuel selon lequel la régulation des gènes *ARR-A* par les facteurs *ARR-B* serait directe (Sakai et al., 2000; Hwang and Sheen, 2001; Sakai et al., 2001; Rashotte et al., 2003). La deuxième hypothèse est donc la plus crédible.

L'implication des *GeBP/GPL* dans la voie des CK est cohérente avec leur éventuelle régulation par le gène *BP*, et leur implication dans des processus tels que le cycle cellulaire.

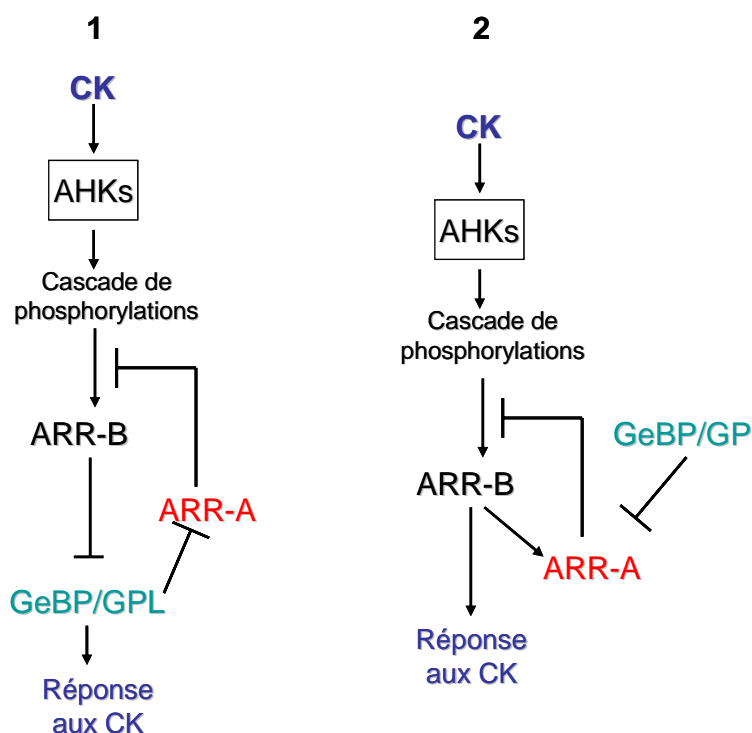


Figure 38 : Principales hypothèses pouvant expliquer l'action des *GeBP/GPL* sur le signal CK

Les 2 hypothèses sont compatibles avec une augmentation de l'expression des *ARR-A* et une réduction de la réponse aux CK en cas d'une perte de fonction des *GeBP/GPL*. L'hypothèse 2 semble la plus probable.

Les gènes GeBP/GPL sont-ils impliqués dans la voie du facteur BP ?

Deux principaux arguments suggèrent que les *GeBP/GPL* pourraient agir dans la voie de BP : (1) Comme expliqué en introduction, l'expression du gène *GeBP* est régulé par *BP* (Curaba et al., 2003). De plus, des résultats préliminaires obtenus récemment suggèrent qu'il pourrait en être de même pour les 3 gènes *GPL*. (2) Les profils GUS des gènes *BP*, *GeBP/GPL*, et *ARR-A* semblent se superposer au niveau de certaines régions spécifiques : SAM, paraclades, et inflorescences (notamment au niveau de la jonction entre fleurs et pédicelles). Cette superposition est cohérente avec l'induction des *ARR-A* par les hormones CK, dont la

biosynthèse et la signalisation sont elles-mêmes contrôlées par les gènes *KNOXI BP* et *STM*. L'implication des *GeBP/GPL* dans la répression des *ARR-A*, est également en accord avec leur expression dans ces mêmes tissus. Ces informations réunies suggèrent que *BP*, après avoir induit le signal CK, pourrait exercer un second contrôle sur l'induction de la réponse à ces hormones permettant la répression par les *GeBP/GPL* de la boucle de régulation négative formée par les *ARR-A* (**Figure 39**).

Les GeBP/GPL agissent dans la voie de CPR5

Les analyses transcriptomiques globales que nous avons effectuées sur la lignée quadruple mutant *gebp gpl1 gpl2 gpl3* et la lignée surexpresser *35S::VP16::GPL2* ont joué un rôle important dans la recherche de la fonction des *GeBP/GPL*. Grâce aux résultats de ces analyses, nous sommes désormais en mesure d'explorer de nouvelles voies contrôlées par ces gènes. L'analyse de ces résultats à l'aide des logiciels *MapMan* et *GeneInvestigator* a notamment démontré que les gènes dérégulés chez les deux lignées montrent une convergence dans la réponse aux stress biotiques et les voies contrôlées par le gène *CPR5*.

Le gène *CPR5* a été découvert grâce à un crible visant à identifier des mutants chez lesquels les processus de réponse aux pathogènes sont constitutivement activés (Bowling et al., 1994). *CPR5* se distingue cependant des autres gènes *Constitutive expresser of PR genes* par la pléiotropie de ses fonctions. En effet, outre son rôle de répresseur des voies de réponse aux pathogènes, *CPR5* présente également des fonctions dans des processus de développement tels que la sénescence des feuilles et le contrôle du cycle cellulaire (Bowling et al., 1997; Kirik et al., 2001; Yoshida et al., 2002). Plusieurs arguments suggèrent que les *GeBP/GPL* pourraient jouer un rôle d'activateur dans les processus contrôlés par *CPR5*, en aval de ce dernier : (1) L'analyse de nos résultats d'expériences microarray avec le logiciel *Geneinvestigator* montre qu'environ un tiers des gènes dérégulés chez les lignées *gebp gpl1 gpl2 gpl3* et *35S::VP16::GPL2* est également dérégulé chez le mutant *cpr5*. (2) La très grande majorité des gènes dérégulés chez le mutant *cpr5* et la lignée *gebp gpl1 gpl2 gpl3* sont surexprimés chez le mutant *cpr5* et réprimés chez le quadruple mutant par rapport au sauvage. A l'inverse, les gènes dérégulés chez le mutant *cpr5* et de la lignée *35S::VP16::GPL2* sont principalement surexprimés chez les deux lignées. (3) Le phénotype du mutant *cpr5* est extrêmement similaire à celui des lignées *35S::VP16::GPL2*. (4) L'expression des *GeBP/GPL* est augmentée dans les analyses microarray du mutant *cpr5* (Cette dérégulation est actuellement en cours de vérification au laboratoire via des expériences de RT-PCR

quantitatives). L'ensemble de ces observations suggère donc que *CPR5* pourrait être un répresseur de l'expression des *GeBP/GPL* qui seraient eux mêmes des activateurs de l'expression des gènes sous son contrôle.

Les GeBP/GPL pourraient-ils jouer un rôle dans la réponse croisée entre développement et stress biotique ?

Le fait qu'une part importante des gènes qui sont dérégulés chez les deux lignées testées en microarray soit impliquée dans le stress biotique, et la découverte du lien avec *CPR5*, dont le rôle dans la réponse aux pathogènes est déjà bien démontré (Bowling et al., 1997) suggère fortement que les *GeBP/GPL* pourraient jouer un rôle dans cette voie. Comme *CPR5* est un répresseur de la réponse aux pathogènes et que l'action des *GeBP/GPL* semble être opposée génétiquement à celle de *CPR5* (données microarray), il se pourrait que la lignée *gebp gpl1 gpl2 gpl3* montre une répression constitutive de la réponse aux pathogènes, ce qui se traduirait par une sensibilité accrue aux attaques biotiques. A l'inverse, les plantes *35S::VP16::GPL2* pourraient montrer une résistance similaire à celle des plantes *cpr5* aux attaques de pathogènes. Les résultats préliminaires de notre collaboration avec l'équipe du Dr Dominique Roby (laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes de Toulouse) semblent effectivement suggérer une résistance de la lignée *35S::VP16::GPL2* à la souche virulente DC3000 (*P. siringae*).

Plusieurs mutants qui présentent également une réponse constitutive au stress biotique, entraînent comme chez *cpr5* des anomalies du développement qui se traduisent par un nanisme des plantes souvent accompagné d'une perte de la dominance apicale du SAM entraînant une prolifération des inflorescences. (Bowling et al., 1994; Ellis et al., 2000; Li et al., 2001; Grant et al., 2003). La signification biologique de cette réponse des plantes n'est pas encore bien comprise, mais elle suggère qu'il doit exister une relation importante entre le développement et la réponse aux pathogènes. Les gènes de la famille R sont les premiers maillons dans la réponse aux pathogènes. Ils ont pour rôle la reconnaissance des facteurs de virulence des pathogènes et le déclenchement de la réponse des plantes (Ellis et al., 2000). Récemment, il a été démontré que la mutation gain de fonction de l'un de ces gènes chez *A. thaliana*, entraîne un nanisme des plantes qui s'accompagne d'une accumulation de CK (Igari et al., 2008). D'autres travaux montrent que l'infection d'*Arabidopsis* par l'actinomycète *R. fascians* entraîne en réponse une expression ectopique des gènes *KNOX* de type I au niveau des feuilles, associée à des modifications de la morphologie foliaire caractéristiques de ce

type de dérégulation (Depuydt et al., 2008). Ces différents travaux suggèrent que le lien entre le stress biotique et le développement pourrait passer par l'action des gènes *KNOXI* et des hormones CK. Au vu de leur implication dans la réponse aux CK, et de leur lien avec les gènes *BP* et *CPR5*, les *GeBP/GPL* pourraient jouer un rôle central dans cette relation croisée entre le développement végétatif et la réponse aux pathogènes (**Figure 39**).

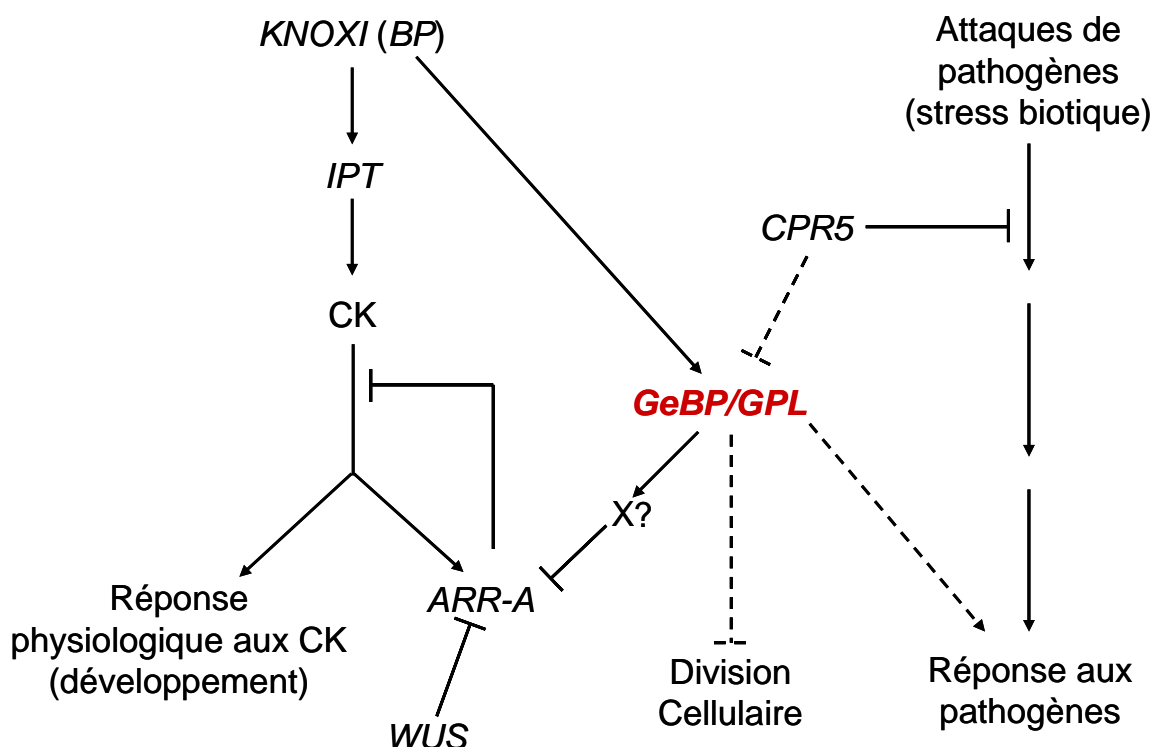


Figure 39 : Modèle génétique des voies dans lesquelles les *GeBP/GPL* sont impliqués.

Probablement régulés par *BP*, les gènes *GeBP/GPL* induisent la réponse aux CK en réprimant l'expression des *ARR-A* via un ou plusieurs intermédiaires inconnus. Ils agiraient également comme des activateurs dans la voie de *CPR5*, en aval de ce dernier. Tout comme *CPR5*, les *GeBP/GPL* semblent impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et la réponse au stress biotique. Les *GeBP/GPL* pourraient contribuer à la réponse croisée entre les phénomènes de défense et de modification du développement dépendants des hormones qui se produisent lors d'une attaque de pathogènes.

Les GeBP/GPL et CPR5 semblent présenter un rôle antagoniste dans le contrôle du cycle cellulaire

Les informations dont nous disposons suggèrent que les *GeBP/GPL* joueraient un rôle d'activateur en aval de *CPR5*. L'action des *GeBP/GPL* serait donc opposée à celle de *CPR5*. Les résultats des mesures de ploïdie que nous avons réalisées semblent corroborer cette hypothèse. En effet, dans leurs travaux, Kirik et ses collaborateurs (2001) ont démontré que la

réduction de taille des feuilles du mutant *cpr5* semblait due à une dérégulation globale du cycle cellulaire, affectant à la fois le nombre de mitoses et d'endoréplifications, et conduisant à un nombre réduit de cellules de taille plus petite (le niveau d'endoréplification d'une cellule étant généralement couplé à sa taille (Sugimoto-Shirasu and Roberts, 2003)). Une première observation grossière des surfaces foliaires des lignées *gebp gpl1 gpl2 gpl3*, et *35S::VP16::GPL2*, révèle que les cellules épidermiques de feuille de ces lignées semblent montrer comme chez le mutant *cpr5* une réduction moyenne de la taille, ce qui est cohérent avec la baisse de niveau de ploïdie observée chez ces deux lignées. Nos résultats montrent de plus que les feuilles des plantes *35S::VP16::GPL2* présentent une réduction de taille et de niveau de ploïdie identiques à celles des plantes *cpr5*. L'ensemble de ces observations suggère donc que les feuilles des plantes *35S::VP16::GPL2* pourraient présenter une réduction du nombre de mitoses et d'endoréplification similaires à celles observées chez le mutant *cpr5*. A l'inverse, les feuilles des plantes *gebp gpl1 gpl2 gpl3* ne semblent pas montrer de différence de taille avec les feuilles des plantes sauvages, bien que leurs cellules semblent en moyenne plus petites (résultat à confirmer). La division cellulaire serait donc stimulée au niveau des feuilles de cette lignée mutante, ce qui entraînerait un déséquilibre de la balance mitose/endoréplification, conduisant à la baisse du niveau de ploïdie que nous avons constatée. Ces résultats, bien que préliminaires, suggèrent donc bien un rôle opposé des *GeBP/GPL* avec *CPR5* dans le contrôle du cycle cellulaire (**Figure 39**).

Les GeBP/GPL sont ils impliqués dans le développement des trichomes ?

Le mutant *cpr5* présente une altération du développement des trichomes, associée à une réduction du nombre d'endoréplifications dans ces cellules (Kirik et al., 2001), qui n'est pas retrouvée chez la lignée *35S::VP16::GPL2* (ni chez aucune de nos lignées mutantes). Cette différence de phénotype suggère que les voies sous le contrôle de *CPR5* ne dépendraient pas toutes des *GeBP/GPL*, et qu'en particulier ces derniers n'interviendraient pas dans les processus de développement des trichomes contrôlés par *CPR5*. Plusieurs arguments restent cependant toujours en faveur d'une action des *GeBP/GPL* dans le contrôle des endoréplifications au niveau des trichomes : (1) *GeBP* a été isolé comme un régulateur potentiel de *GLI*, un gène codant pour l'un des acteurs du complexe d'initiation des trichomes GL1-GL3-TTG. (2) Le logiciel *Genevestigator* a permis d'établir un lien entre les *GeBP/GPL* et le gène *TTG* qui code pour un facteur faisant lui aussi partie de ce complexe. (3) Les mesures de ploïdies suggèrent bien une implication des *GeBP/GPL* dans le cycle cellulaire au niveau des feuilles. De plus, l'absence d'une différence dans la morphologie des trichomes

chez les lignées *gebp gpl1 gpl2 gpl3* et *35S::VP16::GPL2* n'est pas une preuve absolue que les processus d'endoréplication n'y sont pas affectés. En effet, bien que le niveau d'endoréplication d'une cellule soit en général couplé à sa taille, plusieurs études ont démontré qu'un découplage entre endoréplication et croissance cellulaire était parfois possible. En particulier, l'inhibition de l'action de certaines Cyclin-Dependant Kinases (CDK) conduit à des plantes chez lesquelles le cycle cellulaire est globalement réprimé (mitoses et endorélications), alors que les cellules montrent une taille moyenne supérieure aux cellules des plantes sauvages (Hemerly et al., 1995; De Veylder et al., 2001; Jasinski et al., 2002). Des mesures de ploïdie des trichomes des lignées *gebp gpl1 gpl2 gpl3* et *35S::VP16::GPL2* devraient être effectuées prochainement via une collaboration avec l'équipe du professeur John Larkin du Department of Biological Sciences (Université de Louisiane) afin de vérifier si les processus d'endoréplication y sont affectés.

Conclusion

Mon travail de thèse s'inscrit dans une thématique d'équipe qui vise à étudier les processus de différenciation contrôlés par les hormones. En recherchant des régulateurs potentiels de *GLI*, un gène impliqué dans le contrôle de l'endoréplication des cellules épidermiques et dont l'expression est dépendante des hormones GA et CK (Perazza et al., 1998; Gan et al., 2007), une nouvelle famille de quatre protéines: GeBP, GPL1, GPL2 et GPL3 a été identifiée au laboratoire. Ces dernières pouvant constituer une nouvelle famille de facteurs de transcription impliqués dans les processus de différenciation cellulaire contrôlés par les hormones GA et CK, le but de mes travaux consistait à vérifier cette implication et à caractériser moléculairement et fonctionnellement cette nouvelle famille de protéines.

L'étude des protéines GeBP/GPL nous a permis de vérifier leur adressage nucléaire et a démontré leur capacité à former des dimères via un motif Leucine-Zipper non canonique. L'analyse de l'expression des gènes *GeBP/GPL* a permis de mettre en évidence une superposition du profil d'expression de ces gènes avec celui du gène *KNOX* de type I *BREVIPEDICELLUS*, en particulier au niveau du SAM. Grâce à la technique du SELEXE, nous sommes également parvenus à identifier la séquence consensus d'ADN préférentiellement reconnue par GeBP. Parallèlement, pour tenter de comprendre la fonction des *GeBP/GPL*, nous avons réalisé une étude génétique, physiologique et moléculaire, qui nous a permis de démontrer un rôle redondant des *GeBP/GPL* dans la réponse aux CK via la répression des *ARR* de type A. La plupart des résultats cités précédemment ont fait l'objet d'une publication en 2008 (Chevalier et al., 2008). Enfin, une analyse globale des transcriptomes d'une lignée surexpresser de *GPL2* et du quadruple mutant *gebp/gpl*, nous a permis d'établir un lien entre les *GeBP/GPL* et *CPR5*, un gène impliqué dans des processus aussi variés que la réponse au stress biotique, la sénescence des feuilles, et le contrôle du cycle cellulaire. En accord avec la découverte de ce lien, une implication probable des *GeBP/GPL* dans le cycle cellulaire a pu être mise en évidence grâce à des mesures de ploïdies des cellules foliaires, et une collaboration est en cours pour tester si ces gènes sont également impliqués dans la réponse au stress biotique.

Ce travail a donc permis de vérifier un rôle de facteur de transcription de ces protéines, et de démontrer leur implication dans la voie des CK et le contrôle de la balance entre division cellulaire et endoréplication. Les futurs travaux pourraient permettre de confirmer un rôle des *GeBP/GPL* dans la réponse au stress biotique et peut être de déterminer un lien entre l'ensemble de ces fonctions.

Matériels et Méthodes

I Matériel biologique et conditions de culture

I A. Matériel végétal

I A. 1/ Ecotypes, lignées mutantes et transgéniques

L'essentiel du travail mené durant cette thèse a été réalisé chez la plante *Arabidopsis thaliana* (l'arabette des dames) de la famille des crucifères. *Nicotiana Benthamiana* a été utilisée pour la transformation transitoire des constructions BiFC. Les différentes lignées mutantes et transgéniques d'*Arabidopsis* utilisées sont détaillées respectivement dans le **Tableau 2** et le **Tableau 3**.

Lignées	Ecotypes	Provenance	Mutation/Insertion
<i>gebp-1</i> (CSHL_GT6658)	Lansberg	Cold Spring Harbor	Transposon DS
<i>gebp-2</i> (GT_5_108668)	<i>erecta</i>	Laboratory	
<i>gebp-3</i> (GT_5_17684)	(<i>Ler</i>)		
<i>gebp-4</i> (SALK_013473)	Columbia (Col-0)	Salk Institute	TDNA (pROK2)
<i>gpl1-1</i> (WiscDsLox391A04)		University of Wisconsin	TDNA (pDS-Lox)
<i>gpl1-2</i> (SALK_032610)		Salk Institute	TDNA (pROK2)
<i>gpl2-1</i> (SALK_054183)			
<i>gpl3-1</i> (SAIL_885_B10)		Syngenta Biotechnology	TDNA
<i>arr1-3 arr12-1</i>	Col-0	Dr Eric Schaller (DBS, Dartmouth college)	TDNAs (Mason et al., 2005)
<i>Cpr5-1</i>	<i>Ler</i>	Dr Paul P. Dijkwel (MBP, university of Groningen)	EMS: (Bowling et al., 1997)
<i>Cpr5-2</i>	Col-0		EMS : (Boch et al., 1998)
<i>brevipedicellus-2 (bp-2)</i>	<i>Ler</i>	Dr R. Datla (PBI, NRC of canada)	Mutation Ponctuelle (Venglat et al., 2002)

Tableau 2 : Lignées mutantes d'*Arabidopsis* utilisées dans ce travail

Les lignées mutantes *gebp/gpl* ont été identifiées sur le site du SALK : *T-DNA Express* (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). La position théorique de l'élément d'insertion

dans chacune de ces lignées est visualisable sur ce même site. Les lignées *gebp* du CSHL ont été commandées sur le site *GeneTrap* (<http://genetrap.cshl.org>). Toutes les autres lignées ont été obtenues à l'Arabidopsis Biological Resource Center (<http://www.biosci.ohio-state.edu/pcmb/Facilities/abrc/abrchome.htm>) ou au Nottingham Arabidopsis Stock Center (<http://arabidopsis.info/>).

Lignées	Ecotype	Provenance	Vecteur T-DNA
<i>P_{GeBP}::GUS</i> <i>p_{GPL1}::GUS</i> <i>p_{GPL2}::GUS</i> <i>p_{GPL3}::GUS</i>	Columbia (Col-0)	Réalisé au laboratoire	pHGWF57
<i>p_{BP}::GUS</i>		Dr S. Hake (PMBD Université de Californie)	(Ori et al., 2000)
<i>P35S::GFP</i> <i>P35S::GFP::GeBP</i> <i>P35S::GFP::GPL1</i> <i>P35S::GFP::GPL2</i> <i>P35S::GFP::GPL3</i>		Réalisé au laboratoire	pK7WGF2
<i>P2x35S::HA::GeBP</i> <i>P2x35S::HA::GPL1</i> <i>P2x35S::HA::GPL2</i> <i>P2x35S::HA::GPL3</i>		Réalisé au laboratoire	pALLIGATOR2
<i>P35S::VP16</i> <i>P35S::HA::VP16::GeBP</i> <i>P35S::HA::VP16::GPL1</i> <i>P35S::HA::VP16::GPL2</i> <i>P35S::HA::VP16::GPL3</i>		Réalisé au laboratoire	pALLIGATOR1
<i>p2x35S::N-ter YFP::GeBP</i> <i>p2x35S::N-terYFP::GeBP- muté</i>		Réalisé au laboratoire	pBIFP-2
<i>P2x35S::C-ter YFP::GeBP</i> <i>P2x35S::C-terYFP::GeBP- muté</i> <i>P2x35S::C-ter YFP::GPL2</i>		Réalisé au laboratoire	pBIFP-3
<i>P35S::BP</i>		Dr S.Hake	(Lincoln et al., 1994)

Tableau 3 : Lignées transgéniques utilisées pour ce travail

I A. 2/ Milieux et conditions de culture

Cultures en terre

La culture de plantes en terre se fait sur du terreau préalablement imbibé d'eau, autoclavé (20 min à 120°C) puis traité au Trigard (larvicide des moucheron, 0,2g/l). Les graines sont directement semées en terre sans stérilisation de surface préalable. Avant d'être placées en chambre de culture, les graines subissent une stratification dans le but d'uniformiser la levée de dormance des graines, ainsi que le développement des plantules. Les pots sont pour cela placés à l'obscurité et à 4°C pendant deux jours, recouverts d'un film en plastique afin de maintenir une atmosphère saturée en eau. Les plantes sont ensuite cultivées dans une pièce à 25°C avec 16 H de lumière suivie de 8 H d'obscurité (jours longs). Le niveau hygrométrique est estimé à 60 %. L'éclairage est réalisé par un panachage de néons blancs (Mazda Fluor 36W) et horticoles (Ozram Fluora 36 W) apportant une intensité lumineuse de $70\mu\text{M}\cdot\text{S}^{-1}\cdot\text{cm}^2$. L'arrosage s'effectue par subirrigation deux fois par semaine. Après 11 à 14 jours, le film plastique est retiré, et les pots sont recouverts de copeaux de liège afin d'éviter le développement de moisissures.

Cultures in vitro

Toutes les manipulations de culture *in vitro* sont réalisées en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire. Avant d'être semées *in vitro*, les graines sont stérilisées en surface par immersion dans une solution de chlore (dissolution d'une pastille d'environ 1,5 g de chlore actif Javel Dose (Eau Ecarlate) dans 40 mL d'eau distillée) diluée au cinquième dans de l'éthanol absolu. Après 8 min d'agitation, puis décantation, la solution de stérilisation est éliminée et les graines lavées pendant 3 min à l'éthanol absolu, puis séchées sous hotte pendant au moins 1 heure.

Les graines stérilisées sont semées sur milieu MS gélosé stérilisé par autoclave [Sels de Murashige et Skoog (Sigma, 4,3 g/l) ; Saccharose (5 g/l); MES (1g/l); pH 5,7 (KOH) ; Agar (6g/l)]. Le cas échéant, les antibiotiques nécessaires à la sélection des plantes transformées ou les hormones servant pour les tests sont ajoutés à la concentration désirée au moment de couler les milieux. Les conditions de culture sont proches de celles décrites pour les cultures en terre (jours longs à 23°C) avec cependant un éclairage délivré uniquement par

des néons blancs (Mazda Fluor 58W) et une intensité lumineuse s'élevant à $100\mu\text{M}\cdot\text{S}^{-1}\cdot\text{cm}^2$. Le niveau d'hygrométrie à l'intérieur des boîtes de cultures est très élevé, aussi lorsque des plantules doivent être repiquées en terre, les pots sont recouverts de films plastique pendant 4 jours afin d'éviter que les plantes ne subissent un choc hygrométrique.

I A. 3/ Tests de résistance au paclobutrazol

Les graines sont semées sur MSAR supplémenté en paclobutrazol (0, 50, 500 ou 5000 nM, Sigma). Après 1 semaine de culture, le nombre de graine ayant germé est compté.

I A. 4/ Tests de réponse aux Cytokinines

Test de sensibilité aux Cytokinines

Les graines sont semées sur milieu MSAR supplémenté en kinétine (1, 4, ou 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$, Sigma). Après 20 jours de culture, le contenu en chlorophylle des plantes est dosé.

Induction de cals

Pour les tests d'induction de cals par les CK, des racines de plantules cultivées sur milieu MS et âgées de 10 jours ont été excisées et mises en culture pendant 24 jours sur des milieux contenant une auxine, l'acide 2,4 dichlorophénoxyacétique ($30\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), et des concentrations croissantes de Kinétine (0, 50, 200, et 1000 ng/ml), comme cela a déjà été décrit (Higuchi et al., 2004; To et al., 2004; Hutchison et al., 2006).

Induction de la sénescence des feuilles à l'obscurité

Les graines sont semées en terre et stratifiées. Après 14 jours de culture, les 3èmes ou 4èmes feuilles sont détachées des plantes et pesées (en prévision du dosage de chlorophylle), puis incubées à l'obscurité dans de l'eau supplémenté avec des concentrations croissantes (0, 25, et 100 nM) de 6-Benzylaminopurine (BA, Sigma). Après 10 jours d'incubation, le contenu en chlorophylle des feuilles est dosé.

Dosage de chlorophylle

Le matériel végétal après avoir été pesé, est incubé dans du méthanol 100% jusqu'à extraction complète des pigments chlorophylliens (entre 24 H et 48H). La concentration en chlorophylle extraite est alors déterminée par lecture de l'absorbance à 665 et 652 nm comme cela a été décrit précédemment (Porra et al., 1989).

Inhibition de la croissance racinaire

Les graines sont semées sur milieu MSAR supplémenté en BA (0, 1, 10, 100, 1000, 10000 nM). Les milieux de culture sont inclinés à la verticale et les plantes sont cultivées ainsi pendant 14 jours. Les racines sont alors alignées et photographiées, puis les mesures de la longueur racinaire sont effectuées à l'aide du logiciel *Image J*.

I B. Les bactéries

I B. 1/ Souches utilisées

Espèce	Souche	Résistance	Utilisation
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	Aucune	Clonages et amplification de plasmides
<i>Escherichia coli</i>	DB3-1	Protéine CcdB	Manipulation du vecteur pDONR™221
<i>Escherichia coli</i>	BL21 (DE3)	Aucune	Induction de protéines
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	C58 pGV3121	Gentamycine Rifampicine	Transformations végétales

Tableau 4 : Différentes souches bactériennes ayant servies dans ce travail

I B. 2/ Milieux et conditions de culture

Les bactéries sont cultivées en milieu riche LB (Lubria Bertani Broth : [peptone tryptique de caséine (10g/l), extraits de levure (5g/l), NaCl (12g/l); pH 7,5]) à la température adaptée (37°C pour *E.coli* et 28°C pour *A.tumefaciens*). En milieu liquide, les bactéries sont agitées à 180 rpm dans un récipient d'un volume au minimum cinq fois plus grand que le volume de culture afin de conserver une oxygénation optimale du milieu. Pour les cultures sur

milieux solides, de l'agar est rajouté au LB (15g/l). Pour la sélection des bactéries transformées, le milieu de culture est supplémenté par un ou plusieurs antibiotiques selon le vecteur et la souche utilisés, aux concentrations usuelles décrites dans le **Tableau 5**.

Antibiotique	Concentration finale
Ampicilline	100 µg/mL
Kanamycine	50µg/mL
Spectinomycine	100 µg/mL
Rifampycine	50 µg/mL
Gentamycine	20 µg/mL

Tableau 5 : Concentration finale des différents antibiotiques utilisés

I C. Les levures

I C. 1/ Souche utilisée

Nous avons utilisé la souche de levure AH109 (CLONTECH) pour les tests double hybride. Son génotype est : *MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, ade2, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 ::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3 ::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ, MEL1.*

I C. 2/ Milieux et conditions de culture

Les levures sont cultivées en milieu riche YPDA [Difco peptone (20 g/l), extrait de levure (10 g/l), 2% glucose (p/v), L-Adénine hémisulfate (0,2%), Agar (20g/l) pour les milieux solides ; pH 5,8] à 30°C (sous agitation à 180 rpm pour les milieux liquides). La sélection des levures transformées s'effectue sur un milieu minimum SD [Yeast nitrogen base sans acides aminés (6,7 g/l), 2% glucose (p/v)] supplémenté par une solution « Drop-out » contenant les composés d'auxotrophie (acides aminés et bases azotées), à l'exception de ceux permettant de réaliser la sélection phénotypique (Leucine et Tryptophane). Pour les milieux contenant du 3-Amino-1,2,4-Triazole (3-AT), son ajout se fait après autoclave à partir d'une solution stock à 2M, stérilisée par filtration.

Solution « Drop out » pour supplémenter le milieu SD (solution 100X) :

L-Isoleucine (3 g/l), L-Valine (15 g/l), L-Adénine hemisulfate (2 g/l), L-Arginine HCl (2 g/l), L-Histidine HCl monohydrate (2 g/l), L-Leucine (10 g/l), L-Lysine HCl (3 g/l), L-Méthionine (2 g/l), L-Phénylalanine (5 g/l), L-Thréonine (20 g/l), L-Tryptophane (2 g/l), L-Tyrosine (3 g/l), L-Uracile (2 g/l).

II Manipulations génétiques des plantes

II A. Fécondation croisée

Cette fécondation s'effectue manuellement sous la loupe binoculaire au moyen d'une pince. Afin d'éviter tout risque d'autofécondation, seuls les bourgeons floraux encore fermés sont sélectionnés, les autres fleurs de la hampe sont coupées. Les étamines de la fleur sélectionnée sont éliminées (émasculature). Lorsque son pistil est mature (deux jours plus tard), cette fleur émasculée de la plante dite « femelle » est badigeonnée par le pollen d'une fleur mature provenant du parent « mâle ». Les graines F1 sont récoltées une fois sèches, environ 15 jours après la fécondation.

II B. Transformation Stable

II B. 1/ Transformation par « Infiltration d'inflorescences » (Clough and Bent 1998)

Cette technique de transgénèse se base sur la capacité de la bactérie phytopathogène *Agrobacterium tumefaciens* (responsable de la maladie « galle du collet ») à pouvoir infecter des cellules végétales en insérant dans leur génome un ADN étranger (le T-DNA). Ce dernier porte des gènes capables d'induire une tumeur chez la plante infectée, ce qui permet à la bactérie de proliférer en parasite dans cette région.

En pratique, pour introduire dans le génome d'une plante une construction donnée, il suffit donc de modifier le T-DNA de la bactérie en remplaçant les gènes inducteurs de tumeur

par la construction voulue. Les *A. tumefaciens* que nous utilisons sont dépourvues du T-DNA d'origine. La première étape de la transgénèse consiste donc à transformer les bactéries avec un vecteur portant le T-DNA recombinant. La deuxième étape, l'infection des plantes proprement dite, est réalisée de la façon suivante :

Une pré-culture de 2 mL (LB + antibiotiques) d'*A. tumefaciens* saturée (2j de culture), contenant la construction d'intérêt, est utilisée pour ensemercer 200 mL de milieu frais au 1/4000ème. Après environ 16h, cette culture atteint une DO_{600nm} de 0,8 (phase exponentielle de croissance). Les bactéries sont alors culotées à 6000 rpm pendant 15min et re-suspendues dans 200 ml d'une solution de saccharose 5% et Silwet L-77 0,05% (un détergent). Ce produit est essentiel car en modifiant la tension superficielle de la solution, il permet de faciliter la mobilité des bactéries.

Pour chaque transformation, on cultive de l'ordre de 200 plantes (génération T0) réparties sur 4 pots indépendants. La transformation est réalisée quand les premiers boutons floraux apparaissent. Ils sont alors plongés dans la solution d'*Agrobacterium* sous agitation pendant 10 secondes. Une transformation contrôle avec un T-DNA ne portant pas la séquence à tester est réalisé pour chaque vecteur et chaque génotype. Les plantes sont ensuite recouvertes d'un film plastique pendant 2 jours. Elles sont de cette manière soumises à un fort taux hygrométrique qui facilite l'infection par la bactérie.

Durant cette période, les plantes ne doivent pas être exposées à une source lumineuse forte qui risquerait d'entraîner un effet de serre dû au film plastique. Elles finissent ensuite leur développement en condition de culture classique jusqu'à la récolte des graines (génération T1).

II B. 2/ Sélection des transformants

Suite à la transformation, environ une graine sur 500 en moyenne a bien intégré le transgène. Pour identifier ces précieuses graines, on a alors recours au marqueur de sélection porté par le T-DNA. Les différents marqueurs de sélection utilisés en fonction des vecteurs employés sont résumés dans le **Tableau 6**.

Construction	Vecteur	Marqueur de sélection
<i>p35S ::GFP :: GeBP/GPL</i>	pK7WGF2	Kanamycine
<i>p GeBP/GPL ::GUS</i>	pHGWS7	Hygromycine
<i>p2X35S ::GeBP/GPL</i>	Alligator2	GFP
<i>p2X35S ::VP16::GeBP/GPL</i>	Alligator1	GFP

Tableau 6 : Marqueurs employés pour la sélection des transformants primaires (T1)

Sélection sur Kanamycine

Les graines T1 sont semées sur milieu MS supplémenté en Kanamycine (50 µg/ml). Les plantes sauvages arrêtent leur développement au stade cotylédon puis commencent à blanchir. Les transformants stables hémizygotés qui ont poursuivi leur développement sont repiqués en terre.

Sélection sur Hygromycine

Les graines sont semées sur milieu MS + hygromycine (20µg/ml). Les boîtes sont placées à 4°C pendant 3 jours puis éclairées pendant 24 H afin de déclencher la germination. Les boîtes sont ensuite placées à l'obscurité pendant 4 jours. Les plantules sensibles présentent un développement skotomorphogénique anormal avec des hypocotyles très courts et des cotylédons ouverts. Les plantules résistantes ont à l'inverse des hypocotyles longs et des cotylédons fermés. Une fois les transformants repérés, les boîtes sont remises en culture dans des conditions classiques d'éclairage pendant 2 jours pour permettre aux plantes de reprendre un développement photomorphogénique avant le repiquage en terre.

Sélection avec la GFP

Le gène codant pour la GFP est placé sous le contrôle du promoteur du gène *AT2S3* qui code pour une protéine de réserve présente uniquement dans les graines sèches. Les transformants sont sélectionnés en plaçant les graines T1 sous la loupe binoculaire à fluorescence avec un filtre GFP (**Figure 40**). Seules les graines qui fluorescent sont prélevées. Cette méthode a l'avantage d'éviter les problèmes qui accompagnent généralement les systèmes de sélections nécessitant des cultures *in vitro* (contamination par des champignons, mort des plantes lors du repiquage en terre, etc...)

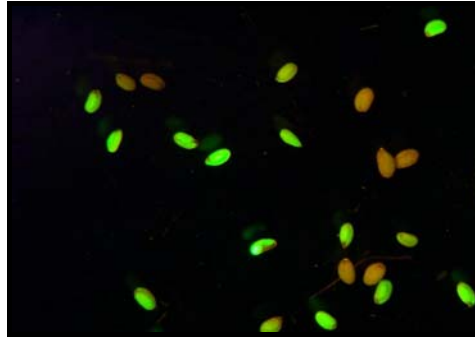


Figure 40 : Graines T2 issues d'une lignée transformée avec une construction portant le marqueur GFP

Les graines ou les plantules sélectionnées sont mises en culture et leur descendance récoltée individuellement (graines T2). Dans le cas d'une insertion unique (le plus courant), on trouve parmi ces graines de seconde génération 50 % d'hémizygotés et 25 % d'homozygotés pour le transgène, les 25 % restantes étant sauvages.

II C. Transformation transitoire par infiltration de feuilles de tabac

L'avantage de la transformation transitoire est qu'elle permet d'observer en quelques jours l'expression d'une construction. La technique par infiltration consiste à faire pénétrer dans les tissus foliaires une solution d'*Agrobacterium*, afin d'infecter les cellules de l'épiderme avec la construction d'intérêt. Une pré-culture de 5 ml (LB + antibiotiques) d'*Agrobacterium* portant la construction d'intérêt (ou les deux constructions dans le cas du BiFC), est réalisée sur la nuit à 28°C. Le lendemain, 1 ml de la pré-culture est ajouté à 4 ml de milieu frais et placé sous agitation à 28°C. Une fois que la DO_{600nm} atteint 0.8, 2 ml de culture sont centrifugés (5000 rpm, 5 min), le culot de bactéries est re-suspendu dans 2 ml d'eau. Cette étape de lavage est répétée deux fois, puis les bactéries sont re-suspendues dans 2 ml de Tp d'infiltration.

-Tp d'infiltration :	Saccharose	2%(p/V)
	Glucose	1%(p/V)
	Acétosyringone	0,2 mM
	MES pH 5,4	20 mM

La solution est alors infiltrée sous pression dans une feuille de tabac, d'une dizaine de cm de long, à l'aide d'une seringue de 1 ml (sans aiguille). La seringue est appuyée contre la paroi abaxiale de la feuille, entre les nervures, tout en étant maintenue de l'autre côté par l'index.

La solution d'*Agrobacterium* diffuse de façon visible sous la couche épidermique. Il faut attendre deux jours pour que les cellules expriment la construction de façon optimale. L'expression s'arrête après 4 jours.

III Biologie Moléculaire

III A. Techniques de clonage et transformation bactérienne

III A. 1/ Clonage classique

L'insert et le vecteur sont digérés par une ou deux enzymes de restriction selon la stratégie du clonage. Utiliser deux enzymes a l'avantage d'empêcher la recircularisation du vecteur et de ne permettre qu'une seule orientation pour le clonage de l'insert. Les deux fragments d'ADN sont ensuite purifiés sur gel d'agarose avant la réaction de ligation pour laquelle le rapport moléculaire optimal doit être d'environ quatre molécules d'insert pour une molécule de vecteur. Des bactéries compétentes sont ensuite transformées avec le produit de ligation et des extractions de plasmides sont réalisées sur les colonies obtenues. La présence de l'insert est vérifiée par digestion enzymatique, puis les vecteurs recombinants sont séquencés afin de vérifier l'absence de mutation.

Digestion enzymatique d'ADN

1 à 3 μg d'ADN sont incubés avec l'enzyme de restriction voulue et son tampon adéquat pendant 1h à la température de fonctionnement de l'enzyme (37°C dans la plupart des cas). Le nombre d'unité d'enzyme à utiliser pour une digestion totale est à déterminer en fonction de la quantité d'ADN et du nombre de sites de coupure. Le volume de réaction dépend du volume d'enzyme utilisé sachant que la concentration en glycérol ne doit pas dépasser les 5 % (les enzymes étant généralement stockées dans 50 % de glycérol). La plupart du temps, 1 μl d'enzyme (10 unités) sont utilisées et le volume réactionnel ne doit donc pas être inférieur à 10 μl final. Il est possible de réaliser des doubles digestions à condition que les deux enzymes utilisées puissent fonctionner dans le même tampon. Dans le cas contraire, on doit réaliser la première digestion puis purifier l'ADN digéré avant de réaliser la seconde.

Electrophorèse et purification des fragments d'ADN

Les fragments d'ADN après ajout de bleu de dépôt (3% glycérol (v/v), 0,025% bleu de bromophénol (p/v)) sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose dans du TBE 1X (Tris borate pH8 90mM, EDTA 1mM) sous une tension électrique de 100 V. On fait varier la concentration en agarose du gel de 0,8 à 3% (p/v) selon la taille des bandes qu'on cherche à séparer. Un marqueur de poids moléculaire est déposé en parallèle afin d'évaluer la taille des bandes. Le Smart Ladder (Eurogentec) est utilisé pour les fragments supérieurs à 100 pb et le Low Molecular Weight (Biolabs) pour les fragments de plus petite taille. L'ADN est révélé par trempage dans une solution de bromure d'éthidium (2µg/ml), et les bandes sont observées sous UV. Les fragments d'ADN d'intérêt sont extraits et purifiés en utilisant le QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), ou le Nucleospin extract 2 (Macherey Nagel) selon les recommandations des fournisseurs.

Ligation

La ligation s'effectue à 16°C sur la nuit, dans un volume réactionnel contenant environ 50 ng de vecteur, 200 ng d'insert, 1 Unité de T4 DNA ligase, 1µl de tampon 10X (contenant de l'ATP) et de l'eau qsp 10µl. Le produit de ligation sert ensuite à la transformation.

III A. 2/ Clonage à partir d'un produit PCR

Les plasmides pENTR/D-TOPO, pCR-II-TOPO® (*invitrogen*), ou pGM-T Easy (*Promega*) ont été utilisés pour le clonage des produits PCR. Ce sont des vecteurs de clonage de fragments PCR de type "T-A". Ils se présentent sous forme linéaire, ouverts au niveau de la séquence codante du gène *lac Za* (possibilité de criblage « blanc bleu »), et possèdent une base T sortante aux extrémités 3' qui permet de s'apparier avec les amplicons possédant une base A sortante en 3' (c'est le cas des amplicons obtenus avec une Taq polymérase classique). Les réactions de clonage sont réalisées selon les recommandations des fournisseurs dans un volume réactionnel de 10 µl final. 2µl de cette solution sont utilisés pour transformer des bactéries compétentes.

III A. 3/ Clonage GATEWAY™

Ce type de clonage a le double avantage d'être rapide et approprié lorsqu'un même fragment est à cloner dans plusieurs vecteurs différents. Cette technologie s'est donc montrée optimale pour le clonage des séquences promotrices et génomiques de chaque membre de la famille GeBP dans les différents vecteurs d'intérêt.

Principe

Cette technique de clonage se base sur la capacité de recombinaison entre l'ADN du phage lambda et celui d'*E.coli* via les sites att lors du cycle lysogénique. Le clonage se fait en deux étapes. Lors de la première, l'ADN d'intérêt est amplifié par PCR en utilisant des amorces directes hybrides possédant une extension attB en 5'. Ce produit de PCR permet de réaliser (grâce à l'extension attB) une première recombinaison *in vitro* (réaction BP) avec les sites attP du vecteur pDONR™221 (Invitrogen) conduisant au clone d'entrée. Celui-ci est utilisé lors de la deuxième étape (réaction LR) qui consiste en une deuxième recombinaison entre les deux sites attL et deux sites attR d'un vecteur de destination portant la construction qui nous intéresse (**Figure 41**).

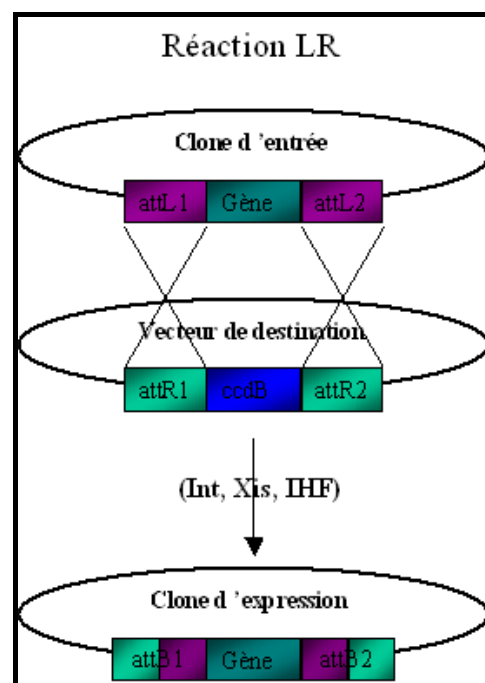


Figure 41 : Schéma de la réaction LR GATEWAY™

La recombinaison qui se produit entre les sites attL et attR entraîne la formation du clone d'expression.

Les deux réactions de recombinaison nécessitent respectivement le mix BP Clonase™ et LR Clonase™ (Invitrogen) qui sont des mélanges des enzymes nécessaires à la recombinaison : Int, IHF, et Xis (uniquement présente dans le mix LR). Le vecteur pDONR™221 et les différents vecteurs de destination portent toujours entre leurs sites attP ou attR une cassette *ccdB* qui code pour une protéine interagissant avec la gyrase de la plupart des souches d'*E.coli* ce qui empêche leur croissance (pour la manipulation du vecteur pDONR™221, la souche résistante *DB3-1* est utilisée). Lors de la recombinaison, cette cassette est naturellement perdue, ce qui permet de ne sélectionner que les bactéries portant la bonne construction.

Réaction de recombinaison BP et LR

Environ 0.1 à 0.3µg de produit PCR avec extension attB ou de clone d'entrée sont mélangés respectivement, à 0.3 µg de pDONR™221 ou de vecteur de destination, 1µl de Mix BP ou LR Clonase et du tampon TE pH.8,3 jusqu'à 5 µl final. Ce mélange est vortexé brièvement deux fois puis incubé à 25°C pendant une heure. La réaction est alors stoppée par l'ajout de 1µl de protéinase K (2µg/µl) et en incubant à 37°C pendant 10 min. Le produit est alors utilisé pour transformer des bactéries par électroporation.

III A. 4/ Vecteurs utilisés et constructions réalisées

Vecteurs	Provenance	Taille	Utilisation	Sélection
pCR®-II-TOPO	Invitrogen	3,5 kb	Clonage des produits PCR	Ampicilline
pGMT-Easy	Promega	2,5 kb		
pDONR™221	Invitrogen	4,8 kb	Vecteur d'entrée utilisé dans les réactions GATEWAY	Kanamycine
pGBKT7	Clontech	7,3 kb	Expression dans la levure pour les tests doubles hybrides	Kanamycine
pGADT7		8,0 kb		Ampicilline
pGAD10		6,7 kb		Ampicilline
pET-15b BP	Dr Sarah Hake		Production de protéine chez <i>E.coli</i>	Ampicilline
pET-19 GeBP	Dr Gilles Vachon			
Alligator1	Dr F. Parcy IRSV, CEA de Grenoble	11,3 kb	Vecteur de destination GATEWAY	Spectinomycine
Alligator2		11 kb		
pBIFP-2		12,2 kb		
pBIFP-3		12 kb		
pK7WGF2	Plant Systems Biology	11,8 kb		
pHGWF57	VIB-Ghent University	13 kb		

Tableau 7 : Différents vecteurs employés dans ce travail

Constructions avec les cDNA des GeBP/GPL

Les ADNc des quatre gènes ont été amplifiés par PCR à partir d'ARN totaux de rosettes âgées de 3 semaines. Ils ont ensuite été clonés dans le vecteur pDONR™221 en effectuant la réaction GATEWAY BP, pour donner les clones d'entrée. Les fusions traductionnelles avec la GFP ont été réalisées en se servant de ces clones d'entrée pour introduire les ADNc dans le vecteur pK7WGF2 par réaction LR. Les constructions pour la surexpression des GeBP/GPL avec ou sans la fusion avec le domaine VP16 ont été réalisées respectivement en clonant les ADNc dans les vecteurs pALLIGATOR2 et pALLIGATOR1 toujours en effectuant la réaction GATEWAY LR.

Fusions transcriptionnelles avec le gène rapporteur GUS

Les promoteurs des quatre gènes ont été amplifiés par PCR à partir d'ADN génomique de rosettes. Ils ont été clonés dans le vecteur pDONR™221 à l'aide de la clonase BP, puis transférés dans le vecteur pHGWFS7 par réaction LR.

Constructions pour la technique du BiFc

Le clone d'entrée portant l'ADNc de GeBP a servi à transformer les vecteurs pBIFP-2 et pBIFP-3 à l'aide de la clonase LR. La version GeBP mutée a été introduite dans ces deux mêmes vecteurs par clonage classique.

III A. 5/ Transformation bactérienne, amplification de plasmide et séquençage

Préparation de bactéries thermo-compétentes

Une pré-culture saturée de 5 ml est utilisée pour ensemercer 500 ml de SOB qui sont mis en culture à 28°C sur la nuit. Le lendemain, lorsque que la DO₆₀₀ a atteint 0.4, les bactéries sont incubées 30 min sur la glace, puis sont centrifugées 2 fois 2500g / 4°C / 10 min. Le culot est repris dans 150 ml de tampon TB froid après la première centrifugation et dans 15 ml après la seconde. 1.2 ml de DMSO est ajouté puis les bactéries sont placées 10 min dans la glace. Les cellules sont aliquotées par fractions de 300µl et stockées à -80°C.

-SOB (500ml):	10 g bacto tryptone	-TB (180 ml):	1,8 ml pipes 1M
	2,5 g extrait de levure		10 ml MnCl ₂ 1M
	0,2 ml NaCl 5M		2,7 ml CaCl ₂ 1M
	1,25 ml KCl 1M		45 ml KCl 1M
	5 ml MgSO ₄ 1M		pH 6.7, filtrer
	pH 7, autoclaver		

Préparation de bactéries électro-compétentes

500 ml de LB sont inoculés à partir d'une pré-culture saturée de 5 ml. Lorsque cette large culture atteint une DO₆₀₀ de 0.8, les bactéries sont maintenues dans la glace durant 30 min, avant de subir 3 centrifugations 4000g / 4 °C / 15 min. Le culot est successivement repris dans 500, 250, puis 20 ml d'eau distillée à 4°C. Après une dernière centrifugation, les bactéries sont reprises dans 1 ml de glycérol 10 % froid. Les bactéries compétentes sont alors aliquotées par fractions de 40 µl et stockées à -80°C.

Transformation par choc thermique

Les bactéries thermo-compétentes sont décongelées sur la glace puis incubées 30 min à 4°C avec une partie du produit de ligation ou de mini-préparation. Le choc thermique est réalisé en incubant rapidement les bactéries à 42°C durant 45 secondes. Elles sont ensuite replacées immédiatement dans la glace pendant 2 minutes. Si nécessaire, une culture d'expression est réalisée en incubant les bactéries dans 500 µl de LB pendant 1h à la température de culture. Les bactéries sont ensuite étalées sur le milieu de sélection et mises en culture.

Transformation par électroporation

L'électroporation est une technique de transformation qui présente un très bon rendement et permet la transformation de vecteur de grande taille (supérieur à 10 kpb). Afin d'augmenter l'efficacité de transformation et d'éviter tout phénomène d'arc électrique lié à la présence de sels dans la solution de ligation, celle-ci est diluée au 1/6^{ème} dans de l'eau désionisée. 1 µl est ensuite ajouté à 40 µl d'une solution de bactéries électro-compétentes maintenues dans la glace. Après une minute dans la glace, la solution est transférée dans une cuve à électroporation de 0,2cm d'espacement entre les électrodes. L'électroporation s'effectue dans l'appareil « Gene Pulser™ » (Biorad) selon les paramètres définis par le fabricant.

Immédiatement après électroporation, environ 300 µl de LB sont ajoutés à la solution de bactéries transformées puis ces dernières sont étalées sur le milieu sélectif une fois la culture d'expression terminée.

Sélection des bactéries transformées et criblage « blanc bleu »

Pour sélectionner les bactéries, un gène de résistance à un antibiotique est présent sur le vecteur. Une fois la transformation effectuée, les bactéries doivent être cultivées 1h dans 500 µl de LB afin qu'elles puissent commencer à exprimer le ou les gènes de résistance (culture d'expression). Cette étape n'est pas nécessaire dans le cas d'antibiotiques qui empêchent juste la division cellulaire (comme c'est le cas de l'ampicilline) sans tuer les bactéries. L'étape suivante consiste à étaler les bactéries sur le milieu sélectif qui consiste en du LB agar supplémenté en antibiotique (les concentrations sont décrites au chapitre IB.2). Les bactéries sont ensuite cultivées jusqu'à apparition des colonies. Certains vecteurs permettent l'utilisation du criblage « blanc bleu ». Dans ce cas, 10 µl d'IPTG (24 mg/ml) et 50µl de X-gal (20mg/ml) sont étalés sur les boites en même temps que les bactéries.

Mini-préparation de plasmide

Les extraction de plasmides ont été réalisées à l'aide des kits « Plasmid miniprep » (*QIAGEN*) ou « nucleospin plasmid » (Macherey Nagel) selon les indications des fournisseurs. Deux ml de culture en phase stationnaire sont nécessaires pour réaliser une extraction.

Séquençage

Des mutations sont susceptibles d'être apparues dans les séquences clonées. Elles peuvent être dues aux erreurs de la polymérase lors de la PCR dans le cas du clonage d'un amplicon ou à l'exposition au UV dans le cas d'une purification sur gel. Dans tous les cas, il est nécessaire de séquencer les clones obtenus afin de vérifier l'absence de mutations. Les amorces choisies doivent s'hybrider environ 200pb en amont de la région de clonage du vecteur pour obtenir une séquence optimale. Ces amorces sont fournies dans le cas des vecteurs commerciaux. Les réactions de séquençage ont été réalisées par Jean-pierre ALCARAZ qui gère la plateforme au laboratoire.

III B. Analyse des acides nucléiques

III B. 1/ Extraction d'ADN génomique d'Arabidopsis à partir de feuilles de rosettes

Une feuille mature est excisée de la rosette (âgée d'environ 3 semaines) de chaque plante à génotyper. La feuille est broyée à l'aide d'un piston en plastique dans un tube *Eppendorf* de 1,5 ml dans lequel 100µl de tampon d'extraction ont été préalablement ajoutés.

- **Tampon d'extraction** : 0,2M Tris Hcl pH 8
 0,25M NaCl
 0,025M EDTA
 Autoclaver puis rajouter du SDS (0,5%)

100µl de ce tampon sont ensuite rajoutés et les feuilles subissent un broyage additionnel. Après avoir été vortexés pendant 10 sec, les tubes sont centrifugés à 15000 rpm à température ambiante pendant 5 min afin de faire précipiter tous les débris cellulaires. L'étape de précipitation de l'ADN est réalisée en transférant le surnageant dans un nouveau tube contenant 200µl d'isopropanol. Les tubes sont vortexés 10 sec puis laissés 2 min à température ambiante avant d'être centrifugés à 15000 rpm à 4°C pendant 5 min. Le surnageant est éliminé et les culots d'ADN sont lavés à l'éthanol 70 % avant d'être repris dans 50µl d'eau désionisée. 2µl de cette solution d'ADN est utilisé pour la réaction de PCR.

III B. 2/Amplification d'un fragment d'ADN par PCR

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permet d'amplifier sélectivement et de façon exponentielle un fragment d'ADN double brin, délimité par deux amorces, grâce à l'utilisation d'une ADN polymérase thermostable, la Taq (Cette polymérase est extraite de la bactérie extrême *Thermophilus aquaticus* que l'on trouve habituellement dans les geysers et sources chaudes). La réaction comprend 3 étapes : une dénaturation des doubles brins (~ 94°C), une hybridation des amorces (45 à 65°C selon les amorces utilisées) et une néosynthèse d'ADN par la Taq polymérase (~ 72°C). Le nombre de cycles de réaction est fonction de la matrice utilisée et de la quantité d'amplicon que l'on souhaite obtenir. Pour

amplifier de l'ADN génomique (1 µg) ou plasmidique (1ng), on réalise généralement 40 cycles. Dans certains cas, un site de restriction est rajouté en 5' de chaque amorce afin de faciliter un éventuel clonage par la suite. Toutes les amorces qui ont été utilisées dans ce travail sont répertoriés dans l'*Annexe 1*.

-Condition de PCR	94°C / 5 min
<u>classiques</u> :	(94°C / 30 sec, 60°C / 30 sec, 72°C / 1 min) X 39 72°C / 10 min
-Mélange réactionnel (25µl) :	Tampon Taq (10X) 2,5 µl
	MgCl ₂ (25 mM) 1,5 µl
	dNTPs (10 mM) 2,5 µl
	Amorces (10 µM) 1 µl de chaque
	Taq polymérase 2 unités
	Matrice 1 ng à 1 µg selon le type d'ADN
	Eau qsp 25 µl

III B. 3/ Génotypage

Le génotypage est une technique qui permet de vérifier si un individu donné possède dans son génome un locus précis ou une version allélique particulière d'un gène. Dans cette étude, le génotypage a servi à l'identification des plantes doubles, triples, ou quadruples homozygotes mutantes obtenues par croisements. Les mutants avec lesquels nous avons travaillé ont tous été obtenus par insertion d'un ADN étranger (T-DNA ou transposon Ds). Pour réaliser le génotypage d'une plante, son ADN génomique est extrait et sert de matrice dans une réaction de PCR multiplexe utilisant deux amorces spécifiques du gène d'intérêt, situées de part et d'autre de l'insertion, ainsi qu'une amorce spécifique de l'élément d'insertion qu'on cherche à détecter (pour chaque type de T-DNA/séquence Ds, nous avons utilisé les amorces recommandées par les organismes qui nous ont fournis les graines mutantes) (**Figure 42**). Ces amorces sont désignées de manière à ce que les amplicons obtenus par PCR ne fasse pas la même taille dans le cas d'un allèle sauvage ou mutant. On peut ainsi vérifier en une seule réaction PCR la présence de l'un des amplicons (wt ou mutant), ou bien des deux (**Figure 42**).

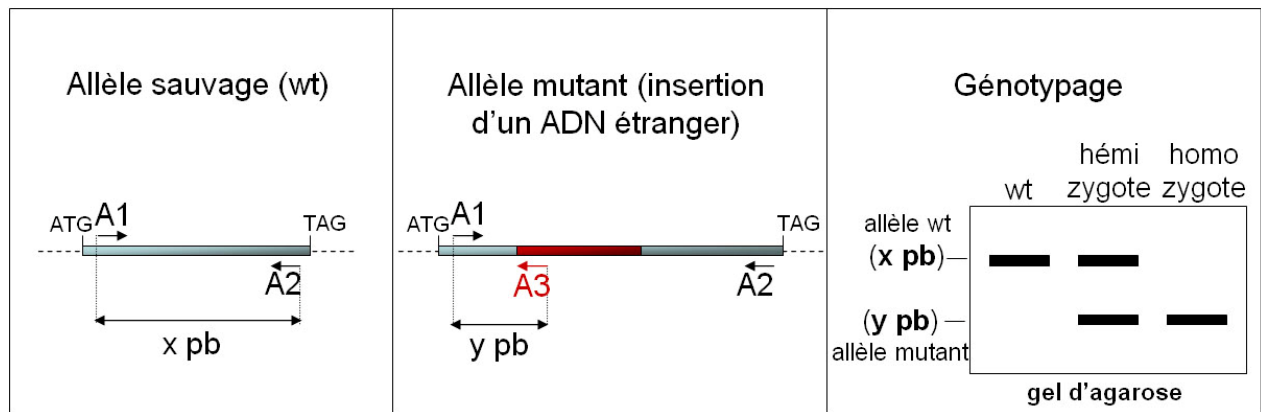


Figure 42 : Principe schématique de la technique du génotypage en multiplexe

Les amorces A1 et A2 sont spécifiques de la séquence du gène d'intérêt, l'amorce A3 est spécifique de la séquence de l'élément inséré provoquant la mutation. Dans le cas d'un allèle sauvage (schéma de gauche), seules les amorces A1 et A2 peuvent s'hybrider, et la réaction de PCR produit un amplicon wt de x pb (schéma de droite). Dans le cas d'un allèle mutant (schéma central), les trois amorces sont capable de s'hybrider, cependant la distance séparant les amorces A1 et A2 est trop importante (> à 1,5 k pb) pour que la Taq polymérase puisse synthétiser l'amplicon correspondant (pour des temps d'élongation d'une minute). En conséquence, seul l'amplicon mutant de y pb correspondant aux amorces A1 et A3 sera amplifié (schéma de droite). Les amorces sont désignées de façon à ce que la différence de taille des amplicons wt et mutants les rendent faciles à séparer par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Les différents profils d'électrophorèse que l'on peut observer selon que la plante génotypée est homozygote wt, hémizygote, ou homozygote mutante, sont schématisés dans le carré de droite.

Il est cependant relativement courant que les amorces entraînent l'apparition de produits PCR secondaires qui rendent difficile l'interprétation. Dans ce cas, le génotypage est réalisé via deux réactions de PCR en parallèle. Une réaction A utilisant les deux amorces spécifiques du gène, et une réaction B utilisant seulement l'une de ces deux amorces couplée avec l'amorce spécifique de l'élément d'insertion.

III B. 2/ Quantification des transcrits

Extraction d'ARN

4 à 5 rosettes au stade 2ème paire de feuilles (2 à 3 semaines) sont congelées dans l'azote liquide puis broyées à froid dans un tube eppendorf de 1,5 ml à l'aide d'un broyeur à billes (MM300, *RETSC/QIAGEN*, billes de diamètre 3). 500 µl de tampon d'extraction sont immédiatement ajoutés à la poudre obtenue (inactivation des RNAses). Après rajout de 500 µl

d'un mélange PCI [1 vol de Phénol saturé dans du Tris-HCl pH.8 (*SIGMA*) pour 1 vol de 24 :1 (chloroforme : isoamyl alcool)], les tubes sont vortexés pendant 20 sec puis centrifugés 5 min à 13000 rpm à 4°C. La phase aqueuse (supérieure) est récupérée et placée dans un nouveau tube. Cette opération qui permet de purifier les acides nucléiques des protéines et des débris cellulaires est renouvelée une seconde fois, puis une troisième fois en utilisant uniquement du chloroforme afin d'éliminer toute trace de phénol (inhibiteur protéique qui pourrait bloquer les étapes suivantes). Les ARN contenus dans la phase aqueuse récupérée sont précipités par ajout de LiCl à 2M final à 4°C sur la nuit. Le lendemain, les tubes sont centrifugés 30 min à 13000 rpm à 4°C. Les culots sont lavés à l'éthanol puis repris dans le volume désiré d'eau désionisée traitée au DEPC (inactivation des RNAses).

Traitement des ARN à la DNase I

L'ARN extrait contient souvent de l'ADN contaminant. Ce dernier est éliminé par traitements à la DNase I (Fermentas), selon les recommandations du fournisseur, à raison de 1U/μg d'ARN. Une fois le traitement effectué, l'enzyme est inactivée en incubant les ARN à 65°C pendant 10 min.

Transcription inverse (RT)

La transcription inverse (RT) permet la synthèse de molécules d'ADN complémentaires (ADNc) simple brin à partir d'une matrice d'ARN. Elle est effectuée grâce à la Reverse Transcriptase du virus de la Leucémie Murine de Moloney (M-MLV Reverse Transcriptase (*Promega*)), à l'aide d'amorces hexamères de séquence aléatoire s'hybridant sur l'ensemble des molécules d'ARN. Ces hexamères aléatoires ont l'avantage de permettre la rétro transcription des messenger non-polyadénylés ce qui n'est pas le cas des amorces poly-dT. Deux microgrammes d'ARN totaux pour un volume final de 50 μL par réaction sont utilisés.

<u>-Mélange réactionnel (50 μl) :</u>	Tampon RTase (5X)	10 μl
	MgCl ₂ (25 mM)	5,5 μl
	dNTPs (10 mM)	2,5 μl
	Hexamères (0,3μg/μl)	1,5 μl
	RTase (50 U/μl)	1,25 μl
	ARN	1,5 μg
	Eau	qsp 50 μl

Afin de détruire les structures secondaires qui pourraient empêcher l'activité de la RTase, les ARN sont incubés préalablement à 65°C pendant 10 min. La réaction de reverse transcription s'effectue ensuite à 25 °C / 10 minutes pour permettre l'hybridation des amorces, puis 1 h à 48°C. L'enzyme est finalement inactivée à 95°C / 5 minutes.

PCR semi quantitative

Pour l'analyse de l'expression des gènes, les amplifications par PCR sont réalisées à partir de 1µl d'ADNc obtenu comme expliqué précédemment. Pour chaque jeu d'amorces, le nombre de cycles à utiliser est déterminé préalablement pour se situer dans la phase exponentielle de l'amplification, avant saturation. Les gènes de ménage à expression constitutive *Elongation Factor-1 (EF-1)*, impliqué dans la traduction protéique) ou de l'Actine8 sont utilisés comme référence afin de normaliser la quantité d'ADNc utilisée. Dans nos conditions, le début de la phase exponentielle d'amplification d'*EF1* se situe aux alentours de 21 cycles de PCR, celle du gène de l'actine8 vers 27 cycles. Une fois les réactions de PCR effectuées, des aliquots de 10 µl de chaque produit PCR sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 1 % (selon les conditions décrites au chapitre III A.1/). Les gels sont colorés au bromure d'éthidium, puis numérisés sous un éclairage UV, dans des conditions d'exposition permettant une acquisition non saturante du signal correspondant aux bandes d'ADN. Dans le cas de la détection des transcrits *arr-a* décrite dans le chapitre II des résultats, l'intensité de chaque bande a été mesurée à l'aide du logiciel « Image J » (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) et normalisé par rapport à l'intensité de la zone de gel entourant la bande.

-Condition de PCR : 94°C / 5 min
(94°C / 30 sec, 60°C / 30 sec, 72°C / 1 min) X nombre de cycles nécessaires

-Mélange réactionnel (25µl) :

Tampon Taq (10X)	2,5 µl
MgCL2 (25 mM)	1,5 µl
dNTPs (10 mM)	2,5 µl
Amorces (10 µM)	1 µl de chaque
Taq polymérase	2 unités
Produit de RT	1µl
Eau	qsp 25 µl

PCR Quantitative en temps réel (F. Laporte)

Ce type de PCR se base sur l'utilisation du SYBR® Green, une molécule qui a la double caractéristique d'avoir une forte affinité pour l'ADN double brin et d'émettre de la fluorescence (sous une lumière d'excitation bleue de longueur d'onde 485nm) uniquement lorsqu'elle est intercalée dans l'ADN. Il est ainsi possible de suivre en temps réel l'amplification du fragment d'intérêt, en mesurant la fluorescence à chaque nouveau cycle de PCR.

<u>-Mélange réactionnel :</u>	Amorces	3µM chacune
	Produit de RT	1 µl
	PCR Master Mix 2X	12.5µl (comprend l'ADN polymérase, les dNTPs, et le SYBR® Green)
	Eau	qsp 25µl

L'appareil utilisé pour la réaction est le IQ5 (*Biorad*). Le choix des oligonucléotides a été effectué à l'aide du logiciel Beacon Designer (PREMIER Biosoft International) qui propose des couples d'amorces en fonction de paramètres optimisés pour l'appareil. Chacune des réactions de PCR a été réalisée en double ainsi que sur des témoins où le produit de RT est remplacé par de l'eau ou des ARN totaux.

Analyse des résultats et quantification

La méthode utilisée est dite des $\Delta\Delta Ct$. A chaque courbe d'amplification par PCR est attribuée un cycle seuil (Ct), à partir duquel la fluorescence détectée atteint une valeur significative par rapport à un seuil défini manuellement.

Pour chaque échantillon, la mesure de l'expression de l'ADNc cible repose sur la comparaison de son Ct avec celui d'un gène contrôle d'expression constitutive, ici le gène de la tubuline. Chaque valeur de ΔCt se voit alors retrancher celle de l'échantillon référence, c'est le $\Delta\Delta Ct$. Enfin, la quantité de cible normalisée par rapport à un gène contrôle et à un échantillon référence est donnée par la valeur $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

III C. Analyse des protéines

III C. 1/ Purification de protéines taggées

Induction

Les protéines GeBP et BP portant un épitope Tag poly(His) ont été induites chez *E. coli* (BL 21) à l'aide des vecteurs pET-19b-GeBP et pET-15b-BP. Après transformation des bactéries, une colonie isolée permet d'inoculer une pré-culture de 20 ml de LB + ampicilline (LB Amp). Le lendemain, la moitié de la pré-culture saturée est utilisée pour ensemercer 200 ml de milieu « LB Ampicilline » frais. Lorsque la DO₆₀₀ a atteint une valeur de 0.6 (environ 1 heure de culture), l'induction est débutée par ajout de 200 µl d'IPTG 1 M à la culture. Si nécessaire, de l'ampicilline peut être rajoutée à cette étape. La culture se poursuit ensuite durant 4 à 5 heures à 37°C. Des aliquots de 1 ml sont prélevés avant et après l'ajout d'IPTG puis toutes les heures pour contrôler par la suite le bon déroulement de l'induction. Les bactéries sont ensuite centrifugées 20 min à 4000g, et le culot est congelé.

Purification en conditions dénaturante

La purification des protéines BP et GeBP a été effectuée en conditions dénaturantes sur colonne Ni-NTA à l'aide du Kit QIAexpressionist™ (QIAGEN) selon les recommandations du fournisseur. La lyse des bactéries a été réalisée à l'aide de la French Press dans le tampon de lyse du Kit (qui contient de l'Urée 8M).

III C. 2/ Détection de protéines taggées

Les protéines BP et GeBP purifiées sur colonne portent un épitope Tag poly(His). Les protéines GeBP/ GPL surexprimées chez *Arabidopsis* avec ou sans la fusion avec le domaine VP16 portent un épitope Tag poly(HA).

Extraction de protéines

Pour chaque plante dont on cherche à détecter la présence de protéines taggées, une feuille de rosette est prélevée et placée dans un tube de 1,5 ml. Les feuilles sont écrasées à l'aide de pistons en plastique pendant quelques secondes, jusqu'à ce que du jus soit visible dans le tube.

Cent microlitres de TP de charge 2X sont immédiatement ajoutés et les tubes sont vortexés vigoureusement. Les tubes sont ensuite chauffés à 95°C pendant 5min afin de dénaturer les protéines puis centrifugés 5 min à 1500 rpm pour précipiter les débris de feuille. Les surnageants sont placés dans un nouveau tube et stockés dans la glace. 10 à 20 µl sont chargés sur gel SDS-PAGE et le reste est congelé.

-TP de charge 2X : 100 mM Tris HCl
4 % SDS
0,2 % bleu de bromophénol
20 % glycérol
Rajouter au moment de l'emploi β-Mercaptoéthanol 5 % final
(ou DTT 200mM)

Electrophorèse de protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Le gel se compose de 2 parties : la partie inférieure correspond au gel de séparation [10 à 15 % acrylamide (v/v) ; 375 mM Tris-HCl pH 8,8 ; 0,1 % SDS], la partie supérieure correspond au gel de concentration [6,6 % acrylamide (v/v) ; 125 mM Tris-HCl pH 6,8 ; 0,1 % (v/v) SDS]. L'électrophorèse est réalisée en voltage constant (100 V) dans du tampon de migration [25 mM Tris-HCl ; 240 mM glycine ; 0,1 % SDS (p/v)]. Après la migration, les protéines sont colorées au bleu de coomassie ou transférées sur membrane de nitrocellulose afin de réaliser une immunodétection.

Coloration des protéines au bleu de coomassie

Les gels ont été colorés à l'aide de la solution PageBlue (*Fermentas*) en se référant aux indications du fournisseur.

Transfert de protéines sur membrane de nitrocellulose

Les protéines séparées par électrophorèse sont transférées électriquement sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher & Schuell) par utilisation d'un appareil de transfert liquide réfrigéré (BioRad). Le transfert se déroule à Ampérage constant de 200 mA pendant 80 min dans du tampon de transfert (39 mM glycine, 48 mM Tris, 0,4 % SDS (p/v); 20 % éthanol (v/v)). Pour contrôler la qualité du transfert et l'homogénéité des quantités de protéines

chargées, la membrane est colorée 10 min au Rouge Ponceau (0,5 % (p/v) Rouge Ponceau dans 1 % (v/v) acide acétique), puis décolorée à l'eau distillée jusqu'à distinguer nettement les bandes protéiques. Une fois numérisée, la membrane est décolorée par 2 lavages dans du TBS-T (TBS : Tris-HCl 20 mM pH 8 ; NaCl 150 mM ; Tween 0,01%). Les sites libres de la membrane sont ensuite bloqués par incubation dans une solution de TBS-T lait (5% de lait écrémé), pendant 1h à température ambiante ou une nuit à 4°C.

Immunodétection des protéines

L'anticorps primaire (Anti-His (*Amersham*) ou Anti-HA (*Euromedex*), monoclonaux de souris) est dilué (1/3000ème à 1/5000ème) dans du TBS-T lait et incubé avec la membrane pendant 2h à température ambiante ou une nuit à 4°C. La membrane est lavée 3 fois 10 min avec du TBS-T à température ambiante, puis incubée pendant 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire (polyclonal de chèvre anti souris (*Biorad*)), couplé à la peroxydase de Raifort (HRP), dilué au 1/3000ème dans du TBS-T lait. Après 3 lavages de 10 min avec du TBS-T et 1 lavage de 10 min avec du TBS, la membrane est placée en présence du réactif ECL (Western Blotting reagents detection kit, Amersham-Biosciences).

La réaction chimique consiste en l'oxydation du luminol par le peroxyde d'hydrogène, catalysée par la HRP, en condition alcaline. La membrane est incubée pendant une minute avec un mélange équivolume des deux substrats de la HRP. Le signal lumineux produit par cette réaction de chimioluminescence est détecté par exposition d'un film autoradiographique (Kodak Biomax MR-1) avec des temps d'exposition allant de 1 à 10 min selon l'intensité du signal.

III D. Etude de l'interaction des protéines GeBP/GPL chez la levure

III D. 1/ Mutagenèse dirigée du motif Leucine-Zipper de GeBP

La mutagenèse dirigée a été réalisée en se basant sur la technique : « Site-specific Mutagenesis by Overlap Extension » (Sambrook and Russell, 2001).

Principe

4 amorces sont nécessaires : Un couple d'amorces Forward (F) et Reverse (R) se situant respectivement aux extrémités 5' et 3' de la séquence à amplifier, et un deuxième couple d'amorces Forward Mutant (FM) et Reverse Mutant (RM) chevauchant le site où se situe le nucléotide à muter (**Figure 40**). Ce sont ces deux dernières amorces qui portent la mutation qu'on cherche à introduire dans la séquence.

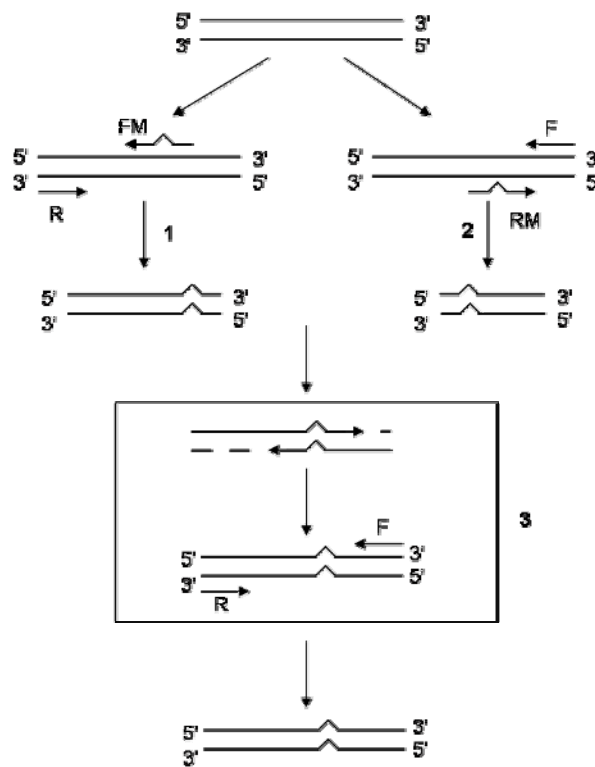


Figure 43 : Schéma de la stratégie de mutagenèse dirigée

Les produits des PCR 1 et 2 sont utilisés comme matrice de la PCR 3 à l'issue de laquelle on obtient le fragment muté final (Sambrook and Russell, 2001).

On commence par réaliser deux PCR en parallèle avec les amorces F et RM dans l'une, et FM et R dans l'autre. On obtient ainsi deux amplicons différents présentant une partie chevauchante de quelques dizaines de bases qui comprend la mutation. On procède alors à la deuxième étape qui consiste en une PCR avec les amorces F et M avec comme matrice un mélange équimolaire des deux amplicons obtenus précédemment. On obtient à l'issue de cette réaction la séquence entière mutée au site voulu.

-Condition de PCR

94°C / 5 min

(94°C / 30 sec, 50°C / 30 sec, 72°C / 1-3 min) X 20

72°C / 10 min

Application au motif Leucine-Zipper de GeBP

Pour la première étape de PCR, nous avons utilisé comme matrice le vecteur pGAD10-GeBP qui porte le cDNA de GeBP fusionné au AD (Curaba et al., 2003). Après la deuxième étape de PCR, les amplicons complets mutés ont été clonés dans le vecteur pGAD10-GeBP à l'aide des enzymes XbaI et SpeI et séquencés pour vérifier l'absence de mutations non désirées que la réaction de PCR aurait pu entraîner.

III D. 2/ Test double hybride

Transformation des levures

Les levures ont été transformées selon le protocole de Gietz (LiAc TRAF0 Method) : il s'agit d'une transformation par choc thermique de levures rendues compétentes par un traitement à l'acétate de lithium. Les vecteurs utilisés pour les transformations portent les gènes LEU2 et TRP1 impliqués dans la biosynthèse de la Leucine et du Tryptophane respectivement, et permettent la sélection des levures co-transformées sur milieu minimum SD supplémenté par du Drop out sans Leucine ni Tryptophane (SD-LT). Le protocole de transformation est disponible sur le site <http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/biochem/gietz/2HS.html>.

Test en gouttes

Des cultures liquides en milieu riche YPDA sont lancées à partir des colonies apparues sur les boîtes de transformants. Une fois que les cultures ont atteint une DO₆₀₀ de 0,2, une série de 4 dilutions en cascade d'un facteur 5 est réalisée avec de l'eau stérile à partir de chaque culture. Puis des gouttes de 5 µl de chaque dilutions (incluant la culture non diluée) sont déposées en parallèle sur une boîte de milieu solide SD ou SD-LT.

III E. Recherche du motif d'ADN reconnu par GeBP par SELEXE

III E. 1/ Premier cycle de SELEXE

Obtention de la sonde d'ADN aléatoires

Le principe de cette technique est décrit dans le chapitre I C des résultats. La première étape consiste à commander une bibliothèque de séquences de 72 nucléotides contenant 21 nucléotides aléatoires centraux flanqués de deux séquences connues. Le pool d'ADN aléatoires doubles brins est ensuite obtenu en réalisant une PCR à l'aide de deux amorces spécifiques des extrémités 5' et 3' de ce 72mère. L'une de ces amorces est couplée à un fluorophore TAMRA au niveau de son extrémité 5'. Le produit PCR est déposé sur un gel d'acrylamide-TBE 6% et subit une électrophorèse pendant 1h30 à 100V. La bande correspondant à la sonde de 72 pb est repérée et découpée. Elle est ensuite purifiée comme expliqué plus loin pour l'extraction des sondes retardées.

<u>-Condition de PCR</u>	94°C / 5 min (94°C / 30 sec, 52°C / 30 sec, 72°C / 30 sec) X 20 72°C / 10 min	
<u>-Mélange réactionnel</u>	TP Taq 10X	5µl
	Primer F TAMRA (100µM)	1µl
	Primer R (100 µM)	1µl
	Matrice aléatoire (10µM)	1µl
	dNTPs (10mM)	2,5µl
	Taq	1 U
	Eau	qsp 50 µl

Retard sur gel de la sonde par la protéine d'intérêt

Lors de cette étape, la spécificité des séquences retardées par la protéine doit être maximale. Pour cela, la quantité de protéine utilisée doit être telle que la bande retardée ne soit pas détectable. En parallèle, il est nécessaire de prévoir un puits avec une quantité plus importante de protéine qui servira de repère visuel du retard (essentiel pour l'étape de purification).

-Réaction de liaison

1µl de protéine à 2µM est mélangé avec 1µl de sonde TAMRA purifiée (environ 200nM), 200 ng de poly(dIdC) (compétiteur non spécifique) et du tampon de liaison 1X qsp 20µl. Un contrôle avec 10 fois plus de protéines et un autre sans protéine sont réalisés en parallèle. La réaction de liaison se déroule dans la glace pendant 30 min.

<u>-TP de liaison 1X</u>	Tris pH8 1M	2ml
	NaCl 5M	5ml
	MgCl ₂ 2M	100µl
	Glycérol	1 ml
	Eau	qsp 100ml

-Au moment de l'utilisation du TP, du DTT 1M pH8 est rajouté au 1/1000ème (agent réducteur : permet d'éviter les agrégats protéiques).

-Electrophorèse et détection de la sonde

Pendant le déroulement de la réaction de liaison, le gel d'Acrylamide-TBE subit une pré-migration à 90V et à 4°C dans du TP TBE 1X (Tris borate pH8 90 mM, EDTA 1 mM) froid. Après 30 min de réaction, les échantillons sont déposés sur le gel. L'électrophorèse se déroule à 90V et à 4°C pendant 1h45. Le gel est ensuite démoulé et scanné à l'aide du phospho-imager Typhoon (*Amersham*) [Détection du TAMRA : Excitation (340-380); Fluorescence (435-485)].

<u>-Gel d'Acrylamide-TBE 6% :</u>	TBE 10X	0,3 ml
	Acrylamide:Bisacrylamide 29:1	0,9 ml
	Persulfate d'ammonium 10%	30µl
	Temed	3µl
	Eau	4,8 ml

-Les plaques d'électrophorèse et les peignes utilisés pour couler le gel ne doivent pas avoir été en contact avec du SDS (inhibe la liaison entre sonde et protéine).

Purification de la sonde retardée

L'image scannée du gel est imprimée en taille réelle et le gel d'acrylamide est superposé sur son image papier à l'aide d'une plaque de verre. Le puits avec 10 fois plus de protéine sert de repère visuel pour situer la hauteur de la bande retardée dans le gel. La zone de gel correspondante au niveau du puits d'intérêt est découpée et placée dans un tube. L'échantillon ainsi récolté est broyé à l'aide d'un piston en plastique et couvert avec 500 µl de solution « Crush and Soak » [NH₄OAc 500 mM ; SDS 0,1 % ; EDTA 0,1mM]. Le tube est vortexé 10 sec puis placé sous agitation à 37°C sur la nuit. Le tube est ensuite centrifugé 20 min à 12000 rpm à 4°C, et le surnageant est récupéré en faisant attention à ne pas prélever d'acrylamide. La sonde est précipitée par ajout de 100µl d'acétate de sodium et 500µl d'Isopropanol froid (vortexer avant l'ajout de l'isopropanol). Le tube est placé 30 min à -80°C puis centrifugé 20 min à 12000 rpm. Le culot est lavé à l'ETOH 70% puis repris dans 30 µl d'eau. L'ADN ainsi précipité est amplifié par PCR et utilisé comme sonde au cycle suivant.

III E. 2/ Cycles suivants et analyse des séquences obtenues

Les cycles qui suivent sont effectués d'une manière similaire. La nouvelle sonde est obtenue en réalisant une PCR dans les mêmes conditions en utilisant comme matrice 5µl de la sonde retardée et purifiée au cycle précédent. A l'inverse du premier cycle, les nouvelles sondes n'ont pas été purifiées sur gel, et 0,5 µl du produit PCR ont été directement utilisés pour la réaction de liaison. Les cycles se poursuivent jusqu'à ce que la bande retardée devienne aussi visible que le contrôle avec 10 fois plus de protéine. Cette augmentation de l'intensité du retard est révélatrice d'un enrichissement en séquences reconnues spécifiquement par la protéine testée dans le pool d'ADN de la sonde.

Afin de savoir quelles sont ces séquences, il faut les cloner et les faire séquencer. Comme le marquage TAMRA empêche le clonage, il faut refaire une PCR avec cette fois-ci une amorce Forward non marquée en prenant comme matrice 1µl du pool d'ADN d'intérêt. Ce produit PCR est cloné dans un vecteur de type T-A qui sert à transformer des bactéries. L'ADN plasmique des clones apparus est extrait et la présence de l'insert est vérifiée par digestion (BsaAI et BglII). Les clones positifs sont envoyés à séquencer.

IV Biologie Cellulaire

IV A. Coloration et préparation des échantillons

Coloration GUS

Les rosettes ou inflorescences sont introduites directement dans le tampon de coloration et infiltrées sous vide durant 10 minutes. La coloration se fait par incubation à 37 °C durant une nuit. Les tissus sont ensuite décolorés dans du tampon Hoyer's durant 1 à 24 h (la solution est remplacée 2 à 3 fois). Le tampon Hoyer's est ensuite remplacé par du glycérol 25% et les tissus sont montés entre lame et lamelle ou stockés à 4°C. L'observation se fait sous microscope (Eclipse E-600, *Nikon*) en lumière transmise ou en fond noir, ou sous loupe binoculaire (SZX12, *Olympus*). Les photos ont été prises à l'aide de la caméra *Olympus* DP70.

<u>-Tampon de coloration (1X) :</u>	TP phosphate 1 M, pH7	5 ml
	EDTA 0,5 M, pH 7,5	1 ml
	X-Gluc	25,2 mg
	Eau distillée	qsp 50 ml
<u>-Tampon phosphate 1M pH7 :</u>	K ₂ HPO ₄ 1M	61,5 ml
	KH ₂ P ₀₄ 1M	38, 5 ml
	Eau distillée	qsp 1L
<u>-Tampon Hoyer's (1X) :</u>	Gomme arabique	7,5g
	Chloral hydrate	100g
	Glycérol	16,7%
	Eau distillée	qsp 30 ml

Inclusion et coupes paraffines (Frédéric Laporte)

Les tissus récoltés sont immédiatement plongés dans la solution de fixation (FAA) et placés sous vide 15 min pour permettre leur immersion totale. Ils sont ensuite placés à 4°C sur la nuit. L'arrêt de la fixation se fait par lavage (2 à 3 bains de 10 min) dans du PBS (Na₂HPO₄ 10mM; KH₂PO₄ 2mM ; NaCl 137mM ; KCl 2,7mM; PH 7,4). Les échantillons sont ensuite

déshydratés par une série de bains successifs de 5 à 10 min : EtOH 30%, 50%, 75%, 95% et 100% (2 bains), puis : Xylène / EtOH 100% (1/3), Xylène / EtOH 100% (1/1), Xylène / EtOH 100% (3/1) et xylène pur (2 bains). Une étape de pré-inclusion est réalisée en ajoutant, dans le deuxième bain de xylène, des copeaux de paraffine (de type 56°C- 58°C) jusqu'à saturation du milieu. Les échantillons sont laissés dans le bain sur la nuit à 56°C. Le lendemain, le mélange est remplacé par de la paraffine pure. Une fois l'échantillon orienté dans le bloc de paraffine, ce dernier est retiré de la plaque chauffante pour refroidir et se solidifier à T° ambiante sur la journée. Des séries de coupes de 10 µm sont réalisées et les rubans obtenus sont placés sur une lame. Les préparations sont laissées sécher à 37°C sur la journée. Les coupes peuvent alors être conservées à température ambiante jusqu'à l'observation.

<u>-Solution de fixation (FAA) :</u>	EtOH 100%	25 ml
	Acide Acétique glacial	2,5 ml
	Formaldéhyde 37%	5 ml
	H2O	qsp 50 ml

Coloration des noyaux au DAPI

La couche épidermique de l'échantillon à colorer est pelée à l'aide d'une pince fine, puis déposée sur une lame. Elle est ensuite recouverte de la solution de coloration (DAPI (molécule fluorescente intercalant de l'ADN, 1 µg/ml), p-phénylène diamine (protecteur de fluorescence, 100 µg/ml), en solution dans du PBS-T) puis infiltrée sous vide pendant 5 minutes afin d'augmenter la pénétration de la solution. La solution excédante est alors éliminée puis remplacée par une goutte de glycérol. L'échantillon une fois recouvert avec une lamelle est prêt à être observé au microscope.

IV B. Microscopie et imagerie

Microscope à épifluorescence

L'observation des noyaux de cellules d'épiderme foliaire a été réalisée sous un microscope optique droit à fluorescence (Eclipse E-600, *Nikon*). Deux filtres différents sont utilisés pour visualiser les signaux GFP et DAPI, de sorte que la co-localisation n'est permise que par la superposition de deux images. Les photos ont été prises à l'aide d'une caméra *Olympus DP70*

qui s'adapte sur les objectifs et permet l'observation en temps réel ainsi que la capture d'image. La caméra est calibrée pour ajouter automatiquement la barre d'échelle sur les photos.

Filtres UV : - DAPI [Excitation (340-380); Fluorescence (435-485)]
 - GFP [Excitation (485-495); Fluorescence (500-520)]

Loupe binoculaire à épifluorescence

La sélection des graines transgéniques fluorescentes a été réalisée à l'aide de la loupe binoculaire à épifluorescence *Olympus SZX12* en utilisant le filtre GFP. Cette loupe a également servi à prendre les photos de plantules des colorations GUS en lumière blanche à l'aide de la caméra DP70.

Microscopie confocale

Pour la technique du BiFC, les observations et capture d'image ont été réalisées à l'aide d'un microscope confocal Leica et les données ont été analysées à l'aide du logiciel Leica LCS 2.61 avec l'aide de Cécile Cottet (UJF).

YFP [Excitation (510-520); Fluorescence (540-560)]

V Bio-Informatique

V A. Analyses de séquences

Logiciels spécifiques d'analyse de séquences

Le logiciel *BioEdit* (Freeware, Tom Hall) a été utilisé pour les manipulations de séquences, recherches de motifs, alignements de séquences, et l'analyse des résultats de séquençage. Les logiciels *Gene Construction Kit* (GCK, *TEXTCO*) et *Vector NTI* (*Invitrogen*) ont été utilisés pour les annotation de séquences, et la création de cartes vectorielles virtuelles.

Recherche de séquences NLS

Les séquences NLS des GeBP/GPL ont été détectées à l'aide du programme *PROSITE* du site web *Motif Scan* (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan).

Identification des motifs consensus reconnus par les protéines BP et GeBP

La recherche de consensus à partir des séquences obtenues avec le SELEXE a été réalisée à l'aide du programme *APACHE* du site internet *BioProspector* (<http://ai.stanford.edu/~xslu/BioProspector/>). La création des logos illustrant les résultats obtenus à partir du programme *APACHE* a été réalisée à l'aide du site *WebLogo* (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>).

V B. Analyse des données microarray

Le diagramme de Venn montrant le nombre de gènes dérégulés de façon commune dans les comparaisons *gebp gpl1 gpl2 gpl3/Col* et *35S::VP16::GPL2/Col* a été réalisé avec le logiciel Internet *GeneVenn* (<http://mcbc.usm.edu/genevenn/genevenn.htm>). L'analyse des voies dérégulées chez la lignée quadruple mutante *gebp/gpl* et la lignée surexpresser de *GPL2* a été réalisée grâce à l'outil *GO-annotation* disponible sur le site Internet *TAIR* (www.arabidopsis.org/tools/bulk/go/index.jsp), et au logiciel *MapMan* du site Internet *GABI_{PD}* (<http://gabi.rzpd.de/projects/MapMan/>). Les comparaisons du transcriptome des lignées *gebp gpl1 gpl2 gpl3* et *35S::VP16::GPL2* avec ceux d'autres lignées mutantes ou surexpresses ont été réalisées à l'aide du logiciel *Genevestigator* (www.genevestigator.ethz.ch/gv/index.jsp). Ce logiciel a également permis d'identifier la surexpression des *GeBP/GPL* dans les cals et les plantes mutées pour *CPR5*.

V C. Recherche des oligonucléotides pour la PCR semi-quantitative

Les séquences nucléiques des gènes *GeBP/GPL* utilisées comme support pour définir les oligonucléotides sont toutes issues de la base de données TAIR, "The Arabidopsis

Information Ressource" (<http://www.arabidopsis.org>). Ces séquences ont été alignées à l'aide du programme ClustalW inclus dans l'utilitaire BioEdit afin de repérer les séquences qui sont communes aux membres de la famille et celles qui sont spécifiques de chaque gène. Les amorces ont ensuite été choisies de manière à ce qu'au minimum les cinq nucléotides en 3' soient totalement spécifiques du gène étudié (si l'amorce ne s'hybride pas en 3', la Taq polymérase ne peut pas agir). La fonction "Primer Test Document" du logiciel Primer Express V2.0 (ABI) a été utilisée pour calculer le TM des amorces et vérifier que leur structure ne permet pas d'autohybridation.

V D. Logiciels de mesure d'intensité et d'analyses statistiques

Le logiciel *Image-J* (open source) a servi pour les mesures de longueur racinaire et d'intensité des bandes des produits de RT-PCR semi quantitatives (détection des *ARR-A*). Le test ANOVA a été réalisé à l'aide du programme *StatL*.

Bibliographie

- Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M** (1997) Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell* **9**: 841-857
- Aida M, Ishida T, Tasaka M** (1999) Shoot apical meristem and cotyledon formation during Arabidopsis embryogenesis: interaction among the CUP-SHAPED COTYLEDON and SHOOT MERISTEMLESS genes. *Development* **126**: 1563-1570
- Aida M, Tasaka M** (2006) Morphogenesis and patterning at the organ boundaries in the higher plant shoot apex. *Plant Mol Biol* **60**: 915-928
- Aida M, Vernoux T, Furutani M, Traas J, Tasaka M** (2002) Roles of PIN-FORMED1 and MONOPTEROS in pattern formation of the apical region of the Arabidopsis embryo. *Development* **129**: 3965-3974
- Akiyoshi DE, Klee H, Amasino RM, Nester EW, Gordon MP** (1984) T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 5994-5998
- Bartek J, Lukas J** (2001) Cell cycle. Order from destruction. *Science* **294**: 66-67
- Barton MK, Poethig RS** (1993) Formation of the shoot apical meristem in Arabidopsis thaliana: an analysis of development in the wild type and in the shoot meristemless mutant. *Development* **119**: 823-831
- Baurle I, Laux T** (2003) Apical meristems: the plant's fountain of youth. *Bioessays* **25**: 961-970
- Belles-Boix E, Hamant O, Witiak SM, Morin H, Traas J, Pautot V** (2006) KNAT6: an Arabidopsis homeobox gene involved in meristem activity and organ separation. *Plant Cell*. **18**: 1900-1907. Epub 2006 Jun 19.
- Boch J, Verbsky L, Robertson L, Larkin J, Kunkel B** (1998) Analysis of resistance gene-mediated defense responses in Arabidopsis thaliana plants carrying a mutation in CPR5. *Mol Plant Microbe Interact* **11**
- Bomblies K, Lempe J, Epple P, Warthmann N, Lanz C, Dangl JL, Weigel D** (2007) Autoimmune response as a mechanism for a Dobzhansky-Muller-type incompatibility syndrome in plants. *PLoS Biol* **5**: e236
- Bornberg-Bauer E, Rivals E, Vingron M** (1998) Computational approaches to identify leucine zippers. *Nucleic Acids Res.* **26**: 2740-2746.
- Bouchez O, Huard C, Lorrain S, Roby D, Balague C** (2007) Ethylene is one of the key elements for cell death and defense response control in the Arabidopsis lesion mimic mutant vad1. *Plant Physiol* **145**: 465-477
- Bowling SA, Clarke JD, Liu Y, Klessig DF, Dong X** (1997) The cpr5 mutant of Arabidopsis expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *Plant Cell* **9**: 1573-1584
- Bowling SA, Guo A, Cao H, Gordon AS, Klessig DF, Dong X** (1994) A mutation in Arabidopsis that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. *Plant Cell* **6**: 1845-1857
- Brenner WG, Romanov GA, Kollmer I, Burkle L, Schmulling T** (2005) Immediate-early and delayed cytokinin response genes of Arabidopsis thaliana identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *Plant J* **44**: 314-333

- Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Lim PO, Nam HG, Lin JF, Wu SH, Swidzinski J, Ishizaki K, Leaver CJ** (2005) Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J.* **42**: 567-585.
- Byrne ME, Barley R, Curtis M, Arroyo JM, Dunham M, Hudson A, Martienssen RA** (2000) *Asymmetric leaves1* mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature* **408**: 967-971.
- Byrne ME, Simorowski J, Martienssen RA** (2002) *ASYMMETRIC LEAVES1* reveals *knox* gene redundancy in *Arabidopsis*. *Development* **129**: 1957-1965
- Campbell N** (1993) *Biology*, 3th ed.,
- Carraro N, Peaucelle A, Laufs P, Traas J** (2006) Cell differentiation and organ initiation at the shoot apical meristem. *Plant Mol Biol* **60**: 811-826
- Chang CW, Sun TP** (2002) Characterization of cis-regulatory regions responsible for developmental regulation of the gibberellin biosynthetic gene *GA1* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **49**: 579-589
- Chassot C, Nawrath C, Metraux JP** (2007) Cuticular defects lead to full immunity to a major plant pathogen. *Plant J* **49**: 972-980
- Chen H, Banerjee AK, Hannapel DJ** (2004) The tandem complex of *BEL* and *KNOX* partners is required for transcriptional repression of *GA20ox1*. *Plant J* **38**: 276-284
- Chevalier F, Perazza D, Laporte F, Le Henanff G, Hornitschek P, Bonneville JM, Herzog M, Vachon G** (2008) GeBP and GeBP-like proteins are noncanonical leucine-zipper transcription factors that regulate cytokinin response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **146**: 1142-1154
- Chien JC, Sussex IM** (1996) Differential regulation of trichome formation on the adaxial and abaxial leaf surfaces by gibberellins and photoperiod in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol.* **111**: 1321-1328
- Chuck G, Lincoln C, Hake S** (1996) *KNAT1* induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **8**: 1277-1289.
- Clark SE, Jacobsen SE, Levin JZ, Meyerowitz EM** (1996) The *CLAVATA* and *SHOOT MERISTEMLESS* loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* **122**: 1567-1575
- Conaway R, Brower C, Conaway J** (2002) Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. *Science* **296**: 1254-1258
- Cooper GM, Hausman RE** (2007) *The Cell* ASM press
Sinauer Associates Inc.
- Curaba J, Herzog M, Vachon G** (2003) GeBP, the first member of a new gene family in *Arabidopsis*, encodes a nuclear protein with DNA-binding activity and is regulated by *KNAT1*. *Plant J* **33**: 305-317.
- D'Agostino IB, Deruere J, Kieber JJ** (2000) Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiol.* **124**: 1706-1717.
- Davies PJ** (1995) *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Davies PJ** (2004) *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Kluwer Academic Publisher
- De Veylder L, Beeckman T, Beemster GT, Krols L, Terras F, Landrieu I, van der Schueren E, Maes S, Naudts M, Inze D** (2001) Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 1653-1668

- De Veylder L, Beeckman T, Beemster GT, Krols L, Terras F, Landrieu I, van der Schueren E, Maes S, Naudts M, Inze D** (2001) Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of Arabidopsis. *Plant Cell* **13**: 1653-1668.
- del Pozo JC, Boniotti MB, Gutierrez C** (2002) Arabidopsis E2Fc functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF(AtSKP2) pathway in response to light. *Plant Cell* **14**: 3057-3071
- Dello Ioio R, Linhares FS, Scacchi E, Casamitjana-Martinez E, Heidstra R, Costantino P, Sabatini S** (2007) Cytokinins determine Arabidopsis root-meristem size by controlling cell differentiation. *Curr Biol* **17**: 678-682
- Depuydt S, Dolezal K, Van Lijsebettens M, Moritz T, Holsters M, Vereecke D** (2008) Modulation of the hormone setting by *Rhodococcus fascians* results in ectopic KNOX activation in Arabidopsis. *Plant Physiol* **146**: 1267-1281
- Dewitte W, Scofield S, Alcasabas AA, Maughan SC, Menges M, Braun N, Collins C, Nieuwland J, Prinsen E, Sundaesan V, Murray JA** (2007) Arabidopsis CYCD3 D-type cyclins link cell proliferation and endocycles and are rate-limiting for cytokinin responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 14537-14542
- Dill A, Jung H-S, Sun T-p** (2001) The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 14162-14167
- Dill A, Sun T** (2001) Synergistic Derepression of Gibberellin Signaling by Removing RGA and GAI Function in Arabidopsis thaliana. *Genetics* **159**: 777-785.
- Dill A, Thomas SG, Hu J, Steber CM, Sun T-p** (2004) The Arabidopsis F-Box Protein SLEEPY1 Targets Gibberellin Signaling Repressors for Gibberellin-Induced Degradation. *Plant Cell* **16**: 1392-1405
- Donnelly PM, Bonetta D, Tsukaya H, Dengler RE, Dengler NG** (1999) Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of Arabidopsis. *Dev Biol* **215**: 407-419
- Douglas SJ, Chuck G, Dengler RE, Pelecanda L, Riggs CD** (2002) KNAT1 and ERECTA regulate inflorescence architecture in Arabidopsis. *Plant Cell*. **14**: 547-558.
- Elliott RC, Betzner AS, Huttner E, Oakes MP, Tucker WQ, Gerentes D, Perez P, Smyth DR** (1996) AINTEGUMENTA, an APETALA2-like gene of Arabidopsis with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *Plant Cell* **8**: 155-168
- Ellis J, Dodds P, Pryor T** (2000) Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 278-284
- Endrizzi K, Moussian B, Haecker A, Levin JZ, Laux T** (1996) The *SHOOT MERISTEMLESS* gene is required for maintenance of undifferentiated cells in Arabidopsis shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE*. *The plant journal* **10**: 967-979
- Esch JJ, Chen M, Sanders M, Hillestad M, Ndkium S, Idelkope B, Neizer J, Marks MD** (2003) A contradictory GLABRA3 allele helps define gene interactions controlling trichome development in Arabidopsis. *Development* **130**: 5885-5894
- Estruch JJ, Prinsen E, H VANO, Schell J, Spena A** (1991) Viviparous Leaves Produced by Somatic Activation of an Inactive Cytokinin-Synthesizing Gene. *Science* **254**: 1364-1367
- Ferreira FJ, Kieber JJ** (2005) Cytokinin signaling. *Curr Opin Plant Biol*. **8**: 518-525.
- Fleet CM, Sun TP** (2005) A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 77-85
- Fletcher JC** (2002) Shoot and floral meristem maintenance in arabidopsis. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 45-66
- Frugis G, Giannino D, Mele G, Nicolodi C, Chiappetta A, Bitonti MB, Innocenti AM, Dewitte W, Van Onckelen H, Mariotti D** (2001) Overexpression of KNAT1 in

- lettuce shifts leaf determinate growth to a shoot-like indeterminate growth associated with an accumulation of isopentenyl-type cytokinins. *Plant Physiol* **126**: 1370-1380
- Fu X, Richards DE, Fleck B, Xie D, Burton N, Harberd NP** (2004) The Arabidopsis Mutant *sleepy1gar2-1* Protein Promotes Plant Growth by Increasing the Affinity of the SCF^{SLY1} E3 Ubiquitin Ligase for DELLA Protein Substrates. *Plant Cell* **16**: 1406-1418
- Furutani M, Vernoux T, Traas J, Kato T, Tasaka M, Aida M** (2004) PIN-FORMED1 and PINOID regulate boundary formation and cotyledon development in Arabidopsis embryogenesis. *Development* **131**: 5021-5030
- Gan S, Amasino RM** (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*. **270**: 1986-1988.
- Gan Y, Kumimoto R, Liu C, Ratcliffe O, Yu H, Broun P** (2006) GLABROUS INFLORESCENCE STEMS modulates the regulation by gibberellins of epidermal differentiation and shoot maturation in Arabidopsis. *Plant Cell*. **18**: 1383-1395.
- Gan Y, Liu C, Yu H, Broun P** (2007) Integration of cytokinin and gibberellin signalling by Arabidopsis transcription factors GIS, ZFP8 and GIS2 in the regulation of epidermal cell fate. *Development* **134**: 2073-2081
- Gilbert SF** (2006) *Developmental Biology*. Sinauer Associates Inc.
- Gomi K, Sasaki A, Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M** (2004) GID2, an F-box subunit of the SCF E3 complex, specifically interacts with phosphorylated SLR1 protein and regulates the gibberellin-dependent degradation of SLR1 in rice. *Plant J* **37**: 626-634
- Grafi G, Larkins BA** (1995) Endoreduplication in Maize Endosperm: Involvement of M Phase--Promoting Factor Inhibition and Induction of S Phase--Related Kinases. *Science* **269**: 1262-1264
- Grandjean O, Vernoux T, Laufs P, Belcram K, Mizukami Y, Traas J** (2004) In vivo analysis of cell division, cell growth, and differentiation at the shoot apical meristem in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 74-87
- Grant JJ, Chini A, Basu D, Loake GJ** (2003) Targeted activation tagging of the Arabidopsis NBS-LRR gene, ADR1, conveys resistance to virulent pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 669-680
- Greenboim-Wainberg Y, Maymon I, Borochoy R, Alvarez J, Olszewski N, Ori N, Eshed Y, Weiss D** (2005) Cross talk between gibberellin and cytokinin: the Arabidopsis GA response inhibitor SPINDLY plays a positive role in cytokinin signaling. *Plant Cell*. **17**: 92-102. Epub 2004 Dec 2017.
- Griffiths J, Murase K, Rieu I, Zentella R, Zhang ZL, Powers SJ, Gong F, Phillips AL, Hedden P, Sun TP, Thomas SG** (2006) Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**: 3399-3414
- Hake S, Smith HM, Holtan H, Magnani E, Mele G, Ramirez J** (2004) The role of knox genes in plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 125-151
- Hanano S, Domagalska MA, Nagy F, Davis SJ** (2006) Multiple phytohormones influence distinct parameters of the plant circadian clock. *Genes Cells* **11**: 1381-1392
- Hay A, Barkoulas M, Tsiantis M** (2006) ASYMMETRIC LEAVES1 and auxin activities converge to repress BREVIPEDICELLUS expression and promote leaf development in Arabidopsis. *Development*. **133**: 3955-3961.
- Hay A, Craft J, Tsiantis M** (2004) Plant hormones and homeoboxes: bridging the gap? *Bioessays*. **26**: 395-404.
- Hay A, Kaur H, Phillips A, Hedden P, Hake S, Tsiantis M** (2002) The gibberellin pathway mediates KNOTTED1-type homeobox function in plants with different body plans. *Curr Biol* **12**: 1557-1565.

- Helliwell CA, Chin-Atkins AN, Wilson IW, Chapple R, Dennis ES, Chaudhury A** (2001) The Arabidopsis AMP1 gene encodes a putative glutamate carboxypeptidase. *Plant Cell* **13**: 2115-2125
- Hemerly A, Engler Jde A, Bergounioux C, Van Montagu M, Engler G, Inze D, Ferreira P** (1995) Dominant negative mutants of the Cdc2 kinase uncouple cell division from iterative plant development. *Embo J* **14**: 3925-3936
- Hibara K, Takada S, Tasaka M** (2003) CUC1 gene activates the expression of SAM-related genes to induce adventitious shoot formation. *Plant J* **36**: 687-696.
- Higuchi M, Pischke MS, Mahonen AP, Miyawaki K, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Shinozaki K, Kato T, Tabata S, Helariutta Y, Sussman MR, Kakimoto T** (2004) In planta functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family. *PNAS* **101**: 8821-8826
- Hulskamp M** (2004) Plant trichomes: a model for cell differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 471-480
- Hülkamp M, Misera S, Jurgens G** (1994) Genetic dissection of trichome cell development in Arabidopsis. *Cell* **76**: 555-566
- Hülkamp M, Schnittger A, Folkers U** (1999) Pattern formation and cell differentiation: trichomes in Arabidopsis as a genetic model system. *Int Rev Cytol* **186**: 147-178.
- Hutchison CE, Li J, Argueso C, Gonzalez M, Lee E, Lewis MW, Maxwell BB, Perdue TD, Schaller GE, Alonso JM, Ecker JR, Kieber JJ** (2006) The Arabidopsis Histidine Phosphotransfer Proteins Are Redundant Positive Regulators of Cytokinin Signaling. *Plant Cell* **18**: 3073-3087
- Hwang I, Sheen J** (2001) Two-component circuitry in Arabidopsis cytokinin signal transduction. *Nature*. **413**: 383-389.
- Igari K, Endo S, Hibara KI, Aida M, Sakakibara H, Kawasaki T, Tasaka M** (2008) Constitutive activation of a CC-NB-LRR protein alters morphogenesis through the cytokinin pathway in Arabidopsis. *Plant J*
- Imamura A, Hanaki N, Nakamura A, Suzuki T, Taniguchi M, Kiba T, Ueguchi C, Sugiyama T, Mizuno T** (1999) Compilation and characterization of Arabidopsis thaliana response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction. *Plant Cell Physiol*. **40**: 733-742.
- Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K, Kakimoto T** (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis. *Nature* **409**: 1060-1063
- Inze D, De Veylder L** (2006) Cell cycle regulation in plant development. *Annu Rev Genet* **40**: 77-105
- Ishida T, Hattori S, Sano R, Inoue K, Shirano Y, Hayashi H, Shibata D, Sato S, Kato T, Tabata S, Okada K, Wada T** (2007) Arabidopsis TRANSPARENT TESTA GLABRA2 is directly regulated by R2R3 MYB transcription factors and is involved in regulation of GLABRA2 transcription in epidermal differentiation. *Plant Cell* **19**: 2531-2543
- Iuchi S, Suzuki H, Kim YC, Iuchi A, Kuromori T, Ueguchi-Tanaka M, Asami T, Yamaguchi I, Matsuoka M, Kobayashi M, Nakajima M** (2007) Multiple loss-of-function of Arabidopsis gibberellin receptor AtGID1s completely shuts down a gibberellin signal. *Plant J* **50**: 958-966
- Jacobsen SE, Binkowski KA, Olszewski NE** (1996) SPINDLY, a tetratricopeptide repeat protein involved in gibberellin signal transduction in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 9292-9296
- Jacobsen SE, Olszewski NE** (1993) Mutation at the *SPINDLY* Locus of *Arabidopsis* Alters Gibberellin Signal Transduction. *Plant Cell* **5**: 887-896

- Janssen BJ, Lund L, Sinha N** (1998) Overexpression of a Homeobox Gene, *LeT6*, Reveals Indeterminate Features in the Tomato Compound Leaf. *Plant Physiol.* **117**: 771-786
- Jasinski S, Piazza P, Craft J, Hay A, Woolley L, Rieu I, Phillips A, Hedden P, Tsiantis M** (2005) KNOX action in Arabidopsis is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Curr Biol.* **15**: 1560-1565.
- Jasinski S, Riou-Khamlichi C, Roche O, Perennes C, Bergounioux C, Glab N** (2002) The CDK inhibitor *NtKIS1a* is involved in plant development, endoreduplication and restores normal development of cyclin D3; 1-overexpressing plants. *J Cell Sci* **115**: 973-982
- Johnson CS, Kolevski B, Smyth DR** (2002) TRANSPARENT TESTA *GLABRA2*, a Trichome and Seed Coat Development Gene of Arabidopsis, Encodes a WRKY Transcription Factor. *Plant Cell* **14**: 1359-1375
- Joubes J, Phan TH, Just D, Rothan C, Bergounioux C, Raymond P, Chevalier C** (1999) Molecular and biochemical characterization of the involvement of cyclin-dependent kinase A during the early development of tomato fruit. *Plant Physiol* **121**: 857-869
- Kakimoto T** (2003) Perception and signal transduction of cytokinins. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 605-627
- Kiba T, Taniguchi M, Imamura A, Ueguchi C, Mizuno T, Sugiyama T** (1999) Differential expression of genes for response regulators in response to cytokinins and nitrate in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* **40**: 767-771.
- Kiba T, Yamada H, Mizuno T** (2002) Characterization of the ARR15 and ARR16 response regulators with special reference to the cytokinin signaling pathway mediated by the AHK4 histidine kinase in roots of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* **43**: 1059-1066.
- Kiba T, Yamada H, Sato S, Kato T, Tabata S, Yamashino T, Mizuno T** (2003) The type-A response regulator, ARR15, acts as a negative regulator in the cytokinin-mediated signal transduction in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* **44**: 868-874.
- Kim HJ, Ryu H, Hong SH, Woo HR, Lim PO, Lee IC, Sheen J, Nam HG, Hwang I** (2006) Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 814-819
- King KE, Moritz T, Harberd NP** (2001) Gibberellins Are Not Required for Normal Stem Growth in Arabidopsis thaliana in the Absence of GAI and RGA. *Genetics* **159**: 767-776
- Kirik V, Bouyer D, Schobinger U, Bechtold N, Herzog M, Bonneville JM, Hulskamp M** (2001) CPR5 is involved in cell proliferation and cell death control and encodes a novel transmembrane protein. *Curr Biol* **11**: 1891-1895.
- Kirik V, Simon M, Huelskamp M, Schiefelbein J** (2004) The ENHANCER OF TRY AND CPC1 gene acts redundantly with TRIPTYCHON and CAPRICE in trichome and root hair cell patterning in Arabidopsis. *Dev Biol* **268**: 506-513
- Kirik V, Simon M, Wester K, Schiefelbein J, Hulskamp M** (2004) ENHANCER of TRY and CPC 2 (ETC2) reveals redundancy in the region-specific control of trichome development of Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **55**: 389-398.
- Kondorosi E, Roudier F, Gendreau E** (2000) Plant cell-size control: growing by ploidy? *Curr Opin Plant Biol* **3**: 488-492
- Kowles RV, Phillips RL** (1985) DNA amplification patterns in maize endosperm nuclei during kernel development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 7010-7014
- Krizek BA** (1999) Ectopic expression of *AINTEGUMENTA* in Arabidopsis plants results in increased growth of floral organs. *Dev Genet* **25**: 224-236
- Kumaran MK, Bowman JL, Sundaresan V** (2002) YABBY polarity genes mediate the repression of KNOX homeobox genes in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**: 2761-2770

- Kurakawa T, Ueda N, Maekawa M, Kobayashi K, Kojima M, Nagato Y, Sakakibara H, Kyojuka J** (2007) Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*. **445**: 652-655.
- Kurosawa E** (1926) Experimental studies on the nature of the substance secreted by the "bakanae" fungus. *Nat. Hist. Soc. Formosa* **16**: 213-227
- Larkin JC, Brown ML, Schiefelbein J** (2003) How do cells know what they want to be when they grow up? Lessons from epidermal patterning in arabidopsis. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 403-430.
- Larkin JC, Oppenheimer DG, Pollock S, Marks MD** (1993) Arabidopsis GLABROUS1 gene requires downstream sequence for function. *Plant Cell* **5**: 1739-1748
- Larkins BA, Dilkes BP, Dante RA, Coelho CM, Woo YM, Liu Y** (2001) Investigating the hows and whys of DNA endoreduplication. *J Exp Bot* **52**: 183-192
- Laux T, Mayer KF, Berger J, Jurgens G** (1996) The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis. *Development* **122**: 87-96
- Leibfried A, To JP, Busch W, Stehling S, Kehle A, Demar M, Kieber JJ, Lohmann JU** (2005) WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature*. **438**: 1172-1175.
- Lenhard M, Jurgens G, Laux T** (2002) The WUSCHEL and SHOOTMERISTEMLESS genes fulfil complementary roles in Arabidopsis shoot meristem regulation. *Development* **129**: 3195-3206
- Leyser O, Day S** (2003) *Mecanismos in Plant Development*. Blackwell Publishing
- Li X, Clarke JD, Zhang Y, Dong X** (2001) Activation of an EDS1-mediated R-gene pathway in the *sncl* mutant leads to constitutive, NPR1-independent pathogen resistance. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 1131-1139
- Li Y, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1992) Altered morphology in transgenic tobacco plants that overproduce cytokinins in specific tissues and organs. *Dev Biol* **153**: 386-395
- Lincoln C, Long J, Yamaguchi J, Serikawa K, Hake S** (1994) A knotted1-like homeobox gene in Arabidopsis is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *Plant Cell* **6**: 1859-1876.
- Loeza-Angeles H, Sagrero-Cisneros E, Lara-Zarate L, Villagomez-Gomez E, Lopez-Meza JE, Ochoa-Zarzosa A** (2008) Thionin Thi2.1 from Arabidopsis thaliana expressed in endothelial cells shows antibacterial, antifungal and cytotoxic activity. *Biotechnol Lett* **30**: 1713-1719
- Long JA, Barton MK** (1998) The development of apical embryonic pattern in Arabidopsis. *Development* **125**: 3027-3035
- Long JA, Moan EI, Medford JI, Barton MK** (1996) A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of Arabidopsis. *Nature* **379**: 66-69.
- Love DC, Hanover JA** (2005) The hexosamine signaling pathway: deciphering the "O-GlcNAc code". *Sci STKE* **2005**: re13
- Lynn K, Fernandez A, Aida M, Sedbrook J, Tasaka M, Masson P, Barton MK** (1999) The PINHEAD/ZWILLE gene acts pleiotropically in Arabidopsis development and has overlapping functions with the ARGONAUTE1 gene. *Development* **126**: 469-481
- Mahonen AP, Higuchi M, Tormakangas K, Miyawaki K, Pischke MS, Sussman MR, Helariutta Y, Kakimoto T** (2006) Cytokinins regulate a bidirectional phosphorelay network in Arabidopsis. *Curr Biol* **16**: 1116-1122
- Mason JM, Schmitz MA, Muller KM, Arndt KM** (2006) Semirational design of Jun-Fos coiled coils with increased affinity: Universal implications for leucine zipper prediction and design. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 8989-8994

- Mason MG, Li J, Mathews DE, Kieber JJ, Schaller GE** (2004) Type-B response regulators display overlapping expression patterns in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **135**: 927-937. Epub 2004 Jun 2001.
- Mason MG, Mathews DE, Argyros DA, Maxwell BB, Kieber JJ, Alonso JM, Ecker JR, Schaller GE** (2005) Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in Arabidopsis. *Plant Cell.* **17**: 3007-3018.
- Mayer KF, Schoof H, Haecker A, Lenhard M, Jurgens G, Laux T** (1998) Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell* **95**: 805-815.
- McGinnis KM, Thomas SG, Soule JD, Strader LC, Zale JM, Sun T-p, Steber CM** (2003) The Arabidopsis SLEEPY1 Gene Encodes a Putative F-Box Subunit of an SCF E3 Ubiquitin Ligase. *Plant Cell* **15**: 1120-1130
- Mele G, Ori N, Sato Y, Hake S** (2003) The knotted1-like homeobox gene BREVIPEDICELLUS regulates cell differentiation by modulating metabolic pathways. *Genes Dev.* **17**: 2088-2093
- Miau LH, Chang CJ, Tsai WH, Lee SC** (1997) Identification and characterization of a nucleolar phosphoprotein, Nopp140, as a transcription factor. *Mol Cell Biol* **17**: 230-239.
- Morohashi K, Zhao M, Yang M, Read B, Lloyd A, Lamb R, Grotewold E** (2007) Participation of the Arabidopsis bHLH factor GL3 in trichome initiation regulatory events. *Plant Physiol* **145**: 736-746
- Moussian B, Schoof H, Haecker A, Jurgens G, Laux T** (1998) Role of the ZWILLE gene in the regulation of central shoot meristem cell fate during Arabidopsis embryogenesis. *Embo J* **17**: 1799-1809
- Muller B, Sheen J** (2007) Advances in cytokinin signaling. *Science.* **318**: 68-69.
- Nishimura C, Ohashi Y, Sato S, Kato T, Tabata S, Ueguchi C** (2004) Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 1365-1377
- Nordstrom A, Tarkowski P, Tarkowska D, Norbaek R, Astot C, Dolezal K, Sandberg G** (2004) Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in Arabidopsis thaliana: a factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 8039-8044
- Ogawa M, Kusano T, Katsumi M, 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
- Oppenheimer DG, Herman PL, Sivakumaran S, Esch J, Marks MD** (1991) A myb gene required for leaf trichome differentiation in Arabidopsis is expressed in stipules. *Cell* **67**: 483-493
- Ori N, Eshed Y, Chuck G, Bowman JL, Hake S** (2000) Mechanisms that control knox gene expression in the Arabidopsis shoot. *Development* **127**: 5523-5532.
- Otsuga D, DeGuzman B, Prigge MJ, Drews GN, Clark SE** (2001) REVOLUTA regulates meristem initiation at lateral positions. *Plant J* **25**: 223-236
- Parcy F, Nilsson O, Busch MA, Lee I, Weigel D** (1998) A genetic framework for floral patterning. *Nature* **395**: 561-566
- Payne CT, Zhang F, Lloyd AM** (2000) GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in Arabidopsis through interaction with GL1 and TTG1. *Genetics* **156**: 1349-1362.
- Peng J, Carol P, Richards DE, King KE, Cowling RJ, Murphy GP, Harberd NP** (1997) The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev* **11**: 3194-3205.

- Peng J, Carol P, Richards DE, King KE, Cowling RJ, Murphy GP, Harberd NP** (1997) The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev* **11**: 3194-3205
- Peng J, Richards DE, Moritz T, Cano-Delgado A, Harberd NP** (1999) Extragenic suppressors of the Arabidopsis gai mutation alter the dose-response relationship of diverse gibberellin responses. *Plant Physiol* **119**: 1199-1208.
- Perazza D, Herzog M, Hulskamp M, Brown S, Dorne AM, Bonneville JM** (1999) Trichome cell growth in Arabidopsis thaliana can be derepressed by mutations in at least five genes. *Genetics* **152**: 461-476
- Perazza D, Vachon G, Herzog M** (1998) Gibberellins promote trichome formation by Up-regulating GLABROUS1 in arabidopsis. *Plant Physiol* **117**: 375-383.
- Pesch M, Hulskamp M** (2004) Creating a two-dimensional pattern de novo during Arabidopsis trichome and root hair initiation. *Curr Opin Genet Dev* **14**: 422-427.
- Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE** (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **975**: 384-394
- Rademacher W** (2000) GROWTH RETARDANTS: Effects on Gibberellin Biosynthesis and Other Metabolic Pathways. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**: 501-531
- Rashotte AM, Carson SD, To JP, Kieber JJ** (2003) Expression profiling of cytokinin action in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **132**: 1998-2011.
- Reinhardt D, Mandel T, Kuhlemeier C** (2000) Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell* **12**: 507-518
- Reinhardt D, Pesce ER, Stieger P, Mandel T, Baltensperger K, Bennett M, Traas J, Friml J, Kuhlemeier C, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwarz H, Hamann T, Offringa R, Jurgens G** (2003) Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature* **426**: 255-260.
- Rerie WG, Feldmann KA, Marks DM** (1994) The *GLABRA2* gene encodes a homeo domain protein required for normal trichome development in *Arabidopsis*. *Genes & Dev.* **8**: 1388-1399
- Richmond A, Lang A** (1957) Effect of Kinetin on Protein Content and Survival of Detached Xanthium Leaves. *Science* **125**: 650-651
- Riefler M, Novak O, Strnad M, Schmullig T** (2006) Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell.* **18**: 40-54. Epub 2005 Dec 2016.
- Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacquard A, Murray JA** (1999) Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**: 1541-1544
- Rotter A, Usadel B, Baebler S, Stitt M, Gruden K** (2007) Adaptation of the MapMan ontology to biotic stress responses: application in solanaceous species. *Plant Methods* **3**: 10
- Sakai H, Aoyama T, Oka A** (2000) Arabidopsis ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *Plant J.* **24**: 703-711.
- Sakai H, Honma T, Aoyama T, Sato S, Kato T, Tabata S, Oka A** (2001) ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science.* **294**: 1519-1521.
- Sakakibara H** (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 431-449

- Sakamoto T, Kamiya N, Ueguchi-Tanaka M, Iwahori S, Matsuoka M** (2001) KNOX homeodomain protein directly suppresses the expression of a gibberellin biosynthetic gene in the tobacco shoot apical meristem. *Genes Dev* **15**: 581-590.
- Salome PA, To JP, Kieber JJ, McClung CR** (2006) Arabidopsis response regulators ARR3 and ARR4 play cytokinin-independent roles in the control of circadian period. *Plant Cell*. **18**: 55-69.
- Schellmann S, Schnittger A, Kirik V, Wada T, Okada K, Beermann A, Thumfahrt J, Jurgens G, Hulskamp M** (2002) TRIPTYCHON and CAPRICE mediate lateral inhibition during trichome and root hair patterning in Arabidopsis. *Embo J* **21**: 5036-5046.
- Schnittger A, Schobinger U, Bouyer D, Weinl C, Stierhof Y-D, Hulskamp M** (2002) Ectopic D-type cyclin expression induces not only DNA replication but also cell division in Arabidopsis trichomes. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* **99**: 6410-6415
- Schwechheimer C** (2008) Understanding gibberellic acid signaling--are we there yet? *Curr Opin Plant Biol* **11**: 9-15
- Semiarti E, Ueno Y, Tsukaya H, Iwakawa H, Machida C, Machida Y** (2001) The ASYMMETRIC LEAVES2 gene of Arabidopsis thaliana regulates formation of a symmetric lamina, establishment of venation and repression of meristem-related homeobox genes in leaves. *Development* **128**: 1771-1783.
- Sessa G, Morelli G, Ruberti I** (1997) DNA-binding specificity of the homeodomain-leucine zipper domain. *J Mol Biol* **274**: 303-309.
- Shani E, Yanai O, Ori N** (2006) The role of hormones in shoot apical meristem function. *Curr Opin Plant Biol*. **9**: 484-489.
- Shimada A, Ueguchi-Tanaka M, Sakamoto T, Fujioka S, Takatsuto S, Yoshida S, Sazuka T, Ashikari M, Matsuoka M** (2006) The rice SPINDLY gene functions as a negative regulator of gibberellin signaling by controlling the suppressive function of the DELLA protein, SLR1, and modulating brassinosteroid synthesis. *In*, Vol 48, pp 390-402
- Silverstone AL, Ciampaglio CN, Sun T** (1998) The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* **10**: 155-169
- Silverstone AL, Jung HS, Dill A, Kawaide H, Kamiya Y, Sun TP** (2001) Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**: 1555-1566
- Silverstone AL, Mak PY, Martinez EC, Sun TP** (1997) The new RGA locus encodes a negative regulator of gibberellin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **146**: 1087-1099
- Silverstone AL, Tseng TS, Swain SM, Dill A, Jeong SY, Olszewski NE, Sun TP** (2007) Functional analysis of SPINDLY in gibberellin signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol* **143**: 987-1000
- Simillion C, Vandepoele K, Van Montagu MC, Zabeau M, Van de Peer Y** (2002) The hidden duplication past of Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 13627-13632
- Sinha NR, Williams RE, Hake S** (1993) Overexpression of the maize homeo box gene, KNOTTED-1, causes a switch from determinate to indeterminate cell fates. *Genes Dev* **7**: 787-795
- Skoog F, Miller CO** (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp Soc Exp Biol* **54**: 118-130

- Smith HMS, Boschke I, Hake S** (2002) Selective interaction of plant homeodomain proteins mediates high DNA-binding affinity. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* **99**: 9579-9584
- Snow M SR** (1937) Auxin and leaf formation. *New Phytologist* **36**: 1-18
- Souer E, van Houwelingen A, Kloos D, Mol J, Koes R** (1996) The no apical meristem gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell* **85**: 159-170
- Steeves TA, Sussex IM** (1989) *Patterns in Plant Development*. Cambridge University. Press, New York
- Sugimoto-Shirasu K, Roberts K** (2003) "Big it up": endoreduplication and cell-size control in plants. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 544-553
- Swain SM, Tseng T-S, Thornton TM, Gopalraj M, Olszewski NE** (2002) SPINDLY Is a Nuclear-Localized Repressor of Gibberellin Signal Transduction Expressed throughout the Plant. *Plant Physiol* **129**: 605-615
- Swain SM, Tseng TS, Olszewski NE** (2001) Altered expression of SPINDLY affects gibberellin response and plant development. *Plant Physiol* **126**: 1174-1185
- Sweere U, Eichenberg K, Lohrmann J, Mira-Rodado V, Baurle I, Kudla J, Nagy F, Schafer E, Harter K** (2001) Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling. *Science* **294**: 1108-1111
- Takada S, Hibara K, Ishida T, Tasaka M** (2001) The CUP-SHAPED COTYLEDON1 gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. *Development* **128**: 1127-1135
- Takei K, Sakakibara H, Sugiyama T** (2001) Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **276**: 26405-26410
- Tanaka M, Takei K, Kojima M, Sakakibara H, Mori H** (2006) Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *Plant J* **45**: 1028-1036
- Tanaka Y, Suzuki T, Yamashino T, Mizuno T** (2004) Comparative studies of the AHP histidine-containing phosphotransmitters implicated in His-to-Asp phosphorelay in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**: 462-465
- Taniguchi M, Kiba T, Sakakibara H, Ueguchi C, Mizuno T, Sugiyama T** (1998) Expression of *Arabidopsis* response regulator homologs is induced by cytokinins and nitrate. *FEBS Lett* **429**: 259-262.
- Taya Y, Tanaka Y, Nishimura S** (1978) 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **271**: 545-547
- Thimm O, Blasing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Kruger P, Selbig J, Muller LA, Rhee SY, Stitt M** (2004) MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J* **37**: 914-939
- Thomas SG, Rieu I, Steber CM** (2005) Gibberellin metabolism and signaling. *Vitam Horm* **72**: 289-338
- Thornton TM, Swain SM, Olszewski NE** (1999) Gibberellin signal transduction presents ellipsisthe SPY who O-GlcNAc'd me. *Trends Plant Sci* **4**: 424-428
- Timmermans MC, Hudson A, Becraft PW, Nelson T** (1999) ROUGH SHEATH2: a Myb protein that represses knox homeobox genes in maize lateral organ primordia. *Science* **284**: 151-153
- To JP, Kieber JJ** (2008) Cytokinin signaling: two-components and more. *Trends Plant Sci* **13**: 85-92
- To JPC, Haberer G, Ferreira FJ, Deruere J, Mason MG, Schaller GE, Alonso JM, Ecker JR, Kieber JJ** (2004) Type-A *Arabidopsis* Response Regulators Are Partially Redundant Negative Regulators of Cytokinin Signaling. *Plant Cell* **16**: 658-671

- Tran LS, Urao T, Qin F, Maruyama K, Kakimoto T, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2007) Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 20623-20628
- Tsiantis M, Schneeberger R, Golz JF, Freeling M, Langdale JA** (1999) The maize rough sheath2 gene and leaf development programs in monocot and dicot plants. *Science* **284**: 154-156
- Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, Kobayashi M, Chow TY, Hsing YI, Kitano H, Yamaguchi I, Matsuoka M** (2005) GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* **437**: 693-698
- Ueguchi-Tanaka M, Nakajima M, Katoh E, Ohmiya H, Asano K, Saji S, Hongyu X, Ashikari M, Kitano H, Yamaguchi I, Matsuoka M** (2007) Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, *GID1*, with a rice *DELLA* protein, *SLR1*, and gibberellin. *Plant Cell* **19**: 2140-2155
- Ueguchi C, Sato S, Kato T, Tabata S** (2001) The *AHK4* gene involved in the cytokinin-signaling pathway as a direct receptor molecule in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **42**: 751-755.
- Urao T, Yakubov B, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (1998) Stress-responsive expression of genes for two-component response regulator-like proteins in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **427**: 175-178
- Veit B** (2004) Determination of cell fate in apical meristems. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 57-64
- Venglat SP, Dumonceaux T, Rozwadowski K, Parnell L, Babic V, Keller W, Martienssen R, Selvaraj G, Datla R** (2002) The homeobox gene *BREVIPEDICELLUS* is a key regulator of inflorescence architecture in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 4730-4735
- Vernoux T, Kronenberger J, Grandjean O, Laufs P, Traas J** (2000) *PIN-FORMED 1* regulates cell fate at the periphery of the shoot apical meristem. *Development.* **127**: 5157-5165.
- Vlach J, Hennecke S, Amati B** (1997) Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Embo J* **16**: 5334-5344
- Vodermaier HC** (2001) Cell cycle: Waiters serving the Destruction machinery. *Curr Biol* **11**: R834-837
- Vollbrecht E, Reiser L, Hake S** (2000) Shoot meristem size is dependent on inbred background and presence of the maize homeobox gene, *knotted1*. *Development.* **127**: 3161-3172.
- Vroemen CW, Mordhorst AP, Albrecht C, Kwaaitaal MA, de Vries SC** (2003) The *CUP-SHAPED COTYLEDON3* gene is required for boundary and shoot meristem formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**: 1563-1577
- Wada T, Kurata T, Tominaga R, Koshino-Kimura Y, Tachibana T, Goto K, Marks MD, Shimura Y, Okada K** (2002) Role of a positive regulator of root hair development, *CAPRICE*, in *Arabidopsis* root epidermal cell differentiation. *Development* **129**: 5409-5419
- Wada T, Tachibana T, Shimura Y, Okada K** (1997) Epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* determined by a *Myb* homolog, *CPC*. *Science* **277**: 1113-1116
- Waites R, Selvadurai HR, Oliver IR, Hudson A** (1998) The *PHANTASTICA* gene encodes a MYB transcription factor involved in growth and dorsoventrality of lateral organs in *Antirrhinum*. *Cell* **93**: 779-789
- Walker AR, Davison PA, Bolognesi-Winfield AC, James CM, Srinivasan N, Blundell TL, Esch JJ, Marks MD, Gray JC** (1999) The *TRANSPARENT TESTA GLABRA1*

- locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis, encodes a WD40 repeat protein. *Plant Cell* **11**: 1337-1350.
- Walter M, Chaban C, Schutze K, Batistic O, Weckermann K, Nake C, Blazevic D, Grefen C, Schumacher K, Oecking C, Harter K, Kudla J** (2004) Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J.* **40**: 428-438.
- Ward ER, Uknes SJ, Williams SC, Dincher SS, Wiederhold DL, Alexander DC, Ahl-Goy P, Metraux JP, Ryals JA** (1991) Coordinate Gene Activity in Response to Agents That Induce Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* **3**: 1085-1094
- Weber JD, Taylor LJ, Roussel MF, Sherr CJ, Bar-Sagi D** (1999) Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol* **1**: 20-26.
- Weir I, Lu J, Cook H, Causier B, Schwarz-Sommer Z, Davies B** (2004) CUPULIFORMIS establishes lateral organ boundaries in Antirrhinum. *Development* **131**: 915-922
- Weiss D, Ori N** (2007) Mechanisms of cross talk between gibberellin and other hormones. *Plant Physiol* **144**: 1240-1246
- Wells L, Vosseller K, Hart GW** (2001) Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc. *Science* **291**: 2376-2378
- Wen C-K, Chang C** (2002) Arabidopsis RGL1 Encodes a Negative Regulator of Gibberellin Responses. *Plant Cell* **14**: 87-100
- Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Van Onckelen H, Schmulling T** (2003) Cytokinin-Deficient Transgenic Arabidopsis Plants Show Multiple Developmental Alterations Indicating Opposite Functions of Cytokinins in the Regulation of Shoot and Root Meristem Activity. *In*, Vol 15, pp 2532-2550
- Williams L, Fletcher JC** (2005) Stem cell regulation in the Arabidopsis shoot apical meristem. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 582-586
- Willige BC, Ghosh S, Nill C, Zourelidou M, Dohmann EM, Maier A, Schwechheimer C** (2007) The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 1209-1220
- Yalpani N, Silverman P, Wilson TM, Kleier DA, Raskin I** (1991) Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *Plant Cell* **3**: 809-818
- Yamada H, Suzuki T, Terada K, Takei K, Ishikawa K, Miwa K, Yamashino T, Mizuno T** (2001) The Arabidopsis AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiol* **42**: 1017-1023
- Yanai O, Shani E, Dolezal K, Tarkowski P, Sablowski R, Sandberg G, Samach A, Ori N** (2005) Arabidopsis KNOXI proteins activate cytokinin biosynthesis. *Curr Biol.* **15**: 1566-1571.
- Yoshida S, Ito M, Nishida I, Watanabe A** (2002) Identification of a novel gene HYS1/CPR5 that has a repressive role in the induction of leaf senescence and pathogen-defence responses in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **29**: 427-437
- Zhang F, Gonzalez A, Zhao M, Payne CT, Lloyd A** (2003) A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of Arabidopsis. *Development* **130**: 4859-4869
- Zhao M, Morohashi K, Hatlestad G, Grotewold E, Lloyd A** (2008) The TTG1-bHLH-MYB complex controls trichome cell fate and patterning through direct targeting of regulatory loci. *Development* **135**: 1991-1999
- Zimmermann IM, Heim MA, Weisshaar B, Uhrig JF** (2004) Comprehensive identification of Arabidopsis thaliana MYB transcription factors interacting with R/B-like BHLH proteins. *Plant J* **40**: 22-34

Zourelidou M, de Torres-Zabala M, Smith C, Bevan MW (2002) Storekeeper defines a new class of plant-specific DNA-binding proteins and is a putative regulator of patatin expression. *Plant J* **30**: 489-497.

Annexe 1 : Amorces utilisées pour l'amplification de séquences spécifiques lors des réactions de PCR

Utilisation	Gène	Information	Orientation	Séquence
Mutagenèse du domaine Leucine-Zipper	<i>GeBP</i>	sauvage	Forward	cggaattcaatgggactagtagtgaaaagag
			Reverse	tccccgggacttctacattgttaatatcttgat
		G263, L270 & L277	Forward Mutant	gaacctgc aaatgtaaaagaagagagcgcgagtgatgaatgaaagcggcatg
			Reverse Mutant	catgccgtttccattcalcactcgcctctcttctttaccattgcaaggctc
		L256	Forward Mutant	aagttgcaggctgagaagct
			Reverse Mutant	agcttctcagcctgcaactt
		G263	Forward Mutant	gatgaacctgc aaatgtaaa
			Reverse Mutant	ttaccattgcaaggctc
		L270	Forward Mutant	gaagagagcgcgagtgatga
			Reverse Mutant	ttcatcactcgcctcttc
		L277	Forward Mutant	tggaaagcgcgcatgttga
			Reverse Mutant	tcaacacatgccgtttcca
		F284	Forward Mutant	ggaacaagagc caaatcaag
			Reverse Mutant	cttgatattgctctgtttcc
F291	Forward Mutant	agcttagagcttcgccaa		
	Reverse Mutant	ttgccggaagctctaagct		

SELEXE		oEDW-Selex Random	Pool aléatoire	tggagaagaggagagatctagcnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnncttagacttcttcttcttcgattccgg
		oEDW-selex F TAMRA	Forward	tggagaagaggagagatctag
		oEDW-selex F	Forward	tggagaagaggagagatctag
		oEDW-Selex R	Reverse	ccggaatcgaagaagaaca

Isolation des Promoteurs	<i>GPL1</i>		Forward	ggggacaagttgtacaaaaagcagccttaagcttgaagcatttagaaagaagag
			Reverse	ggggaccactttgtacaagaaagctgggctactagtgttaattgttacacttctgatt
	<i>GPL2</i>		Forward	ggggacaagttgtacaaaaagcagccttaagcttctctatactcatgtttgaatcat
			Reverse	ggggaccactttgtacaagaaagctgggctactagtgtcaattgtctacttttactt
	<i>GPL3</i>		Forward	ggggacaagttgtacaaaaagcagccttaagcttgttaaaaagttgtacacttttc
			Reverse	ggggaccactttgtacaagaaagctgggctctagctgatcggatgaagaatcaaaact

Isolation des cDNA	<i>GeBP et GPL1</i>		Forward	ggggacaagttgtacaaaaagcagccttgaattcgcaataagcatggtgactccgaagc agatcgat
			Reverse	ggggaccactttgtacaagaaagctgggctgacctaattaactatcattagctcctctcgaagcttgg
	<i>GPL2</i>		Forward	ggggacaagttgtacaaaaagcagccttgaattcaattgacaatggcgactccgacgg agctagtttctc
			Reverse	ggggaccactttgtacaagaaagctgggctgacctaattaccatcattgctcctctcgaagc
	<i>GPL3</i>		Forward	ggggacaagttgtacaaaaagcagccttgaattccaccgatcaatggtgtagaaga gagttcctgattcc
			Reverse	ggggaccactttgtacaagaaagctgggctgacctaattaggagaactcctgaagttgcaagcttgc

	<i>GeBP</i>	GT-F	Forward	ccatattgcttcttttctctc
--	-------------	------	---------	-----------------------

Identification des mutants (génotypage)		GT-R	Reverse	ggagaatctctcaacgatagaacttc
	Transposon DS dans les lignées gebp	DS5	Bordure 5'	tacgataacggctcggtac
		DS3	Bordure 3'	ccgtcccgaagttaaatatg
	<i>GPL1</i>	W391LP	left primer	aacgtccgcaatgtgtattaagttgtc
		W391RP	right primer	tcttgtgcacttctctggcct
	<i>T-DNA dans gpl1-1</i>	P745	Bordure gauche (2 bordures gauches)	aacgtccgcaatgtgtattaagttgtc
	<i>GPL2</i>	183LP2	left primer	tctgaattctgaatccagaatccatc
		183RP2	right primer	attcagatcctgttttagctcgaaa
	<i>T-DNA dans gpl2-1</i>	LBa1	Bordure gauche	tggttcacgtagtggccatcg
		183RB1	Bordure droite	gctagctgatatgaccttagcgacttttg
<i>Gpl3</i>	885LP1	left primer1	tggaccaagccaaggtgagtg	
	885LP2	left primer2	cgagattgataatggtgagagag	
	885RP2	right primer	gaacggatcgtggatacatcatg	

Analyse du niveau des transcrits GeBP/GPL chez les mutants	<i>GeBP</i>		Forward	cctattttcttcttttctctc
			Reverse	tacgataacggctcggtac
	<i>GPL1</i>		Forward	agactctcggaaaacacagcagc
			Reverse	tgcccaaacagaacaagacaac
	<i>GPL2</i>		Forward	gaaacagcaacagaagaagaacg
			Reverse	ctcactctcctcaaacctcc
	<i>GPL3</i>		Forward	tgtgaggagcaagagcagc
			Reverse	gcttctctcctcaaggca
	<i>EF1</i>		Forward	atgccccaggacatcgtgattcat
			Reverse	tggcggcaccccttagctggatca

Analyse du niveau des transcrits ARR [d'après (Kim et al., 2006)]	<i>ARR5</i>		Forward	ctactctcttgatggctgag
			Reverse	tatcgtactgtggaatctgataaac
	<i>ARR6</i>		Forward	attcgttgatcaatggctgag
			Reverse	atcggagagctcagatcttgc
	<i>ARR7</i>		Forward	ctgagttgacaatggcgttg
			Reverse	gctaaggtcttggcctctatac
	<i>Actine8</i>		Forward	aatcagatgtggatcttaaggca
			Reverse	tccgagttgaaagagctacaac

Vérifications des résultats d'analyses microarrays	<i>THI 2.4</i>		Forward	CATGGCACAAAATCAAGTTGACG
			Reverse	CGCGAAGAGGCAAGCATTATAG
	<i>PER 21</i>		Forward	ATTACTTCCATGAGCAGTTCTCAC
			Reverse	AGTTCACATAACGACAATCCTTCC
	<i>PR-1</i>		Forward	TCTTGTAGGTGCTCTTGTCTTCC
			Reverse	CAACCTCTCGTCCCACTGC
	<i>PR-5</i>		Forward	TTGAATTGACTCCAGGTGCTTCC
			Reverse	GCCAGAGTGACGGGAGGAAC
	<i>YLS9</i>		Forward	TTGTCATCCTCGGCGTAGCC
			Reverse	AAGCGGGTAAGGGACGCATC
AT2G25450		Forward	AGGTTTATGATGCTCTGTCTTCC	
		Reverse	AAGTCTCCATTGTTGTCGTTAAG	

Annexe 2 : Résultats bruts des analyses micro-array

Signification des données :

IS1 : Log2 de l'intensité de signal d'un gène X dans la condition « traitée », en prenant en compte les valeurs du dye et du swap de la condition « traitée ».

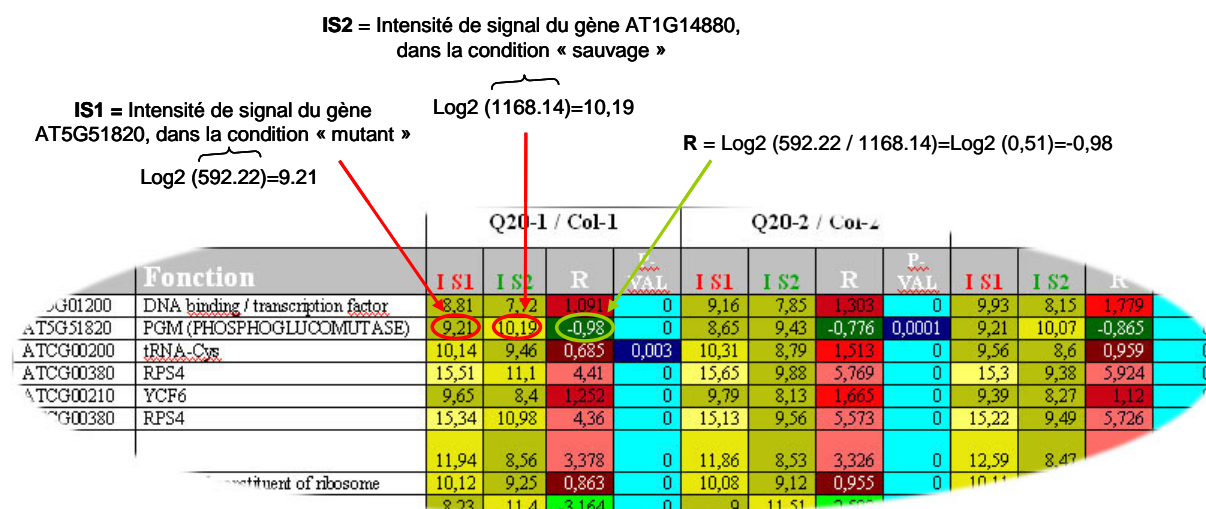
IS2 : Log2 de l'intensité de signal du même gène X dans la condition « sauvage », en prenant en compte les valeurs du dye et du swap de la condition sauvage.

-On considère que les signaux <7 correspondent aux gènes très faiblement exprimés (de l'ordre du bruit de fond), 7 à 10 faiblement à moyennement, >10 fortement, >13 les transcrits majoritaires.

R : Log2 du ration entre l'intensité de signal d'un gène donné de la condition « traitée »/l'intensité de signal du même gène de la condition « sauvage ». Seul les gènes qui sont exprimés différemment selon le test statistique Pval sont indiqués dans le tableau.

Pval : p-value Bonferroni pour chaque gène. Les gènes ayant une p-value supérieure à 5.e-2 sont considérés comme non différemment exprimés et sont absents du tableau.

Exemple :



Légende des indices colorimétriques :

Indice d'intensité de signal			
7	10	13	>13

Indice de p-value Bonferroni			
0	1.E-08	5.E-02	>5.E-02

Indice de la Valeur R correspondant à la différence d'expression entre les deux échantillons testés						
-2,5	-1,5	-1	Pas de différence	1	1,5	2,5
0,00						

Comparaison du quadruple mutant *gebp/gpl* avec Col

Gène	Fonction	Q20-1 / Col-1				Q20-2 / Col-2				Q20-3 / Col-3			
		IS1	IS2	R	P-VAL	IS1	IS2	R	P-VAL	IS1	IS2	R	P-VAL
AT5G01200	DNA binding / transcription factor	8,81	7,72	1,091	0	9,16	7,85	1,303	0	9,93	8,15	1,779	0
AT5G51820	PGM (PHOSPHOGLUCOMUTASE)	9,21	10,19	-0,98	0	8,65	9,43	-0,776	0,0001	9,21	10,07	-0,865	0
ATCG00200	tRNA-Cys	10,14	9,46	0,685	0,003	10,31	8,79	1,513	0	9,56	8,6	0,959	0
ATCG00380	RPS4	15,51	11,1	4,41	0	15,65	9,88	5,769	0	15,3	9,38	5,924	0
ATCG00210	YCF6	9,65	8,4	1,252	0	9,79	8,13	1,665	0	9,39	8,27	1,12	0
ATCG00380	RPS4	15,34	10,98	4,36	0	15,13	9,56	5,573	0	15,22	9,49	5,726	0
CATMA C058		11,94	8,56	3,378	0	11,86	8,53	3,326	0	12,59	8,47	4,114	0
AT2G07675	structural constituent of ribosome	10,12	9,25	0,863	0	10,08	9,12	0,955	0	10,11	8,96	1,144	0
AT2G31660	protein transporter	8,23	11,4	-3,164	0	9	11,51	-2,503	0	9,07	12,29	-3,215	0
AT5G44090	calcium ion binding	11,59	10,8	0,79	0	11,45	10,58	0,876	0	11,51	10,77	0,737	0,0005
AT1G03090	MCCA	10,22	11,94	-1,717	0	10,51	11,57	-1,056	0	10,84	12,13	-1,299	0
AT4G24230	acyl-CoA binding	10,34	11,36	-1,019	0	10,65	11,53	-0,88	0	10,77	11,46	-0,689	0,003
AT5G22920	ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding	11,36	12,5	-1,136	0	11,31	12,15	-0,836	0	11,88	12,66	-0,785	0
AT4G03510	RMA1; protein binding / ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding	9,77	11,42	-1,643	0	9,94	11,01	-1,077	0	10,68	11,6	-0,919	0
AT2G25450	unknown protein	9,31	14,16	-4,854	0	10,82	13,8	-2,984	0	10,42	14,36	-3,937	0
AT1G68340	unknown protein	9,23	8,25	0,977	0	9,38	8	1,373	0	9,89	8,34	1,548	0
AT2G36340	transcription regulator	10,27	8,82	1,448	0	11,03	9,02	2,011	0	11,05	8,96	2,094	0
AT5G01730	wave3	9,04	7,7	1,336	0	9,49	7,92	1,575	0	9,84	8,23	1,61	0
AT5G33320	CUE1 (CAB UNDEREXPRESSED 1); antiporter/ triose-phosphate transporter	9,77	8,25	1,518	0	10,25	8,24	2,01	0	10,36	7,88	2,481	0
AT1G78620	unknown protein	8,93	7,67	1,262	0	9,6	7,68	1,92	0	9,95	8,04	1,915	0
AT5G05780	ATHMOV34	9,5	11,1	-1,598	0	9,33	10,96	-1,637	0	9,52	11,14	-1,623	0
AT1G48750													
AT1G48760	lipid binding clathrin binding	10,66	9,33	1,328	0	10,98	10,36	0,622	0,05	10,67	9,34	1,329	0
AT5G28910	unknown protein	9,42	8,14	1,282	0	9,48	8,23	1,254	0	9,05	8,36	0,687	0,004
AT1G49470	unknown protein	10,19	9,54	0,65	0,01	10,35	9,63	0,721	0,0008	10,15	9,49	0,657	0,01
AT3G55500	ATEXPA16 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A16)	10,08	8,15	1,93	0	10,16	8,25	1,913	0	9,78	8,18	1,593	0
AT5G45430	ATP binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase	8,75	10,13	-1,382	0	8,73	10,36	-1,623	0	8,78	10,12	-1,34	0
AT1G78320	ATGSTU23; glutathione transferase	9,25	8,43	0,814	0	8,91	8,27	0,646	0,02	9,27	8,63	0,643	0,02
CATMASCTRL25		8,97	9,76	-0,79	0	8,87	9,5	-0,633	0,03	9,15	9,91	-0,758	0,0002
AT1G52990	electron transporter	9,44	8,07	1,367	0	9,34	8,28	1,057	0	9,52	8,25	1,266	0
AT5G35935	unknown protein	7,73	8,48	-0,751	0,0002	7,74	8,52	-0,785	0	7,79	8,67	-0,877	0
AT1G67750	pectate lyase	11,25	9,96	1,283	0	11,03	10,09	0,94	0	10,26	8,8	1,458	0
AT5G41370	XPB1; ATP binding / ATP-dependent DNA helicase/ ATP-dependent helicase/ DNA binding / helicase/ nucleic acid binding	9,91	10,8	-0,899	0	9,9	10,69	-0,785	0	9,87	10,62	-0,753	0,0002
AT5G42850	electron transporter	9,55	8,8	0,751	0,0002	9,75	9	0,754	0,0002	9,64	8,93	0,713	0,001
AT5G45490	ATP binding	8,02	10,78	-2,755	0	8,05	10,33	-2,282	0	7,98	10,63	-2,649	0
AT5G37350	unknown protein	9,1	10,02	-0,925	0	9,22	10,01	-0,789	0	8,91	9,7	-0,79	0
AT5G43050	unknown protein	9,24	10,11	-0,868	0	9,42	10,16	-0,741	0,0003	9,21	10,05	-0,843	0
AT1G73600	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase/ methyltransferase/ phosphoethanolamine N-methyltransferase	10,77	10,02	0,744	0,0003	10,76	9,91	0,842	0	10,53	9,9	0,631	0,04

AT5G47250	ATP binding	9,62	8,42	1,203	0	9,16	8,2	0,962	0	9,36	8,3	1,058	0
AT5G45500	unknown protein	8,41	9,74	-1,334	0	8,21	9,39	-1,185	0	8,43	9,87	-1,439	0
AT4G24880	unknown protein	8,94	8,08	0,863	0	9,41	8,37	1,044	0	9,29	8,44	0,852	0
AT3E21190	EUGENE prediction	7,99	8,84	-0,849	0	8,27	8,95	-0,681	0,004	8,45	9,08	-0,635	0,03
AT5G42390	metalloendopeptidase	12,3	13,02	-0,726	0,0006	12,17	13,05	-0,888	0	12,38	13,12	-0,747	0,0003
AT5G50650	nucleotide binding	8,52	9,59	-1,062	0	8,69	9,46	-0,769	0,0001	8,7	9,56	-0,862	0
AT5G52470	FIB1 (FIBRILLARIN 1)	10,97	12,03	-1,064	0	11	11,93	-0,935	0	10,91	11,81	-0,907	0
AT5G43210	nuclease	10,79	9,56	1,233	0	10,95	9,43	1,514	0	10,64	9,19	1,454	0
AT5G36930	ATP binding / transmembrane receptor	7,94	8,93	-0,992	0	8,05	8,75	-0,698	0,002	7,81	8,62	-0,8	0
AT2G20875	unknown protein	8,35	9,39	-1,035	0	8,38	9,29	-0,912	0	8,52	9,39	-0,867	0
AT5G28920	unknown protein	7,9	9,1	-1,204	0	7,9	9,06	-1,156	0	7,83	8,97	-1,137	0
AT5G48335	unknown protein	9,88	10,95	-1,07	0	9,9	10,93	-1,028	0	9,86	10,82	-0,952	0
AT4G00970	ATP binding / protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase	9,83	8,16	1,669	0	9,76	8,35	1,417	0	9,7	8,36	1,336	0
AT2G02470	DNA binding / protein binding / zinc ion binding	8,75	9,73	-0,975	0	8,8	9,52	-0,72	0,0008	9,02	9,69	-0,664	0,01
AT5G40370	arsenate reductase (glutaredoxin)/ electron transporter/ thiol-disulfide exchange intermediate	13,62	12,7	0,922	0	13,84	12,66	1,179	0	13,54	12,63	0,903	0
AT3G15630	unknown protein	10,57	11,89	-1,323	0	10,79	11,81	-1,023	0	10,99	12	-1,005	0
ATCG01040	YCF5	8,87	10,56	-1,695	0	9,05	9,81	-0,764	0,0001	8,59	9,43	-0,837	0
AT1G58290	HEMA1; glutamyl-tRNA reductase	10,65	11,73	-1,081	0	10,97	11,8	-0,836	0	10,91	11,59	-0,678	0,006
AT1G55360	unknown protein	13,05	11,97	1,074	0	12,59	11,57	1,014	0	12,21	11,53	0,676	0,006
ATMG01090	ORF262	8,53	9,64	-1,115	0	8,64	9,74	-1,094	0	8,64	9,6	-0,964	0
AT2G31810	acetolactate synthase/ amino acid binding	10,95	12,45	-1,494	0	11,82	12,95	-1,131	0	12,04	13	-0,965	0
AT5G45510	unknown protein	8,84	9,85	-1,009	0	8,54	9,31	-0,775	0,0001	8,7	9,8	-1,095	0
AT5G15500	protein binding	10,48	9,14	1,346	0	10,27	9,63	0,64	0,02	9,92	10,65	-0,73	0,0006
AT3G54880	unknown protein	9,81	10,78	-0,971	0	10,16	11,19	-1,03	0	10,29	11,5	-1,206	0
AT5G14280	transcription regulator	9,72	10,76	-1,036	0	9,64	10,68	-1,043	0	9,52	10,55	-1,034	0
AT3G01290	unknown protein	8,81	9,5	-0,685	0,003	9,51	10,89	-1,375	0	10,03	11,45	-1,413	0
AT5G64090	unknown protein	13,42	12,04	1,379	0	13,2	12,47	0,733	0,0005	12,75	13,74	-0,992	0
AT2G18420	unknown protein	11,09	12,56	-1,474	0	11,86	13,11	-1,246	0	11,93	13,15	-1,218	0
AT3G30775	ERD5 (PROLINE OXIDASE); proline dehydrogenase	8,61	10,31	-1,7	0	8,84	11,28	-2,444	0	9,89	11,92	-2,035	0
AT2G39570	amino acid binding	12,7	13,63	-0,927	0	12,91	13,61	-0,705	0,002	12,74	13,75	-1,008	0
AT1G10070	branched-chain-amino-acid transaminase/ catalytic unknown protein	9,43	11,81	-2,38	0	10,26	11,46	-1,202	0	10,39	12,32	-1,933	0
AT5G07440	GDH2 (GLUTAMATE DEHYDROGENASE 2); oxidoreductase	9,41	11,3	-1,885	0	9,7	11,67	-1,971	0	10,6	12,28	-1,679	0
AT2G37130	peroxidase	9,38	10,41	-1,028	0	9,78	10,76	-0,986	0	10,39	11,03	-0,637	0,03
AT2G41240	DNA binding / transcription factor	11,41	8,74	2,665	0	11,33	8,71	2,616	0	10,35	8,89	1,462	0
AT4G36670	carbohydrate transporter/ sugar porter	9,98	12,33	-2,354	0	11,16	12,16	-0,998	0	10,89	12,83	-1,94	0
AT5G03545	unknown protein	12,32	11,32	0,999	0	12,33	10,95	1,373	0	12,37	11,32	1,056	0
AT4G30270	MER15B; hydrolase, acting on glycosyl bonds / hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	10,31	11,92	-1,617	0	11,07	12,44	-1,364	0	11,84	13,02	-1,184	0
AT2G28120	unknown protein	10,3	11,32	-1,025	0	10,97	11,91	-0,939	0	11,48	12,17	-0,694	0,003
AT5G27845	unknown protein	9,75	8,23	1,524	0	10,76	8,18	2,572	0	10,31	8,15	2,166	0
AT5G20250	DIN10 (DARK INDUCIBLE 10); hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	12,26	13,7	-1,436	0	12,56	13,65	-1,088	0	12,99	13,67	-0,687	0,004
AT5G20230	ATBCB (ARABIDOPSIS BLUE-	11,18	12,03	-0,85	0	11,65	12,43	-0,785	0	11,45	12,68	-1,23	0

	COPPER-BINDING PROTEIN); copper ion binding / electron transporter												
AT1G66100	toxin receptor binding	11,43	12,35	-0,917	0	11,64	12,53	-0,887	0	10,55	11,7	-1,151	0
AT3G47340	ASN1 (DARK INDUCIBLE 6)	11	13,41	-2,413	0	10,94	12,43	-1,484	0	11,48	12,59	-1,116	0
AT5G39580	peroxidase	7,87	8,52	-0,651	0,01	8,33	9,48	-1,155	0	8,68	9,89	-1,209	0
AT4G16745	unknown protein	10,17	8,48	1,692	0	9,87	8,62	1,25	0	9,58	8,65	0,932	0
AT3G56980	ORG3; DNA binding / transcription factor	10,11	8,35	1,759	0	9,81	8,21	1,602	0	8,93	8,27	0,669	0,008
ATCG00430													
ATCG00440	PSBG NDHC	14,85	13,88	0,961	0	14,83	13,91	0,919	0	14,4	13,09	1,312	0
AT1G18710	DNA binding / transcription factor	11,32	10,56	0,754	0,0002	11,38	10,4	0,984	0	10,79	9,31	1,479	0
AT5G48490	lipid binding	11,19	10,53	0,663	0,009	11,36	10,65	0,706	0,002	11,29	9,85	1,44	0
AT1G02205	CER1 (ECERIFERUM 1)	12,25	10,77	1,481	0	12,49	11,55	0,937	0	12,25	11,16	1,087	0
AT3G20340	unknown protein	8,26	8,97	-0,707	0,001	8,41	9,08	-0,672	0,006	8,43	9,64	-1,212	0
AT1G08630	aldehyde-lyase	7,88	8,62	-0,743	0,0003	8,12	8,96	-0,838	0	8,27	9,7	-1,431	0
AT5G41080	glycerophosphodiester phosphodiesterase	8,85	9,97	-1,116	0	9	10,62	-1,623	0	9,13	11,07	-1,937	0

Comparaison du surexprimeur 596 *P1a* (*VP16::GPL2*) avec Col

Gène	Fonction	IS1	IS2	R	P- VAL	IS1	IS2	R	P- VAL	IS1	IS2	R	P- VAL
AT1G66100	toxin receptor binding	10,25	12,66	-2,412	0	10,35	13,11	-2,766	0	9,91	11,99	-2,08	0
AT1G70850	unknown protein	10,64	11,96	-1,32	0	11,76	13,03	-1,27	0	11,13	12,53	-1,399	0
AT4G26530	fructose-bisphosphate aldolase	12,41	13,37	-0,96	0	12,07	14,03	-1,96	0	11,74	13,13	-1,387	0
AT4G19170	NCED4 (NINE-CIS- EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 4)	9,85	10,79	-0,933	0	10,34	11,77	-1,426	0	10,32	11,66	-1,335	0
AT2G31460	unknown protein	9,63	10,44	-0,814	0	9,5	11,25	-1,748	0	9,8	11,08	-1,275	0
AT3G55610	catalytic/ glutamate 5-kinase/ glutamate-5- semialdehyde dehydrogenase	9,33	10	-0,673	0,004	9,26	10,5	-1,236	0	9,82	11,01	-1,193	0
AT4G05310	unknown protein	10,91	11,66	-0,749	0,0002	10,86	12,51	-1,655	0	10,93	11,99	-1,066	0
AT1G73330	ATDR4	10,52	11,33	-0,813	0	11,1	12,42	-1,315	0	10,48	11,55	-1,064	0
AT1G12800	RNA binding	9,62	10,47	-0,844	0	9,7	11,4	-1,697	0	10,13	11,16	-1,034	0
AT3G28060	unknown protein	9,26	10,1	-0,84	0	10,59	9,85	0,738	0	10,33	11,35	-1,016	0
AT3G06145	unknown protein	9,4	10,03	-0,621	0,04	9,54	10,82	-1,277	0	9,25	10,24	-0,993	0
ATCG00760	RPL36	9,59	10,5	-0,916	0	9,24	11,2	-1,966	0	8,85	9,83	-0,984	0
ATCG00570	PSBF PSBE	10,07	11,07	-0,998	0	9,5	11,35	-1,854	0	9,32	10,28	-0,958	0
ATCG00580													
AT1G51500	CER5 (ECERIFERUM 5); ATPase, coupled to transmembrane movement of substances	9,75	10,43	-0,677	0,004	10	10,81	-0,813	0	10,11	11,06	-0,953	0
ATCG00750	RPS11 RPL36	11,71	12,35	-0,634	0,02	10,98	13,01	-2,036	0	11,16	12,11	-0,95	0
ATCG00760													
AT5G49730	oxidoreductase	11,06	11,83	-0,773	0	11,4	12,24	-0,837	0	10,82	11,77	-0,948	0
AT1G13650	unknown protein	7,79	9,16	-1,377	0	8,15	10,21	-2,06	0	7,81	8,75	-0,94	0
AT4G21280	calcium ion binding	11,51	12,14	-0,636	0,02	11,51	12,77	-1,265	0	11,54	12,46	-0,925	0
AT5G67550	unknown protein	9,09	11,37	-2,279	0	10,16	10,85	-0,687	0	10,34	11,24	-0,9	0
AT1G64860	SIGA (SIGMA FACTOR A); DNA binding / DNA-directed RNA polymerase/ transcription factor	11,31	12,06	-0,75	0,0001	11,29	12,35	-1,066	0	11,29	12,18	-0,894	0
		9,84	10,74	-0,903	0	9,37	10,93	-1,556	0	9,11	9,99	-0,877	0
AT2G03520	ATUPS4	10,79	12,1	-1,308	0	10,96	11,9	-0,941	0	10,21	11,07	-0,856	0
AT5G19220	ADG2 (ADPG PYROPHOSPHORYLASE	10,85	11,48	-0,634	0,02	10,39	11,77	-1,378	0	10,7	11,54	-0,847	0

	2); glucose-1-phosphate adenylyltransferase/ nucleotidyltransferase												
ATCG00740	RPOA RPS11	12,08	12,87	-0,793	0	10,84	12,61	-1,768	0	10,8	11,64	-0,837	0
ATCG00750													
AT5G58330	malate dehydrogenase/ oxidoreductase	10,89	11,58	-0,694	0,002	10,93	11,91	-0,973	0	11,33	12,16	-0,831	0
AT3G02380	COL2 (CONSTANS-LIKE 2); transcription factor/ zinc ion binding	10,28	11,05	-0,769	0,0001	10,35	11,47	-1,118	0	9,92	10,73	-0,818	0
ATCG00640	RPL33 RPS18	11,18	12	-0,821	0	10,88	12,18	-1,303	0	10,17	10,97	-0,802	0
ATCG00650													
AT3G55980	transcription factor	10,86	10,17	0,686	0,003	10,9	11,58	-0,678	0	10,93	11,71	-0,786	0
AT3G59400	GUN4	11,83	12,57	-0,747	0,0002	11,92	13,16	-1,238	0	11,73	12,5	-0,777	0
AT1G52000	unknown protein	8,31	9,55	-1,242	0	9,01	9,66	-0,653	0	9,23	10,01	-0,777	0
AT3G47620	transcription factor	10,56	11,41	-0,854	0	10,75	11,9	-1,157	0	10,72	11,49	-0,77	0
AT1G20800	unknown protein	12,8	13,73	-0,935	0	12,41	13,98	-1,572	0	12,49	13,26	-0,766	0
AT1G73870	transcription factor/ zinc ion binding	9,94	10,96	-1,023	0	10	11,27	-1,268	0	9,94	10,7	-0,752	0
ATCG00640	RPL33	9,8	10,46	-0,659	0,008	9,17	10,18	-1,012	0	9,04	9,79	-0,752	0
AT1G60950	FED A; electron transporter/ iron ion binding IRT3; cation transporter/ metal ion transporter	11,89	12,76	-0,873	0	11,56	13,05	-1,492	0	11,89	12,64	-0,751	0
AT1G60960													
AT2G44230	unknown protein	10,29	11,42	-1,13	0	10,81	11,66	-0,855	0	10	10,75	-0,744	0
AT3G29030	ATEXPA5 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A5)	8,37	9,53	-1,156	0	8,99	9,81	-0,811	0	8,3	9,03	-0,737	0
AT3G46780	unknown protein	12,39	13,02	-0,628	0,03	12,8	13,74	-0,939	0	12,51	13,23	-0,722	0
AT2G42220	unknown protein	12,17	12,99	-0,817	0	12,22	13,32	-1,097	0	11,92	12,63	-0,715	0
ATCG00840	RPL23.1 tRNA-Ile	10,66	11,28	-0,623	0,03	10,35	11,17	-0,827	0	9,36	10,06	-0,706	0
ATCG00850													
ATCG00430	PSBG NDHC	13,27	14,1	-0,833	0	13,05	14,29	-1,235	0	12,98	13,68	-0,698	0
ATCG00440													
AT2G36490	ROS1	9,66	10,69	-1,035	0	9,95	10,97	-1,018	0	9,67	10,37	-0,698	0
AT1G73480	catalytic/ hydrolase	9	9,63	-0,638	0,02	9,78	10,3	-0,523	0,03	9,24	9,93	-0,689	0
AT1G26760	unknown protein	10,85	11,5	-0,648	0,01	10,95	11,83	-0,875	0	10,99	11,68	-0,685	0
AT1G70700	unknown protein	10,46	11,08	-0,629	0,03	10,72	11,81	-1,089	0	10,55	11,22	-0,679	0
AT2G43010	PIF4 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4); DNA binding / transcription factor	9,48	10,58	-1,102	0	9,74	10,81	-1,067	0	9,52	10,2	-0,678	0
AT1G58270	ZW9	9,63	10,29	-0,657	0,009	10,07	11,1	-1,03	0	10,59	11,26	-0,67	0
AT2G16005	unknown protein	8,61	9,33	-0,722	0,0005	9,71	10,55	-0,84	0	9,09	9,76	-0,668	0
AT3G04690	ATP binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein- tyrosine kinase	7,76	8,82	-1,066	0	8,7	9,27	-0,572	0,003	8,2	8,87	-0,665	0
AT2G05620	PGR5	9,96	10,68	-0,723	0,0005	10,19	11,09	-0,902	0	10,05	10,71	-0,66	0
AT4G09010	peroxidase	11,14	12,01	-0,866	0	11,65	12,49	-0,836	0	11,19	11,85	-0,656	0
AT5G24420	6-phosphogluconolactonase	10,13	11,81	-1,68	0	10,77	11,79	-1,019	0	10,5	11,15	-0,653	0
AT4G38770	PRP4 (PROLINE-RICH PROTEIN 4)	8,66	9,32	-0,66	0,008	8,9	10,15	-1,25	0	9,02	9,67	-0,649	0
AT1G64970	G-TMT (GAMMA-TOCOPHEROL METHYLTRANSFERASE)	10,01	10,92	-0,91	0	10,35	11,08	-0,738	0	10,37	11,01	-0,643	0
AT1G29660	carboxylic ester hydrolase/ hydrolase, acting on ester bonds	10,3	11,11	-0,809	0	10,88	11,57	-0,69	0	10,3	10,94	-0,64	0
AT4G28250	ATEXPB3 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN B3)	9,63	11,59	-1,96	0	10,5	12,12	-1,623	0	10,49	11,13	-0,639	0
AT3G08940	LHCB4.2	12,72	13,43	-0,711	0,0009	13,19	13,78	-0,589	0,001	12,66	13,3	-0,639	0
AT2G01490	phytanoyl-CoA dioxygenase	12,2	13,07	-0,862	0	12,68	13,39	-0,717	0	12,38	13,01	-0,631	0
AT1G26560	hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	9,06	9,74	-0,68	0,003	9,52	10,1	-0,581	0,002	9,33	9,96	-0,631	0
ATCG00160	RPS2 (RIBOSOMAL PROTEIN S2)	10,77	11,63	-0,861	0	10,64	11,8	-1,16	0	10	10,62	-0,625	0
AT3G10940	phosphoprotein phosphatase/ protein tyrosine/serine/threonine phosphatase	10,35	11,15	-0,802	0	11,09	11,7	-0,615	0,0002	10,42	11,05	-0,624	0

AT2G42380	DNA binding / transcription factor	8,53	9,48	-0,958	0	9,05	10,4	-1,341	0	8,64	9,25	-0,612	0,0001
AT5G38410	ribulose-bisphosphate carboxylase	12,97	13,81	-0,84	0	13,25	14,12	-0,862	0	12,62	13,23	-0,61	0,0001
AT1G69530	ATEXPA1 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A1)	11,05	12,23	-1,186	0	11,02	11,75	-0,737	0	11,05	11,65	-0,603	0,0001
AT1G74070	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	11,75	12,62	-0,87	0	11,71	12,52	-0,816	0	11,15	11,76	-0,601	0,0001
AT5G36910	THI2.2.2 (THIONIN 2.2); toxin receptor binding	9,07	10,2	-1,129	0	8,79	10,6	-1,813	0	8,99	9,59	-0,6	0,0001
AT1G62870	unknown protein	10,91	11,54	-0,627	0,03	11,39	12,05	-0,656	0	10,93	11,53	-0,599	0,0001
AT2G35130	unknown protein	10,04	10,72	-0,678	0,004	10,29	10,99	-0,696	0	10,09	10,68	-0,593	0,0002
AT2G24270	ALDH11A3; aldehyde dehydrogenase/ oxidoreductase	11,1	11,74	-0,632	0,02	11,29	12,37	-1,08	0	11,46	12,05	-0,591	0,0002
AT3G15570	signal transducer	10,07	10,71	-0,64	0,02	10,49	11,21	-0,726	0	10,47	11,04	-0,576	0,0005
ATCG00790	RPL16 RPS3	12,3	13,06	-0,763	0,0001	11,59	12,76	-1,171	0	10,89	11,46	-0,574	0,0006
ATCG00800													
AT1G63070	unknown protein	9,99	10,65	-0,659	0,008	10,41	11,05	-0,64	0,0001	10,07	10,64	-0,566	0,0009
AT3G01440	calcium ion binding	9,96	10,63	-0,671	0,005	10,02	10,99	-0,972	0	9,72	10,28	-0,565	0,001
ATCG00280	PSBC	9,41	10,05	-0,634	0,02	9,73	10,46	-0,739	0	8,68	9,24	-0,56	0,001
AT3G10230	LYC (LYCOPENE CYCLASE); lycopene beta cyclase	8,54	9,19	-0,647	0,01	8,81	9,92	-1,116	0	9,07	9,63	-0,557	0,002
AT1G76110	transcription factor	9,21	10,16	-0,944	0	9,01	9,64	-0,636	0,0001	8,76	9,32	-0,557	0,002
AT2G36870	hydrolase, acting on glycosyl bonds / hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	9,72	10,48	-0,766	0,0001	10,44	11,01	-0,566	0,003	9,98	10,53	-0,554	0,002
AT1G21500	unknown protein	12,69	13,36	-0,675	0,004	12,75	13,53	-0,78	0	12,7	13,24	-0,548	0,002
ATCG00800	RPS3	11,42	12,23	-0,814	0	10,89	12,21	-1,324	0	11,08	11,62	-0,539	0,004
AT5G54490	PBP1 (PINOID-BINDING PROTEIN 1); calcium ion binding	9,64	9,02	0,616	0,04	9,7	10,47	-0,771	0	9,64	10,16	-0,52	0,01
AT3G28270	unknown protein	11,37	12,07	-0,695	0,002	13,29	12,76	0,539	0,01	13,13	13,64	-0,513	0,01
AT4G16515	unknown protein	9,23	10,7	-1,467	0	9,75	10,77	-1,017	0	9,19	9,7	-0,508	0,02
AT3G09922	unknown protein	7,87	8,61	-0,741	0,0002	7,86	8,56	-0,697	0	8,04	8,54	-0,498	0,03
AT1G52340	ABA2 (ABA DEFICIENT 2); oxidoreductase	10,01	10,72	-0,718	0,0006	10,47	11,04	-0,576	0,002	10,26	10,75	-0,496	0,03
ATCG00720	PETB PETD	11,41	12,08	-0,677	0,004	10,59	11,11	-0,52	0,03	10,04	10,54	-0,496	0,03
ATCG00730													
AT1G65820	glutathione transferase	12,17	11,55	0,619	0,04	12,93	12,42	0,513	0,04	12,44	11,95	0,492	0,04
AT1G07240	UDP-glycosyltransferase/ transferase, transferring glycosyl groups	10,95	9,84	1,115	0	11,26	10,52	0,748	0	10,88	10,39	0,494	0,04
AT3G48140	unknown protein	13,86	13,2	0,664	0,006	14,34	13,81	0,533	0,02	13,94	13,44	0,498	0,03
AT5G20230	ATBCB (ARABIDOPSIS BLUE-COPPER-BINDING PROTEIN); copper ion binding / electron transporter	12,79	11,47	1,316	0	12,82	12,14	0,682	0	13,14	12,64	0,499	0,03
AT1G32790	CID11; RNA binding	12,04	11,41	0,628	0,03	12,52	11,83	0,687	0	12,35	11,85	0,5	0,03
AT1G28680	transferase	9,55	8,89	0,66	0,007	10,01	9,46	0,552	0,007	9,77	9,27	0,501	0,03
AT4G18930	cyclic-nucleotide phosphodiesterase	9,44	8,79	0,645	0,01	10	9,36	0,647	0	10,12	9,61	0,502	0,03
AT1G33560	ADR1 (ACTIVATED DISEASE RESISTANCE 1)	10,15	9,21	0,939	0	10,62	9,93	0,691	0	10,31	9,81	0,503	0,02
AT5G04330	heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding	8,82	8,08	0,738	0,0003	9,07	8,36	0,711	0	8,79	8,29	0,507	0,02
AT3G12170	heat shock protein binding / unfolded protein binding	9,81	8,98	0,823	0	9,97	8,83	1,143	0	9,89	9,38	0,513	0,02
AT2G40140	transcription factor	11,14	9,74	1,397	0	11,27	10,41	0,854	0	11,19	10,67	0,519	0,01
AT5G13710	SMT1 (STEROL METHYLTRANSFERASE 1)	13,47	12,85	0,618	0,04	13,59	12,98	0,604	0,0005	13,54	13,02	0,52	0,01
AT3G59700	ATHLECRK (ARABIDOPSIS THALIANA LECTIN-RECEPTOR KINASE); kinase	8,77	8,01	0,757	0,0001	8,97	8,3	0,664	0	9,15	8,63	0,524	0,009
AT2G38110	ATGPAT6/GPAT6; 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase/ acyltransferase	8,49	7,7	0,793	0	8,93	8,21	0,721	0	8,63	8,1	0,525	0,008

AT2G44370	unknown protein	9,23	8,26	0,967	0	9,45	8,81	0,631	0,0001	9,37	8,84	0,526	0,008
AT4G39675	unknown protein	9,4	8,22	1,178	0	9,41	8,38	1,027	0	9,08	8,55	0,526	0,008
AT2G34320	unknown protein	8,65	8	0,648	0,01	8,95	8,24	0,706	0	8,86	8,33	0,527	0,007
AT1G20900	ESC (ESCAROLA)	9,18	8,39	0,795	0	9,6	9,08	0,518	0,03	9,74	9,21	0,528	0,007
AT3G16440	ATMLP-300B (MYROSINASE-BINDING PROTEIN-LIKE PROTEIN-300B)	10,36	8,9	1,452	0	10,7	10,05	0,643	0,0001	10,16	9,62	0,534	0,005
AT5G11110	unknown protein	9,51	8,72	0,787	0	9,98	9,28	0,702	0	9,42	8,89	0,534	0,005
AT1G49900	nucleic acid binding / transcription factor/ zinc ion binding	9,14	8,38	0,753	0,0001	9,21	8,64	0,566	0,003	8,8	8,26	0,536	0,004
AT5G19970	unknown protein	10,13	9,11	1,022	0	10,26	9,49	0,771	0	10,05	9,51	0,537	0,004
AT5G62920	ARR6 (RESPONSE REGULATOR 6); transcription regulator/ two-component response regulator	9,42	8,77	0,651	0,01	9,77	9,08	0,69	0	9,6	9,05	0,542	0,003
AT2G14796	unknown protein	8,96	7,92	1,042	0	8,95	8,24	0,711	0	8,43	7,89	0,543	0,003
AT1G74790	unknown protein	9,92	9,19	0,724	0,0005	10,31	9,37	0,934	0	10,21	9,67	0,544	0,003
AT4G25580	unknown protein	9,37	8,24	1,131	0	9,21	8,62	0,594	0,0008	9,43	8,89	0,546	0,003
AT1G55120	ATFRUCT5 (BETA-FRUCTOFURANOSIDASE 5); hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	9,21	8,42	0,781	0	9,33	8,64	0,695	0	9,05	8,5	0,553	0,002
AT2G20290	XIG; motor/ protein binding	9,25	8,5	0,757	0,0001	9,35	8,4	0,95	0	8,66	8,11	0,555	0,002
AT1G12010	unknown protein	9,19	8,44	0,745	0,0002	9,39	8,75	0,645	0	9,57	9,01	0,558	0,001
AT5G20330	BETAG4; hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	10,95	10,29	0,652	0,01	11,2	10,57	0,634	0,0001	11,03	10,47	0,56	0,001
AT5G11670	malic enzyme/ oxidoreductase, acting on NADH or NADPH, NAD or NADP as acceptor	13,76	12,56	1,2	0	13,68	12,82	0,867	0	13,59	13,03	0,562	0,001
AT5G36880	catalytic	12,34	11,56	0,781	0	12,52	12,01	0,509	0,05	12,69	12,13	0,564	0,001
AT3G07000	protein binding / zinc ion binding	8,63	7,97	0,654	0,01	8,91	8,35	0,564	0,004	8,82	8,26	0,564	0,001
AT5G35200	binding	12,36	11,74	0,619	0,04	12,38	11,77	0,607	0,0004	12,53	11,97	0,567	0,0009
AT2G37110	unknown protein	12,14	11,33	0,816	0	12,27	11,66	0,615	0,0002	12,63	12,06	0,567	0,0009
AT4G02380	SAG21 (SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 21)	13,49	12,61	0,877	0	14,19	12,63	1,55	0	13,36	12,8	0,568	0,0008
AT2G39530	unknown protein	8,31	7,45	0,861	0	8,65	7,97	0,684	0	8,68	8,11	0,571	0,0007
AT1G66880	ATP binding / protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase	9,9	8,85	1,047	0	9,99	9,48	0,513	0,04	9,83	9,26	0,575	0,0006
AT2G27550	ATC (ARABIDOPSIS THALIANA CENTRORADIALIS); phosphatidylethanolamine binding	9,91	8,49	1,411	0	10,42	9,47	0,942	0	10,43	9,85	0,575	0,0006
AT1G29050	unknown protein	11,35	10,36	0,993	0	11,5	10,32	1,174	0	11,55	10,97	0,579	0,0004
AT3G15660	electron transporter	10,69	10,08	0,61	0,05	11	10,39	0,617	0,0002	11	10,42	0,58	0,0004
AT5G17380	pyruvate decarboxylase	12,89	11,96	0,927	0	13,34	12,32	1,021	0	13,18	12,6	0,582	0,0004
AT3G43835	unknown protein	10,99	9,94	1,044	0	11,55	10,22	1,336	0	11,22	10,63	0,583	0,0004
AT3G54580	structural constituent of cell wall	10,21	8,54	1,669	0	11,01	9,95	1,067	0	10,05	9,47	0,584	0,0003
AT4G28400	catalytic/ protein phosphatase type 2C	9,71	8,95	0,752	0,0001	10,17	9,49	0,684	0	10,07	9,48	0,588	0,0003
AT4G28405	unknown protein												
AT5G66280	GMD1 (GDP-D-MANNOSE 4,6-DEHYDRATASE 1); GDP-mannose 4,6-dehydratase/ NAD binding / catalytic	9,17	7,93	1,242	0	9,2	8,52	0,684	0	8,55	7,96	0,589	0,0003
AT4G25110	caspase	9,7	8,77	0,935	0	9,86	8,81	1,045	0	9,8	9,21	0,589	0,0002
AT3G01970	WRKY45; transcription factor	9,87	9,15	0,72	0,0006	10,44	9,4	1,048	0	10,84	10,25	0,59	0,0002
AT5G45220	transmembrane receptor	8,25	7,57	0,683	0,003	8,14	7,63	0,508	0,05	8,35	7,76	0,593	0,0002
AT3G52080	monovalent cation:proton antiporter	9,19	7,97	1,221	0	9,26	8,39	0,87	0	8,67	8,07	0,594	0,0002
AT3G51240	F3H (TRANSPARENT TESTA 6); naringenin 3-dioxygenase	9,9	8,74	1,159	0	10,61	9,75	0,861	0	10,03	9,44	0,595	0,0002
AT3G56970	ORG2; DNA binding / transcription factor	10,17	9,08	1,086	0	10,64	8,84	1,805	0	9,6	9	0,597	0,0002
AT1G56660	unknown protein	9,86	8,56	1,291	0	10,12	9,52	0,604	0,0004	10,06	9,46	0,598	0,0001

AT1G62810	copper ion binding	10,2	9,4	0,797	0	10,97	10,06	0,903	0	11,37	10,77	0,598	0,0002
AT5G59090	peptidase/ subtilase	9,33	7,72	1,616	0	9,78	8,68	1,101	0	9,09	8,5	0,598	0,0002
AT2G17420	NTRA	11,76	11,02	0,742	0,0002	11,85	11,29	0,557	0,005	11,82	11,22	0,601	0,0001
AT5G28830	calcium ion binding	9,78	9,13	0,643	0,02	10	9,25	0,752	0	10,35	9,74	0,603	0,0001
AT3G15356	carbohydrate binding	12,22	11,13	1,099	0	12,44	10,77	1,674	0	12,49	11,89	0,603	0,0001
AT3G20910	transcription factor	10,85	10,14	0,711	0,0009	10,91	10,39	0,526	0,02	11,02	10,42	0,604	0,0001
AT5G06610	unknown protein	8,37	7,75	0,614	0,05	8,76	7,96	0,795	0	8,48	7,87	0,607	0,0001
AT2G25520	organic anion transporter	11,32	10,58	0,741	0,0002	11,24	10,67	0,563	0,004	10,98	10,37	0,609	0,0001
AT4G14365	protein binding / ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding	10,23	9,02	1,201	0	10,58	9,39	1,184	0	10,72	10,11	0,61	0,0001
AT4G36670	carbohydrate transporter/ sugar porter	12,89	11,67	1,216	0	13,14	11,91	1,23	0	13,22	12,6	0,611	0,0001
AT2G31560	unknown protein	13,29	12,4	0,89	0	14,03	13,19	0,845	0	13,57	12,96	0,613	0,0001
AT1G21670	unknown protein	11,16	10,17	0,988	0	11,61	10,45	1,161	0	11,16	10,55	0,613	0,0001
AT1G65060	4CL3; 4-coumarate-CoA ligase	9,3	8,4	0,907	0	9,52	8,71	0,812	0	8,95	8,33	0,617	0
AT1G34090	unknown protein	8,32	7,4	0,922	0	8,35	7,68	0,671	0	8,12	7,5	0,619	0
AT2G36470	unknown protein	9,25	8,53	0,726	0,0004	9,44	8,55	0,897	0	9,01	8,37	0,64	0
AT4G16563	pepsin A	11,74	10,3	1,436	0	12,17	11,61	0,562	0,004	11,77	11,13	0,642	0
AT1G02000	GAE2 (UDP-D-GLUCURONATE 4- EPIMERASE 2); NAD binding / catalytic	9,7	8,91	0,787	0	10,12	9,22	0,906	0	9,5	8,86	0,643	0
AT1G72060	serine-type endopeptidase inhibitor heat	12,51	11,57	0,936	0	12,88	11,59	1,29	0	12,84	12,19	0,644	0
AT1G72070	shock protein binding / unfolded protein binding												
AT3G19390	cysteine-type endopeptidase/ cysteine-type peptidase	9,88	8,76	1,113	0	10,01	9,22	0,781	0	10,25	9,61	0,646	0
AT4G16745	unknown protein	9,86	8,57	1,289	0	10,16	8,59	1,565	0	9,32	8,67	0,646	0
AT5G67530	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase/ ubiquitin-protein ligase	10,65	9,28	1,369	0	10,7	9,65	1,053	0	10,72	10,08	0,649	0
AT1G09970	ATP binding / kinase/ protein serine/threonine kinase	12,46	11,21	1,25	0	12,8	11,63	1,178	0	12,42	11,77	0,65	0
AT1G73800	calmodulin binding	8,45	7,58	0,876	0	8,51	7,71	0,804	0	8,55	7,9	0,654	0
AT4G02570	ATCUL1 (CULLIN 1)	13,07	12,32	0,753	0,0001	13,39	12,6	0,788	0	12,79	12,13	0,655	0
AT3G09740	SYF71 (SYNTAXIN OF PLANTS 71)	11,46	10,5	0,961	0	11,9	11,05	0,847	0	11,56	10,9	0,656	0
AT5G14180	carboxylic ester hydrolase/ catalytic	12,11	10,86	1,247	0	12,28	11,12	1,158	0	12,84	12,18	0,662	0
AT4G32150	VAMP7C (VESICLE-ASSOCIATED MEMBRANE PROTEIN 7C)	11,02	9,89	1,129	0	12,01	11,09	0,918	0	11,63	10,95	0,674	0
AT4G27710	CYP709B3; heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding	11,51	10,9	0,616	0,04	12,25	11,3	0,949	0	12,15	11,47	0,675	0
AT4G12300	CYP706A4; heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding	9,48	8,77	0,707	0,001	10,24	8,91	1,333	0	9,5	8,82	0,676	0
AT1G19640	JMT (JASMONIC ACID CARBOXYL METHYLTRANSFERASE); jasmonate O- methyltransferase	9,35	8,47	0,879	0	9,72	9,08	0,639	0,0001	9,64	8,95	0,682	0
AT4G39260	ATGRP8 (GLYCINE-RICH PROTEIN 8); RNA binding / nucleic acid binding	14,2	13,5	0,706	0,001	14,56	13,89	0,673	0	14,51	13,82	0,686	0
AT3G13950	unknown protein	8,75	7,96	0,798	0	8,86	8,16	0,701	0	8,96	8,27	0,691	0
AT5G41040	transferase	8,75	7,88	0,872	0	9,5	8,74	0,759	0	8,97	8,27	0,699	0
AT2G41240	DNA binding / transcription factor	10,77	9,27	1,507	0	11,13	8,99	2,142	0	9,88	9,18	0,703	0
AT4G34590	GBF6; DNA binding / transcription factor	9,04	8,4	0,642	0,02	9,59	9,06	0,533	0,02	9,48	8,78	0,707	0
AT1G64660	catalytic	11,77	10,77	0,997	0	12,21	11,04	1,167	0	12,28	11,57	0,707	0
AT5G39670	calcium ion binding EMB2744	8,7	7,77	0,928	0	9,16	8,52	0,648	0	9,19	8,49	0,708	0
AT5G39680													
AT1G56680	chitin binding / chitinase	8,61	7,62	0,996	0	8,87	8,21	0,658	0	8,52	7,81	0,708	0
AT4G24690	zinc ion binding	11,99	11,22	0,762	0,0001	12,45	11,67	0,78	0	12,33	11,62	0,708	0
AT3G54150	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase	8,25	7,62	0,638	0,02	8,61	7,89	0,725	0	8,66	7,95	0,712	0
AT5G58375	unknown protein	12,4	11,52	0,879	0	12,88	12,01	0,872	0	12,92	12,2	0,719	0
AT1G28590	carboxylic ester hydrolase/ hydrolase, acting	9,86	8,92	0,948	0	10,27	9,32	0,951	0	10,31	9,59	0,719	0

	on ester bonds												
AT4G26920	unknown protein	11,83	10,64	1,197	0	12,19	11,6	0,591	0,0009	12,07	11,34	0,726	0
AT4G33355	lipid binding unknown protein	11,52	10,51	1,007	0	12,01	11,26	0,745	0	11,96	11,24	0,726	0
AT4G33360													
AT5G58820	subtilase	10,54	8,78	1,762	0	10,4	9,2	1,205	0	10,14	9,41	0,731	0
AT2G30490	ATC4H (CINNAMATE-4-HYDROXYLASE)	12,63	11,95	0,682	0,003	13,13	12,49	0,632	0,0001	13,3	12,57	0,734	0
AT5G18310	unknown protein	9,35	8,42	0,931	0	9,76	9,06	0,695	0	9,71	8,96	0,753	0
AT5G24530	oxidoreductase, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen, 2-oxoglutarate as one donor, and incorporation of one atom each of oxygen into both donors	10,09	9,04	1,051	0	9,88	9,26	0,622	0,0002	9,81	9,06	0,755	0
AT1G53645	unknown protein	10,64	10,02	0,626	0,03	11,15	10,5	0,651	0	10,71	9,96	0,755	0
AT3G01720	unknown protein	10,82	9,64	1,183	0	11,18	10,39	0,789	0	10,92	10,15	0,768	0
AT4G31800	WRKY18; transcription factor	11	9,34	1,666	0	11,55	10,68	0,87	0	11,64	10,87	0,77	0
AT1G36060	DNA binding / transcription factor	9,33	8,43	0,895	0	9,6	9,03	0,563	0,004	9,32	8,55	0,771	0
AT3G63010	catalytic	9,47	8,7	0,771	0,0001	9,5	8,82	0,68	0	9,91	9,13	0,776	0
AT3G20340	unknown protein	10,22	9,02	1,199	0	9,86	9,21	0,648	0	10,69	9,91	0,781	0
AT3G04070	ANAC047; transcription factor	9,59	8,38	1,206	0	9,72	8,87	0,844	0	9,95	9,17	0,783	0
AT1G74030	phosphopyruvate hydratase	10,46	9,57	0,889	0	10,77	10,18	0,586	0,001	10,04	9,26	0,786	0
AT5G41670	phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating)	11,01	10,28	0,737	0,0003	11,27	10,4	0,868	0	11,32	10,52	0,798	0
AT1G76070	unknown protein	9,62	8,84	0,786	0	9,95	9,18	0,772	0	10,02	9,22	0,8	0
AT5G09440	unknown protein	12,53	11,16	1,371	0	12,89	11,65	1,242	0	12,68	11,88	0,801	0
AT1G10070	branched-chain-amino-acid transaminase/	12,75	11,41	1,337	0	12,07	11,1	0,971	0	12,98	12,17	0,806	0
AT1G10090	catalytic unknown protein												
AT5G37740	unknown protein	9,77	8,67	1,1	0	10,47	9,71	0,758	0	10,07	9,26	0,808	0
AT2G04038	DNA binding / transcription factor	9,98	8,87	1,109	0	10,28	9,11	1,168	0	10,14	9,33	0,809	0
AT5G54960	PDC2 (PYRUVATE DECARBOXYLASE-2); pyruvate decarboxylase	11,47	10,44	1,031	0	11,75	10,53	1,219	0	11,84	11,03	0,817	0
AT5G62790	DXR (1-DEOXY-D-XYLULOSE 5-PHOSPHATE REDUCTOISOMERASE)	9,41	8,26	1,15	0	9,25	8,13	1,125	0	8,86	8,04	0,82	0
AT3G01820	ATP binding / nucleotide kinase	10,95	9,74	1,213	0	11,24	10,23	1,019	0	9,95	9,13	0,822	0
AT3G54420	APEP3; chitinase	9,45	8,3	1,141	0	9,7	9,19	0,515	0,04	9,52	8,7	0,826	0
AT5G25450	ubiquinol-cytochrome-c reductase	9,39	8,53	0,864	0	9,88	9,31	0,568	0,003	10,36	9,54	0,826	0
AT1G15030	unknown protein unknown protein	11,31	9,26	2,053	0	10,42	9,61	0,812	0	11,34	10,5	0,836	0
AT1G15040													
AT3G14990	catalytic	12,6	11,83	0,768	0,0001	12,72	11,95	0,775	0	13,27	12,42	0,842	0
AT1G03850	electron transporter/ thiol-disulfide exchange intermediate	12	10,63	1,362	0	11,96	11,28	0,684	0	12,29	11,44	0,849	0
AT3G15520	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	9,16	8,17	0,986	0	9,4	8,52	0,88	0	9,5	8,63	0,868	0
AT2G26440	enzyme inhibitor/ pectinesterase	10,22	8,81	1,409	0	10,32	8,9	1,419	0	9,95	9,08	0,869	0
AT2G47860	signal transducer	10,31	9,07	1,239	0	10,61	9,74	0,875	0	10,32	9,44	0,873	0
AT3G23250	DNA binding	8,83	8,22	0,612	0,05	9,6	8,78	0,812	0	9,88	9	0,876	0
AT1G08940	catalytic	9,5	8,65	0,859	0	9,9	8,87	1,028	0	9,95	9,06	0,884	0
AT5G11190	DNA binding / transcription factor	8,82	7,85	0,971	0	9,53	8,39	1,145	0	9,19	8,3	0,891	0
AT5G44920	transmembrane receptor catalytic	9,55	8,59	0,958	0	10,09	9,4	0,689	0	9,96	9,07	0,892	0
AT5G44930													
AT4G27730	ATOPT6; oligopeptide transporter	9,5	8,62	0,874	0	9,34	8,64	0,695	0	9,58	8,69	0,896	0
AT5G03910	ATATH12; ATPase, coupled to transmembrane movement of substances	9,44	8,48	0,961	0	9,66	8,76	0,891	0	9,56	8,67	0,897	0
AT1G62420	unknown protein	11,29	9,2	2,095	0	11,75	9,53	2,227	0	11,07	10,18	0,899	0
AT3G30720	unknown protein	9,62	8,44	1,182	0	9,74	8,99	0,748	0	9,44	8,54	0,901	0
AT3G10400	RNA binding / nucleic acid binding	10,03	9,13	0,905	0	10,71	9,75	0,964	0	10,59	9,69	0,901	0
AT3G18250	unknown protein	9,07	8,23	0,843	0	9,13	8,38	0,749	0	9,06	8,16	0,905	0
AT4G36010	unknown protein	10,57	9,2	1,365	0	10,95	10,03	0,929	0	11	10,09	0,908	0

AT1G28580	carboxylic ester hydrolase/ hydrolase, acting on ester bonds / lipase	12,33	11	1,339	0	12,63	11,31	1,313	0	12,66	11,75	0,909	0
AT2G29720	monooxygenase/ oxidoreductase	9,93	9,02	0,913	0	10,36	9,4	0,963	0	10,29	9,38	0,912	0
AT3G23560	ALF5 (ABERRANT LATERAL ROOT FORMATION 5); antiporter/ drug transporter/ transporter	11,25	9,71	1,545	0	11,44	9,89	1,542	0	11,46	10,55	0,913	0
AT2G26290	ATP binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase	9,58	8,47	1,115	0	9,78	9,06	0,715	0	9,9	8,98	0,927	0
AT5G27845	unknown protein	10,87	8,64	2,231	0	10,57	8,98	1,588	0	10,24	9,31	0,929	0
AT4G31500	CYP83B1 (CYTOCHROME P450 MONOOXYGENASE 83B1); oxygen binding	12,45	11,47	0,982	0	13,12	12,32	0,805	0	12,69	11,75	0,932	0
AT1G79530	NAD binding / glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating)/ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	11,4	10,21	1,191	0	11,95	11,38	0,575	0,002	11,82	10,89	0,933	0
AT4G28088	unknown protein	9,16	7,5	1,652	0	9,15	7,99	1,156	0	8,74	7,8	0,937	0
AT1G05710	transcription factor	10,29	8,93	1,358	0	10,57	9,62	0,945	0	10,61	9,67	0,94	0
AT5G27760	unknown protein	10,74	10,02	0,72	0,0006	11,56	10,65	0,913	0	11,53	10,58	0,946	0
AT4G33070	pyruvate decarboxylase	9,04	8,14	0,902	0	9,64	8,78	0,857	0	9,49	8,54	0,947	0
AT3G23120	kinase/ protein binding	9,5	8,29	1,209	0	9,16	8,55	0,609	0,0003	9,49	8,53	0,963	0
AT3G62780	unknown protein	9,32	8,05	1,269	0	9,77	9,11	0,657	0	9,39	8,42	0,967	0
AT4G30290	ATXTH19; hydrolase, acting on glycosyl bonds / hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	10,17	9	1,169	0	11,02	10,39	0,636	0,0001	11,54	10,57	0,971	0
AT4G13180	oxidoreductase	12,37	10,92	1,448	0	12,45	11,25	1,205	0	12,74	11,76	0,975	0
AT4G15910	ATDI21	12,03	10,97	1,062	0	12,74	11,6	1,139	0	12,7	11,72	0,976	0
AT2G47630	catalytic/ hydrolase	10,67	9,83	0,838	0	11	10,12	0,884	0	10,78	9,8	0,978	0
AT3G46300	unknown protein	9,53	8,53	1,005	0	9,82	9,04	0,784	0	9,55	8,57	0,979	0
AT3G51660	unknown protein	10,48	9,1	1,378	0	11,09	9,02	2,074	0	10,72	9,74	0,981	0
AT1G15380	lactoylglutathione lyase	12,83	10,82	2,013	0	12,96	11,69	1,265	0	13,06	12,07	0,985	0
AT5G13080	WRKY75; transcription factor	8,94	7,98	0,962	0	9,48	8,56	0,926	0	9,68	8,7	0,988	0
AT5G65020	ANNAT2; calcium ion binding / calcium-dependent phospholipid binding	10,88	9,9	0,979	0	11,64	10,74	0,902	0	11,25	10,27	0,989	0
AT4G13660	unknown protein	9,72	8,5	1,221	0	9,74	9,04	0,708	0	9,79	8,8	0,993	0
AT5G60350	unknown protein	8,65	7,83	0,819	0	8,71	7,96	0,752	0	8,81	7,8	1,005	0
AT4G39270	ATP binding / protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase	9,77	8,29	1,489	0	10,09	8,79	1,291	0	9,2	8,19	1,008	0
AT1G74000	SS3 (STRICTOSIDINE SYNTHASE 3)	9,82	8,29	1,53	0	9,37	8,36	1,01	0	9,43	8,42	1,011	0
AT5G26690	metal ion binding	8,99	8,08	0,905	0	8,88	8,2	0,682	0	9,43	8,4	1,023	0
AT4G14130	XTR7 (XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE 7); hydrolase, acting on glycosyl bonds / hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	11,69	10,21	1,489	0	12,1	11,26	0,832	0	11,9	10,88	1,023	0
AT4G34950	unknown protein	11,14	9,9	1,238	0	11,73	10,39	1,337	0	11,97	10,95	1,024	0
AT5G26340	MSS1; carbohydrate transporter/ sugar porter	10,23	9,15	1,079	0	10,53	9,46	1,072	0	11,06	10,04	1,025	0
AT1G14880	unknown protein	9,48	8,06	1,425	0	9,29	8,46	0,828	0	9,54	8,51	1,036	0
AT2G38860	YLS5	9,35	8,35	0,998	0	9,9	9	0,904	0	9,53	8,49	1,042	0
AT5G24030	transporter	12,64	10,49	2,155	0	13,17	12,22	0,95	0	13,32	12,28	1,043	0
AT3G01830	calcium ion binding ATP binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase	9,44	7,87	1,565	0	9,27	8,27	1,005	0	8,88	7,84	1,043	0
AT2G23900	polygalacturonase	11,09	10,07	1,017	0	10,87	9,78	1,09	0	10,68	9,6	1,074	0
AT3G18280	lipid binding	11,37	10,49	0,875	0	12,57	11,19	1,381	0	12,09	11,01	1,083	0

AT2G36120	unknown protein	13,97	13,27	0,702	0,001	14,72	13,74	0,982	0	14,33	13,25	1,086	0
		8,99	7,66	1,324	0	8,78	7,68	1,097	0	8,71	7,62	1,093	0
AT1G74020	SS2 (STRICTOSIDINE SYNTHASE 2); strictosidine synthase	9,66	8,13	1,533	0	9,48	8,52	0,965	0	9,51	8,41	1,103	0
AT1G64740	TUA1 (ALPHA-1 TUBULIN)	11,92	10,32	1,598	0	11,75	10,34	1,413	0	11,74	10,63	1,106	0
AT2G29750	UDP-glycosyltransferase/ transferase, transferring glycosyl groups	11,15	9,73	1,423	0	11,88	9,6	2,283	0	12,34	11,22	1,123	0
AT5G06500	DNA binding / transcription factor	9,11	8,16	0,952	0	9,27	8,4	0,865	0	9,14	8,02	1,125	0
AT2G15490	UDP-glycosyltransferase	11,69	10,12	1,564	0	11,77	10,75	1,017	0	12,23	11,1	1,13	0
AT1G77380	AAP3; amino acid permease	9,79	8,7	1,093	0	10,28	9,28	0,997	0	10,6	9,46	1,134	0
AT4G25200	ATHSP23.6-MITO (MITOCHONDRION- LOCALIZED SMALL HEAT SHOCK PROTEIN 23.6)	8,8	7,91	0,892	0	8,87	8,04	0,826	0	9,07	7,93	1,139	0
AT4G01830	ATPase, coupled to transmembrane movement of substances	10,12	8,77	1,343	0	10,12	9,29	0,825	0	9,75	8,61	1,144	0
AT5G15880 AT5G15890	unknown protein unknown protein	9,12	7,82	1,299	0	9,46	8,17	1,29	0	9,09	7,94	1,146	0
AT1G21520	unknown protein	9,02	8,18	0,832	0	9,79	8,99	0,8	0	10,08	8,93	1,148	0
		9,47	8,23	1,241	0	9,61	8,22	1,385	0	9,22	8,06	1,156	0
AT5G13330	DNA binding / transcription factor	9,35	8,21	1,142	0	10,26	9,3	0,963	0	9,91	8,75	1,161	0
AT2G14900	unknown protein	12,02	10,64	1,373	0	12,29	10,93	1,358	0	12,09	10,92	1,165	0
AT5G42830	transferase	10	8,24	1,756	0	9,93	8,56	1,376	0	9,9	8,73	1,166	0
AT2G38870	serine-type endopeptidase inhibitor	12,38	11,17	1,213	0	12,79	11,94	0,852	0	12,82	11,66	1,167	0
AT1G27670	unknown protein	10,78	9	1,779	0	10,71	9,49	1,222	0	10,55	9,38	1,173	0
AT3G50410	OBP1; DNA binding / transcription factor	10,08	8,91	1,169	0	10,11	9,39	0,723	0	10,08	8,89	1,196	0
AT2G37130	peroxidase	12,25	10,31	1,942	0	12,42	10,97	1,448	0	12,46	11,26	1,196	0
AT5G13880	unknown protein	9,21	7,95	1,266	0	9,32	8,09	1,231	0	9,07	7,86	1,209	0
AT5G19550	ASP2 (ASPARTATE AMINOTRANSFERASE 2)	13,28	11,93	1,35	0	13,15	11,91	1,235	0	12,92	11,71	1,214	0
AT5G09420	amidase	9,72	8,28	1,44	0	9,61	8,31	1,302	0	9,32	8,11	1,215	0
AT2G35980	YLS9 (YELLOW-LEAF-SPECIFIC GENE 9)	9,51	7,5	2,012	0	9,54	8,29	1,247	0	9,2	7,98	1,218	0
AT4G37295	unknown protein	11,09	9,26	1,83	0	11,09	9,53	1,561	0	11,06	9,84	1,225	0
AT1G74710	ICS1 (ISOCHORISMATE SYNTHASE1); isochorismate synthase	9,69	8,99	0,695	0,002	10,33	9,35	0,979	0	10,16	8,93	1,234	0
AT1G33700	unknown protein	9,6	7,92	1,676	0	9,62	8,07	1,555	0	9,42	8,18	1,242	0
AT3G50930	ATP binding / ATPase/ nucleoside- triphosphatase/ nucleotide binding	9,54	7,9	1,631	0	9,81	8,48	1,33	0	9,87	8,63	1,249	0
AT3G11340	UDP-glycosyltransferase/ transferase, transferring hexosyl groups	9,52	8,16	1,36	0	9,95	9,1	0,859	0	10,28	9,02	1,255	0
AT2G41260	M17	12,62	11,19	1,433	0	13,29	11,17	2,12	0	12,93	11,68	1,259	0
AT2G34500	CYP710A1; heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding	9,68	8,44	1,237	0	10,07	9,06	1,016	0	10,52	9,26	1,263	0
AT2G43590	chitin binding / chitinase	8,98	8,15	0,831	0	9,06	8,51	0,551	0,007	9,55	8,28	1,264	0
AT4G37530	peroxidase	11,24	9,72	1,526	0	11,59	10,03	1,557	0	11,74	10,46	1,274	0
AT1G05540	unknown protein	10,1	8,77	1,325	0	10,21	9,03	1,181	0	9,72	8,42	1,302	0
AT2G18193	ATP binding / ATPase/ nucleoside- triphosphatase/ nucleotide binding	8,85	8,03	0,828	0	8,96	8,24	0,724	0	9,54	8,21	1,329	0
AT1G19530	unknown protein	10,07	9,08	0,991	0	10,61	9,6	1,013	0	10,89	9,56	1,33	0
AT1G75040	PR5 (PATHOGENESIS-RELATED GENE 5)	10,2	8,42	1,777	0	11,08	8,62	2,465	0	9,89	8,55	1,336	0
AT4G16260	hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	9,59	8,29	1,302	0	10,06	9,36	0,702	0	10	8,66	1,341	0
AT1G19610	LCR78/PDF1.4	10,63	9,22	1,405	0	11,49	9,64	1,854	0	11,68	10,33	1,352	0
AT1G03880	CRU2 (CRUCIFERIN 2); nutrient reservoir	9,32	8,1	1,213	0	9,43	8,03	1,399	0	9,67	8,31	1,356	0
AT3G57010	strictosidine synthase	10,92	8,93	1,988	0	11,37	9,75	1,616	0	10,96	9,6	1,358	0
AT3G21720	catalytic/ isocitrate lyase	9,07	8,03	1,038	0	9,27	8,3	0,961	0	9,47	8,11	1,362	0

AT2G43510	ATT11	11,62	10,67	0,957	0	12,93	11,01	1,924	0	13,28	11,88	1,401	0
AT5G20240	PI (PISTILLATA); DNA binding / transcription factor	11,79	9,01	2,775	0	11,17	8,91	2,257	0	11,67	10,23	1,433	0
AT4G22470	lipid binding	11,42	9,28	2,139	0	12,46	10,23	2,232	0	13,1	11,64	1,46	0
AT2G26560	nutrient reservoir	10,19	8,64	1,546	0	10,3	8,46	1,845	0	10,41	8,93	1,482	0
AT2G25650	transcription regulator	9,85	8,6	1,251	0	9,91	8,81	1,101	0	10,2	8,71	1,484	0
AT1G21540	catalytic	10,19	8,45	1,737	0	9,96	8,22	1,739	0	9,77	8,29	1,486	0
AT3G46220	unknown protein ATHSP17.4	10,61	8,82	1,785	0	11,02	10,24	0,779	0	12,1	10,62	1,487	0
AT3G46230													
AT4G28190	ULT1 (ULTRAPETALA1); DNA binding	11,19	9,2	1,994	0	11,06	9,65	1,411	0	11	9,5	1,495	0
AT2G25510	unknown protein	13,89	11,96	1,934	0	13,56	12,86	0,692	0	13,16	11,66	1,498	0
AT1G67330	unknown protein	9,99	8,03	1,96	0	10,75	8,94	1,817	0	9,93	8,43	1,498	0
AT5G13420	transaldolase	12,09	10,11	1,982	0	12,36	10,68	1,683	0	12,29	10,76	1,525	0
AT4G15610	unknown protein	11,45	9,61	1,836	0	11,4	10,4	1,003	0	12,1	10,57	1,526	0
AT1G07400	unknown protein	8,97	8,04	0,926	0	9,12	8,56	0,555	0,006	10,28	8,75	1,527	0
AT2G21640	unknown protein	10,23	9,12	1,101	0	10,54	9,03	1,51	0	11,23	9,7	1,53	0
AT3G23550	antiporter/ drug transporter/ transporter	11,34	9,14	2,201	0	11,8	8,97	2,834	0	11,36	9,78	1,582	0
AT4G02520	ATGSTF2; glutathione transferase	14,05	12,32	1,728	0	14,24	12,71	1,533	0	14,39	12,8	1,583	0
AT2G18680	unknown protein	10,68	9,04	1,637	0	10,83	9,64	1,188	0	11,43	9,8	1,626	0
AT5G16360	unknown protein	9,97	8,09	1,882	0	10,2	8,44	1,76	0	9,89	8,27	1,627	0
AT3G28210	PMZ	9,91	8,68	1,228	0	9,88	9,17	0,713	0	11,32	9,61	1,708	0
AT2G43610	chitin binding / chitinase	12,11	9,41	2,696	0	12,08	11,02	1,058	0	12,21	10,47	1,74	0
AT1G13330	unknown protein unknown protein	10,4	8,99	1,407	0	10,77	9,28	1,484	0	11,14	9,35	1,791	0
AT1G13340													
AT4G30910	aminopeptidase	13,02	10,71	2,306	0	13,34	11,12	2,219	0	12,98	11,12	1,858	0
AT1G34080	unknown protein	10,43	7,71	2,72	0	10,19	7,61	2,58	0	9,3	7,39	1,904	0
AT1G73260	endopeptidase inhibitor	14,36	11,92	2,446	0	14,36	13,22	1,139	0	14,85	12,89	1,963	0
AT3G22840	ELIPI (EARLY LIGHT-INDUCIBLE PROTEIN); chlorophyll binding	11,92	8,89	3,035	0	11,87	9,47	2,392	0	11,13	9,14	1,986	0
AT2G43620	chitin binding / chitinase	11,02	8,65	2,365	0	11,71	9,18	2,537	0	12,04	10	2,041	0
AT3G60140	DIN2 (DARK INDUCIBLE 2); hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	9,82	8,75	1,07	0	9,73	8,4	1,329	0	11,77	9,72	2,048	0
AT1G58340	ZF14; antiporter/ drug transporter/ transporter	11,73	8,85	2,886	0	11,29	9,37	1,919	0	11,12	9,05	2,069	0
AT3G50260	DNA binding / transcription factor	11,6	8,98	2,622	0	11,78	9,43	2,355	0	11,77	9,62	2,147	0
AT1G69880	electron transporter/ thiol-disulfide exchange intermediate	9,06	8,29	0,774	0	10,54	8,51	2,028	0	11,24	9,01	2,233	0
AT3G10750	unknown protein	11,43	8,63	2,807	0	11,67	9,12	2,544	0	11,67	9,28	2,387	0
AT3G21080	unknown protein	11,45	8,4	3,053	0	11,38	8,55	2,834	0	11,58	9,19	2,397	0
AT4G27340	unknown protein	9,51	7,63	1,887	0	10,32	7,78	2,547	0	9,94	7,35	2,589	0
AT3G57510	ADPG1; polygalacturonase	10,47	7,74	2,734	0	9,98	7,65	2,33	0	10,45	7,73	2,725	0
AT5G01870	lipid binding	11,92	8,89	3,033	0	12,62	9,63	2,983	0	12,21	9,21	3,007	0
AT5G14280	transcription regulator	15,72	10,36	5,359	0	15,65	10,63	5,015	0	15,7	10,49	5,21	0

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Schéma de l'organisation du méristème apical caulinaire (SAM) des dicotylédones	5
Figure 2 : Modèle Schématique des régulations génétiques impliquées dans la maintenance du SAM et l'organogenèse des feuilles	9
Figure 3 : Contrôle de l'initiation des trichomes par un système activateur-inhibiteur	14
Figure 4 : Structure générale des GA	17
Figure 5 : La voie majoritaire du métabolisme des GA chez les plantes supérieures	18
Figure 6 : Modèle schématique de la voie de signalisation des GA	22
Figure 7 : Structures de la kinétine et de la trans-zéatine	24
Figure 8 : Voie majoritaire du métabolisme des CK bioactives chez les plantes	25
Figure 9 : Modèle de la voie de signalisation des CK chez Arabidopsis	28
Figure 10 : Modèle schématique du réseau d'interactions connu actuellement entre les GA et les CK	33
Figure 11 : Représentation schématique des interactions entre hormones et facteurs de transcription nécessaires au développement correct du SAM	35
Figure 12 : Locus du gène MYB GL1 d'Arabidopsis.	41
Figure 13 : Résultats des premières études de GeBP	43
Figure 14 : Structures et homologies des protéines de la famille GeBP/GPL.	45
Figure 15 : Motifs NLS et localisation nucléaire des protéines GeBP et GPL	50
Figure 16 : Fonctionnalité du motif Leucine-Zipper non canonique	53
Figure 17 : Principe de la technique du SELEXE	55
Figure 18 : Détermination des séquences consensus reconnues par les protéines GeBP et BP à l'aide de la technique du SELEXE	57
Figure 19 : Analyse de l'expression des promoteurs des gènes GeBP/GPL et BP	59
Figure 20 : Caractéristiques des mutants d'insertion gebp et gpl	65
Figure 21 : Réduction de la sensibilité du triple mutant gebp gpl1 gpl2, aux hormones cytokinines	69
Figure 22 : Test d'induction à l'obscurité de la sénescence de feuilles détachées	71
Figure 23 : Essais d'induction de cals	72
Figure 24 : Test d'inhibition de croissance racinaire par les CK exogènes	73
Figure 25 : Etude de la réponse moléculaire aux CK chez les mutants gebp/gpl	76
Figure 26 : Détection par western blot des protéines GeBP/GPL de lignées surexprimeuses ou super activatrices	78
Figure 27 : Phénotypes des lignées 35S::VP16::GPL2	79
Figure 28 : Niveaux des transcrits de gènes de réponse aux CK ARR-A et tests de sensibilité au CK de lignées surexprimeuses de GPL2	81
Figure 29 : Nombre de gènes dérégulés chez les lignées gebp gpl1 gpl2 gpl3 et 35S::VP16::GPL2 par rapport à Col	87
Figure 30 : Répartition des gènes dérégulés chez les deux lignées comparées à Col dans divers processus biologique d'après les annotations du site Internet « TAIR ».	88
Figure 31 : Cartographie des gènes dérégulés chez les lignées 35S::VP16::GPL2 et gebp gpl1 gpl2 gpl3 dans la voie de réponse au stress biotique à l'aide du logiciel MapMan	90
Figure 32 : Vérification du niveau des transcrits des gènes dérégulés dans les analyses microarrays par la technique de RT-PCR Quantitative	93
Figure 33 : Comparaison des transcriptomes des lignées 35S::VP16::GPL2 et gebp gpl1 gpl2 gpl3 avec ceux des lignées présentes dans la base de donnée du logiciel Genevestigator	95
Figure 34 : Comparaison de la dérégulation des gènes communs aux transcriptomes des lignées cpr5/gebp gpl1 gpl2 gpl3 et cpr5/36S::VP16::GPL2.	97
Figure 35 : Comparaison du phénotype des lignées cpr5-2 et 35S::VP16::GPL2	99
Figure 36 : Mesure du niveau d'endoréplication des cellules de feuilles	100
Figure 37 : Originalités du motif Leucine-Zipper des protéines GeBP/GPL	104
Figure 38 : Principales hypothèses pouvant expliquer l'action des GeBP/GPL sur le signal CK	109
Figure 39 : Modèle génétiques des voies dans lesquelles les GeBP/GPL sont impliqués.	112
Figure 40 : Graines T2 issues d'une lignée transformée avec une construction portant le marqueur GFP	126
Figure 41 : Schéma de la réaction LR GATEWAY™	129
Figure 42 : Principe schématique de la technique du génotypage en multiplexe	136
Figure 43 : Schéma de la stratégie de mutagenèse dirigée	143
Tableau 1 : Récapitulatif des différentes lignées mutantes gebp/gpl identifiées in silico	64
Tableau 2 : Lignées mutantes d'Arabidopsis utilisées dans ce travail	117

Tableau 3 : Lignées transgéniques utilisées pour ce travail	118
Tableau 4 : Différentes souches bactériennes ayant servies dans ce travail	121
Tableau 5 : Concentration finale des différents antibiotiques utilisés	122
Tableau 6 : Marqueurs employés pour la sélection des transformants primaires (T1)	125
Tableau 7 : Différents vecteurs employés dans ce travail	130