Mise en évidence d'éléments de signalisation en aval du récepteur d'auxine ABP1

Sébastien Paque

▶ **To cite this version:**

Sébastien Paque. Mise en évidence d'éléments de signalisation en aval du récepteur d'auxine ABP1. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA112079 . tel-01423841

HAL Id: tel-01423841
https://theses.hal.science/tel-01423841

Submitted on 1 Jan 2017

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.

Université Paris-Sud
Ecole doctorale : Sciences du végétal

Institut Des Sciences du Végétal
CNRS - Gif sur Yvette

THÈSE DE DOCTORAT

DISCIPLINE : BIOLOGIE

Soutenue le 07/06/2013

par

Sébastien Paque

Mise en évidence d'éléments de signalisation en aval du récepteur d'auxine ABP1

Composition du jury :

Directrice de thèse :	Catherine Perrot-Rechenmann	Directeur de Recherche
Rapporteurs :	Christian Fankhauser	Professeur
	Laurent Laplaze	Directeur de Recherche
Examinateurs :	Stéphanie Robert	Chargé de Recherche
	Richard Sibout	Chargé de Recherche
	Michel Dron	Professeur

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu les membres de mon jury pour avoir bien voulu évaluer mon travail de thèse et de se déplacer (d'une poignée de milliers de kilomètres ou du haut de la colline) pour ma soutenance.

Merci à Catherine, pour avoir travaillé sur ABP1 avec tant d'énergie et pour avoir élaboré les lignées conditionnelles, sans lesquelles ABP1 resterait oubliée. C'est un peu grâce à toi si ABP1 renaît de ses cendres… Mais d'un point de vue personnel, je te fais part de toute ma reconnaissance pour m'avoir tant appris et de mon admiration pour ton talent. Tu aurais mérité plus de moyens pour découvrir tout et encore plus sur ABP1. Mais je voulais surtout témoigner du bonheur que j'ai eu à travailler avec toi lors de mes années de thèse. Je n'aurai pas pu mieux tomber.

Merci aux membres de l'ISV pour le quotidien avec une mention spéciale pour ceux que j'aime bien, ceux qui prennent le RER avec moi (non RER B, je ne t'ai pas oublié, c'est volontaire de ne pas te citer) et ceux avec qui j'ai passé de bons moments. Merci à tous pour le quotidien. Quatre ans, ce n'est pas rien. Et je me sens bien à l'ISV.

Bien évidement, merci aux membres de l'équipe d'être de l'équipe! Je tiens tout particulièrement à remercier Anne-Laure et Vérène, car elles m'ont beaucoup appris. Merci à ceux qui ont été impliqués dans l'approche suppresseur. Au passage, je remercie aussi les anciens membres du laboratoire, pour leurs contributions aux connaissances acquises sur ABP1. Merci à mes petits stagiaires.

Merci à Gregory Mouille pour avoir été mon premier collaborateur (!) et pour son accueil lors de mes nombreuses visites sur la plateforme. Une mention spéciale pour Samuel Mondy pour son aide quant à l'analyse bioinformatique. Cet homme là est précieux.

Merci aux personnes qui se sont occupées ou qui s'occupent du bon fonctionnement de l'école doctorale (ED145) et une grosse pensée pour « doc'en herbe », l'association des doctorants. J'espère que cette initiative perdurera. Je me suis beaucoup investi mais cela m'a beaucoup apporté.

Merci aux lignées suppressives pour m'avoir fait subir les montagnes russes émotionnelles : impatience, désespoir, espoir, joie, désespoir, inquiétude, espoir, frustration, angoisse, frustration. Je vous aime quand même.

Merci aux membres de ma famille qui, bien que ne comprenant rien à ce que je faisais m'ont soutenu, ont pris des nouvelles et m'ont encouragé. Je pense tout particulièrement à mon grand frère Jean-Michel, à ma chère tante Claudine (il n'y a pas que toi qui ponds des ouvrages de 300 pages…).

Merci à mes amis d'être mes amis. Sans vous, je ne serais pas grand chose.

Enfin, comment ne pas parler de Laurie, qui a été omniprésente dans ma vie depuis plus de trois ans que ce soit à « Doc'en herbe », au laboratoire, dans ma vie, dans mon cœur. Merci pour avoir toujours été près de moi, et puis merci d'avance pour la suite qui s'annonce belle…

Table des matières

INTRODUCTION 3

L'auxine 5

L'homéostasie de l'auxine 7

Le métabolisme 7

La biosynthèse 7

La gestion du stock d'auxine libre 8

La dégradation 8

La conjugaison 9

La compartimentation 9

Le transport de l'auxine 11

La signalisation de l'auxine 16

ABP1 , un récepteur membranaire 16

L'obtention de plantes conditionnelles : une petite révolution 23

ABP1 et l'endocytose des PINs 27

La régulation de PINs 27

Le recyclage des PINs par endocytose 29

Comment ABP1 influe-t-elle sur le transport de l'auxine ? 32

La signalisation nucléaire de l'auxine 35

Des ARFs pas si activateurs que cela 37

Les interactions ARFs-Aux/IAAs 40

Interaction TIR/AFBs - Aux/IAAs 47

Les autres éléments de signalisation 49

SKP2A 49

Comment ABP1 agit sur la voie $SCF^{TIR/AFBs}$ 52

Evolution de la voie 53

Le modèle de l'hypocotyle étiolé 55

Description du modèle 55

Objectifs de la thèse 61

Résultats - Partie I : Caractérisation de l'hypocotyle étiolé des plantes ss12k 62

Introduction 63

Manuscrit d'article – actuellement soumis à un comité de lecture 71

PARTIE PAROI 104

Résultats intermédiaires et Conclusion 104

Résultats intermédiaires et Conclusion 106

Proposition d'un modèle pour expliquer ces résultats 110

Résultats – Partie II : Obtention de lignées suppressives du phénotype lié à l'inactivation d'ABP1 111

Le crible 114

validation du caractère suppresseur des lignées 116

Plan de travail 120

« Nettoyage » des lignées 122

Détermination du caractère récessif/dominant des mutations 124

Test d'allélisme 125

Phénotypes des lignées 127

Impact des mutations suppressives sur le phénotype racinaire à la lumière 131

Choix des lignées 133

Conclusion partie crible 134

Résultats Partie III : Identification d'une mutation suppressive - le cas de la lignée 99 136

Obtention de lignées recombinantes 138

Création d'une plante ss12k Ler 138

Analyse des données de séquençage 144

Cartographie des mutations pour la lignée 99 150

Liste des mutations candidates pour la lignée 99 152

Confirmation de DCL3 comme suppresseur de l'inactivation d'ABP1 dans la lignée 154

Perspectives..... 156

Conclusion 158

Résultats - PARTIE IV : Implication de DCL3 dans la suppression du phénotype ss12k.....162

Introduction 163

La protéine DCL3..... 165

La voie RdDM 166

Résultats 170

Implication de la voie RdDM..... 170

Caractérisation préliminaire de la lignée dcl3.99, ss12k 172

La réponse à l'auxine de la lignée 99..... 173

Perspectives..... 180

Conclusion 182

DISCUSSION GENERALE.....185

ABP1 et l'expansion cellulaire 187

ABP1 et la photomorphogenèse 190

ABP1 est-il un récepteur ?..... 193

Implication d'ABP1 dans la signalisation de l'auxine 195

Ma vision de la signalisation de l'auxine 201

Bibliographie 203

Matériels et méthodes.....219

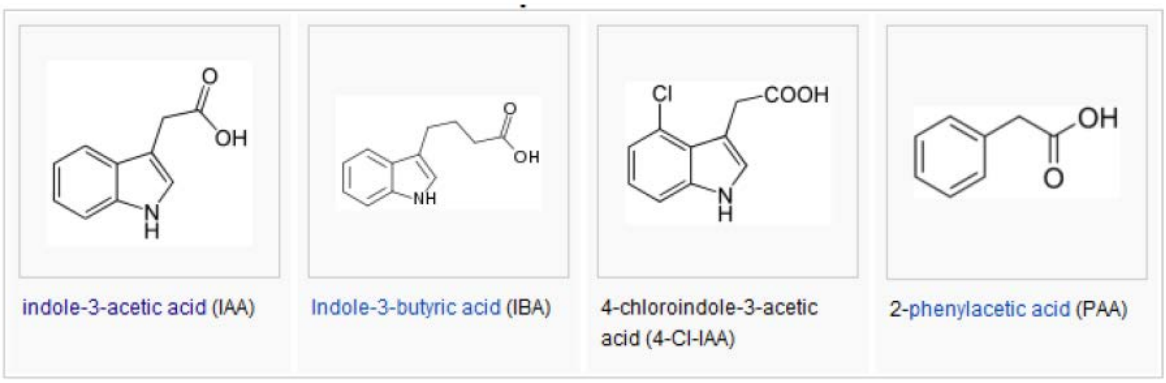
ANNEXES 223

Liste des abréviations

2,4-D	acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
ABP1	Auxin Binding Protein 1
ADN	Acide desoxyribonucléaique
BFA	Brefeldin A
CAPS	cleaved amplified *polymorphic* sequence
Col	Columbia
EMS	ethyl methylsulfonate
AIA	Acide Indole Acétique
IBA	Indole 3 butiric acid
Ler	Lansberg
lncARN	Long non coding ARN
NGS	Next Generation Sequencing
NPA	1-N-Naphthylphthalamic acid
RdDM	RNA directed DNA methylation
RE	Réticulum endoplasmique
SSLP	Simple Sequence Length *Polymorphisms*
tasi ARN	Trans acting small interfering ARN
scFv	single chain fragment variable
siARN	small interfering ARN

INTRODUCTION

A



B

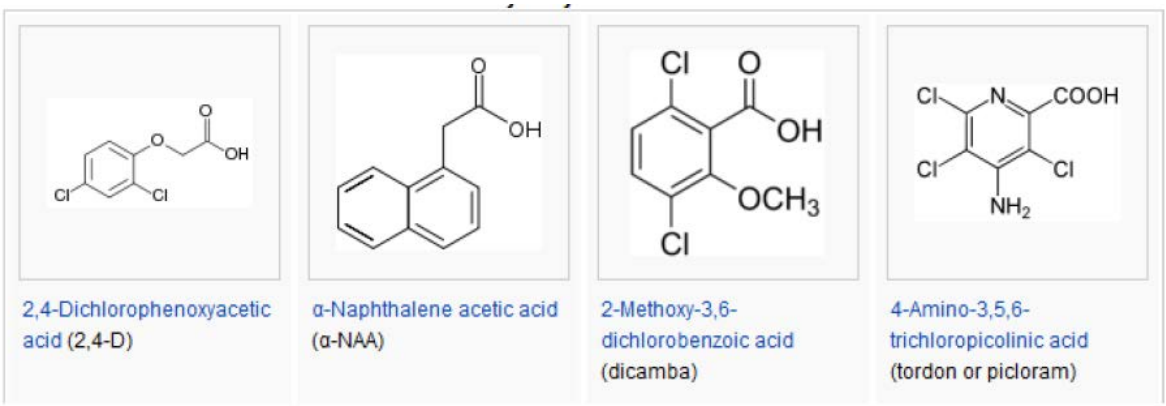


Figure 1 : Structure chimique des molécules à activité auxinique

Principales auxines naturelles (a), la plus répandue chez les plantes à fleurs est l'acide indole acétique (AIA) (b) principales auxines synthétiques. Toutes les auxines possèdent un noyau aromatique et un groupement carboxylique.

Source : Syngenta molecule library

L'auxine

L'auxine est considérée comme une phytohormone clef dans la biologie d'une plante. Elle fut découverte au début du XXe siècle par sa capacité à faire courber des coléoptiles d'avoine vers une source lumineuse. Les premières expériences menées par Boyen-Jensen, Paal ou Soding permirent la purification de l'auxine puis les travaux de Went, Kogl et Haagen-Smit ont permis la découverte de l'auxine naturelle et de sa structure. L'obtention de ces données furent à l'origine des études de l'impact de l'auxine sur le développement végétal et de comprendre à quel point l'auxine influe sur l'ensemble des processus physiologiques et développementaux des organismes végétaux. Les effets de l'auxine sur un tissu sont dépendants de la concentration mais également de l'environnement cellulaire, que ce soit le modèle étudié (espèce, organe), le tissu ou son stade de développement.

Chez les angiospermes, l'auxine est indispensable pour tous les processus physiologiques comme le développement de la racine, des parties aériennes, la régulation des différents types de tropismes mais également pour la floraison et la fructification ou encore la réponse aux pathogènes. L'auxine influe sur ces processus en modulant la division cellulaire, l'endoréplication ainsi que l'expansion (Perrot-Rechenmann, 2010). Cette essentialité se traduit par les effets délétères d'une modification de son transport (drogue ou mutant *pin*) de son homéostasie (mutant surproducteur *yucca* (Zhao et al., 2001)) ou mutants ayant un défaut de production *wei, tar* (Stepanova et al., 2008)) ou mutant de signalisation (*axr3.1*, (Rouse et al., 1998), mutant *abp1* (Chen et al., 2001), mutant *tir/afbs* (Dharmasiri et al., 2005b).

Il faut toutefois noter qu'il serait plus convenable de parler des auxines. L'acide indole acétique (AIA) est la plus fréquente à l'état naturel mais de nombreuses molécules possèdent des effets auxiniques (Fig.1). Ces composés auxiniques présentent comme point commun un noyau aromatique et une fonction carboxylique. La sensibilité aux auxines dépend des espèces, des tissus et des récepteurs. La plante n'est capable de produire qu'une petite quantité d'auxine naturelles comme le l'IBA (Indole-3-butyric acid), le PAA (2-phenylacetic acid) et le 4-Cl-IAA (uniquement chez les gymnospermes) mais leurs rôles respectifs n'est pas encore clairement défini (Fig. 1A).

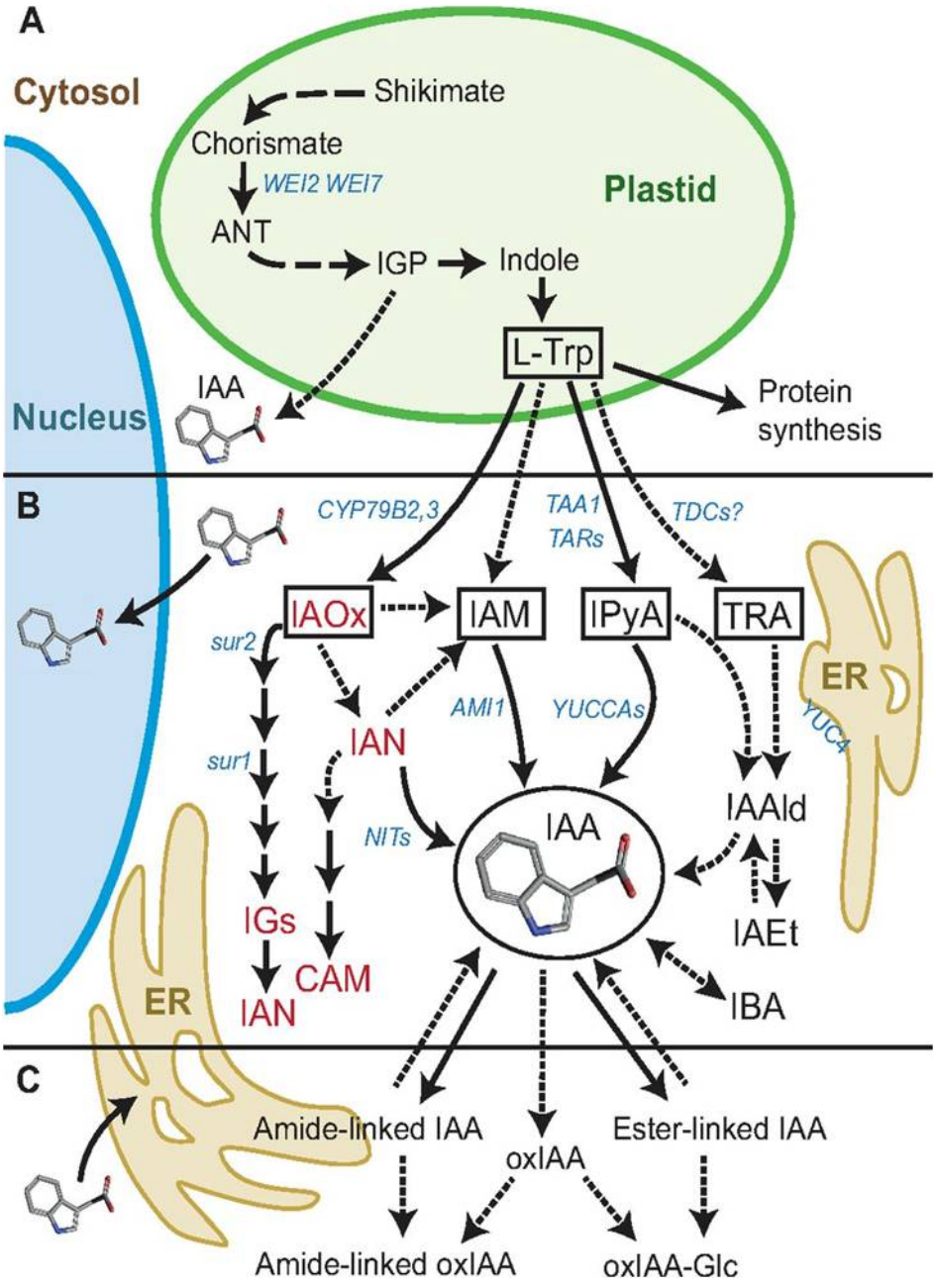


Figure 2 – Schéma récapitulatif des diverses voies métaboliques de l'auxine

Ce schéma montre la complexité mais aussi les interconnexions de différentes voies de biosynthèse de l'AIA (B) à partir du L-Trytophane (Trp) qui est produit dans le plaste (A). La partie basse de ce schéma présente les processus possibles de conjugaisons et de dégradations de l'auxine. Les gènes impliqués dans ces processus sont en bleu et en italique.

Source : (Ljung, 2013)

Les auxines de synthèse ont été ou sont utilisées comme herbicide ou hormone de bouturage (2,4-D, picloram…(Fig1.b)) et servent dans certaines expériences de laboratoire. Toutefois, l'utilisation d'auxine de synthèse ne possédant pas les mêmes affinités que l'AIA peut prêter à discussions. Il existe notamment des spécificités d'interactions différentes entre les auxines et les récepteurs ou les transporteurs (Tromas et al., 2010). Dans ce manuscrit, je simplifierai en parlant de la biologie de l'AIA qui est la plus commune.

L'homéostasie de l'auxine

Le métabolisme

L'homéostasie est la capacité que peut avoir un système à conserver son équilibre de fonctionnement en dépit des contraintes. De par son rôle central pour la plante, l'homéostasie de l'auxine est essentielle pour son bon développement. Cet équilibre se fait au sein de chaque cellule en modulant le métabolisme (la biosynthèse et la dégradation) mais également la conjugaison (pour l'inactiver), la compartimentation (pour la stocker ou l'inactiver) ou le transport (pour attirer ou évacuer). Les progrès pour comprendre l'homéostasie de l'auxine progressent chaque jour grâce à l'aide de mutants ou de surexpresseurs de gènes clefs mais également grâce aux techniques de détection qui permettent dorénavant d'avoir une résolution à l'échelle de la cellule.

La biosynthèse

L'auxine est majoritairement produite dans les organes photosynthétiques comme les jeunes feuilles à partir desquels le transport permet de diriger l'auxine des organes sources vers les organes puits. Toutefois, chaque tissu végétal est potentiellement capable de produire de l'auxine. C'est notamment le cas dans la racine primaire où les gènes de biosynthèse sont exprimés avec une certaine similarité de profils d'expression avec une carte des contenus en auxine à l'échelle de la cellule obtenue grâce à des techniques de pointes de dosage d'auxine (tri cellulaire puis chromatographie couplée à la spectrométrie de masse) (Petersson et al., 2009). Bien que les connaissances concernant les voies de biosynthèse ne soient pas exhaustives, la découverte perpétuelle de nouveaux gènes permet de connaitre de mieux en mieux les étapes de production. A ce jour deux voies distinctes sont caractérisées ; l'une dépendante et l'autre dépendante du tryptophane (Ljung, 2013).

La plupart des précurseurs de l'auxine proviennent du L-tryptophane (L-Trp) qui est transformé dans le chloroplaste par la voie du shikimate qui se déroule dans le chloroplaste (Fig. 2). Cette voie est connue grâce à l'étude de plusieurs mutants. A ce jour, l'hypothèse est que le L-TRP est le précurseur majoritaire de l'IAA (Ljung, 2013).

Ensuite plusieurs voies interconnectées ont été identifiées pour aboutir à la production d'AIA. La voie « IPyA » (indole-3-pyruvic acid) semble être la principale concernant la biosynthèse de l'auxine chez *Arabidopsis* (Fig. 2). Les gènes *TAA1* et *TAR1*, *TAR2* permettent la synthèse de l'IPyA qui sera ensuite transformé en auxine par l'enzyme YUCCA. Les combinaisons de mutants nuls *wei et tar* aboutissent à des mutants avec moins d'auxine (Stepanova et al., 2008) alors que le surexpresseur de *YUCCA* permet d'obtenir des plantes contenant plus d'auxine (Zhao et al., 2001). La voie IAM (indole-3-acetamide) semble partagée jusqu'aux bactéries. La voie IAOx (indole-3-acetaldoxime) permettrait de convertir l'indole-3-acétonitrile (IAN) en IAA. L'IAN pourrait être un stock important de précurseur dans la cellule (Ljung, 2013).

Une voie indépendante du tryptophane est également envisagée pour expliquer qu'une plante déplétée en tryptophane soit toujours capable de produire des métabolites auxiniques (Ouyang et al., 2000).

La gestion du stock d'auxine libre

La dégradation

Les oxIAA semblent jouer un rôle prépondérant compte tenu de l'augmentation de leur concentration après un ajout d'auxine (Ostin et al., 1998), après un stimulus induisant une augmentation de la concertation d'auxine (Sairanen et al., 2012) ou encore dans des mutants surproducteurs (Stepanova et al., 2011). Il pourrait encore s'agir d'un mécanisme mis en place par la plante pour contrôler au mieux les concentrations locales d'auxines.

La conjugaison

Les conjugués d'auxine sont un moyen sûr et rapide pour contrôler la concentration locale en auxine et donc de préserver son homéostasie. L'auxine peut-être conjuguée à des sucres, des peptides ou des acides aminés. Certaines formes de conjugaison font partie du catabolisme de l'auxine dans la mesure où les conjugués formés ne peuvent être retransformés en auxine active : La liaison de l'auxine à l'alanine ou la leucine est hydrolysable contrairement à celle liant l'hormone à la glutamine ou l'acide aspartique (Kowalczyk and Sandberg, 2001).

La classe II des gènes de la grande famille *GH3*, ont été identifiées comme jouant un rôle important dans la conjugaison rapide de l'auxine et sont aussi parmi les premiers gènes transcrits en réponse à sa perception (Hagen and Guilfoyle, 1985; Staswick et al., 2005). Ce mécanisme de rétrocontrôle permet ainsi d'éviter un emballement de la voie et donc de permettre un contrôle efficace de la signalisation et une réponse mesurée.

La compartimentation

Il s'agit d'un bon moyen de stocker des précurseurs, des conjugués ou l'auxine elle-même. La vacuole est classiquement un organite désigné comme étant utilisée par la cellule végétale pour la dégradation ou le stockage de métabolites. Toutefois son rôle dans l'homéostasie n'est pas établi. D'après les théories actuelles, le réticulum endoplasmique pourrait faire figure de candidat pour être un organite important pour l'homéostasie de l'auxine notamment car on y trouve plusieurs éléments liés à la biologie de l'auxine (Wabnik et al., 2011). C'est le cas de transporteurs d'efflux comme PIN5 ou les PILS (Barbez et al., 2012) qui permettraient de charger l'auxine ou ses conjugués dans le RE. On trouve également des hydrolases qui pourraient permettre de transformer les conjugués d'auxine en auxine libre (Woodward and Bartel, 2005). ABP1 est également présent dans le RE mais à ce jour aucun rôle n'a été mis en évidence pour cette protéine dans cet organite.

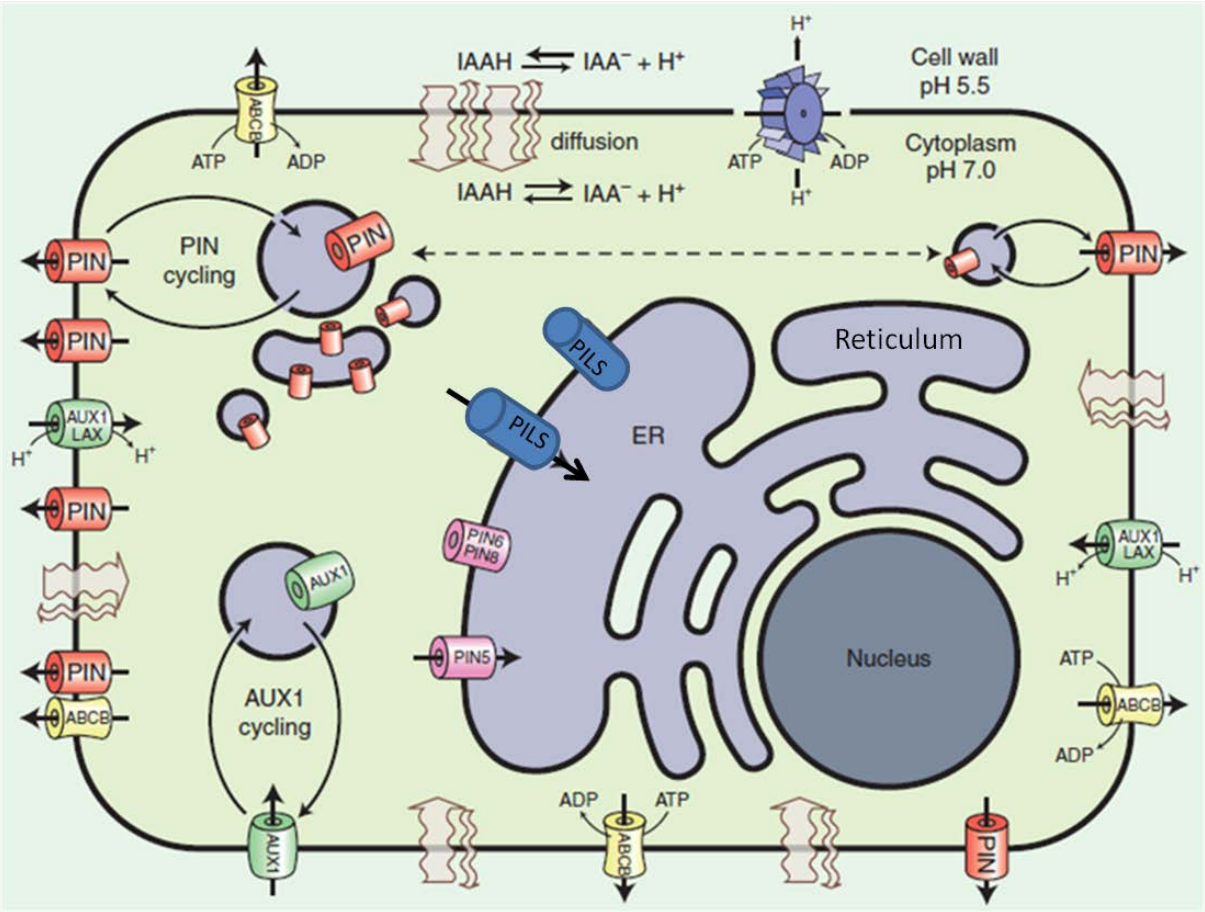


Figure 3 – Schéma présentant les différentes familles de transporteurs

Naturellement, la forme protonnée de l'auxine (IAAH) diffuse à travers la cellule. Une fois dans le noyau, elle est déprotonnée en raison du pH régnant dans le cytosol. Afin de pouvoir importer ou exporter l'auxine de façon active, la plante possède plusieurs types de transporteurs. A ce jour seuls les AUX1 et les LAX sont connus pour leurs capacités d'important d'auxine. Concernant l'export, certains membres de la famille des transporteurs ABC (en jaune) sont disposés sur toutes les faces de la cellule. Au contraire des PINs (en rouge), qui sont des transporteurs polarisés au niveau de la membrane plasmique. Certains PINs et PILS (en mauve et bleu) sont localisés sur la membrane du réticulum et pourraient permettre le chargement de l'auxine dans le RE (en bleu).

Source : Légères adaptations à partir de (Zazimalova et al., 2010)

Le transport de l'auxine

Le transport de l'auxine permet à la phytohormone d'être répartie au sein de la plante. Les principales voies de circulation de l'auxine sont connues et la circulation de l'auxine permet le bon développement de la plante. Le transport de l'auxine à travers la plante se fait de deux façons différentes.

Il existe un transport dit de longue distance où l'auxine est chargée dans le phloème, tissu végétal permettant la circulation de la sève élaborée au sein de la plante. Ce transport est important à l'échelle de la plante et permet un flux d'auxine des organes sources aux organes puits mais ne peut être finement régulé (Petrasek and Friml, 2009).

Le deuxième type de transport de l'auxine est le transport polarisé (fig.3). Il permet une régulation fine via le contrôle de divers transporteurs. L'ensemble de ces transporteurs d'influx et d'efflux permet une mobilité de cellule à cellule de l'auxine et donc une répartition contrôlée de l'hormone. Le principe du processus est basé sur le fait que l'auxine est un acide faible (pKa= 4,75)(Fig.3). La forme protonnée est hydrophobe et la forme déprotonnée est hydrophile. A l'extérieur de la cellule, dans l'apoplasme, le pH se situe aux alentours de 5,5, ce qui permet l'apparition de molécules protonnées (AIAH), non chargées. Sous cette forme, l'AIAH peut entrer par diffusion au sein de l'auxine. Une fois dans le cytoplasme, les conditions changent et le pH augmente aux alentours de 7,4 ce qui fait favorise considérablement la forme déprotonnée AIA^- ; l'anion auxine ne peut alors plus sortir de la cellule par diffusion (Fig. 3). Ainsi, les transporteurs d'auxine ont toute leur importance dans le but de créer des gradients d'auxine. Plusieurs familles de transporteurs d'auxine ont déjà été caractérisées (Fig. 3).

Les transporteurs d'influx

Les transporteurs d'influx sont des protéines permettant l'entrée d'auxine dans la cellule même lorsque la concentration externe est limitante et donc la composante diffusible négligeable. *AUX1* fut découvert il y a près de 25 ans grâce à la résistance du mutant nul *aux1* à une auxine de synthèse, l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (ou 2,4D) (Bennett et al., 1996). De par sa nature, la diffusion du 2,4-D est faible, son entrée dans la cellule doit donc être facilitée par des transporteurs. Il a ensuite été montré qu'*AUX1* code pour une perméase-like. Depuis, trois autres gènes phylogénétiquement proches, les gènes *LAX* (pour like *AUX1*) ont été découverts comme jouant le même rôle de transporteurs d'influx de l'auxine. (Bennett et al., 1996; Peret et al., 2012).

Ces protéines de la famille des perméases fonctionnent comme des symporteurs à protons (Yang et al., 2006). A ce jour, *LAX3* et *AUX1* sont les mieux caractérisés notamment car leur rôle dans la biologie de la racine a été mis en évidence. Ils sont ainsi importants pour la formation des racines latérales (Marchant et al., 2002; Swarup et al., 2008) et le tropisme de la racine primaire (Marchant et al., 1999). Les quatre gènes sont proches phylogénétiquement mais ne partagent pas les mêmes profils d'expression ni la même implication dans les phénomènes auxiniques. Par exemple, *LAX3* est exprimé dans les cellules épidermiques faisant face à l'émergence d'une nouvelle racine latérale, facilitant son passage par l'activation de gènes de remodelage de la paroi tandis qu'*AUX1* est exprimé dans le primordium racinaire de la racine émergente dès les premières étapes (Peret et al., 2012). La capacité d'import d'auxine a été montrée en système hétérologue pour les quatre transporteurs mais la capacité d'influx de LAX2 parait bien plus réduite. Les mutants *lax2.1* et *lax2.2* présentent un défaut de vasculature dans les parties aériennes, confortant néanmoins son rôle dans l'influx de l'auxine (Peret et al., 2012).

Les transporteurs d'efflux

Il existe trois familles de transporteurs d'efflux d'auxine qui possèdent des localisations subcellulaires différentes. Les PILS, les PINs et certains ABC transporteurs de type B (Fig. 3).

Les PINs

Le phénotype en tête d'épingle caractéristique d'une perte de fonction du gène *PIN1* montre l'importance de ce gène chez *A. thaliana* (Okada et al., 1991). On peut obtenir le même phénotype en traitant des plantes avec un inhibiteur du transport de l'auxine (1-N-Naphthylphthalamic acid ou NPA), ce qui montre l'importance des transporteurs d'efflux d'auxine dans le transport de l'auxine. On dénombre 8 membres dans cette famille de protéines transmembranaires (de 6 à 10 domaines), divisés en deux sous-groupes qui correspondent à la longueur de leurs séquences protéiques. Cette différence se joue sur la longueur d'une boucle hydrophile au sein de la protéine (Fig. 4.A). Ainsi *PIN1, 2, 3, 4* et *7* sont qualifiés de « longs » alors que *PIN 5, 6 et 8* sont dit « courts ». Cette différence de taille semble également être corrélée à leurs localisations, les PINs longs sont situés sur la membrane plasmique, au contraire des PINs courts qui seraient dans le réticulum endoplasmique (Zazimalova et al., 2010).

Concernant les PINs courts, peu d'informations sont disponibles pour *PIN6 et 8* à propos d'une éventuelle activité au contraire de *PIN5* qui a été montré comme étant localisé dans le réticulum où il pourrait permettre le chargement de l'auxine dans le RE (Mravec et al., 2009). Les PINs longs sont localisés au niveau de la membrane plasmique où ils jouent des rôles primordiaux

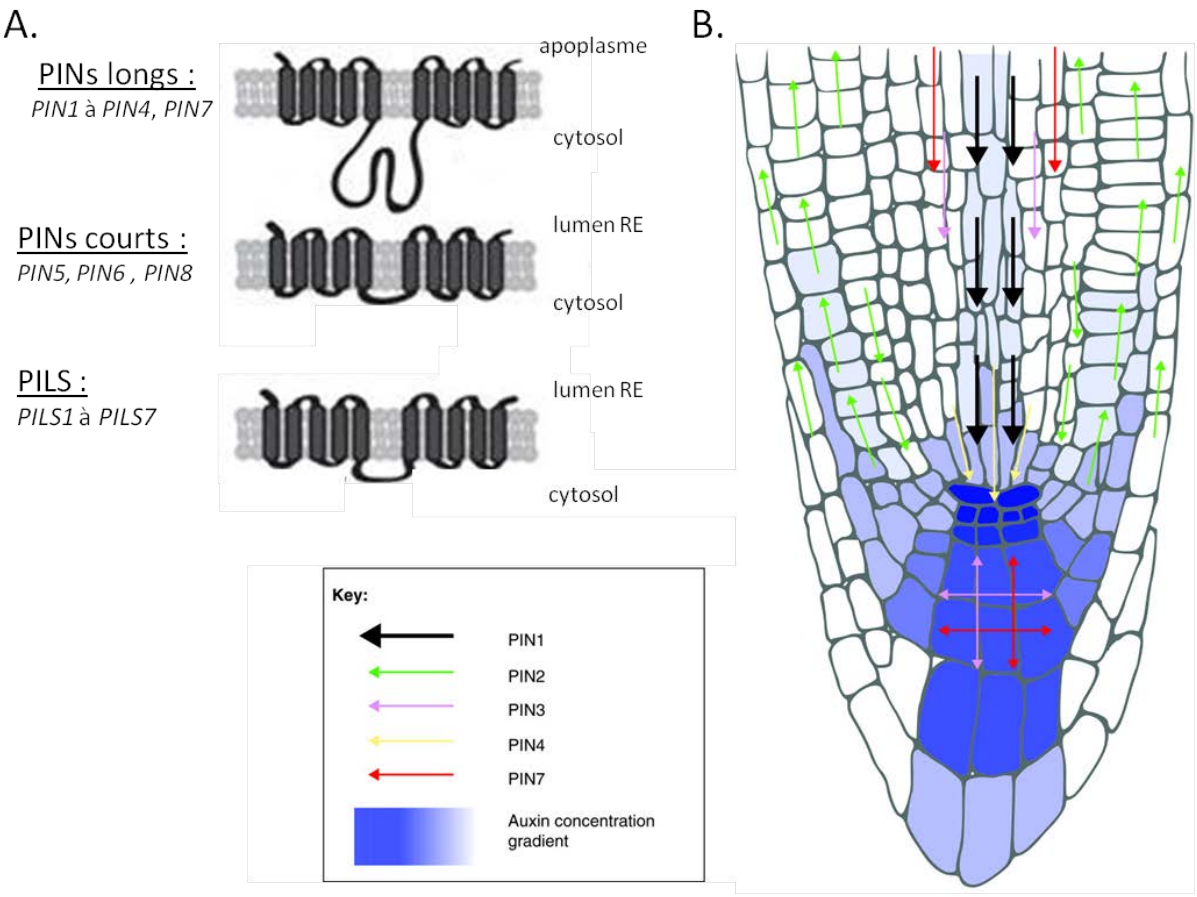


Figure 4 – Les transporteurs d'efflux PIN et PILS

Topologie des différentes familles de PIN et PILS (A). Rôles des PINs dans le transport polarisé de l'auxine dans le méristème racinaire (B). La disposition polarisée des PINs permet de créer un circuit pour l'auxine qui est essentiel pour son développement.

Sources :(Krecek et al., 2009; Barbez et al., 2012)

pour le transport polarisé de l'auxine. Les profils d'expression sont très spécifiques et permettent un transport directionnel. Le modèle de la croissance racinaire est particulièrement bien étudié et montre comment les PINs peuvent orienter le flux d'auxine dans cet organe (Fig. 4B).

La localisation polarisée des PINs et les différents profils d'expression des PINs font que l'auxine emprunte des chemins privilégiés de cellule en cellule au travers des tissus de la plante. Le méristème racinaire est un modèle de choix pour illustrer ce propos. Ainsi *PIN1, PIN3 et PIN4* sont localisées dans la stèle et leurs localisations basales permet à l'auxine d'être dirigée vers le centre quiescent (Friml et al., 2002; Blilou et al., 2005). A ce niveau, *PIN3 et PIN7* sont localisés sur la face latérale et basale, extérieur au centre quiescent ce qui va permettre à l'auxine d'être redirigée vers l'épiderme et la columelle (Muller et al., 1998; Friml, 2003). Enfin *PIN2* est localisé sur la face apicale et latérale interne des cellules du cortex et de l'épiderme. Sa position permet la réorientation de l'auxine à l'opposé de l'apex racinaire puis vers la stèle au niveau de la zone de transition. L'ensemble de ces voies de distribution de l'auxine forme ainsi une sorte de fontaine où l'auxine après avoir atteint un maximum au niveau du centre quiescent est redistribuée latéralement jusqu'à la zone de transition. Ce flux permet d'entretenir la croissance racinaire. De plus, l'auxine induit l'expression des PINs et participe donc à augmenter la capacité d'acheminement du flux d'auxine (Benjamins and Scheres, 2008). Ce transport polarisé permet des accumulations spatio-temporelles de l'auxine qui affectent le développement de la racine notamment l'initiation des racines latérales (Peret et al., 2009) mais aussi par exemple la canalisation de l'auxine dans les feuilles pour induire la formation des vaisseaux conducteurs (Rolland-Lagan and Prusinkiewicz, 2005).

Les PILS

Bien que partageant peu de similarité de séquences avec les PINs, les PILS semblent être les ancêtres des PINS. Ces protéines possèdent la même topologie que les PINs courts (Fig. 4A) ainsi que le domaine conservé semblant conférer la spécificité de transporteur d'auxine et se localisent comme PIN5, dans le système endomembranaire qu'est le réticulum endoplasmique (Barbez et al., 2012). Les PILS sont présents au sein de la lignée verte et sont très conservés (Feraru et al., 2013). Les mutants type « perte de fonction » ou « surexpresseurs » conduisent à des phénotypes très forts, notamment au niveau des fleurs (Barbez et al., 2012). Leurs rôles de transporteurs ont été validés en

système hétérologue et la théorie proposée par les auteurs est que ces nouveaux transporteurs pourraient contrôler l'homéostasie de l'auxine en influant sur la capacité du RE à stocker l'auxine. Toutefois, leur découverte est récente et encore peu de données sont disponibles mais cette nouvelle famille de transporteur permet d'approfondir nos connaissances sur l'homéostasie de l'auxine.

LES ABC

La famille des ABC (pour ATP Binding Cassette) est extrêmement large et regroupe des transporteurs ayant des spécificités de substrats très larges. Toutefois certains présentent une relative spécificité pour l'auxine. L'activité d'efflux de l'auxine a été prouvée en système hétérologue pour certains (Blakeslee et al., 2007). Chez *Arabidopsis*, des mutants nuls comme *mdr1* montrent une altération importante du transport de l'auxine (Noh et al., 2001). L'hypothèse actuelle est que les ABC transporteurs soutiennent l'action des PINs, bien que leur localisation soit non polaire (Mravec et al., 2008).

Ce descriptif des multiples processus de contrôle de son métabolisme ou de sa disponibilité met en évidence le fait que l'auxine est une hormone dont l'homéostasie est finement régulée ce qui va de pair avec son rôle fondamentale dans la physiologie d'une cellule végétale. La répartition des différents transporteurs d'influx et d'efflux permet d'orienter les flux d'auxines au sein de la plante mais pourraient également donner la possibilité à la plante de moduler le contenu en auxine dans le cytoplasme ou d'utiliser le réticulum endoplasmique comme citerne.

Toutefois bien que le transport soit important pour créer des gradients d'auxine, le système de perception et de signalisation de l'auxine est lui aussi essentiel afin de permettre à la cellule, au tissu ou à l'organe de pouvoir répondre de manière physiologique et coordonnée à une concentration locale en auxine. La prochaine partie de cette introduction présentera donc les différents éléments de signalisation qui permettent la réponse à l'auxine.

La signalisation de l'auxine

ABP1 , un récepteur membranaire

Identification et premières découvertes

En 1972, Hertel et collaborateurs ont mis en évidence que des fractions microsomales de maïs étaient capables de fixer l'auxine radioactive (AIA et NAA). Plus tard, des expériences d'affinité à l'auxine sur des fractions cellulaires obtenues par ultracentrifugation dans des gradients de sucrose ont permis de montrer que trois sites de liaison se trouvaient dans la cellule ; l'un dans la fraction nucléaire, le second dans les fractions endomembranaires et le troisième au niveau de la membrane plasmique (Dohrmann et al., 1978). Le premier candidat au rôle de récepteur isolé fut la protéine Auxin Binding Protein 1 (ABP1). ABP1 fut identifié puis cloné à partir de fractions endomembranaires de coléoptiles de maïs (Löbler and Klämbt, 1985; Shimomura et al., 1986; Hesse et al., 1989; Inohara et al., 1989; Tillman et al., 1989). Ses capacités de fixation de l'auxine à des doses physiologiques (de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-6} M selon les auxines et pour une protéine en solution) ont incité la communauté scientifique à continuer les recherches sur ce potentiel récepteur.

Le maïs (*Zea maïs*) fut en fait la plante idéale pour l'identification et le clonage de ZmABP1 car on découvrit *a posteriori* que l'expression de *ZmABP*1 était augmentée chez le maïs par l'insertion d'un petit élément transposable dans sa région promotrice jouant le rôle d'enhancer (Elrouby and Bureau, 2000). Des orthologues d'*ABP1* furent ensuite trouvés chez les plantes modèles *Arabidopsis thaliana* (Palme et al., 1992) et chez le tabac (*Nicotiana tabacum)* (Leblanc et al., 1997) avec respectivement un gène unique et un gène par génome (le tabac étant polyploïde). Chez *Arabidopsis*, l'expression d'ABP1 est ubiquitaire mais à un niveau faible (Tromas et al., 2009).

ABP1 est une protéine de 20 à 22 kDa selon les espèces, pouvant être glycosylée. La comparaison des séquences protéiques d'ABP1 dans divers organismes ont permis de montrer qu'ABP1 était très conservée dans le règne végétal (Tromas et al., 2010). Chez les angiospermes, on retrouve la succession de quatre acides aminés (KDEL) en position carboxy terminale qui constitue un signal de rétention dans le réticulum endoplasmique chez les eucaryotes (Pelham, 1989) mais ce domaine n'est pas présent dans l'ensemble du phylum végétal. Sa structure tertiaire est apparentée à celle des germines chez les plantes (Woo et al., 2002a).

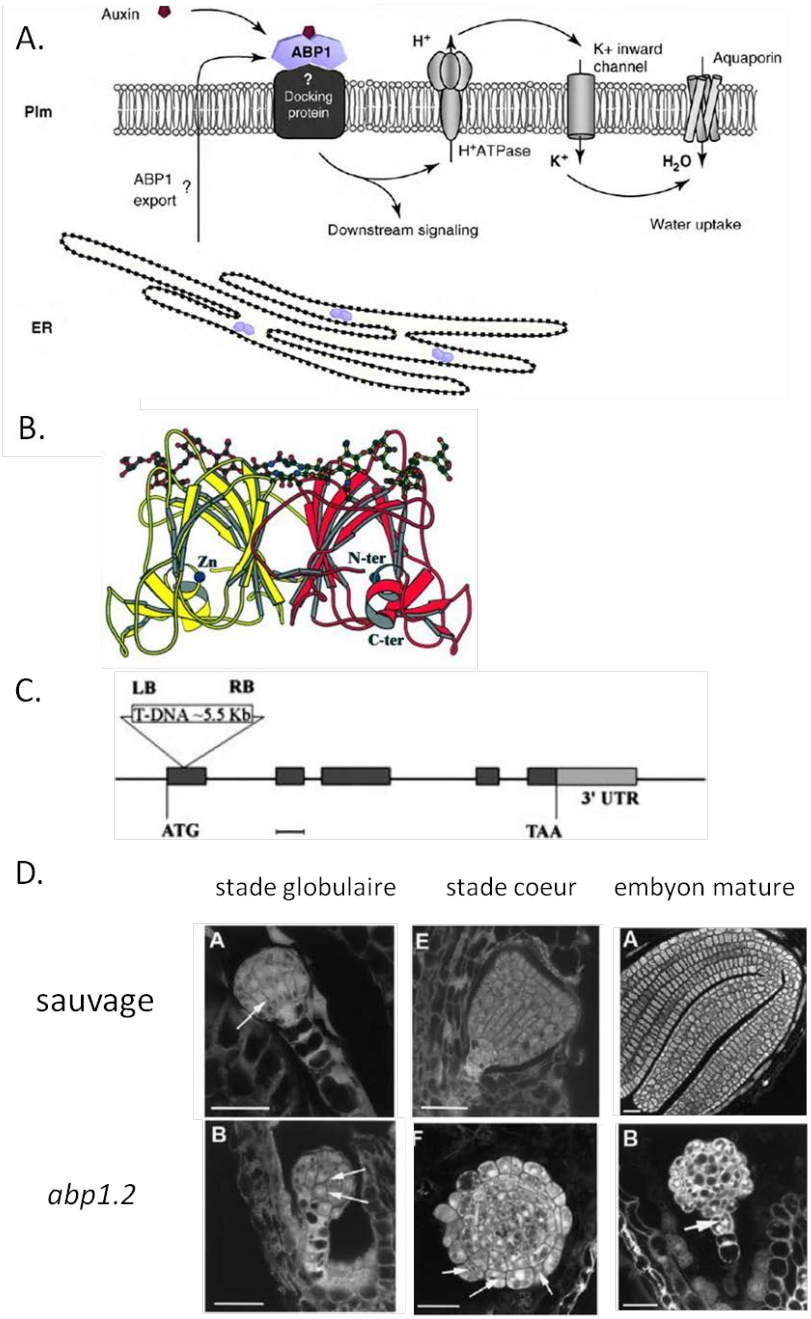


Figure 5 – Premières indications du rôle fondamental que joue ABP1 dans la cellule

Les premières expériences d'électrophysiologie ont permis de montrer l'implication d'ABP1 dans l'activation de réponses physiologiques au niveau de la membrane plasmique (a). A ce niveau, ABP1 est trouvée sous forme de dimère et chaque monomère porte un site de glycosylation chez le maïs et Arabidopsis(b). Chez Arabidopsis, un gène unique code pour ABP1 (c). il existe un mutant d'insertion*, abp1.2*, qui présente à l'état homozygote un phénotype embryolétal du à des problèmes de mises en place des plans de division (flèches blanches chez le mutant), des défauts dans l'acquisition des axes de symétrie et des défauts d'expansion cellulaire (d).

Source : A (Perrot-Rechenmann, 2010) / B (Woo et al., 2002b) / C et D (Chen et al., 2001)

La séquence protéique ne laisse pas présager de domaine hydrophobe, ce qui a été confirmé par des expériences de cristallographie qui ont permis de montrer la structure 3D de la protéine. Sa structure est uniquement constituée de feuillets beta formant un tonneau et un ion zinc fortement lié à la protéine a été trouvé lors de l'analyse cristallographique. Comme en solution, le cristal d'ABP1 est sous forme d'homodimère et présente un site de glycosylation (Shimomura et al., 1986; Woo et al., 2002a)(Fig. 5B).

L'une de ses séquences centrale de la protéine constitue le cœur du site de liaison d'auxine et est très conservé à travers les différentes espèces. Toutefois, d'autres résidus provenant de domaines situés dans le dernier tiers de la protéine participent également au site de liaison. La charge négative du carboxyle de l'auxine vient se positionner face à l'atome de zinc dans le site de liaison. L'étude du cristal d'ABP1 avec et sans auxine ne révèle pas de changement de conformation (Woo et al., 2002a) alors que plusieurs expériences ont montré un changement de conformation (par dichroïsme circulaire, résonance plasmonique de surface ou expérience d'électrophysiologie en présence de protéines mutées)(Shimomura et al., 1986; Venis and Napier, 1990; David et al., 2001; Warwicker, 2001). Toutefois, l'analyse par spectrométrie de masse de protéines extraites de maïs et correspondant donc majoritairement à la protéine accumulée dans le réticulum endoplasmique a révélé un pont disulfure entre les protéines 2 et 61 (Feckler C., 2001). Ainsi la configuration exacte de la protéine *in vivo*, voire le passage possible d'un état à l'autre restent encore à élucider ainsi que l'importance relative de tels changements conformationnels pour l'adressage de la protéine à la membrane et les réponses physiologiques.

Dans les extraits cellulaires, ABP1 est exclusivement associée aux fractions membranaires. Pourtant, ABP1 ne possède pas de domaine transmembranaire ou de séquence spécifique pour une modification post-traductionnelle permettant un ancrage direct aux membranes. L'ensemble des données fonctionnelles indiquent que la protéine est associée à la membrane plasmique et plutôt à la face extracellulaire de la membrane. Chez le maïs, des expériences *in vitro* ont montré que la partie C terminale d'ABP1 pouvait interagir la protéine CBP1 (C-terminal binding protéine) qui est une protéine à ancre GPI (Glycosylphosphatidylinositol. Il s'agit d'un glycolipide rajouté post traductionnellement et qui permet l'ancrage à la membrane).

Toutefois, aucune interaction *in vivo* n'a été prouvée (Sasaki et al., 1994; Shimomura, 2006). L'orthologue de Zm*CBP1* dans *Arabidopsis* est le gène *AtSKU5.* Mais, à ce jour, aucune évidence expérimentale ne soutient que SKU5 puisse interagir *in vivo* avec ABP1. Entre temps, il semble que le partenaire membranaire d'ABP1 ait été identifié. L'équipe de Z.Yang a potentiellement identifié un groupe de quatre LRR-RLK (pour Leucine Rich Repeat- Receptor Like Kinase) comme partenaires d'ABP1 à la membrane. Toutefois, je tiens à préciser, qu'à ce jour, les résultats n'ont pas encore été

publiés mais seulement évoqués dans un bilan de conférences sur l'auxine (Strader and Nemhauser, 2013). Ce résultat constituerait une avancée majeure dans la connaissance de la biologie d'ABP1.

La localisation d'ABP1 a longtemps été et est toujours source de débat en liaison avec la fonctionnalité de la protéine mais il est acquis qu'ABP1 possède une double localisation. En effet, on trouve la protéine dans le réticulum endoplasmique et associée à la membrane plasmique. Les expériences initiales sur des fractions issues d'ultracentrifugations ont été confirmées par immunolocalisation (Jones and Herman, 1993; Henderson et al., 1997; Bauly et al., 2000). La théorie actuelle veut que la localisation d'ABP1 dans le réticulum face office de réserve afin de mieux contrôler la quantité d'ABP1 à la membrane d'où la protéine agit sur la signalisation de l'auxine (Tromas et al., 2010)(Fig. 5.A). Cette théorie est notamment étayée par le fait que dans le réticulum, le pH ne semble pas permettre une fixation de l'auxine sur ABP1 à des doses physiologiques contrairement à la membrane où les conditions semblent réunies (Tian et al., 1995; Napier, 1997). Chez le maïs où *ABP1* est surexprimé, la quantité d'ABP1 à la membrane reste faible au regard du stock dans le réticulum et aucune sensibilité particulière à l'auxine n'a jamais été évoquée chez le maïs. La surexpression d'ABP1 chez le tabac ou chez *Arabidopsis* ne semble pas induire de phénotype particulier (Bauly et al 2000 ; Robert et al 2010), seule la surexpression transitoire de la protéine accompagnée d'un traitement par une auxine synthétique a été rapportée comme stimulant l'expansion cellulaire dans des fragments de feuilles (Jones et al., 1998). Toutefois, aucune explication à ce jour ne permet d'expliquer comment la protéine est exportée malgré son signal de rétention. Celui-ci n'est pas clivé car le peptide signal KDEL est toujours présent dans des protéines excrétées (Jones and Herman, 1993). L'hypothèse la plus vraisemblable est que ce signal de rétention soit masqué, soit par un partenaire ou par une protéine chaperonne chargée de son exocytose mais aucune expérience n'a permis d'élucider cette énigme. Enfin, c'est au niveau de la membrane plasmique que le ou les rôles d'ABP1 ont été mis à jour. C'est donc à la membrane plasmique, face à l'apoplasme qu'ABP1 semble avoir un rôle physiologique.

ABP1 une protéine fondamentale pour la cellule

L'importance d'une faible quantité d'ABP1 au niveau de la membrane plasmique est renforcé par le phénotype du surexpresseur d'ABP1 dépourvu du KDEL (pro35S :ABP1$^{\Delta KDEL}$-GFP). Bien que la quantité d'ABP1 exprimée n'ait pas été montrée, on peut penser que, sans le signal de rétention, plus d'ABP1 soit localisée au niveau de la membrane. Quoiqu'il en soit, cette construction provoque chez les plantules de graves problèmes développementaux conduisant à la létalité ou à l'infertilité (Robert et al., 2010).

Classiquement l'étude du rôle d'un gène passe par l'utilisation de mutants nuls afin d'observer les conséquences de l'absence de celui-ci et de surexpresseurs pour évaluer les effets d'une augmentation quantitative de la protéine. J'ai déjà mentionné précédemment que la surexpression n'induisait pas d'altération phénotypique significative, à priori en raison de la rétention de l'excès de protéine dans le réticulum. Pour les mutants, un mutant d'insertion dans le gène ABP1 a été rapporté (*abp1.2*) mais l'embryolétalité de l'homozygote empêche toute analyse phénotypique au-delà des premières étapes de l'embryogenèse. Les embryons homozygotes pour l'insertion arrêtent leur développement au stade globulaire à cause de plans de divisions anormaux qui conduisent à un amas de cellules désorganisées et de défauts d'expansion cellulaire (Chen et al., 2001)(Fig. 5D). Bien que les gros problèmes développementaux du mutant nul mettent en avant l'importance d'ABP1 dans le développement de la plante, ils empêchent une caractérisation *in planta* du rôle d'ABP1.

L'hétérozygote ne présente pas de défaut développemental majeur (Chen et al 2001) mais une étude a montré de légers problèmes de gravitropisme ou phototropisme ou de délai de floraison ainsi qu'une différence d'expression de gènes entre le sauvage et l'hétérozygote. Bien qu'elles soient à prendre avec précaution car le protocole de culture n'est pas identique entre le contrôle et le mutant *abp1.2,* il semble néanmoins que l'expression de gènes en réponse à l'auxine soit différente (Effendi et al., 2011). Toutefois, ces phénotypes sont sans commune mesure avec les phénotypes d'*abp1.2* et pro35S:ABP1$^{\Delta KDEL}$ -GFP.

Il existe également un mutant ponctuel, *abp1.5*. Ce mutant possède une mutation sur l'un des résidus formant le site de liaison de l'auxine. L'hypothèse émise est que cette mutation empêche la liaison de l'auxine mais cela n'a pas été démontré à ce jour. Il n'est pas clair de savoir si cette mutation inhibe ou potentialise la fixation de l'auxine ce qui rend l'analyse des réponses de ce mutant compliquée ou ambigüe. Au niveau macroscopique, ce mutant ne présente aucune différence significative avec le sauvage mais semble, au niveau microscopique, présenter un défaut au niveau de l'endocytose ou un léger défaut de formation des cellules en pavement des cotylédons (Robert et al., 2010; Xu et al., 2010).

La faiblesse des outils génétiques a longtemps compromis l'étude *in planta* d'ABP1. Toutefois, de nombreuses études sur des cultures cellulaires ou des protoplastes ainsi que le développement d'une gamme d'anticorps agonistes ou antagonistes de l'auxine ont permis de montrer le rôle d'ABP1 au niveau de la membrane.

La perception de l'auxine sur des protoplastes est connue pour activer une hyperpolarisation de la membrane plasmique due notamment à l'activation de la pompe à proton et de canaux potassiques entrants. L'utilisation d'anticorps dirigés contre Zm*ABP1* inhibe la réponse de manière dose dépendante (Napier et al., 1988; Barbier-Brygoo et al., 1989; Barbier-Brygoo et al., 1991). Un autre anticorps (D16) dirigé contre un peptide de synthèse recouvrant une partie du site de liaison à l'auxine a permis de montrer que leur apport exogène sur des protoplastes induisait les mêmes effets qu'un ajout d'auxine (Venis et al., 1992). Ces résultats suggéraient l'implication d'ABP1 dans l'hyperpolarisation de la membrane plasmique en réponse à la perception d'auxine. La confirmation de l'implication d'ABP1 dans cette réponse électrophysiologique est venue de l'utilisation d'un ensemble de neuf anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine de tabac et testés sur protoplastes de tabac donc en système homologue (Leblanc 1997). Il a été montré que tous ces anticorps avaient un effet sur la réponse membranaire, soit en bloquant la réponse à l'auxine (antagonistes) soit en mimant la réponse (hormonomimétique) (Leblanc et al., 1997; David et al., 2001). Parmi ces anticorps monoclonaux, l'anticorps mAb12 s'est révélé être un fort antagoniste de la réponse auxinique. La cartographie de l'épitope et des analyses « structure-fonction » ont montré que cet anticorps reconnaissait un épitope conformationnel chevauchant le site de liaison de l'auxine et que sa liaison sur la protéine avait pour effet de bloquer cette dernière (David et al., 2001).

Ces activations rapides de canaux sont tenus comme responsables du gonflement de protoplastes (swelling) lorsque l'anticorps anti-*ZmABP1* est appliqué simultanément avec l'auxine (Steffens et al., 2001). Dans des cellules en culture, la surexpression d'ABP1 a permis de montrer une sensibilité accrue à la stimulation de l'expansion dépendant de l'auxine (Jones et al., 1998). Alors que la diminution de l'expression par une approche anti-sens réduit la capacité d'expansion de cellule de tabac en culture (Chen et al., 2001).

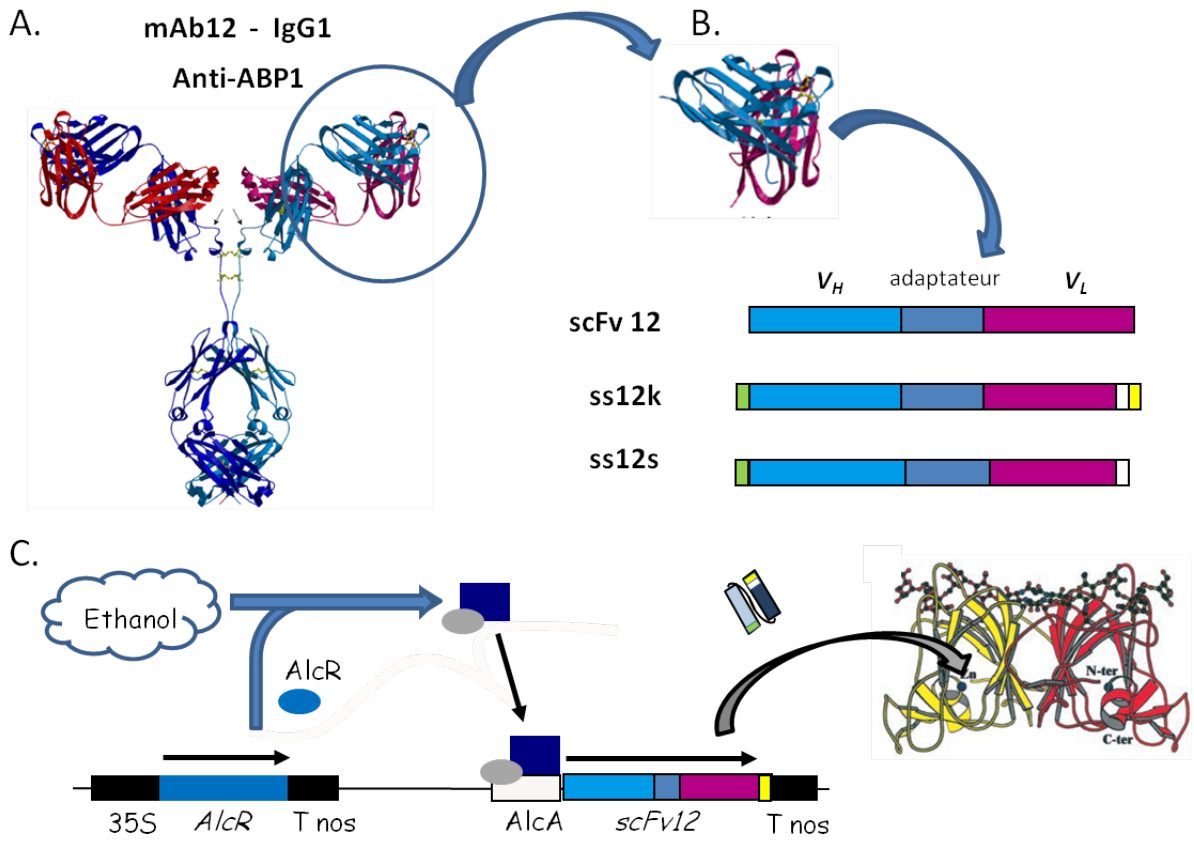


Figure 6 – Présentation de la construction ss12k permettant l'inactivation d'ABP1

Pour élaborer la lignée conditionnelle pour ABP1, l'anticorps antagoniste de l'auxine mAb12 (a) a été choisi. Les séquences codantes des parties hypervariables des chaines légères et lourdes ont été clonées puis assemblées autour d'une séquence adaptatrice permettant un repliement efficace (b). En N terminal, un signal d'adressage vers le réticulum a été ajouté (vert) alors qu'en C terminal c'est une séquence Etag (blanc) qui facilité la détection du scFv. Enfin Une séquence permettant la rétention dans le réticulum (en jaune ss12k) a été ajouté en C-ter de la protéine ss12k. Cette construction a ensuite été placée en aval d'un promoteur inductible par l'éthanol (c).

L'obtention de plantes conditionnelles : une petite révolution

Afin d'outrepasser les problèmes de développements induits par la mutation nulle, le laboratoire a mis au point des plantes conditionnelles pour ABP1 en utilisant comme moyen d'inhibition soit une construction anti-sens soit un anticorps recombinant (ou scFv pour single chain Fragment variable) inhibant l'action d'ABP1. Parmi le panel d'anticorps disponible, le choix se porta sur mAb12 qui a déjà été caractérisé pour ses capacités inhibitrices de l'action d'ABP1. Toutefois, compte tenu la structure d'un anticorps, formé pour une IgG de l'assemblage de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères, l'équipe a décidé de n'utiliser que les fragments variables des chaînes lourdes et légères de l'anticorps mAb12 (Fig. 6A). Les séquences codantes furent donc juxtaposées bien qu'une séquence permettant la plasticité de l'anticorps recombinant fut ajoutée entre les deux séquences. La capacité de l'anticorps recombinant (appelé scFv12) à inhiber l'action d'ABP1 fut testée et confirmée avant son utilisation in vivo (David et al., 2007).

Plusieurs constructions scFv12 furent testées sur des cultures cellulaires avec pour différence la présence ou l'absence de peptide signal et de signal de rétention KDEL en C-ter. Les lignées exprimant le scFv12 dans les compartiments cellulaires où se trouvent ABP1 (RE et membrane plasmique) réussirent à inhiber la croissance ces cellules au contraire des versions exprimées dans le cytosol où théoriquement, ABP1 n'est pas présente (David et al, 2007). La première utilisation de lignées conditionnelles pour ABP1 (sous promoteur inductible par la tétracycline) a permis de mettre en évidence le rôle important d'ABP1 dans la division cellulaire. Dans des cultures de cellules de tabac (BY2), il a été montré que l'inactivation d'ABP1 entrainait un blocage des cellules lors du passage de la phase G1 à la phase S et ainsi que lors de la transition de la phase G2 à la phase mitotique (David et al., 2007).

La séquence codant le scFv12 (soit excrété (ss12s) soit avec séquence KDEL (ss12k)) fut placée sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'éthanol puis la construction fut introgressée dans la plante modèle *Arabidopsis thaliana* écotype *columbia* (fig 6.B). En parallèle, des lignées anti-sens furent générées (AS ABP1). Plusieurs lignées furent testées afin de choisir celles ne présentant pas de fuite du système d'expression et une expression suffisante de l'anticorps après induction. Dans les deux modèles, 8h après l'induction, le scFv ou l'anti-sens étaient détectables par western blot (Figure 7D), le dosage du contenu global en auxine ne montrait pas de différence avec le sauvage (Braun et al., 2008; Tromas et al., 2009). La première conclusion fut que l'inactivation d'ABP1 induit de graves défauts développementaux à différents stades de vie de la plante.

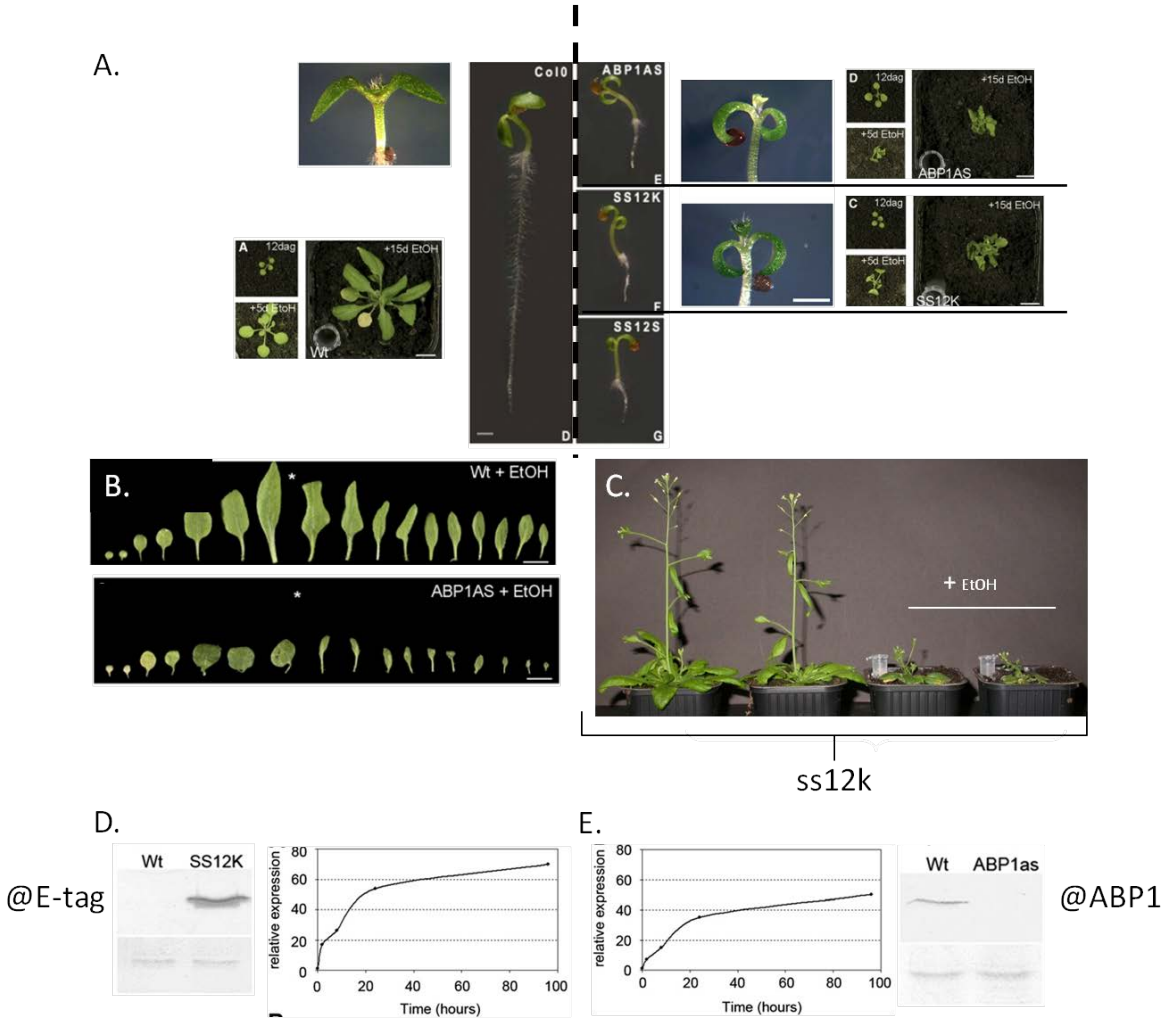


Figure 7 – phénotype des lignées conditionnelles pour ABP1

Présentation du phénotype des lignées permettant l'inactivation d'ABP1 *via* la production de l'anticorps scFv secrété (ss12s) ou adressé au réticulum (ss12k) ou bien à l'aide d'une construction anti sens pour ABP1 (ABP1 AS). L'inactivation d'ABP1 conduit à une altération du développement chez la plantule de 4jours ayant poussé à la lumière ou plus tard au stade rosette (a). ABP1 affecte également la formation des feuilles (b) où l'astérisque représente l'apport d'éthanol. La croissance de la hampe florale requiert également ABP1 (c). Cinétique de production du scFv (d) et accumulation de l'ARN antisens (e) après apport d'éthanol. Les deux constructions sont détectables à partir de 8h comme le montrent les Western blots (c) et (d).

Source : (Braun et al., 2008; Tromas et al., 2009)

Chez la plantule de quatre jours ayant poussé à la lumière (continue), l'inactivation d'ABP1 depuis la germination induit un défaut de développement de la racine primaire, une épinastie et un défaut de croissance des cotylédons (Tromas et al., 2009)(Fig.7A). A des stades plus avancés, l'inactivation d'ABP1 perturbe tout autant le développement des feuilles de la rosette ou celui de la hampe florale (Braun et al., 2008; Tromas et al., 2009)(Fig. 7B et C).

Dans les parties aériennes, une mesure de la taille des cellules sur des feuilles de plantules inactivées (ou non) a permis de montrer que la taille des cellules étaient trois fois plus petite dans la lignée sans ABP1 fonctionnelle par rapport au sauvage. Leur dénombrement a révélé qu'il y avait moins de cellules. L'endoréplication était également inhibée suite à l'inactivation d'ABP1 mais le défaut d'expansion cellulaire affectait aussi bien des cellules n'ayant pas endorépliqué que des cellules ayant préalablement endorépliqué (Braun et al., 2008a).

Dans les cellules de la racine, une caractérisation précise du méristème racinaire montra que l'inactivation d'ABP1 réduisait le diamètre de la racine ainsi que la taille du méristème bien que son organisation soit conservée (Tromas et al., 2009). L'utilisation de divers marqueurs a permis de bien caractériser ce modèle. Le marqueur de division cellulaire proCYCb1:CYCB1-Dbox-GUS permet d'identifier les cellules en division à un instant *t* par coloration (Colon-Carmona et al., 1999). Lorsqu'ABP1 est inactivée, on perd l'expression de ce marqueur ce qui sous-entend que la division est perturbée dans ce contexte.

Les gènes PLETHORA (PLT) sont essentiels pour la maintenance du méristème racinaire et participent à mettre ne place la réponse auxinique (Galinha et al., 2007). Le profil d'expression des gènes PLT (autour du centre quiescent) reste inchangé mais leur intensité et leur zone d'expression décroissent. La surexpression de PLT2 après inactivation d'ABP1 permet de maintenir les cellules méristématiques au sein du méristème en différant leur élongation mais sans toutefois restaurer la division (Tromas et al., 2009).

L'analyse de ces plantes conditionnelles a clairement montré que l'inactivation d'ABP1 induisait des modifications d'expression géniques, en particulier de gènes dits de réponse précoce à l'auxine. Leur niveau de base est modifié ainsi que la réponse suite à un traitement exogène par l'auxine (Braun et al., 2008; Tromas et al., 2009; Effendi et al., 2011). Le mécanisme par lequel ABP1 contrôle l'expression des gènes reste encore inconnu mais il montre l'implication de la protéine dans le contrôle de réponses transcriptionnelles qui ont lieu dans le noyau. Le rôle d'ABP1 n'est donc pas

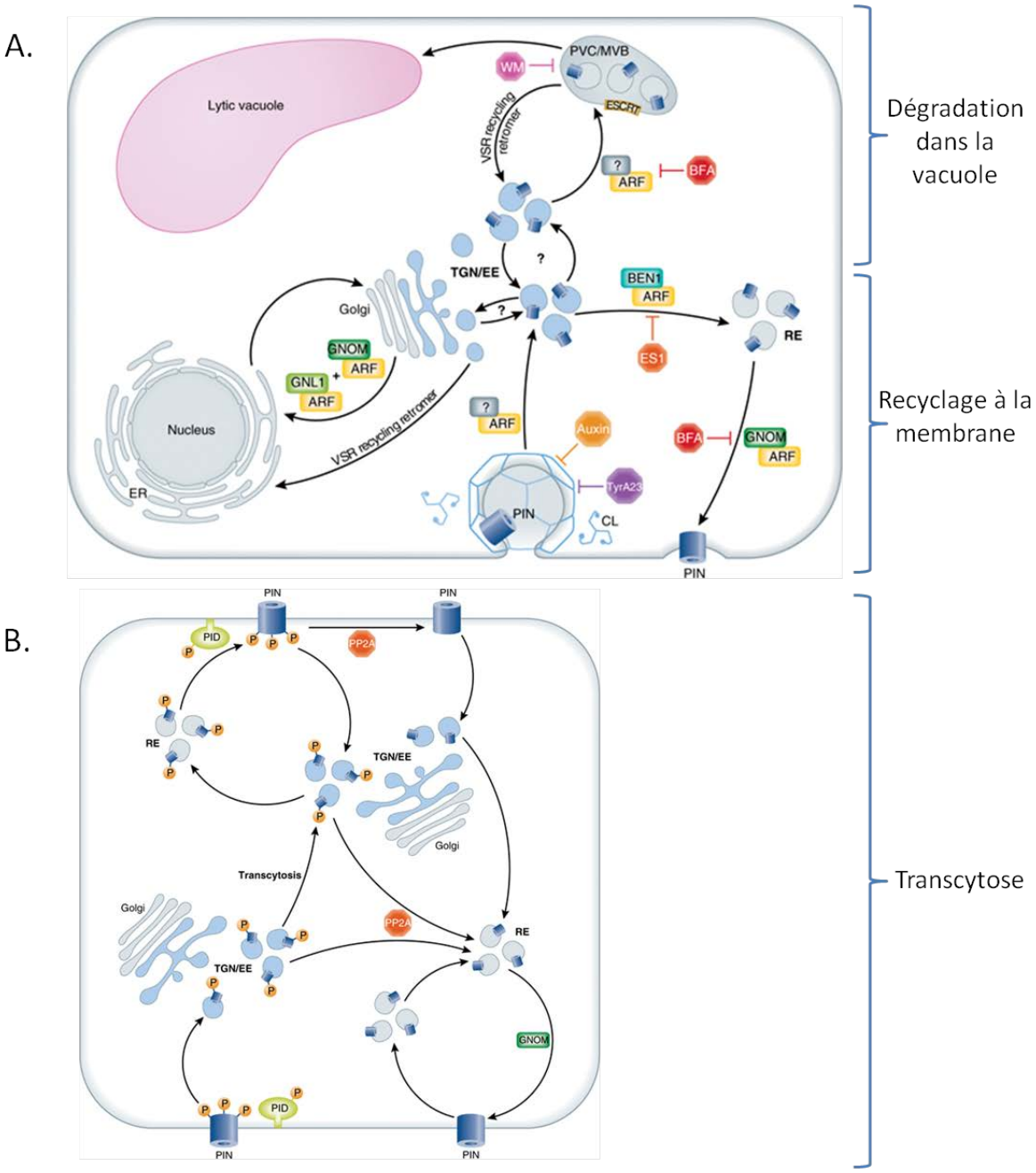


Fig 8 – régulation de la localisation des PINs

Le processus de localisation des PINs à la membrane est un mécanisme de régulation complexe qui implique des régulations de l'endocytose des PINs par les vésicules à clathrine ou leur adressage et dégradation dans la vacuole (a) mais aussi une relocalisation, appelée transcytose qui permettrait de favoriser la polarité des PINs sur un coté de la membrane (b).

Source : (Grunewald and Friml, 2010)

restreint à des modifications de potentiel de membrane. L'obtention de ces plantes conditionnelles pour ABP1 a permis de remettre ABP1 sur le devant de la scène et depuis, plusieurs études ont révélé le rôle d'ABP1 dans deux mécanismes essentiels dans la signalisation de l'auxine : la régulation de l'endocytose clathrine-dépendante et la régulation de la durée de vie de répresseurs transcriptionnels. Les données seront présentées après l'introduction de ces différents mécanismes.

ABP1 et l'endocytose des PINs

Une série d'articles a notamment mis en évidence un lien entre l'activité d'ABP1 et la dynamique de recyclage des PINs. Avant de vous présenter ces résultats, je tiens à vous présenter les connaissances actuelles sur la régulation de la localisation des PINs.

La régulation de PINs

La localisation polaire des PINs est un mécanisme finement régulé et leur localisation polarisée est susceptible d'orienter les flux d'auxine au sein des tissus. Depuis dix ans, plusieurs études ont permis de découvrir ses mécanismes de régulation. L'utilisation de la brefeldin A (BFA) a joué un rôle important pour la visualisation de l'endocytose des PINs. Elle empêche l'exocytose des PINs à la membrane et permet de visualiser les PINs dans des corps BFA. Le premier exemple fut pour PIN1 où la BFA permis de montrer que l'endocytose de PIN1 était perturbée par les inhibiteurs de transports et que l'endocytose était dépendante de l'actine et non des microtubules (Geldner et al., 2001). Depuis, des données complémentaires ont mis en évidence que les microtubules intervenaient également dans le recyclage des PINs (Dhonuskshe et al 2007, Xu et al 2010). Etant donné que l'inhibiteur de la traduction, la cycloheximide ne bloque pas ce processus, il a été proposé que ce mécanisme de recyclage des PINs était en fait du à un recyclage des PINs plutôt qu'une production *de novo*. Ce résultat fut confirmé quelques années plus tard par l'utilisation de protéines rapportrices photo convertibles (Dhonukshe et al., 2007).

Le recyclage

Le recyclage des PINs se fait sous le contrôle de GNOM, un facteur d'échange GDP/GTP pour des ARF GTPases (ARF-GEF) qui permet de modifier la susceptibilité des PINs à être recyclés (fig 8.A) .C'est ce mécanisme qu'inhibe la BFA. Les régulations par phosphorylation rendent plus ou moins sensibles les PINs au contrôle de GNOM. La phosphorylation est assurée par PINOID ainsi que par WAG1 et WAG2 qui sont des sérine/thréonine kinases ; la phosphatase PP2A se chargeant du processus inverse (Michniewicz et al., 2007; Dhonukshe et al., 2010). La phosphorylation de la boucle hydrophile des PINs est essentielle pour la polarisation des transporteurs au regard des effets délétères causés par la perte de fonction ou la surexpression de *PINOID* (Friml et al., 2004; Huang et

al., 2010). Le recyclage des PINs à la membrane est un phénomène dynamique qui selon les hypothèses émises permettrait de répondre rapidement aux stimuli ou de lutter contre un effet de dilution due à la fluidité de la membrane plasmique et la capacité des protéines à se déplacer au sein de celle-ci. En maintenant un contrôle régulier sur la maintenance de la polarisation, on évite une diffusion des protéines au sein de la membrane et on maintient la polarité des PINs (Kleine-Vehn and Friml, 2008; Grunewald and Friml, 2010).

La transcytose

La transcytose est un phénomène qui permet une relocalisation d'une protéine à une autre région membranaire située à l'opposée (fig 8.B). L'utilisation d'une protéine PIN2 couplée à un fluorophore photoconvertible (EosFP) fut déterminante pour observer ce processus de relocalisation (Kleine-Vehn et al., 2008). Il semblerait que ce phénomène soit indépendant de l'activité de PINOID puisqu'il n'est pas altéré dans le fond mutant *pid*. Il est en revanche sous le contrôle de GNOM car, dans le fond mutant, on observe une perturbation de la transcytose. Ce processus pourrait intervenir dans l'adressage orienté des PINs en position basale ou apicale, selon les PINs et les cellules, de même que dans le changement de polarité en réponse à différents stimuli (Kleine-Vehn et al., 2008). Toutefois, ce phénomène n'a été observé qu'après un long traitement à la BFA (2h) ce qui rend l'interprétation biologique délicate. Il peut également s'agir d'un mécanisme pour tenter de détoxifier ou contourner l'effet de la drogue.

La dégradation

Enfin, les PINs sont aussi dégradés. Chez les plantes, comme chez les animaux, l'ubiquitination des cibles semblent être un facteur déterminant pouvant affecter la durée de vie ou la compartimentation. La monoubiquitination de résidus lysine peut induire l'endocytose puis l'adressage des protéines ainsi marquées à la vacuole. C'est le cas de PIN2 comme l'a mis en évidence une récente étude montrant que de multiples mutations sur les sites potentiels d'ubiquitination de la protéine (sur les lysines de la boucle hydrophile) inhibaient sa relocalisation vers la vacuole. Un traitement à l'auxine ou une gravistimulation de la racine (qui entraîne une accumulation d'auxine sur la face inférieure de la racine) provoquent l'adressage de PIN2 dans la vacuole puis sa dégradation. Cet effet est atténué dans le fond génétique exprimant la protéine PIN2 mutée sur les lysines insensible à l'ubiquitination, ce qui implique directement l'ubiquitination de PIN 2 dans cet adressage (Leitner et al., 2012). Ce processus est également partagé par d'autres cibles comme par exemple le transporteur de fer IRT1 (Barberon et al., 2011). Une élévation des contenus en auxine induit l'adressage de PIN2 à la vacuole et l'activité de la voie $SCF^{TIR/AFBs}$ semble être requise

pour ce processus au moins pour des concentrations supra-optimales en auxine. De plus, l'utilisation d'auxines synthétiques permettant de cibler ou d'éviter de manière spécifique la voie $SCF^{TIR/AFBs}$ a permis de confirmer l'implication de cette voie dans la dégradation des PINs dans la vacuole (Baster et al., 2013).

Le recyclage des PINs par endocytose

Les vésicules à clathrines

A ce jour, seules les vésicules à clathrines sont connues chez les plantes pour assurer l'endocytose. L'endocytose intervient dans l'internalisation de molécules extracellulaires et la régulation de l'abondance relative de protéines membranaires telles que des récepteurs ou différents types de transporteurs. Leur implication a été montrée en particulier dans le recyclage des PINs (Dhonukshe et al., 2007). Depuis, différentes drogues affectant les mécanismes d'endocytose clathrine-dépendante ont été utilisées comme la tyrphostine A23 (Dhonukshe et al., 2007) ou l'endosidine (Robert et al., 2008) ou encore l'ikarugamycine (Nagawa et al., 2012) pour mettre en évidence ce processus. L'endocytose médiée par des vésicules à clathrine est un mécanisme conservé à travers l'évolution car il est aussi présent chez les animaux. Les vésicules à clathrines sont composées de différentes protéines mais les clathrines à longues chaines ou courtes chaines sont essentielles (Royle, 2006). Plusieurs types de protéines sont concernés par l'endocytose et toutes ne sont pas polarisées comme le sont les PINs. C'est notamment le cas de l'aquaporine PIP2;1 (Luu and Maurel, 2011) ou le récepteur des brassinostéroïdes BRI1 (Russinova et al., 2004). L'auxine inhibe l'endocytose et ainsi intervient sur l'abondance relative des PIN à la membrane plasmique (Paciorek et al., 2005)

L'endocytose des PINs semble indépendante de la voie de signalisation des corécepteurs nucléaires de l'auxine comme le montre l'absence d'impact sur l'endocytose de mutations nulles pour les protéines à F-box *tir1.1, afb2.1, afb3.1* (Robert et al., 2010). L'utilisation d'auxines synthétiques spécifiques capable d'agir uniquement sur la voie $SCF^{TIR/AFBs}$ ont permis de confirmer la non implication de la voie $SCF^{TIR/AFBs}$.

De façon similaire aux mécanismes identifié chez les animaux, l'endocytose clathrine-dépendante est régulée par l'intermédiaire de l'activité d'une famille de Rho GTPases agissant notamment sur le remodelage du cytosquelette en réponse à différents stimuli (Craddock et al., 2012; Wang et al., 2013).

Les ROPs

Les plantes possèdent une seule sous-famille de Rho-GTPases, appelées ROP ou RAC. Chez les animaux et les champignons, les Rho GTPases ont été caractérisées comme des plaques tournantes dans les voies de signalisation car plusieurs voies divergent à partir de ces protéines (Nagawa et al., 2010). Ainsi les Rho GTPases agissent sur le cytosquelette et le trafic vésiculaire. Chez *Arabidospis*, 11 gènes encodent pour des ROPs, répartis en quatre groupes, lesquels semblent affecter différents processus. Leur implication a notamment été montrée dans la croissance du tube pollinique ou la mise en place d'interdigitations des cellules en pavement des cotylédons, ces deux mécanismes nécessitant un contrôle fin du cytosquelette (Craddock et al., 2012). Les ROPs interviennent dans le contrôle de l'endocytose de vésicules à clathrine et donc le contrôle de l'endocytose des PINs (Chen et al., 2012; Lin et al., 2012; Nagawa et al., 2012). Une étude montrant que ROP6 agit sur le recyclage de PIN2 *via* le cytosquelette a été récemment publiée (Chen et al., 2012). Ce résultat place les ROPs comme étant des acteurs importants influençant le transport polarisé de l'auxine. Les PINs participent à ce processus car dans le mutant *pin1*, les cellules ne présentent pas d'interdigitations (Xu et al., 2010).

L'implication du cytosquelette

Lors de la mise en évidence du recyclage des PINs par endocytose, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des microfilaments d'actine (cytochalasine D or latrunculine B) ou des microtubules (oryzaline) a permis de montrer que le recyclage des PINs faisait intervenir les microfilaments d'actine (Geldner et al., 2001). Cependant, une étude récente à montrer l'importance des microtubules pour la localisation de la kinase PINOID sur les faces de la membrane plasmiques. En effet, dans des fonds mutants pour des protéines importantes pour la réorientation des microtubules (CLASP et MAP65), la localisation des PINs est affectée et cela se répercute sur l'endocytose (Kakar et al., 2013).

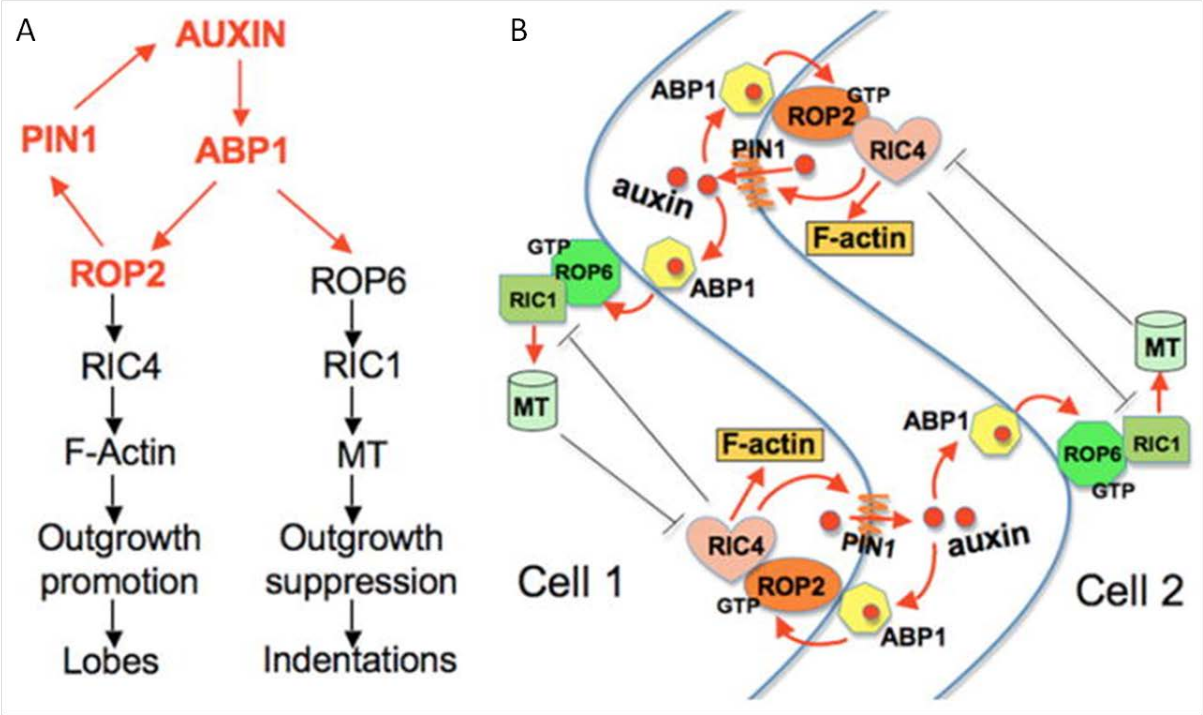


Fig 9 – modèle de signalisation pour la formation des interdigitations

Régulation génique entre les différents protagonistes dans le modèle de la formation des interdigitations des cellules en pavement des cotylédons chez *A.thaliana* (A). Schéma de fonctionnement de ce modèle : L'auxine, perçu par ABP1 conduit d'une part à l'activation de ROP2 qui via l'effecteur RIC4, va agir sur l'actine et d'autre part sur ROP6 qui via l'effecteur RIC1, va agir sur les microtubules. Ces régulations du cytosquelette vont aboutir à la formation de lobes. Ce phénomène est encouragé par le maintien de PIN1 dans les régions lobées, qui va ainsi exporter l'auxine dans l'apoplasme où ABP1 pourra soutenir de nouveau le phénomène.

Source : (Xu et al., 2010)

Comment ABP1 influe-t-elle sur le transport de l'auxine ?

Depuis peu, il a été montré qu'ABP1 était essentielle pour l'endocytose des vésicules à clathrine. A l'aide des plantes conditionnelles pour ABP1, l'équipe de J.Friml a montré qu'en l'absence d'ABP1 fonctionnelle le nombre de vésicules à clathrine dans la racine diminuait (Robert et al., 2010). Cette diminution du nombre de vésicules à clathrine s'explique par un blocage de l'endocytose lorsqu'ABP1 est inactivée. Inhiber l'endocytose revient à laisser les protéines concernées par ce mécanisme au niveau de la membrane plasmique. Parmi ces protéines se trouvent les PINs, et notamment PIN2 qui est la protéine utilisée dans la plupart des études. Une surexpression d'ABP1 n'a pas d'effet sur l'endocytose mais la surexpression d'une protéine sans KDEL à la membrane induit une augmentation de l'internalisation des PINs. Ce mécanisme pourrait expliquer la nécessité de contrôler finement l'export d'ABP1 à la surface. Le signal de rétention dans le réticulum KDEL serait alors un moyen de contrôle (Robert et al., 2010). Si ABP1 semble essentielle pour le recrutement des vésicules à clathrine et le recyclage des PINs, la protéine semble également impliquée dans l'inhibition de l'endocytose par l'auxine. L'auxine inhibe l'internalisation des PINs même dans des cellules surexprimant ABP1$^{\Delta KDEL}$. En revanche, cet effet inhibiteur est perdu dans l'allèle hypomorphe *abp1-5* qui porte une mutation sur l'un des résidus de la poche de liaison d'auxine, suggérant que si la protéine ne lie plus l'auxine l'effet inhibiteur est perdu (Robert et al, 2010). De même dans ce mutant, il a été montré que l'activation par l'auxine de ROP2 était perdue (Xu et al, 2010).

En parallèle à ces expériences sur le contrôle de l'endocytose des vésicules à clathrine, une étude a mis en évidence le rôle d'ABP1 dans la formation des cellules en pavement des cotylédons. Ces interdigitations sont le fruit d'une croissance lobée des cellules qui sont sous le contrôle d'au moins deux ROP GTPases et de leur effecteurs RIC (ROP-interactive CRIB motif-containing protein). Dans les mutants nuls *rop2* et *rop6*, les lobes ne se forment pas aussi clairement que chez les plantes Col0. L'auxine permet la formation de ces lobes et ABP1 semble indispensable à ce processus (Xu et al., 2010). Les ROP sont aussi connues pour être des éléments de signalisation. Dans ce modèle, elles peuvent notamment agir sur le cytosquelette et permettre la formation d'interdigitations dans les cellules des cotylédons (Fig. 9)

Plus récemment, l'analyse de doubles mutants composés de plantes conditionnelles pour ABP1 (ss12k et ss12s) et du mutant nul pour ROP6 (ou son effecteur) ont confirmé qu'ABP1 agissait en amont de ces deux gènes (Chen et al, 2012). Dans le double mutant ss12k, *rop6*, les lignées présentaient une augmentation de l'endocytose de PIN2 par rapport, donc une restauration de l'endocytose mais une résistante à l'auxine, c'est-à-dire pas d'inhibition par l'auxine (Chen et al., 2012). En revanche la surexpression de ROP6 ou l'expression d'une protéine mutée constitutivement active rop6CA dans le fond inactivé pour ABP1 réduisait encore davantage l'endocytose. Ainsi, les auteurs ont proposé un modèle d'action dans lequel ABP1, *via* les ROP/RICs, influerait sur l'endocytose des vésicules à clathrine et donc sur la présence des PINs au niveau de la membrane plasmique (Xu et al., 2010; Chen et al., 2012).

Les recherches sur ces mécanismes de régulation de l'endocytose sont actuellement en plein essor et doivent leur succès à l'utilisation de la microscopie confocale, à la quantification de la fluorescence et du comptage de corps d'inclusion BFA. La fraction ABP1 présente à la membrane plasmique semble jouer un rôle prépondérant dans ces mécanismes d'endocytose et de recyclage des protéines PINs donc dans la régulation des capacités de transport polarisé de l'auxine. Toutefois, ces réponses à l'échelle cellulaire soulèvent un ensemble de questions qui seront discutées et confrontées à d'autres données à la fin de ce manuscrit. Je tenterai d'inclure ces données dans un modèle global de signalisation de l'auxine.

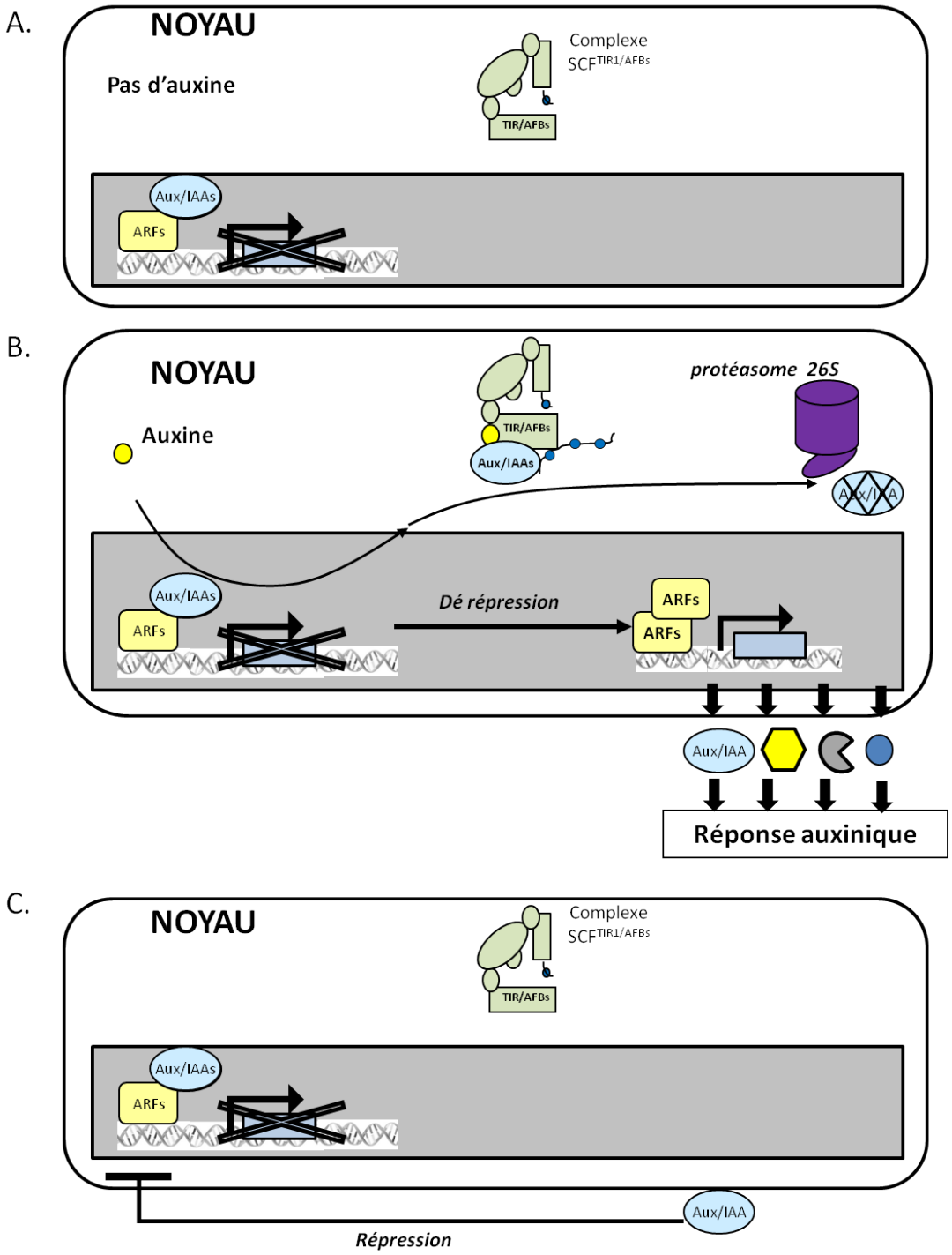


Figure 10 – Schéma du modèle simplifié de la voie $SCF^{TIR/AFBs}$

Sans la présence d'auxine, la transcription est bloquée par les Aux/IAAs qui sont les répresseurs de la voie (A). La présence d'auxine permet la liaison entre les Aux/IAAs et les complexes $SCF^{TIR/AFBs}$ ce qui induit la polyubiquitination et donc la dégradation des Aux/IAAs par le protéasome 26S, libérant ainsi aux ARFs qui permettent la transcription des gènes de réponse à l'auxine (B). Parmi les gènes de réponse, des Aux/IAAs sont alors transcrits, et une fois traduits, ils peuvent de nouveau inhiber le système (C).

La signalisation nucléaire de l'auxine

Les données scientifiques concernant le transport polarisé de l'auxine montrent à quel point les flux d'auxine sont importants afin de créer des zones d'accumulation qui permettent l'activation ou l'inhibition de processus biologiques. Toutefois, pour que la réponse à l'auxine puisse se mettre en place, la cellule végétale doit posséder une signalisation qui lui permette de percevoir l'auxine, de transformer le signal de perception et d'activer une voie de signalisation d'auxine modifiant la transcription de gènes de réponse à l'auxine et donc une réponse adaptée au stimulus auxinique.

De par sa localisation au niveau de la membrane plasmique et ses caractéristiques de récepteur, ABP1 fait office de candidat parfait pour intégrer une voie de signalisation mais celle-ci reste encore mal connue. Il existe toutefois une voie de signalisation nucléaire de l'auxine qui depuis dix ans est de mieux en mieux comprise et permet le contrôle de l'expression de gènes de réponse à l'auxine. J'appellerai cette voie $SCF^{TIR/AFBs}$, du nom des complexes ubiquitine ligase E3 impliqués. La voir peut être simplifiée à trois différents éléments : les ARFs, les Aux/IAAs et les TIR/AFBs. Je me propose de présenter succinctement la voie $SCF^{TIR/AFBs}$ puis de vous montrer une réalité plus complexe de la voie.

Un modèle simplifié

Les ARFs (Auxin Response Factor) sont les facteurs de transcription des gènes de réponses à l'auxine. En l'absence d'auxine dans le noyau, ils ne peuvent pas activer la transcription car ils sont inhibés par l'action des Aux/IAAs. Les Aux/IAAs sont les répresseurs transcriptionnels de la voie. Sans auxine, le système est donc réprimé par les Aux/IAAs (fig. 10A). Toutefois, la présence d'auxine va permettre d'activer le système. Les Aux/IAAs ont en effet la capacité, en présence d'auxine dans le noyau, de se fixer sur les protéines à F-box TIR1 (transport inhibitor response) ou AFBs (Auxin related F-box). Ces Fbox ont pour rôle de recruter leurs cibles au sein de complexe ubiquitine ligase E3, $SCF^{TIR1/AFBs}$ ce qui permet la polyubiquitinylation des cibles et leur dégradation par le protéasome 26S. (fig.10B). Sans répresseurs transcriptionnels, les ARFs activateurs sont désormais libres d'activer la transcription des gènes de réponses à l'auxine possédant un ou des domaines spécifiques AuxRE (Auxine Response Element) dans leurs régions promotrices. Parmi ces gènes de réponse, on trouve les Aux/IAAs, qui pourront une fois traduit, inhiber l'action des ARFs (Fig. 10C). Cette boucle de rétrocontrôle permet potentiellement au système de ne pas s'emballer.

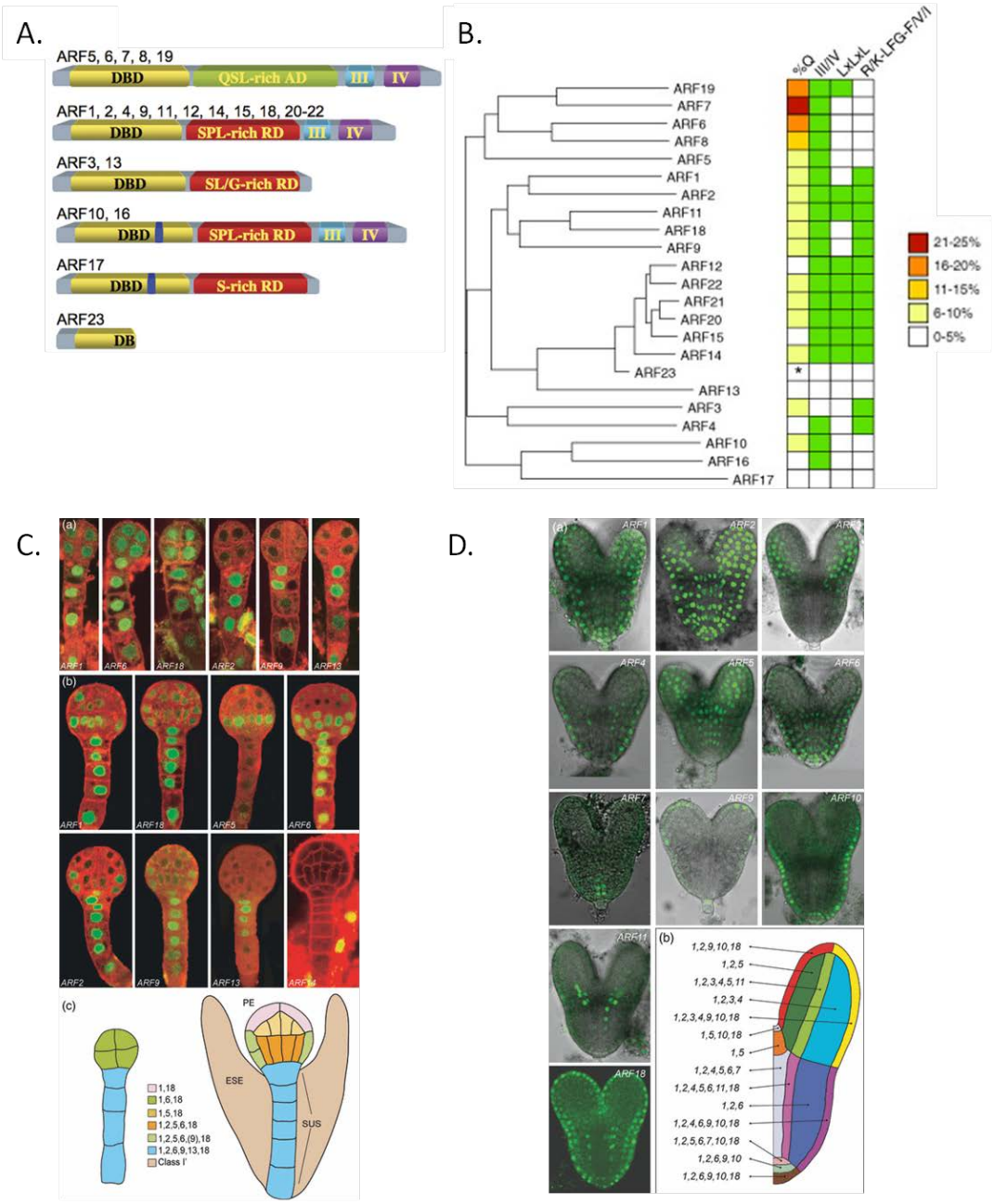


Figure 11 – Les ARFs, les effecteurs de la voie SCF$^{TIR/AFBs}$

Présentation des membres de la famille des ARFs, de leurs domaines conservés (a) et de leurs relations phylogénétiques (b). le % Q représente la proportion de glutamine dans le domaine régulateur central des activateurs (voir légende). Les trois autres colonnes du tableau montrent la présence (vert) ou l'absence (blanc) des domaines d'interaction protéine-protéine III et IV (b), du domaine LxLxL et d'un nouveau domaine identifié comme répresseur. La superposition des profils d'expression des ARFs permettent d'obtenir une carte d'expression des ARFs au niveau du tissu, ici deux stades de l'embryogenèse sont illustrés ((c) et (d)).

Source : A.(Guilfoyle et Hagen 2007) ; B. (Lokerse and Weijers 2009) ; C. (Rademacher et al., 2011)

Une réalité plus complexe

La voie $SCF^{TIR/AFBs}$ est souvent présentée sous cette voie simplifiée. Toutefois, grâce à l'approfondissement des connaissances sur les différents éléments de cette voie, on s'aperçoit qu'elle est bien plus élaborée et complexe qu'il n'y parait. Je vais donc détailler certains éléments de la voie $SCF^{TIR/AFBs}$ afin de mieux présenter la complexité cette voie de signalisation essentiellement nucléaire.

Des ARFs pas si activateurs que cela…

Les ARFs (pour auxin response factor) sont des facteurs de transcription de l'auxine qui peuvent se fixer à l'ADN en absence d'auxine. Le site de liaison des ARFs à l'ADN est appelé AuxRE (pour Auxine Response Element) et correspond à la séquence conservée TGTCTC. D'autres motifs ont été repérés en aval de gènes de réponse à l'auxine et sont ignorés de ce modèle. Les ARFs constituent une famille multigénique de 22 membres chez *Arabidopsis* (Fig.11A et B). La structure classique d'un ARF consiste en quatre domaines conservés au sein de la famille (Okushima et al., 2005b).

Le domaine I est celui qui permet aux ARFs de se fixer à l'ADN tandis que le domaine II semble contribuer à la capacité inhibitrice ou promotrice de la transcription. Au contraire du modèle présenté précédemment, les ARFs ne sont pas tous des activateurs. Il s'agit même de l'inverse puisque seulement cinq ARFs ont été répertoriés comme activateurs et ont pour point commun, un domaine II riche en glutamine, sérine et leucine. Le reste de la famille, présenté comme répresseurs possèdent un domaine II riche en proline, leucine et glycine (Guilfoyle and Hagen, 2007). Toutefois, les capacités inhibitrices ou répressives des ARFs sont encore sujet à débat. En effet la capacité inhibitrice ou activatrice des ARFs est basé sur la présence de certains acides aminés dans le domaine II et sur l'identification d'autres motifs tels que LxLxL qui permet une possible interaction directe avec le répresseur transcriptionnel TOPLESS ou R/K-LFG-V/I/F qui est présent chez plusieurs répresseurs et serait un motif de reconnaissance d'interaction avec un co-represseur (Lokerse and Weijers, 2009). Par exemple, le transcriptome du double mutant nul *arf7/arf19* montre que certains gènes de réponses à l'auxine sont activés, d'autres réprimés ce qui laisse entendre que le mécanisme précis d'action des ARFs est encore mal compris et que ces protéines pourraient agir selon les cas comme répresseur ou comme activateur (Okushima et al., 2005a). Au cours du développement du pétale, ARF6, qui est plutôt classé parmi les activateurs, semble également pouvoir agir comme un répresseur et réguler la transition entre division cellulaire et expansion (Varaud et al., 2011). Les

domaines III et IV sont des domaines d'interaction protéine-protéine et servent à la dimérisation d'ARFs entre eux ou entre les ARFs et leurs répresseurs, les Aux/IAAs. Au niveau des sites de liaison à l'ADN, on peut donc imaginer un mélange entre compétitions et interactions entre les différents ARFs pour accéder au site de liaison à l'ADN et modulation de ces interactions en fonction des autres facteurs impliqués dans les complexes régulateurs (Guilfoyle and Hagen, 2012). Toutefois, des données expérimentales manquent pour répondre à ces interrogations.

De manière intéressante, la plupart des mutants nuls des ARFs ne présentent pas ou peu de phénotype au contraire de certaines combinaisons de doubles mutants comme c'est le cas pour *ARF7 et ARF19*. Les simples mutants nuls *arf7* ou *arf19* ont un phénotype faible comparé à celui de double mutant *arf7, arf19* qui présente des phénotypes auxiniques aggravés tels qu'un défaut de développement des racines latérales et une absence de phototropisme dans l'hypocotyle étiolé (Okushima et al., 2005b). Ceci met en avant la redondance fonctionnelle de certains ARFs. Cependant celle-ci ne s'étend pas à l'ensemble des membres de la famille (Guilfoyle and Hagen, 2007). L'exemple d'ARF5 montre néanmoins que certains sont uniques pour leur contrôle de certains aspects du développement. Le mutant *arf5* (ou monopteros *mp*) présente un grave défaut du développement de l'embryon pour lequel le pôle racinaire n'est pas formé suite à une division aberrante de la cellule de hypophyse (Hardtke and Berleth, 1998).

La superposition des profils d'expression des ARFs correspond de manière assez fidèle avec les différents types cellulaires dans l'embryon d'*Arabidopsis* (fig. 11C et D). L'hypothèse tirée de cette élégante démarche serait que la combinaison des différents patrons d'expression des ARFs serait corrélée avec le devenir de la cellule en permettant une réponse à l'auxine spécifique (Rademacher et al., 2011).

Depuis quelques années, on découvre également des facteurs de transcription (bHLH pour ARF6 et MYB pour ARF7) en tant qu'interacteurs de certains ARFs et qui pourraient influencer la transcription des gènes de réponses à l'auxine. C'est par exemple le cas de *MYB77* pour *ARF7* dans le développement des racines latérales (Shin et al., 2007) et BPE, un bHLH pour *ARF6* pour réguler la croissance du pétale (Varaud et al., 2011).

Certains ARFs sont aussi régulés de manière post-transcriptionnelle par des ta-si RNA (trans acting small interefering RNA)(Khan et al., 2011). Ces ta-siARNs sont en fait le produit d'un gène non codant qui est la cible d'un microARN ce qui va générer un clivage du transcrit, qui sera utilisé par une voie de biosynthèse de tasiARN. Plusieurs exemples ont déjà été répertoriés. miR167 régule ainsi l'expression d'*ARF6* et d'*ARF8*, miR160 qui cible *ARF6, ARF10 et ARF17* et miR390 est requis pour la production de TAS3 ta-siARN qui cible *ARF2, 3, et 4* (Khan et al., 2011).

Le rôle de mir390 dans le contrôle du développement des racines latérales a été montré récemment (Khan et al., 2011). Il s'agit d'un microARN qui est inductible par l'auxine et possède le profil spatio-temporel d'un gène impliqué dans les premières étapes d'initiation. De plus, son expression est fortement réduite dans le mutant *slr (solitary root)*, qui est incapable de former des racines latérales. En étudiant l'expression de miR390 dans des fonds mutants pour ARF3 et ARF4, une boucle de rétrocontrôle entre mir390 et ces cibles a été mise à jour, ce qui permet une expression contrôlé de ces régulateurs de développement des racines latérales (Khan et al., 2011). Une partie des ARFs est donc régulé de manière post transcriptionnelle, ce qui représente un niveau de régulation qui s'ajoute au contrôle spatio-temporelle de l'expression d'un gène.

Les Aux/IAAs, les répresseurs de la voie

Les Aux/IAAs sont les répresseurs transcriptionnels de la voie $SCF^{TIR/AFBs}$. Ils ont initialement été découverts chez le pois (*Pisum sativum*) ou le soja (*Glycine max*) pour leur expression rapide en réponse à l'application exogène d'auxine (Theologis et al., 1985). Les Aux/IAAs forment une famille multigénique de 29 membres chez *Arabidopsis* (Overvoorde et al., 2005). Les simples mutants « perte de fonction », ne présentent pas de phénotype ; les doubles mutants voire les triples mutants (ou plus) d'une même sous-classe n'ont pas de phénotype laissant penser à une forte redondance fonctionnelle au sein de la famille (Overvoorde et al., 2005).

Les Aux/IAAs possèdent quatre domaines conservés. Les domaines III et IV sont des domaines d'interaction protéine-protéine similaires à ceux présents chez une majorité d'ARFs. C'est grâce à la présence de ces domaines d'interaction protéine-protéine que les ARFs et des Aux/IAAs sont susceptible d'interagir et que les Aux/IAAs inhibent l'action des ARFs activateurs. Le domaine II, appelé le dégron, est essentiel pour la régulation de la durée de vie de la protéine. C'est en effet le domaine d'interaction avec les protéines à F-box TIR/AFBs. Les mutants de gain de fonction des Aux/IAAs possèdent systématiquement une mutation dans le dégron, ce qui empêche ou réduit l'interaction de la protéine avec les complexes $SCF^{TIR/AFBs}$ et donc empêche sa dégradation par le protéasome. Les Aux/IAAs étant les répresseurs de la voie $SCF^{TIR/AFBs}$, leur stabilité réprime la voie de signalisation de l'auxine, ce qui induit de graves problèmes de développement. Pour exemple, je

citerai le mutant de gain de fonction d'*IAA14*, appelé *slr1* (pour *solitary root1*) qui possède une mutation dans le dégron. La stabilisation d'IAA14 inhibe totalement l'initiation des racines latérales même en présence d'auxine (Fukaki et al., 2002).

Le domaine I est également important car il s'agit d'un domaine d'interaction protéine-protéine qui permet le recrutement de corépresseurs (Tiwari et al., 2004). Le premier corépresseur identifié fut la protéine TOPLESS, qui se lie au motif de répression (LxLxL). Dans le cas de d'IAA 12 (ou BDL pour BODENLOS) qui forme un module de régulation avec ARF5 (MP, MONOPTEROS), cette liaison permet de réprimer l'action d'ARF5 au cours du développement de l'embryon (Long et al., 2006; Szemenyei et al., 2008). Si TOPLESS est fusionnée au domaine III et IV des Aux/IAAs, on obtient alors un répresseur permanent qui peut directement se lier à ARF5 et n'est plus dépendant de la dégradation par le complexe $SCF^{TIR/AFBs}$. La plante contenant cette construction a alors un phénotype similaire au mutant de gain de fonction *bodenlos* (*iaa12*) ou au mutant nul *monopteros (arf5)*, c'est-à-dire, pas de racine chez l'embryon (Weijers et al., 2005). Ce résultat montre à quel point la stabilité des Aux/IAAs est essentielle dans la voie $SCF^{TIR/AFBs}$.

Les interactions ARFs-Aux/IAAs

L'interaction entre les ARFs et les Aux/IAAs est l'une des clés de voute du modèle aujourd'hui admis de la signalisation de l'auxine. Deux exemples particulièrement étudiés sont le couple ARF5-IAA12 dans l'embryon (Moller and Weijers, 2009) et le trio IAA14, ARF7-ARF19 pour les racines latérales. Comme évoqué précédemment dans leurs paragraphes respectifs, le double mutant nul *arf7, arf19* et le mutant de gain de fonction d'IAA14, *slr1*, présentent des phénotypes similaires avec l'absence de racines latérales. De plus ils possèdent un profil d'expression comparable dans les racines, laissant présager qu'IAA14 interagit de façon privilégiée avec ARF7 et ARF19 (Peret et al., 2009). Plus récemment, les différents travaux visant à explorer les interactions entre les ARFs activateurs-répresseurs et les Aux/IAAs en système hétérologue (levure) permettent d'observer une tendance favorisant certaines combinaisons d'interaction (Vernoux 2011 et al., 2011).

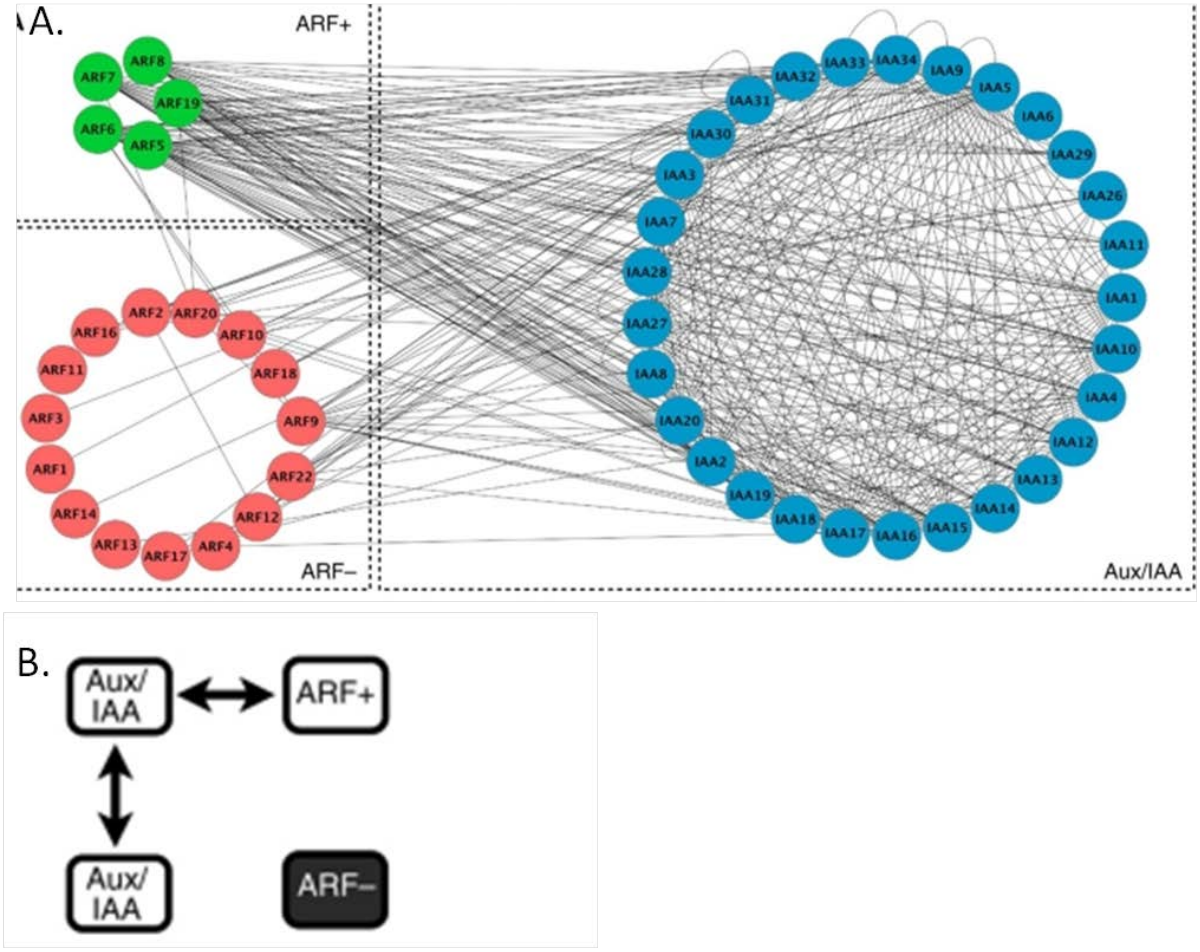


Figure 12 – test des interactions privilégiées entres les ARFs et les Aux/IAAs

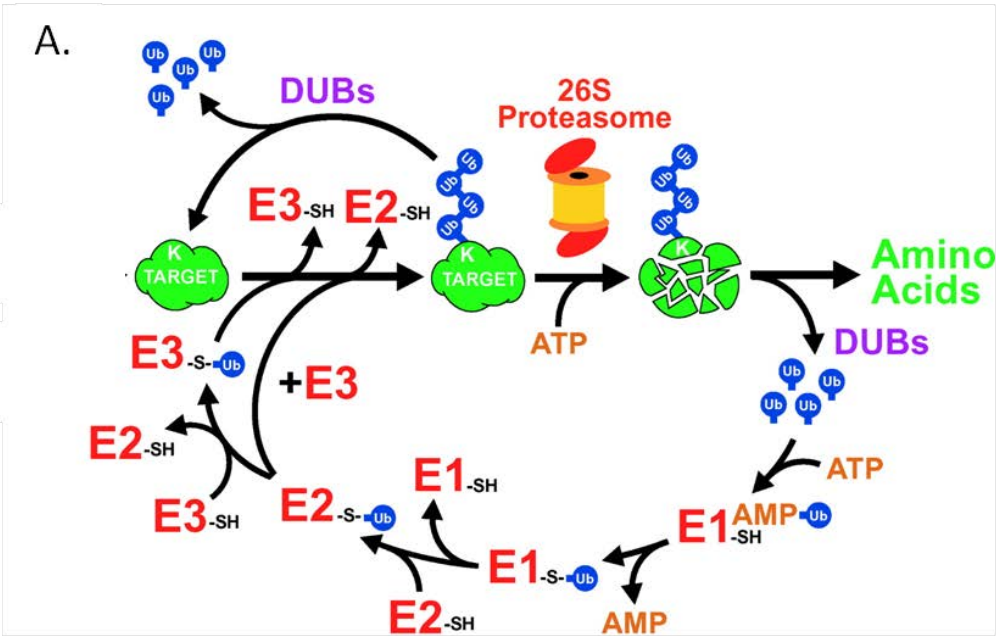
Résultat de tests d'interaction entre les différents Aux/IAA et ARFs en système hétérologue. Cette étude a permis de mettre en avant des affinités d'interactions plus élevées entre les Aux/IAAs (en bleu) et les ARFs activateurs (ARF – et en vert) ou entres les Aux/IAAs eux-mêmes par rapport aux interactions entre les ARFs répresseurs (ARF + et en rouge) avec les deux autres familles testées (ARF activateurs et Aux/IAAs).

Source : (Vernoux et al., 2011)

Il semble que l'affinité entre les ARFs considérés comme activateurs et les Aux/IAAs est plus forte que pour les autres types d'interactions ARFs activateurs – ARFs répresseurs, Aux/IAAs – Aux/IAAs et Aux/IAAs- ARFs répresseurs (Fig. 12) (Vernoux et al., 2011). Peu de travaux concernent l'étude de ces interactions mais de manière intéressante, les ARFs répresseurs possèdent un acide aminé supplémentaire dans le domaine III par rapport aux ARFs activateurs. Le domaine III servant à l'interaction avec les Aux/IAAs, il pourrait être à l'origine des différences d'affinité (Guilfoyle and Hagen, 2012). Bien qu'il faille attendre d'autres études pour conforter ou infirmer ce modèle (notamment des études *in vivo*), il semble qu'il existe des affinités différentes entre les ARFs et les Aux/IAAs.

Toutefois, il faut également prendre en compte la spatio-temporalité des profils d'expressions de ces différents acteurs. Comme montré dans le chapitre précédent pour les ARFs, on peut imaginer que les profils d'expressions des Aux/IAAs sont également importants pour la réponse auxinique de la cellule.

L'assemblage des profils d'expression des ARFs et des Aux/IAAs ainsi que les tests d'affinités *in vivo* seraient des données intéressantes et pourraient montrer un aspect important de la régulation de la voie $SCF^{TIR/AFBs}$ dans chaque cellule. Ces différents niveaux de régulations pourraient contrôler finement la capacité des ARFs activateurs à permettre la transcription des gènes de réponses à l'auxine. Dans un premier temps, Les ARFs activateurs doivent se débarrasser de l'inhibition des Aux/IAAs puis faire face à la compétition des ARFs répresseurs sur les sites « AuxRE » avant de pouvoir transcrire les messagers de réponse à l'auxine. L'accumulation de ces niveaux de régulation pour les Aux/IAAs et les ARFs présente un degré de complexité autrement plus important que celui présenté dans le modèle simplifié de la voie $SCF^{TIR/AFBs}$.



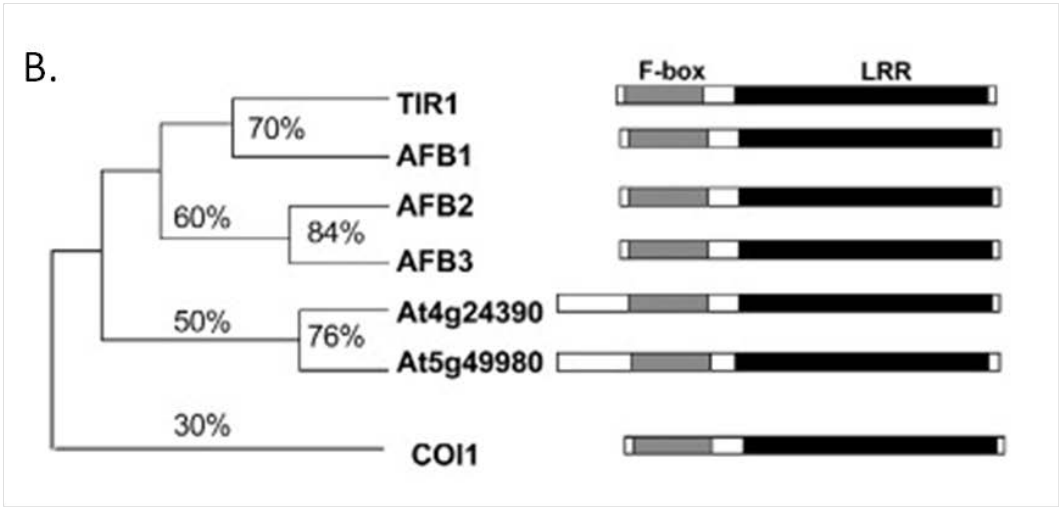


Figure 13 – Les TIR/AFBs permettent l'ubiquitination de cibles

Le processus de dégradation par le protéasome permet de dégrader des cibles pré-identifées. C' est un système très répandu chez les plantes (A). E1 va permettre le chargement de l'ubiquitine. Il s'agit d'un mécanisme consommant de l'ATP. L'ubiquitine est alors transférée sur E2 puis sur E3 qui lors de la liaison avec la cible permettra sa poly-ubiquitination. Celle-ci entraine la dégradation de la cible par le protéasome. Les TIR/AFBs sont une famille monophylétique. L'alignement des séquences protéiques permet de montrer qu'elles sont éloignées de COI, la plus proche F-box connue (B). Deux sous-groupes se distinguent. Le premier comprend TIR1, AFB1, AFB2 et AFB3, le deuxième AFB4 et AFB5 (dont seul les numéros d'accession sont affichés sur ce diagramme)

Source A: (Smalle and Vierstra, 2004), B : (Dharmasiri et al., 2005b)

Les TIR/AFBs

Chez les plantes, le système de dégradation protéique qui permet la dégradation de protéines cibles par polyubiquitinylation est très largement utilisé. 6% des protéines *d'Arabidopsis thaliana* sont concernées dans ce processus (Vierstra, 2009). Plusieurs types de complexes multiprotéiques, constitués de protéines « scaffold » et d'un ensemble de protéines et d'enzymes sont impliqués dans les processus d'ubiquitination et de contrôle de la durée de vie des protéines. Ils ne seront pas détaillés ici où j'évoquerai seulement les principales étapes et les complexes ubiquitine ligase E3 de type SCF (pour SKP1, CULLIN, F-box). L'ubiquitination comporte une première étape dite d'activation par l'enzyme E1, puis une étape de conjugaison où l'ubiquitine est conjuguée à l'enzyme E2, laquelle est recrutée par le complexe SCF qui assure la troisième étape qui est la ligation c'est-à-dire le transfert de l'ubiquitine sur la protéine cible (ou substrat). Ce cycle se répète pour aboutir à la polyubiquitination des substrats (fig.13A). La dynamique d'assemblage de ces complexes ne sera pas abordée mais constitue un aspect important de la dynamique des systèmes SCF. La spécificité d'interaction entre les complexes SCFs et leurs cibles est due aux protéines F-box qui recrutent et interagissent avec le substrat (Cardozo and Pagano, 2004). Chez les plantes, l'implication des F-box et donc des complexes SCF est très répandue en particulier dans les mécanismes de la signalisation. On en dénombre pas moins de 700 chez *A. thaliana* alors que ce nombre chute à 100 chez les animaux, 31 chez *D. melanogaster* et 21 pour la levure S. *cerevisiae* (Vierstra, 2009). Parmi ces 700 F-box certaines sont essentielles pour la signalisation hormonale comme SLY1 qui est le récepteur des gibbérellines ou COI1 pour le jasmonate (McGinnis et al., 2003; Thines et al., 2007).

Concernant la signalisation de l'auxine, un groupe de six F-box proches phylogénétiquement est impliqué dans la signalisation de l'auxine. Parmi ces six gènes, *TIR1* a été le premier à être identifié comme étant un récepteur nucléaire de l'auxine (Gray et al., 2001; Dharmasiri et al., 2005a; Dharmasiri et al., 2005b; Kepinski and Leyser, 2005). Ces six protéines possèdent entre 50 et 70% de similarités au niveau de leurs séquences protéiques (Dharmasiri et al., 2005b; Parry et al., 2009). Elles possèdent toutes un domaine F-box dans la partie amino-terminale, le reste de la protéine est constitué d'une succession de 18 domaines riches en leucine (domaine LRR, leucine rich repeat). *AFB4* et *AFB5* se distinguent car elles forment un sous-groupe possèdant un domaine supplémentaire de fonction inconnue en position amino-terminale (Dharmasiri et al., 2005b)(fig.13B). Ces deux gènes semblent se comporter différemment par rapport aux quatre Fbox et leur rôle n'est pas encore clairement établi comme étant lié à la signalisation de l'auxine (Walsh et al., 2006).

Les simples mutants ne présentent pas de phénotypes forts comparés au phénotype du triple (*tir1.1, afb2.1, afb3.1*) et quadruple (*tir1.1, afb1.1, afb2.1, afb3.1*) mutant qui présentent

d'importants défauts de développement. Chez ces deux mutants, trois groupes de phénotypes distincts ont été mis en évidence : 1/3 des plantes se développe, 1/3 développe une racine courte et quelques feuilles mais ne survive pas, et 1/3 présente des phénotypes de type *bodenlos/iaa12* également non viable. L'apparition de phénotype de type *bdl* est cohérente avec une stabilisation d'IAA12 chez l'embryon en l'absence des F-box , pouvant donc empêcher l'activité d'ARF5 dans le développement de l'embryon. Cette étrange ségrégation n'est à ce jour pas expliquer mais on peut supposer qu'il s'agisse d'un effet seuil et que les autres AFBs, non mutées complémentent la fonction des protéines manquantes. Ces résultats indiquent néanmoins une redondance fonctionnelle pour les *TIR1, AFB1, AFB2* et *AFB3* (Dharmasiri et al., 2005b).

Un site de fixation de miR393 a été identifié sur *TIR1, AFB2* et *AFB3* ce qui montre une potentiel régulation post-transcriptionnelle ciblant l'abondance relative des ARNs pour ces 3 *TIR/AFBs* (Parry et al., 2009). Cette régulation a été confirmée lors d'une infection par *Pseudomonas syringae.* En réponse, la plante produit miR393 en quantité, ce qui induit l'inhibition de l'expression des trois cibles et ainsi réduit la capacité de réponse des plantes à l'auxine. Cette réponse aux pathogènes peut également être déclenchée par la flagelline, un éliciteur classique de réponse aux pathogènes (Navarro et al., 2006). Ce mécanisme de régulation pourrait ainsi permettre à la plante de réagir rapidement en cas d'infection et potentiellement de limiter l'énergie que lui coute son développement (médié par l'auxine) au profit de l'énergie métabolique que nécessite une réponse aux pathogènes (Navarro et al., 2006).

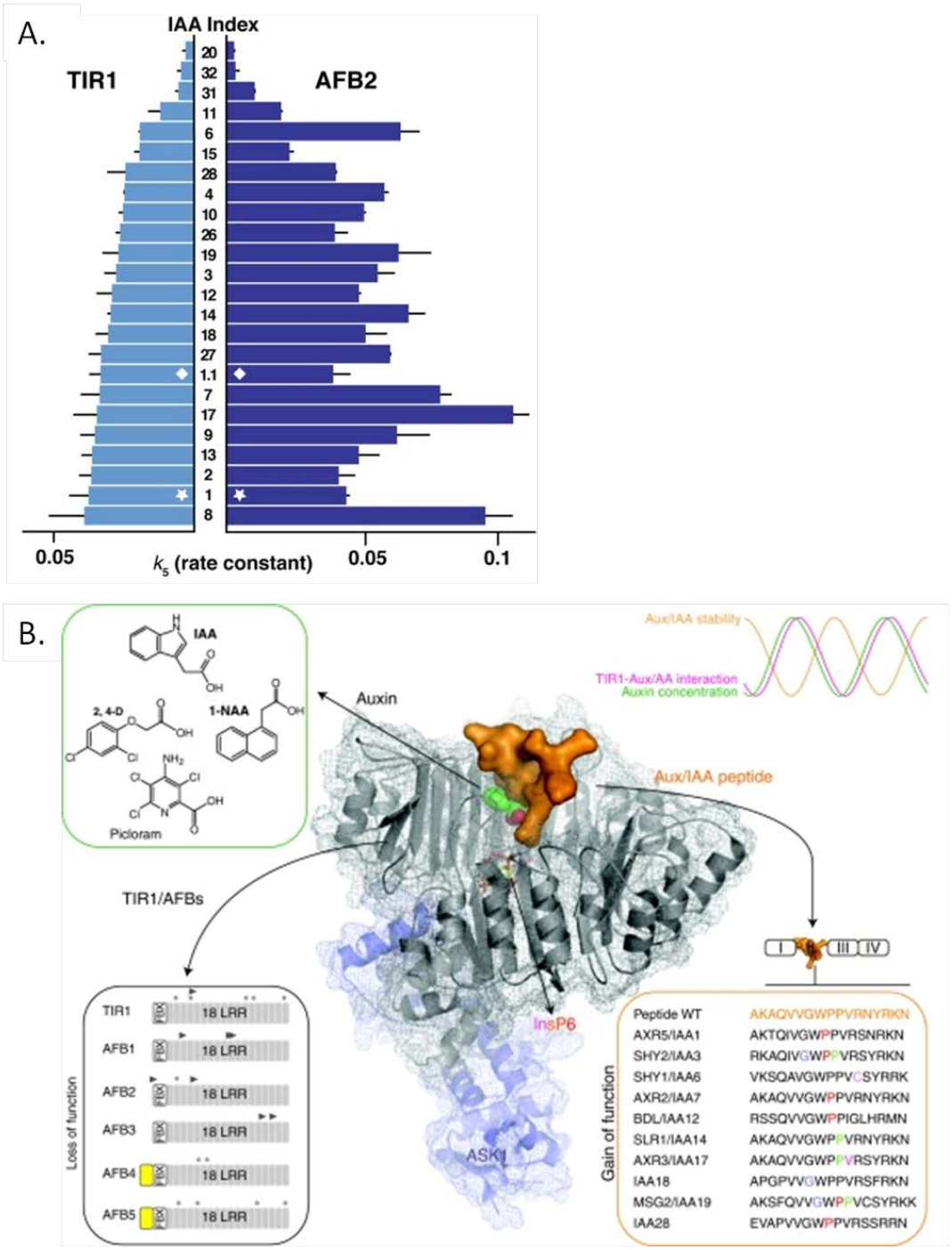


Figure 14 – Interaction auxine dépendante des corécepteurs Aux/IAAs-TIR/AFBs

Mesure des constante de dégradation mesurée *in vitro* des couples TIR1-Aux/IAAs et AFB2-Aux/IAAs. On remarque aisément que chaque combinaison à sa propre sensibilité à la dégradation (a). Structure conformationnelle du complexe Aux/IAAs-TIR/AFBs qui est permis grâce à la présence d'auxine. Plusieurs auxines permettent l'interaction entre les différents TIR/AFBs recensés et les Aux/IAAs. Une mutation dans le dégron des Aux/IAAs inhibe cette interaction (b).

Source : A. (Havens et al., 2012) B : (Calderon-Villalobos et al., 2010)

Interaction TIR/AFBs - Aux/IAAs

Historiquement, c'est TIR1 qui a été identifié en premier sur un crible de plante résistant au NPA d'où son nom Transport Inhibitor Resistant (Ruegger et al., 1998). Plusieurs années plus tard son rôle en tant que récepteur à l'auxine a été mis en avant puis confirmé par des expériences en systèmes hétérologues en présence d'un Aux/IAA ou d'un peptide recouvrant le dégron du domaine II (Gray et al., 2001; Kepinski and Leyser, 2004; Dharmasiri et al., 2005a). La nature de la liaison entre TIR1 , l'auxine et les Aux/IAA a ensuite été publiée (Tan et al., 2007). Par analogie, l'activité de récepteur a été confirmé pour AFB1, AFB2 et AFB3 (Dharmasiri et al., 2005b; Parry et al., 2009). Ces protéines F-box sont considérés comme étant des corécepteurs avec les Aux/IAAs (Calderon-Villalobos et al., 2010).

Dans cette liaison, l'auxine joue un rôle primordial en facilitant l'interaction entre les deux co-récepteurs. Au niveau de la structure protéique, les TIR/AFBs forment une poche largement ouverte dans laquelle se loge l'auxine. L'InsP6 se place également dans la poche et semble jouer le rôle de cofacteur bien que son rôle soit encore méconnu. La liaison de l'auxine n'entraine pas de modification de structure, elle agirait seulement comme un ligand qualifié de glue moléculaire. L'agencement de ces différents acteurs crée une environnement hydrophobe (Tan et al., 2007; Calderon-Villalobos et al., 2010).

C'est par le dégron des Aux/IAAs que se fait l'interaction avec les F-box grâce à des liaisons non covalentes (Calderon-Villalobos et al., 2010). Les protéines TIR/AFBs seules ne lient que très faiblement l'auxine en revanche l'association Aux/IAA -Fbox augmente la liaison d'où la notion de corécepteurs. Les mutations dans le dégron affectent donc la qualité des liaisons covalentes et empêchent la stabilisation de l'interaction avec la F-box (Fig.14).

L'affinité des Aux/IAAs pour les Fbox et pour la liaison de l'auxine dépend des combinaisons (paires) formées comme l'ont montrés des tests de l'affinité relative de toutes les Aux/IAAs avec TIR1 ou AFB2 (Fig.14). Concernant les autres domaines conservées des Aux/IAAs, ils semblent aussi jouer un rôle sur la stabilité des interactions protéine-protéine formées. Par exemple, la qualité de la liaison est plus forte avec la protéine IAA7 entière qu'avec l'unique domaine II d'IAA7 (Calderon Villalobos et al., 2012). En système levure, l'importance des domaines I, III, IV a également été montré comme des séquences régulatrices qui accélèrent ou freinent la dégradation des Aux/IAAs (Havens et al., 2012). L'importance des acides aminés hors du domaine d'intéraction TIR/AFBs – Aux/IAAs a récemment été mis en exergue grâce à l'étude de deux mutations (D170E et M473L) Elles augmentent la capacité d'interaction *in vitro* et *in vivo* entre TIR1et certains Aux/IAAs. L'expression de TIR1 modifiée induit des phénotypes auxinique chez la plante.

Les résultats de ces études montrent également que les spécificités de liaisons sont différentes entre les différentes combinaisons de corécepteurs AFBs et AUX/IAAs. Ces compraison d'intéraction, bien que pratiquées dans des tubes à essais ou en système levure montrent l'éventuelle complexité du système avec des récepteurs de haute et faible affinité pour l'auxine selon les cellules ou le contexte (Yu et al.; Calderon Villalobos et al., 2012; Havens et al., 2012).

Les modifications post-traductionnelles semblent jouer également sur cette affinité avec l'auxine. Le dégron des Aux/IAAs contient deux prolines très conservées. En système *in vitro*, il a été montré que le degré d'hydroxylation de ces prolines modifie la qualité de la liaison avec TIR1 et rend l'interaction dépendante ou indépendante de la présence d'auxine (Dharmasiri et al., 2003). Cette hydroxylation existe-t-elle *in vivo* et comment le degré d'hydroxylation serait régulé restent encore à élucider. Toutefois, chez la tomate (*Lycopersicon esculentum*), le gène *DIAGEOTROPICA* pourrait jouer un rôle étant donné qu'il code pour une cyclophylline qui agit sur l'isomérisation des prolines (Oh et al., 2006). Le mutant *dgt* présente des phénotypes auxiniques comme une réduction de la dominance apicale, l'altération de réponses à l'auxine etc. Chez *P.patens*, on retrouve un orthologue de DIAGEOTROPICA et le mutant possède également des phénotypes auxiniques lié au développement de la mousse (Lavy et al., 2012). La nitrosylation des cystéines est également une modification post traductionnelles importante qui affecte la stabilité des Aux/IAAs. Des mutations sur ces cystéines, acide aminés cibles de nitrosylation provoquent une baisse de l'interaction entre l'IAA7 et TIR1. De plus, des colorations GUS révélant la présence du marqueur de stabilité des Aux/IAAs, la protéine recombinante AXR3NtGUS, ont montré qu'il existait un lien entre la disponibilité en azote et la capacité d'interaction entre les Aux/IAAs grâce à l'utilisation de chélateurs ou de source de monoxyde d'azote (Terrile et al., 2012).

La plasticité de ce système

A la vue de la diversité des membres et de la complexité conférées par les différents profils d'expressions et les affinités relatives, on imagine que chaque tissu possède son propre « écosystème auxinique » ce qui permet au tissu d'avoir une sensibilité qui lui est propre. Il faut également garder à l'esprit que d'autres facteurs peuvent intervenir sur l'homéostasie de l'auxine. Les interconnexions avec les autres hormones ou d'autres facteurs comme la lumière ou les nutriments peuvent donc moduler la réponse auxinique. Comme exemple, je citerai la démonstration que la carence en phosphate inorganique dans le sol provoque dans la racine, une augmentation de l'expression de TIR1 ; cette dernière accroit la capacité de dégradation des cibles (Aux/IAAs) et permet l'activation de la transcription en réponse à l'auxine, en particulier via ARF7 et ARF19 ce qui aboutit au

développement du système racinaire afin de mieux exploiter les ressources du sol. (Perez-Torres et al., 2008).

Les autres éléments de signalisation

Comme je viens de vous le détailler, la voie $SCF^{TIR/AFBs}$ semble bien plus compliquée que le modèle simplifié couramment utilisé. Toutefois, pour bien prendre en compte cette complexité, il faut tenir compte des différents éléments de signalisation autres que les trois briques essentielles du système ($SCF^{TIR/AFBs}$, Aux/IAAs et ARFs). A ce jour, peu ont été découverts mais il y a fort à parier que leur nombre soit bien plus important.

SKP2A

Je me dois de mentionner la protéine de liaison d'auxine SKP2A, récemment proposée comme récepteur d'auxine (Jurado et al., 2008; Jurado et al., 2010). Il s'agit tout comme les TIR/AFBs, d'une protéine de type F-box. SKP2A est connu pour être impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire. Les cibles de SKP2A sont des régulateurs négatifs importants de la division comme E2FC et DPB (del Pozo et al., 2002). Tout comme pour les TIR/AFBs, le complexe SCF^{SKP2A} est capable de fixer l'auxine et de permettre la dégradation de ces cibles.

PICKLE

Sans trop rentrer dans les détails, j'aimerais citer le cas du gène PICKLE. *PICKLE* code pour un remodeleur chromatinien ATP-dépendant qui enlève les acétylations des histones ce qui modifie l'état chromatinien. Quatre allèles de *PICKLE* ont été trouvés lors d'un crible de suppression du phénotype racinaire de *slr1* (appelé suppresseur of solitary root *, ssl*), le mutant de gain de fonction d'IAA14 (Fukaki et al., 2006). Ainsi le mutant *slr1, ssl2* retrouve un phénotype comparable au sauvage. Toutefois, *pickle* ne peut pas restaurer le phénotype du double mutant *arf7, arf19*. Ce résultat indique que *PICKLE* joue un rôle dans la voie de signalisation de l'auxine qui génétiquement, se situe entre *IAA14* et les *ARFs*. L'application d'inhibiteur spécifique de la famille de PICKLE (histone dé-acétylase) supprime le phénotype du mutant *solitary root,* ce qui montre l'implication de processus épigénétiques pour le développement des racines latérales (Fukaki et al., 2006). A ce jour, aucune autre étude n'évoque un rôle de *PICKLE* avec d'autres ARFs ou Aux/IAAs ou n'a permis de mieux comprendre ce phénomène.

Corépresseurs des Aux/IAAs

Le corépresseur transcriptionnel TOPLESS a été évoqué précédemment. Il y a fort à parier que d'autres corépresseurs puissent interagir avec des Aux/IAAs pour participer à la répression de l'activité des ARFs. Bien que non encore publié, il a été évoqué que MAB2 qui fait parti du complexe MEDIATOR pourrait jouer un rôle dans la corépression avec les Aux/IAAs avec lesquels ils interagissent. Le mutant *mab2* peut partiellement supprimer le phénotype gain de fonctions de certains Aux/IAAs, et dans ce fond génétique, l'expression de PINOID est fortement augmentée (Ito et al., 2011; Strader and Nemhauser, 2013)

IBR5

Le rôle d'IBR5 dans la signalisation est encore inconnu. IBR5 est issu d'un crible de résistance à l'IBA. Il s'agit d'une phosphatase à double spécificité (Monroe-Augustus et al., 2003). L'équipe de Bonnie Bartel, à l'origine de la découverte d'IBR5 a émis l'hypothése qu'IBR5 agissait de manière indépendante de la voie $SCF^{TIR/AFBs}$ en se basant sur un phénomène d'additivité observé dans la croissance de la racine ou la résistance aux hormones. Toutefois, IBR5 semble agir sur la durée de vie des Aux/IAAs car on observe plus la présence du marqueur de la durée de vie des AUX/IAAs, AXR3NtGUS après sa production, au contraire du fond sauvage ou *tir1.1* (Strader et al., 2008). Le rôle d'IBR5 est donc encore vague et son rôle dans la signalisation de l'auxine reste encore à prouver.

D'autres seconds messagers

Plusieurs études ont avancé l'hypothèse de l'implication de cascade de MAPkinases (Kovtun et al., 1998) ou de signaux calciques (Shishova and Lindberg, 1999) dans la signalisation auxinique. Il s'agit d'éléments de signalisation classiques connus comme pouvant être impliqués dans une voie de signalisation. Leurs rôles restent toutefois encore incertain et ne sera donc pas évoqué de manière plus précise.

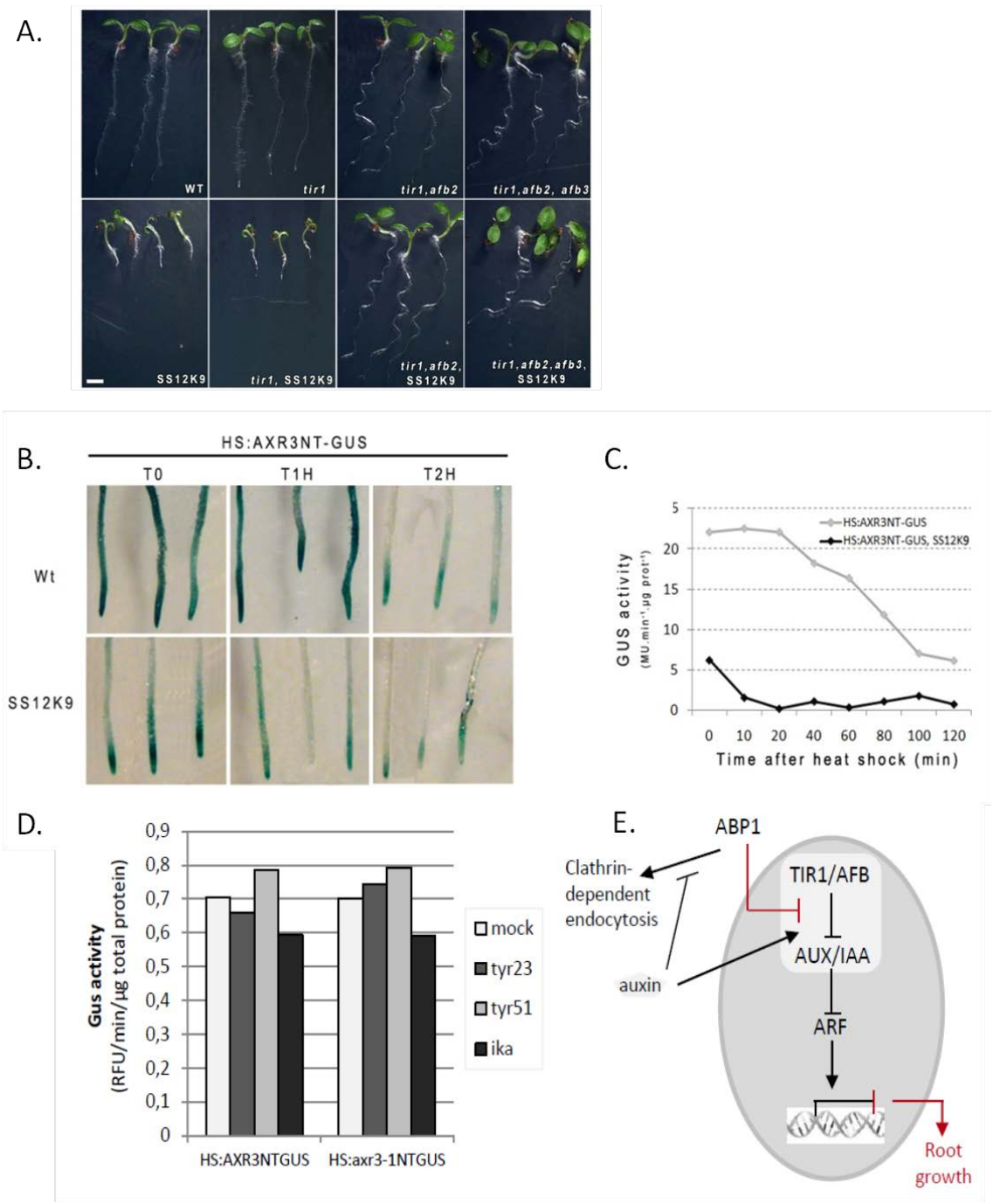


Figure 15 – ABP1 agit sur la stabilité des Aux/IAAs

Les TIR/AFBs sont épistatiques d'ABP1 comme le montre la suppression du phénotype ss12k dans le fond tir1.1, afb2.1, afb3.1, ss12k (a). Il semble qu'ABP1joue sur la stabilité des Aux/IAAs comme le montre les colorations GUS (b) et la fluorimétrie (c). L'utilisation d'inhibiteur d'endocytose révélè que cette action d'ABP1 sur la stabilité des Aux/IAAs est indépendante de l'action d'ABP1 sur l'endocytose de vésicules à clathines (d). Ces résultats ont donc inspirés un modèle de fonctionnement des deux récepteurs dans la voie de signalisation de l'auxine (e).

Source : (Tromas et al., 2013, en révision & en annexe)

Comment ABP1 agit sur la voie $SCF^{TIR/AFBs}$

N.B : L'étude montrant le rôle d'ABP1 sur la voie $SCF^{TIR/AFBs}$ a été menée dans l'équipe et est actuellement en révision après les commentaires des reviewers. Bien qu'ayant pris part à cette étude dans ses derniers développements, il s'agit principalement du travail de l'ancien doctorant du laboratoire. Le manuscrit de cet article est situé en annexe. Je vous invite donc à le lire car ce papier apporte des éléments importants pour soutenir une action d'ABP1 sur la voie $SCF^{TIR/AFBs}$.

Cette étude présente un résultat à ce jour jamais décrit. Il met en effet en avant une relation génétique entre ABP1 le récepteur membranaire de la signalisation de l'auxine et la voie nucléaire $SCF^{TIR/AFBs}$. L'utilisation de plantes *tir1.1, afb2.1, afb3.1*, ss12k a permis de révéler une épistasie des TIR/AFBs sur ABP1. Les mutations nulles des gènes TIR/AFBs sont donc capables de supprimer le phénotype des plantes inactivées pour ABP1 (Fig. 15.A).

L'étude de la durée de vie du marqueur de la durée de vie des Aux/IAAs, la protéine AXR3NtGUS. Les données montrent que l'inactivation d'ABP1 conduit à une instabilité des Aux/IAAs lorsqu'ABP1 n'est plus fonctionnelle (Fig. 15.B et C). Cette instabilité du marqueur est due à une plus forte dégradation de la protéine rapportrice par le protéasome 26S comme le prouve le traitement des plantules avec un inhibiteur du protéasome 26S, le MG132. En présence de cet inhibiteur, les niveaux de production du marqueur sont similaires dans le fond sauvage ou inactivé pour ABP1. Il avait déjà été montré que l'inactivation d'ABP1 n'affectait pas les contenus en auxine libre, ce qui aurait pu expliquer un tel effet.

En parallèle, il semblait important de déterminer si la voie d'endocytose dépendante des vésicules à clathrine était éventuellement suffisante pour expliquer les effets observés sur la voie $SCF^{TIR/AFBs}$. J'ai testé la quantité de marqueur après la phase de production de la protéine marqueur (après choc thermique) lorsque l'endocytose est inhibée par des drogues telles que l'ikarugamycine et la tyrphostine A23. Les données de fluorimétrie ont révélé qu'aucune de ces drogues ne permettait de modifier la quantité de la protéine rapportrice AXR3NtGUS. Ce résultat écarte le processus d'endocytose comme acteur de la voie dépendante d'ABP1 agissant sur l'homéostasie de la voie $SCF^{TIR/AFBs}$. Il soulève également la question de la part relative des modifications d'endocytose par rapport aux régulations transcriptionnelles dans les altérations développementales liées à l'inactivation d'ABP1. Les données présentées dans l'article sont clairement en faveur des modifications d'expression génique via la modulation de la $SCF^{TIR/AFBs}$.

Evolution de la voie

Le modèle de signalisation que je vous ai présenté est valide pour le modèle *Arabidospis thaliana*. Chez d'autres espèces modèles comme le riz (*Oriza sativa*), si le nombre d'acteurs change, les éléments semblent avoir la même fonction, on retrouve ainsi moins d'ARFs et d'Aux/IAAs. Toutefois, il est intéressant de regarder la présence de ces éléments de signalisation de l'auxine dans des plantes plus éloignées phylogénétiquement. Cette approche permet d'émettre des hypothèses sur la mise en place de la signalisation de l'auxine au cours de l'évolution.

L'auxine est une hormone essentielle pour toutes les plantes terrestres. On retrouve des orthologues des principaux acteurs de la voie de l'auxine précédemment décrits jusqu'aux mousses bien que leur nombre ne soit pas le même. Chez la mousse modèle *Physcomitrella patens*, on retrouve ainsi tous les éléments de signalisation de l'auxine que ce soit les enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'auxine (*YUCCAs*), sa perception (*TIR1/AFBs-AUX/IAAs* et *ABP1*) ou sa signalisation, les ARFs, ou son transport (*PINs, PILS, AUX1/LAXs*) (Rensing et al., 2008; Tromas et al., 2010; Viaene et al., 2013). La voie $SCF^{TIR/AFBs}$ fonctionnait déjà chez l'ancêtre commun de *Physcomitrrella patens* et d'*Arabidopsis thaliana* et l'interaction $SCF^{TIR/AFBs}$ – Aux/IAAs était toujours auxine dépendante. (Prigge et al., 2010).

ABP1 a surement été présent dans le génome de l'ancêtre commun à toutes les plantes terrestres de part sa présence dans toutes les espèces analysées avec un nombre de copies faible voir unique (Tromas et al., 2010). Une différence apparait néanmoins entre *Arabidopsis* et les mousses, il s'agit de l'absence de signal de rétention dans le réticulum chez les mousses (Panigrahi et al., 2009). On peut émettre l'hypothèse que ce signal de rétention et donc le stockage d'ABP1 dans le réticulum est une innovation qui a permis de mieux contrôler la réponse à l'auxine.

Chez les Streptophytes, d'après les analyses phylogénétiques, les transporteurs PINs n'étaient pas localisés au niveau de la membrane plasmique mais dans le réticulum, comme les PILS et les PINs courts (Viaene et al., 2013). La localisation des PINs longs à la membrane plasmique est donc potentiellement un moyen de mieux contrôler le transport polarisé de l'auxine chez des organismes multicellulaires (De Smet et al., 2011).

Chez les Chlorophytes, la présence d'éléments de signalisation auxiniques est parcellaire, il semble ne pas y avoir d'orthologues des éléments de la voie $SCF^{TIR/AFBs}$, ni de PINS (Lau et al., 2009; Viaene et al., 2013). Toutefois, on trouve des orthologues d'*ABP1* et des autres transporteurs de type Aux/LAX et ABC. On trouve également la présence de certains gènes de biosynthèse. (Tromas et al., 2010; De Smet et al., 2011).

D'après ces différentes études, ABP1 est donc l'un des premiers éléments de signalisation apparu. L'apparition de nouveaux éléments de signalisation et de transporteurs est corrélé avec une complexification de l'organisation des organismes notamment l'acquisition d'une polarité, la multicellularité… On peut donc supposer que la mise en place d'un transport polarisé a pu permettre une meilleure répartition de l'auxine, et que le contrôle de ces flux a permis un développement plus complexe. Enfin la complexification de sa signalisation a permis de mieux gérer les flux d'auxine et ajuster les réponses cellulaires aux contraintes du développement et de stimuli extérieurs. La mise en place d'une sorte de système de régulation de la présence d'ABP1 à la membrane, permis grâce au stockage d'ABP1 dans le réticulum (avec l'apparition du KDEL), permet d'apporter un contrôle strict de l'abondance relative de la protéine à la membrane plasmique. De cette évolution a pu résulté la double localisation d'ABP1. Si le rôle de récepteur est associé à la membrane plasmique, le réticulum apparait davantage comme organe de stockage et de régulation.

Le modèle de l'hypocotyle étiolé

Description du modèle

Lors d'une croissance à l'obscurité, la plantule se développe en suivant le programme développemental de skotomorphogenèse qui se caractérise par un étiolement important de l'hypocotyle et une crosse apicale permettant de plaquer les cotylédons, encore fermés, contre l'hypocotyle. Ce processus permet à la plantule d'émerger du sol lors de la germination et d'atteindre la surface pour enfin devenir autotrophe grâce à la captation de l'énergie lumineuse. L'hypocotyle étiolé constitue un modèle physiologique intéressant car il ne met en jeu que l'expansion cellulaire (Gendreau et al., 1997). Etudier le développement de l'hypocotyle étiolé est donc un modèle de choix pour une étude ciblée sur l'expansion cellulaire.

Comprendre le programme de développement de la skotomorphogenèse doit se faire en intégrant les connaissances de la photomorphogenèse. Le développement d'une plantule est en fait issu d'une balance entre ces deux programmes et c'est la qualité de la lumière qui agit sur ce rapport de force. Selon les stimuli lumineux, les hormones, la balance penche en faveur de l'un des deux programmes développementaux. A l'inverse d'un système ON/OFF, cette régulation fine permet ainsi de moduler le développement de la plante en conditions de lumière faible ou pour permettre à une plante de s'écarter d'une position où la lumière est limitante (syndrome d'évitement).

Deux types de facteurs de transcription sont les effecteurs de la skotomorphogenèse ou de la photomorphogenèse. D'un coté, des facteurs de transcription de type leucine zipper, HY5 (ELONGATED HYPOCOTYL) et HYH (HY5 HOMOLOG) permettent la transcription des gènes de réponse à la lumière. De l'autre, les PIFs, des facteurs de transcription de la famille des bHLH sont chargés de mettre en place et de maintenir la skotomorphogenèse.

Les PIFs

Les PIFs (Phytochrome interacting factor) sont un famille de facteurs de transcription de type bHLH essentiel pour la skotomorphogenèse comme le montre le quadruple mutant pour les gènes *PIF 1,3,4 et 5* (appelé *pifq)* qui présente un phénotype dé-étiolé à l'obscurité (leivar and quail 2011)(Shin et al., 2009). A l'obscurité, les PIFs ont la capacité de se fixer sur des séquences promotrices appelés G box. Les gènes possédant cette boîte de régulation sont impliqués dans l'expression des gènes affectant le développement selon les conditions de lumière, des enzymes impliquées dans la signalisation de différentes hormones (auxine, brassinostroide, gibberrellines).

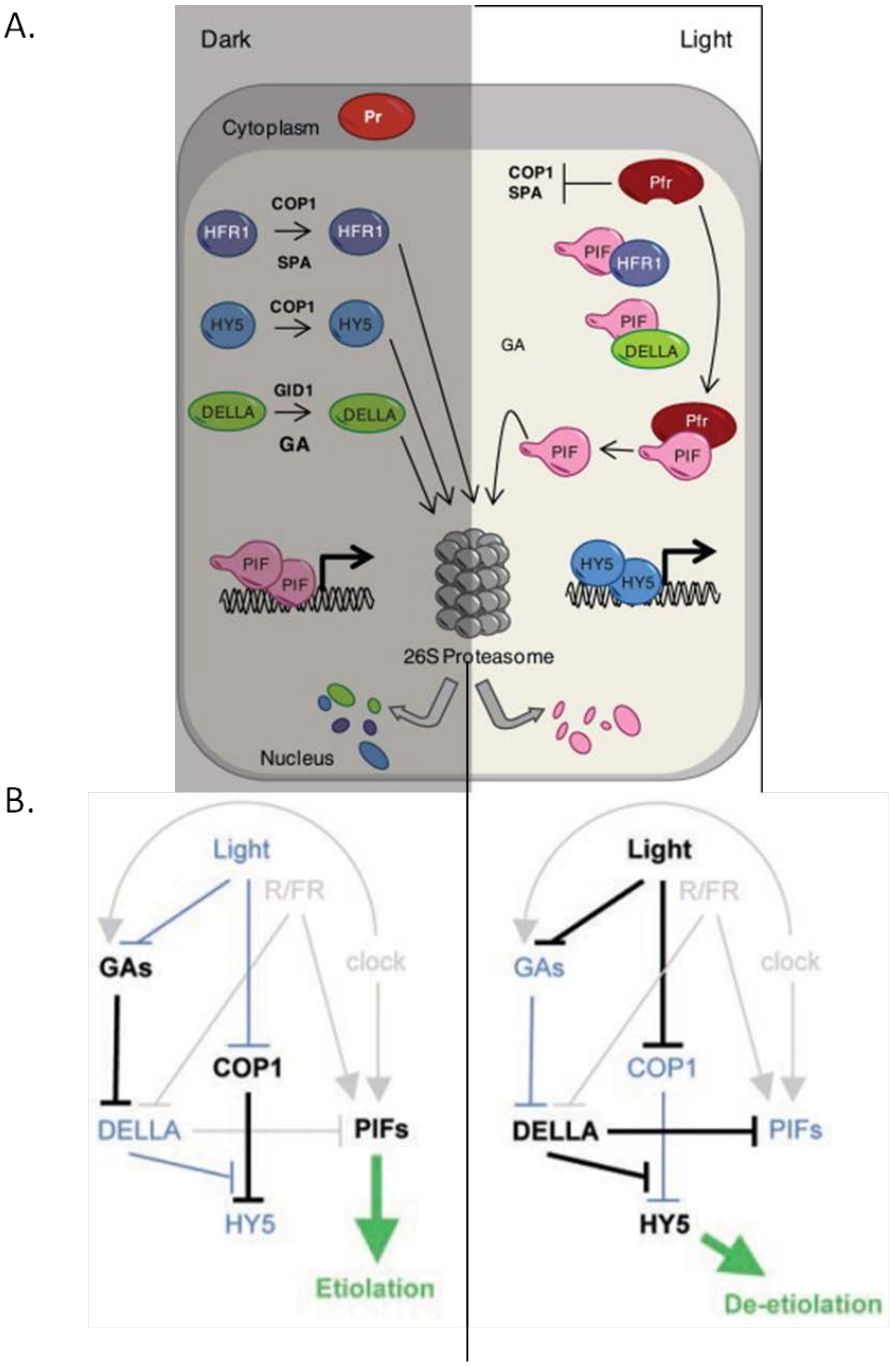


Figure 16 – modèle des voies de signalisation de la skotomorphogenèse

Schéma de régulation des différents acteurs de la skotomorphogenèse ou de la photomorphogenèse. Dans ces deux schémas, les PIFs et HY/HYH sont les facteurs de transcriptions centraux pour le contrôle de ces deux processus.

Source : A : (Kami et al., 2010) B : (Alabadi and Blazquez, 2008)

Les HY5/HYH

HY5 est stabilisé par la lumière et son niveau est inversement proportionnel à la capacité d'expansion (Osterlund et al., 2000). Ce sont des facteurs de transcription de type leucine zipper (bZIP) qui se fixent eux aussi au niveau des séquences G-box (Oyama et al., 1997; Song et al., 2008) et vont donc permettre la transcription de gènes de réponse à la lumière. Une étude de localisation de site potentiel de liaison d'HY5 par (CHIP-CHIP) à estimé à 9000 le nombre de promoteurs susceptibles d'être régulés par HY5. Dans le mutant *hy5*, 3000 gènes montrent un défaut d'expression. Ces chiffres sont très élevés et montrent l'importance du développement de la plante en fonction de la lumière mais mettent aussi en avant l'importance de ce facteur de transcription dans la biologie de la photomorphogenèse. Parmi les gènes dérégulés, on retrouve de nombreux facteurs de transcription qui, par effet cascade, activeront d'autres voies de signalisation et permettront la mise en place d'une réponse adaptée au stimulus lumineux. Parmi les réponses développementales de la plante, l'expansion, la biologie du chloroplaste sont des processus importants. Les gènes impliqués dans leurs contrôles sont régulés par HY5. On retrouve également de nombreux gènes impliqués dans des voies de signalisation hormonales comme l'auxine, les cytokinines, l'éthylène et l'acide jasmonique, ce qui met avant les interconnexions entre les voies de signalisation et la lumière (Zhang et al.)

La régulation transcriptomique via HY5/HYH et les PIFs, et la perception de la lumière conduisent à de nombreuses modifications épigénétiques afin de contrôler l'expression de gènes. Une étude des variations de ces marques lors d'un passage d'une plantule étiolée à la lumière illustre ce propos (Charron et al., 2009) et montre les différents niveaux de régulations qui permettent de contrôler la réponse à la lumière.

La régulation de l'homéostasie des PIFs et de HY5/HYH

COP1 est une E3 ligase qui joue un rôle fondamental dans la signalisation de la photomorphogenèse. COP1 promeut la dégradation de régulateurs positifs comme HY5 et HYH ou HFR1 (Long hypocotyl in far red1)(fig.16) (Lau and Deng, 2012). En présence de lumière, COP1 est exporté hors du noyau et en parallèle la quantité d'HY5 augmente. Les cryptochromes vont pouvoir interagir dans le noyau avec COP1 (Wang et al., 2001). Le déroulement exact de ces étapes est encore mal défini. Les récepteurs de la lumière bleue, les cryptochromes et ceux de la lumière rouge, les phytochromes, sont des régulateurs importants de l'homéostasie des PIFs et des HY5/HYH.

Les phytochromes A et B perçoivent la lumière rouge. Ces protéines sont synthétisées à l'obscurité sous forme inactive (forme Pr), et sont activées par la perception de la lumière rouge (la forme activée est nommé Pfr). Les PIFs sont des cibles des phytochromes. L'activation des

phytochromes va permettre leurs localisations nucléaires où ils pourront procéder à la dégradation de leurs cibles par le protéasome 26S (Fig.16).

La skotomorphogenèse est un processus hétérotrophe. La source de carbone provient donc des réserves des graines. Il ne s'agit pas d'un processus optimal pour la biologie de la plante. Afin de pouvoir être prêt à utiliser au mieux la perception de la lumière, il existe un mécanisme de rétrocontrôle qui consiste à favoriser d'une part la dégradation du phytochrome PhyB, et de stimuler l'ubiquitination des cibles de COP1 d'autre part (Jang et al., 2010). La plante devient donc hypersensible à la lumière.

Interconnexion avec des voies de signalisation hormonales

L'une des difficultés d'étudier une voie de signalisation en particulier est que toutes les voies de signalisation possèdent des interconnexions les unes avec les autres. C'est le résultat de ces interactions entre différentes voies de signalisation qui permet d'aboutir à une réponse en adéquation avec les paramètres physiologiques. De par son rôle central dans la biologie de la plante, l'auxine est souvent impliquée que ce soit en conflit ou en synergie avec d'autres hormones ou stimuli.

Il a été montré que les protéines DELLA étaient capables d'interagir avec PIF3 et PIF4 afin de les empêcher de se lier sur les régions promotrices des gènes impliqués dans la skotomorphogenèse (Daviere et al., 2008; Feng et al., 2008)(Fig.16). L'activité de la protéine PIF3 est positivement régulée par les gibbérellines via la dégradation des protéines DELLAs. Il semble que cette régulation de l'activité ne requiert ni la transcription ni la dégradation de la protéine. L'hypothèse est donc que les DELLAs favoriseraient l'accumulation d'une forme active de PIF3 (Alabadi et al., 2008). En parallèle de favoriser la skotomorphogenèse, les gibbérellines inhibent la photomorphogenèse en maintenant un faible niveau de HY5 (Alabadi et al., 2008). En présence de lumière, le phytochrome B promeut l'accumulation de DELLAs dans l'hypocotyle et donc favorise l'expansion cellulaire typique de la skotomorphogenèse (Achard et al., 2007). L'implication des gibbérellines a notamment été mise en évidence par l'utilisation de mutants déficients en gibbérellines ou des défauts de formation de la crosse apicale (Achard et al., 2003; Vriezen et al., 2004).

D'autres hormones participent à la régulation de la skotomorphogenèse. Les brassinostéroïdes sont notamment connus pour jouer sur le gravitropisme de l'hypocotyle (Gupta et al.). Au niveau de la crosse apicale, l'étude des interconnexions entre l'éthylène, l'auxine et les brassinostéroïdes ont révélés que le bon développement de la crosse apicale dépendant d'une bonne homéostasie des ces hormones (De Grauwe et al., 2005).

L'auxine

La croissance de l'hypocotyle à l'obscurité fait intervenir l'auxine de façon encore mal comprise. L'auxine semble impacter la voie de la skotomorphogenèse, notamment l'élongation de l'hypocotyle et la formation de la crosse apicale. Pour la formation de la crosse apicale, le transport de l'auxine est essentiel (Vandenbussche et al.), alors qu'il ne semble ne semble pas nécessaire dans le contrôle de la croissance de l'hypocotyle comme le montre l'absence d'effet du NPA à l'obscurité alors que le même traitement inhibe l'élongation à la lumière (Jensen et al., 1998). La diminution des contenus en auxine, dans les mutants de biosynthèse *wei* et *tar* par exemple provoque une diminution de la croissance de l'hypocotyle indiquant que cette phytohormone est impliquée. La signalisation de l'auxine semble se mêler à celle de la lumière comme le montre le phénotype dé-étiolé de plusieurs mutants de la voie auxine. Par exemple, des mutants de gain de fonction de certains Aux/IAA comme *axr3/iaa17* ou *shy2/iaa3* sont dé-étiolés et peuvent même développer les premières feuilles à l'obscurité. Le mutant d'insertion *arf8* présente un hypocotyle long malgré un éclairement en lumière blanche, bleue ou rouge (Tian et al., 2004). De même, la mutation de type perte de fonction du gène ARF7 (ou NPH4/MSG1/TIR5) révèle l'implication d'ARF7 dans le phototropisme puisque le mutant présente un défaut de croissance à la lumière bleue (Watahiki and Yamamoto, 1997; Harper et al., 2000). Mais d'autres gènes que les ARF, impliqués dans les réponses auxiniques, peuvent jouer un rôle dans la réponse à la lumière. Ainsi, le gène FIN219 a été montré comme suppresseur du mutant dé-étiolé *cop1*, FIN219 code pour une protéine de la famille GH3 (Hsieh et al., 2000)(Wang et al., 2011). FIN219 peut interagir directement avec COP1 et influencer sur sa localisation.

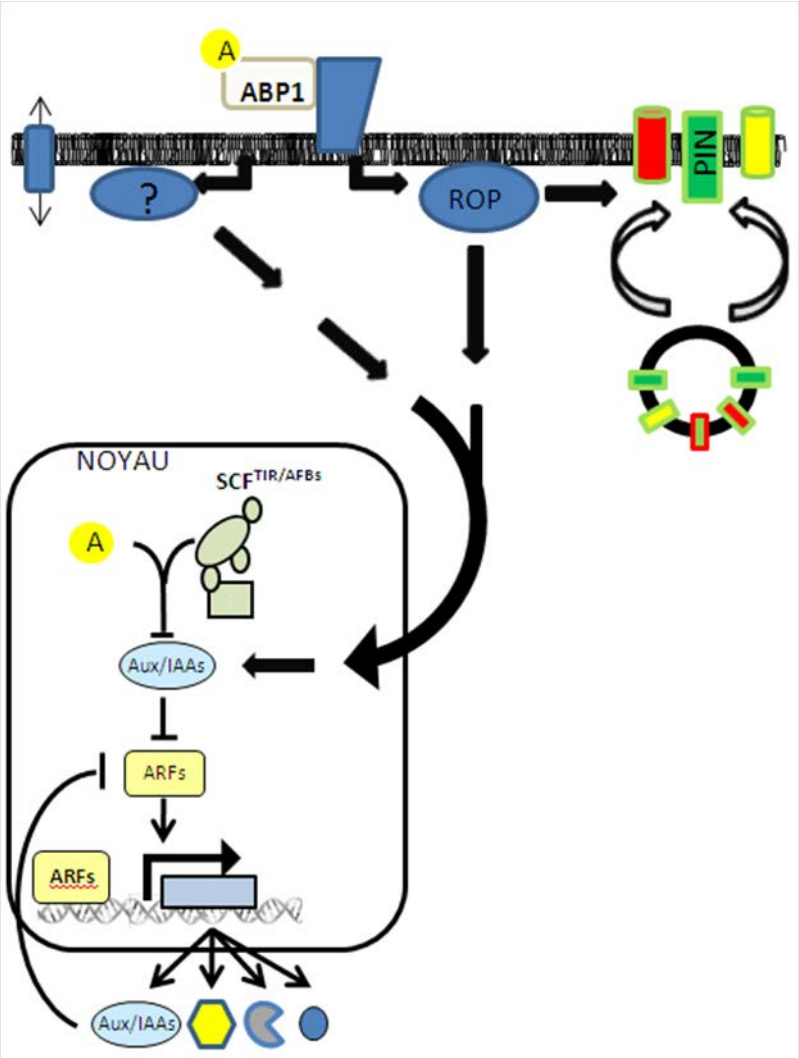


Figure 17 – schéma de la voie de signalisation ABP1

Voie de signalisation putative imaginée à partir des différentes études montrant l'impact de l'inactivation d'ABP1 sur l'endocytose des vésicules à clathrine (Robert et al., 2010; Chen et al., 2012) et sur la durée de vie des Aux/IAAs (Tromas et al., 2013 en révision et en annexe)

Objectifs de la thèse

A ce jour, nous disposons de plusieurs faisceaux de preuves permettant de considérer ABP1 comme un acteur majeur de la signalisation de l'auxine.

D'une part, des études d'électrophysiologie ou sur des cultures cellulaires ont montré son implication dans les réponses rapides suite à perception de l'auxine. Ce rôle au niveau de la membrane plasmique a été récemment conforté en montrant la capacité d'ABP1 à réguler l'endocytose des vésicules à clathrine et donc d'influer sur le transport polarisé de l'auxine. Ces travaux ont également montré qu'ABP1 pouvait, via les ROPs, jouer sur le cytosquelette et était, par exemple, essentiel pour la mise en place d'interdigitations des cellules en pavements des cotylédons.

D'autre part, des expériences menées par le laboratoire montre qu'ABP1 joue sur la voie nucléaire de signalisation de l'auxine en modifiant la durée de vie des Aux/IAAs. Cette modification de l'homéostasie de la voie $SCF^{TIR/AFBs}$ peut expliquer comment l'inactivation d'ABP1 induit des modifications d'expressions de gènes. De façon intéressante, ABP1 semble exercer un rôle régulateur essentiel en absence d'auxine et moduler (inhiber) ces réponses en présence d'auxine. A l'exception des réponses électrophysiologiques, ABP1 apparait comme un régulateur négatif des réponses à l'auxine. Toutefois, tout reste à faire pour comprendre ces deux niveaux de régulation en aval d'ABP1. On peut alors s'interroger sur ces deux niveaux de régulations, déterminer s'ils sont liés ou indépendants. De plus, l'identification d'éléments de signalisation agissant en aval d'ABP1 et qui affecteraient la voie $SCF^{TIR/AFBs}$ constitue un défi important.

Le modèle de l'hypocotyle étiolé est un modèle physiologique qui bien qu'étant le fruit d'une fine régulation entre hormone et autres facteurs, est plus simple que d'autres modèles au niveau de sa régulation. Cela est notamment du au fait qu'il n'implique que le processus d'expansion cellulaire.

C'est dans cet environnement scientifique que s'inscrit mon projet de thèse qui consiste à mieux comprendre le rôle et les mécanismes d'action d'ABP1. Le projet principal fut donc de mener à bien une approche génétique de type suppresseur dans le but de découvrir de nouveaux éléments de signalisation en aval d'ABP1. Cette partie est traitée dans la seconde moitié de ce manuscrit. La première partie est consacrée à la caractérisation des plantes conditionnelles pour ABP1 dans les conditions de croissance à l'obscurité en essayant de comprendre comment l'inactivation de la protéine affecte la skotomorphogenèse et/ou la croissance cellulaire.

Partie Paroi :

Caractérisation de l'hypocotyle étiolé des plantes ss12k

Introduction

L'expansion cellulaire ainsi que la division et l'endoréplication, sont les processus que module la plante pour se développer. L'expansion cellulaire consiste en l'agrandissement d'une cellule déjà existante. Cet élargissement est le fruit de la balance entre la pression de turgescence de la cellule et les propriétés biomécaniques de la paroi végétale. Or la paroi est un compartiment qui grâce à sa rigidité sert de squelette externe à la cellule végétale. Sans la paroi, une plante ne sera qu'un amas de protoplaste. Sa rigidité est un gage de solidité et permet de structurer la plante, mais son manque de fluidité n'autorise pas l'expansion. Afin que la cellule augmente en taille, une augmentation de la plasticité/extensibilité de la paroi est donc requise (Cosgrove, 2005).

La paroi n'est pas un compartiment si simple et les enzymes impliquées dans l'expansion sont nombreuses. En effet, la paroi végétale est composée d'un maillage solide de microfibrilles de cellulose et d'hémicellulose liées entre elles par des liaisons hydrogène. C'est ce réseau qui est supposé structurer la paroi et lui conférer sa rigidité. Les xyloglucanes sont les principales hémicelluloses chez les dicotylédones et donc chez la plante modèle *Arabidopsis* (Hayashi and Kaida, 2010). Ce maillage baigne dans un gel de pectines (Cosgrove 2005). La capacité des pectines à former un gel est liée à leur degré de méthyl-esterification. Les pectines sont un composant essentiel de la paroi. Elle joue un rôle dans l'espacement du réseau cellulose-hémicellulose ou participent à l'adhésion des cellules entre elles (Palin and Geitmann, 2012). Dans cet environnement au pH relativement acide (pH), se trouve plusieurs protéines agissant sur les différents composés pariétaux. Les expansines jouent un rôle important pour la plasticité pariétale en jouant sur le maillage du réseau cellulose-xyloglucane. Leur rôle est notamment mis en exergue dans la théorie de la croissance acide (Sampedro and Cosgrove, 2005). Des familles d'enzymes sont spécifiques des autres composants. C'est le cas des pectines méthyl estérase qui joue sur la viscosité du gel de pectines. Les endoglucanases et les Xyloglucane endotrans glycosidases/hydrolases (ou XTHs) sont des enzymes capables d'influer sur l'élasticité de la paroi en agissant sur les xyloglucanes.

Pour augmenter en taille, la cellule doit donc d'abord passer outre la rigidité de la paroi végétale. Ainsi, la rigidité de la paroi doit diminuer raisonnablement afin de permettre à la cellule *via* la pression de turgescence d'augmenter sa taille mais sans trop fragiliser la paroi qui joue toujours un rôle dans le maintient de la forme de la cellule, de la structure du tissu (Cosgrove, 2005). L'expansion cellulaire est un phénomène irréversible et implique divers paramètres comme la plasticité, la pression de turgescence mais également l'apport de nouveaux matériaux. Les enzymes de

remodelages pariétales comme les expansines ou les XTHs jouent alors un rôle essentiel. Pour compliquer le mécanisme, l'expansion cellulaire doit être orientée. Cette orientation permet de modeler la forme de la plante. Dans l'hypocotyle étiolé, cette expansion est anisotropique. On pense que ce contrôle de l'expansion cellulaire résulte en partie du rôle des microtubules et de la cellulose. L'orientation des microtubules varie entre une cellule en expansion ou différenciée (Nick et al., 1992)(Xu et al., collaboration – article en préparation) et les microfibrilles de cellulose changent d'orientation (Refregier et al., 2004). Mais la plasticité pariétale doit également être suffisante pour permettre l'expansion.

L'auxine est l'un des facteurs majeurs influant sur l'expansion cellulaire. Elle a notamment été mise en avant dans la théorie de la croissance acide (acid growth theory) où sa perception conduirait à une acidification de l'apoplasme favorisant l'activité de protéines pariétales comme les expansines qui interviennent dans l'expansion (Rayle and Cleland, 1992a). Toutefois, on ne peut expliquer le phénomène d'expansion cellulaire par la seule théorie de croissance acide et le modèle proposé est quelque peu restrictif. Cependant il place l'auxine comme un élément régulateur important de l'expansion cellulaire.

Plusieurs arguments suggèrent une implication d'ABP1 dans l'expansion cellulaire. Tout d'abord ABP1 est un récepteur à l'auxine et son inactivation induit à l'obscurité un phénotype laissant supposer un défaut d'expansion cellulaire (voir figue 1 dans l'article). Ensuite elle est localisée à la face externe de la membrane plasmique et induit lors de la perception d'auxine une hyperpolarisation de la membrane, l'activation des canaux ioniques et de la pompe à protons (Rück et al., 1993; Thiel et al., 1993; Barbier-Brygoo et al., 1996; Fellner et al., 1996; Leblanc et al., 1999b; Leblanc et al., 1999a; David et al., 2001). L'implication d'ABP1 dans l'expansion cellulaire fut confirmée par l'utilisation des plantes conditionnelles pour ABP1 ou de lignées cellulaire surexprimant ABP1. Dans des cellules de tabac, la surexpression d'ABP1 permet de potentialiser l'action de l'auxine sur l'expansion cellulaire (Jones et al., 1998). Chez *Arabidopsis*, l'inactivation d'ABP1 conduit à une forte diminution de l'expansion cellulaire dans les feuilles.

L'une des questions en suspens est : comment les éléments de signalisation de l'auxine comme ABP1 peuvent influer sur la composition pariétale ?

C'est donc dans ce contexte qu'une collaboration a été initiée avec Grégory Mouille du laboratoire « Paroi primaire » de l'IJPB de Versailles avec l'appui de la plateforme de chimie du végétal afin de permettre de mieux comprendre l'implication d'ABP1 dans le processus d'expansion cellulaire. Cette partie résume les résultats obtenus grâce à cette collaboration.

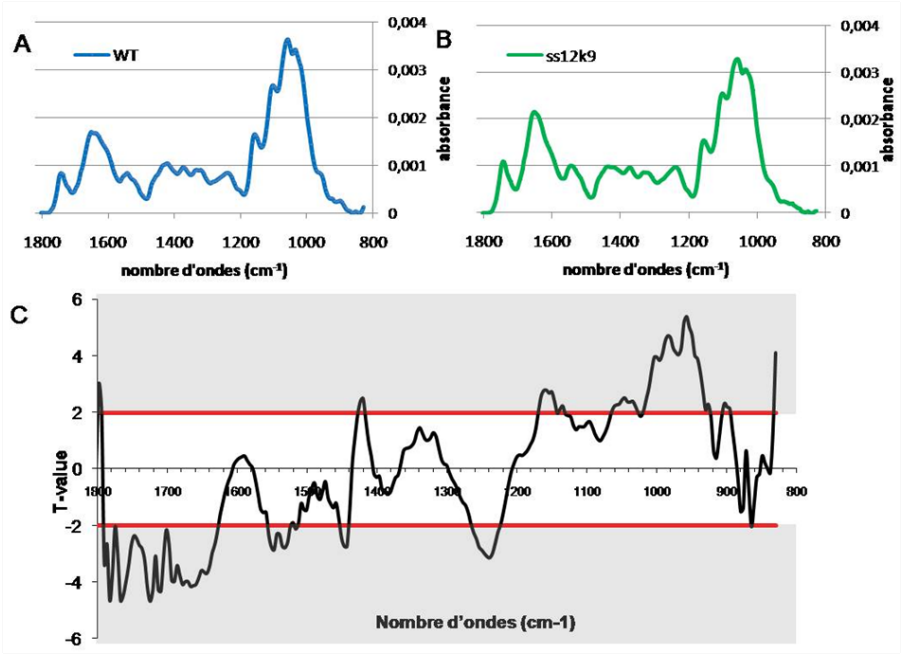


Figure 18 - Profil FT-IR des plantes sauvage et ss12k
Profil FT-IR des hypocotyles étiolés dans plantules sauvage (A) ou ss12k (B) et test de student (C) afin de déterminer pour quel nombre d'ondes il existe une différence significative (zones grises) entre les deux échantillons.

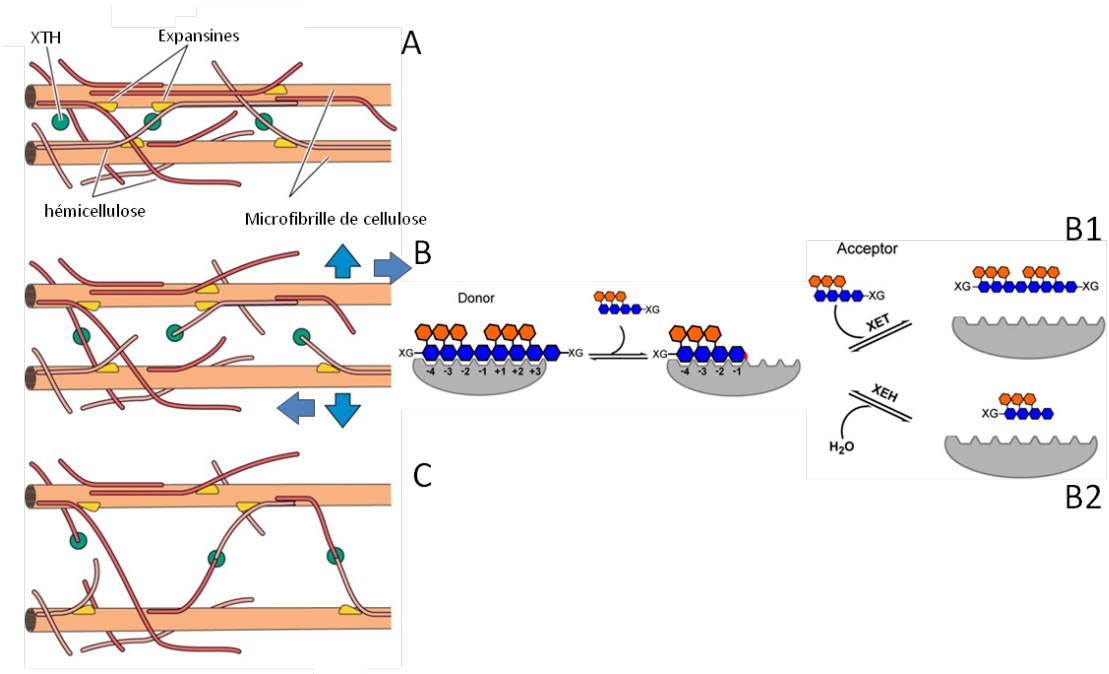


Figure 19- Mécanisme d'action du couple XTH/expansines permettant l'élongation cellulaire.
Les XTHs et les expansines sont dans la matrice pariétale (a). Les XTHs clivent les xyloglucanes et les expansines permettent l'étirement du maillage (b). Les XTHs peuvent remplacer l'oligosaccharide par un autre OXG (b1)ou un autre xyloglucane(c), ce qui permet de restructurer le réseau. Les XTHs ont également la capacité d'hydrolyser les xyloglucanes (b2).
Source : (Eklof and Brumer, 2010))

J'ai commencé les premiers tests de caractérisation de la paroi en utilisant la microscopie infra rouge à transformée de Fourrier ou (FT-IR) qui est une technique permettant de comparer la composition globale de la paroi de plusieurs génotypes en se basant sur leur capacité à absorber la lumière infra rouge. La capacité d'absorbance dépendant des liaisons entre chaque molécule, on peut ainsi attribuer certains nombres d'ondes à certains polymères. Ces premiers résultats nous ont permis de mettre en évidence à l'aide d'un test de Student qu'il existait des différences significatives pour certains nombres d'onde (λ^{-1}) entre un hypocotyle sauvage ou dépourvu d'ABP1 actif. A l'aide des spectres, il est cependant difficile de relier un nombre d'onde à un type de liaison. Toutefois l'utilisation de mutants déficients dans certains polymères pariétaux ont permis d'identifier des nombres d'ondes liés à certains composants. C'est le cas de la zone entre 1000 et 940 cm^{-1} qui semble liée à la composition pariétale en général. Sur cette zone, les hypocotyles sauvages et ss12k possèdent des différences significatives (Fig.18). Ce premier résultat nous a donc encouragé à persévérer dans la caractérisation de l'hypocotyle étiolé des plantules inactivées pour ABP1. Le dosage des différents sucres pariétaux et des analyses plus poussées sur la composition de certains d'entre-eux (données présentes dans l'article) nous ont indiqué un défaut de composition des xyloglucanes, le principal composant des hémicelluloses de la paroi primaire chez les plantes alors que la composition des autres composés pariétaux ne semblait pas être significativement affectée par l'inactivation d'ABP1.

Ce phénotype m'a donc encouragé à approfondir les recherches sur les xyloglucanes et l'ensemble a constitué un projet à part entière. Je me suis donc concentré sur la composition des xyloglucanes dans les plantes inactivées pour ABP1. Pour ce faire, j'ai bénéficié de l'expertise de la plate-forme de chimie du végétal pour analyser la composition des xyloglucanes par spectrométrie de masse. Cette technique sera notamment largement utilisée dans le manuscrit d'article qui suit cette introduction. Etant donné que la présentation classique de ces données dans les publications fait référence à une nomenclature bien précise, je tiens à vous la présenter succinctement et par la même occasion schématiser la façon dont on procède pour analyser la composition des xyloglucanes à l'aide la spectrométrie de masse (Fig.20).

Les xyloglucanes sont des polymères de glucose (branché en β 1-4) qui portent des ramifications plus ou moins complexes souvent présentes sous la forme d'un motif de trois ramifications successives suivi d'un glucose non ramifié (Fig 20.b). Ces ramifications ne dépassant pas trois sucres suivent des combinaisons bien précises qui impliquent un xylose branché sur le glucose,

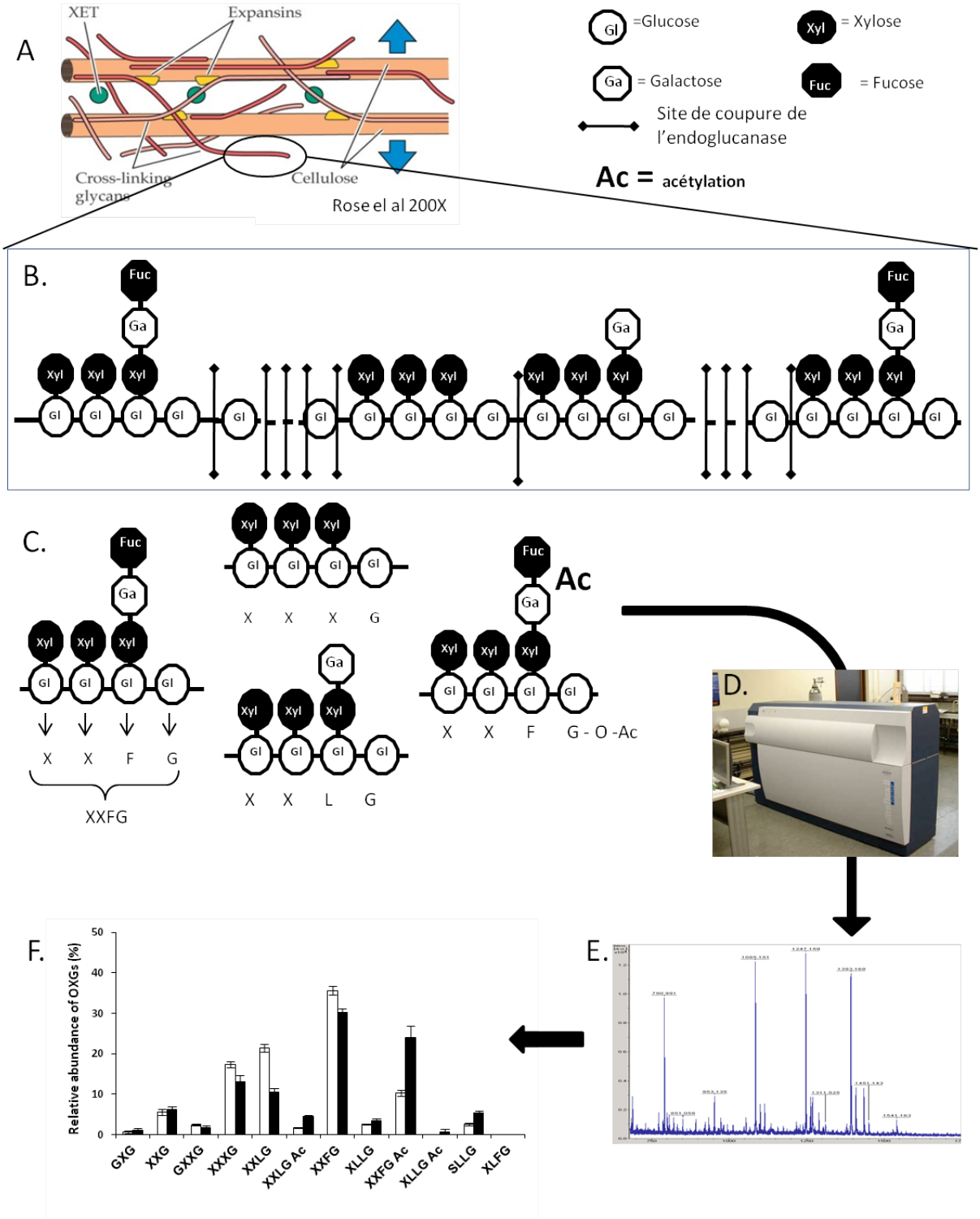


Figure 20 – Schéma de structure d'un xyloglucane, de sa nomenclature et de la technique de quantification. Les xyloglucanes, principale hémicellulose de la paroi (a) sont composés d'un squelette de β1-4 glucose et peuvent présenter des ramifications plus ou moins complexes et formant des motifs particuliers(B). La digestion de l'échantillon par une endoglucanase permet d'individualiser les OXyGs et de les nommer selon une nomenclature précise correspondant à la séquence de substitution (C). Ces OXyGs sont ensuite identifiés par spectrométrie de masse (D) et le profil obtenu (E) permet une quantification relative leur abondance (F).

suivi parfois d'un galactose lui-même suivi d'un autre sucre qui peut-être soit un fucose (dans la plupart des cas) soit plus rarement de l'arabinose. Le schéma d'un xyloglucane (Fig.20.b) vous permet de voir quelques uns de ses motifs. Les xyloglucanes peuvent être clivés par les XTHs et le motif de la ramification est suspecté de jouer un rôle sur la reconnaissance par les XTHs. Il y aurait donc une spécificité de substrat propre à chaque XTH (Maris et al., 2009). Les XTHs reconnaissent des motifs spécifiques composés de trois ramifications suivis d'un glucose non ramifié. Ce motif est appelé oligosaccharides car il peut se retrouver sous cette forme au sein de la cellule selon que la XTH incorpore l'OXyG (fonction transglycosylase, XET) ou le relargue après clivage (fonction hydrolase, XEH) (Fig19.b1 et b2).

Une nomenclature est donc devenue indispensable pour décrire ces ramifications. Elle se base sur le dernier sucre porté par la ramification, si celui-ci est un fucose, l'ensemble de la ramification sera nommé F, un S s'il s'agit d'un arabinose et si un galactose est le dernier sucre du motif, se sera un L. La lettre X désigne une substitution simple par un xylose et la lettre G un glucose non ramifié. Comme les OXG sont des enchainements de trois ramifications et d'un glucose non ramifié, on obtient en juxtaposant chaque lettre symbole un nom d'oligosaccharides de 4 lettres(Fig 20.C). Parfois, le galactose peut être acétylé. Cette modification est alors notifiée par l'ajout -O-Ac.

Toutefois, il est à ce jour impossible de détailler avec précision l'enchainement de ces motifs le long de la chaine de glucane. Il se trouve que la technique utilisée dans la communauté scientifique pour caractériser les xyloglucanes permet seulement de détailler la proportion relative de ces ramifications. Enfin, il est impossible de détecter les successions de glucoses non ramifiés. La raison tient au protocole utilisé pour la quantification de ces OXyGs. En effet, les OXyGs sont identifiés selon leur masse par spectrométrie de masse (Lerouxel et al., 2002). Il faut donc au préalable les individualiser ce qui implique une digestion avec une endoglucanase. L'endoglucanase étant une enzyme coupant après chaque glucose non ramifié, on comprend l'impossibilité de détecter les successions de glucose non ramifiés puisqu'elles sont digérées par l'enzyme. Néanmoins, cette technique permet d'évaluer la proportion des différents OXyG. L'utilisation de cette technique sur divers génotypes, couplée à des données de transcriptomique nous a permis de montrer un rôle spécifique d'ABP1 sur la composition des xyloglucanes.

A ce jour, je suis dans une phase de valorisation de ce projet puisque l'article que vous allez lire a été soumis à un comité de lecture. C'est donc pour cette raison que la partie de caractérisation de la paroi de l'hypocotyle des plantes inactivées pour ABP1 n'est pas mis en page comme le reste de la thèse et l'anglais est utilisé dans le manuscrit. Je vous donc de m'excuser pour cette disparité de format et de langues.

Enfin, puisqu'un article représente avant tout un travail collectif, je me dois de vous informer de la part de mon investissement dans ce travail. En tant que premier auteur de ce papier, j'ai été le principal expérimentateur de cette étude et ai été impliqué dans toutes les étapes, de la conception à la réalisation expérimentale d'une partie significative des expériences à l'analyse des données et la rédaction du manuscrit. Toutefois, je tiens à préciser l'implication des différents auteurs :

L'analyse en microscopique électronique et le comptage des cellules le long de l'hypocotyle ont été faits par Laurie Grandont. Les dosages des sucres pariétaux ont été réalisés par Grégory Mouille. C'est également grâce à son expertise que j'ai pu, à l'aide des techniciens présents sur la plateforme (dont Arnaud Goyallon puis Cyril Gartner), procéder à l'obtention des profils de ramifications des xyloglucanes par spectrométrie de masse. L'analyse transcriptomique a été réalisée en collaboration avec l'équipe de Miguel Blazquez où David Alabadi a réalisé les hybridations sur puce. Ces échantillons ont été préparés par Philippe Muller, lequel a réalisé les analyses d'expression géniques par qRT-PCR. Enfin Catherine Primard-Brisset a aidé à la culture de certaines plantes utilisées pour les analyses. J'ai donc été impliqué dans chaque aspect de l'étude mais toujours avec l'aide d'un spécialiste du domaine ce qui accroit faisabilité et efficacité. J'ai enfin procédé à l'élaboration des figures et à la rédaction du contenu sous les conseils de ma directrice de thèse.

Manuscrit d'article – actuellement soumis à un comité de lecture

AUXIN BINDING PROTEIN 1 acts on xyloglucan composition to modulate cell expansion through a $SCF^{TIR/AFBs}$ dependent pathway

Paque Sébastien [a], Grégory Mouille [b], Laurie Grandont [a], David Alabadi [c], Cyril Gaertner [b], Philippe Muller [a], Catherine Primard-Brisset [a], Arnaud Goyallon[b], Rodnay Sormani[b], Miguel Blazquez [c] and C. Perrot-Rechenmann [a,1]

Affiliation

[a] Institut des Sciences du Végétal (ISV), UPR2355 Centre National de la Recherche Scientifique, Saclay Plant Sciences, 1, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif sur Yvette Cedex France

[b] Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB), Saclay Plant Sciences, INRA Centre de Versailles-Grignon, Route de Saint-Cyr, 78026 Versailles Cedex France

[c] Instituto de Biología Molecular y Celular de Planta (IBMCP), U. politécnica de Valencia, Avda de los Naranjos s/n; Valencia 46022 Spain

[1] Address correspondence to catherine.rechenmann@isv.cnrs-gif.fr
The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantcell.org) is Catherine Perrot-Rechenmann (catherine.rechenmann@isv.cnrs-gif.fr)

INTRODUCTION

The AUXIN BINDING PROTEIN 1 (ABP1) is an essential plant protein involved in the control of growth and development all along the plant life. This protein was initially identified on its capacity to bind the phytohormone auxin and was shown to affect plasma membrane hyperpolarization via the modulation of ion fluxes across the membrane (Thiel et al., 1993; Barbier-Brygoo et al., 1996; Leblanc et al., 1999b; Leblanc et al., 1999a). These rapid ionic changes were correlated to a possible involvement of ABP1 in the control of cell expansion at least in shoot tissues thus providing the first molecular evidences supporting the Acid-Growth Theory. This theory states that auxin promotes the excretion of protons at the apoplast resulting in cell wall loosening processes and increased growth rate (Rayle and Cleland, 1992b). Binding of auxin to ABP1 as well as increased amount of ABP1 at the plasma membrane were both shown to promote protoplast swelling or to enhance cell expansion of leaf cells (Jones et al., 1998; Steffens et al., 2001; Christian et al., 2006). Conversely, the functional inactivation of ABP1 was demonstrated to severely impair cell expansion in shoot tissues irrespective of their DNA content (Braun et al., 2008a; Xu et al., 2010) whereas in roots, cell elongation was effectively maintained (Tromas et al., 2009). The effect of ABP1 on cell expansion varies in a cellular or tissular context-dependent manner. To date, the mechanism by which ABP1 controls cell expansion is still poorly understood. In shoot tissues, it is not clear whether the contribution of ABP1 to cell expansion relies solely on non-genomic responses or acts also via the regulation of gene expression. ABP1 was reported to affect expression of various auxin regulated genes but little is known on broader effects of ABP1 on gene expression (Braun et al., 2008; Tromas et al., 2009; Effendi et al., 2011).

More recently, ABP1 was shown to control the stability of AUX/IAA transcriptional repressors and to negatively regulate the $SCF^{TIR1/AFB}$ pathway (Tromas et al.). The $SCF^{TIR1/AFB}$ pathway includes various combinations of TRANSPORT INHIBITOR 1/ AUXIN SIGNALING F-BOX and AUX/IAA nuclei localized co-receptors of distinct relative affinity for auxin binding or of distinct specificity (Calderon Villalobos et al., 2012). TIR1/AFB F-box proteins promote polyubiquitination of AUX/IAA substrates and their degradation via the 26S proteasome (Chapman and Estelle, 2009). After degradation of AUX/IAA repressors, AUXIN RESPONSE FACTORs (ARF) activate the transcription of auxin responsive genes. ABP1 and $SCF^{TIR1/AFB}$ signaling pathways ensure highly controlled and balanced responses to changes in auxin concentration during plant growth and development.

Cell expansion is an increase in cell size that plays an essential role in plant growth and adaptive processes. Cell expansion results from complex mechanisms among which the ability of cell walls to extend is an important and potentially restrictive parameter (Wolf et al., 2012). It results from the combination of cell wall loosening that involves modifications and remodeling of preexisting cell wall components and biosynthesis of novel cell wall materials. In the primary cell wall of growing cells, crystalline cellulose microfibrils and hemicelluloses interact with each other to form a complex network comparable to an external skeleton surrounding the plant cells. This network is embedded in a gel of pectin that contains cell wall proteins involved either in cell wall loosening or in the integration of novel cell wall components within the network. Composition and physical properties of the primary cell wall are highly regulated in order to control growth according to the organ, developmental or environmental stimuli. In most vascular dicotyledonous plant species, xyloglucans (XyGs) are the major hemicellulose (Scheller and Ulvskov, 2010). This polysaccharide is composed of a backbone of β-1,4- D glycopyranosyl and a combination of side chains of various length. These side chains are made of 1 to 3 sugars, starting with D-xylose then D-galactose and L-fucose or to a lesser extend L-arabinose and are named by a single letter nomenclature corresponding to the last substituted sugar of each chain (Fry et al., 1993). Successive side chains design specific patterns separated by free glucose residues of the backbone. Biosynthesis of XyGs takes place in the golgi apparatus and polysaccharides are delivered at the cell surface by exocytosis. XyG biosynthesis involves various glycosyl transferases (Lerouxel et al., 2006; Zabotina, 2012). Sugar residue of XyG side chains can also be O-acetylated in the golgi by the activity of O-acetyltransferases but the biological function of acetylation is unknown (Gille and Pauly, 2012). XyG precursors can still be modified at the cell wall by glycoside hydrolases and incorporated into XyG polymers by xyloglucan endo/transglycosidase hydrolases (XTH) (Rose et al., 2002; Scheller and Ulvskov, 2010). These enzymes exhibit xyloglucan endo-transglycosidase (XET) and/or xyloglucan endo-hydrolase (XEH) activities and are responsible for both the integration of newly synthesized XyGs and for wall restructuring (Rose et al., 2002; Baumann et al., 2007). XyGs and XyG remodeling were proposed to play an important role in growth and developmental processes (Fry, 1994; Pauly et al., 2001; Takeda et al., 2002; Ryden et al., 2003; Pena et al., 2004; Swarup et al., 2008). The wall loosening expansins are also important for XyG remodeling, acting on wall hydration and disrupting hydrogen bonds between XyGs and cellulose microfibrils (Cosgrove, 2000).

Structural variations of XyG chains are susceptible to modify the properties of the polymer, the cross-linking with cellulose microfibrils and to reinforce or weaken the cell wall (Levy et al., 1997; Cosgrove, 2005; Wolf et al., 2012). A large set of apoplastic glycosidases or trans-glycosidases (β-glucosidases, α-xylosidases, β-galactosidases and α-fucosidases) were shown to act specifically on XyGs. These enzymes modify XyG structure by modulating the length of side chains that might

change their susceptibility to XTH activity (Augur et al., 1993; Iglesias et al., 2006; Frankova and Fry, 2012). In addition, XyG-derived oligosaccharides, also named oligosaccharins, can also be released. Their modification by addition or removal of sugar residues from their side chain was reported to affect their biological activity as signaling molecules. In particular, removing of fucose from XXFG oligosaccharide fragment was shown to suppress its anti-auxin activity (York et al., 1984; Fry et al., 1990).

Auxin effects on the cell wall are not restricted to interference with oligosaccharins. Apoplastic acidification resulting from auxin-related responses at the plasma membrane is thought to favor the action of expansins on wall loosening (Cosgrove, 2000). Many studies also report that various cell wall related genes are differentially expressed in response to auxin or to alteration of auxin signaling (Sanchez et al., 2003; Okushima et al., 2005b; Overvoorde et al., 2005; Nemhauser et al., 2006; Stepanova et al., 2007). To our knowledge, the resulting effects of such changes in gene expression on the composition or the structure of the cell wall is unknown.

Here we further investigated the role of ABP1 in the control of cell expansion using dark grown hypocotyl of previously described conditional plants for ABP1(Braun et al., 2008). We analyzed changes in gene expression resulting from ABP1 inactivation with a specific interest for cell wall related genes and we characterized changes in the hypocotyl cell wall. In this context, modulation of XyG side chain length was shown to be of critical importance for hypocotyl elongation. In addition, genetic interactions demonstrated that the major effect of ABP1 is through modulation of gene expression.

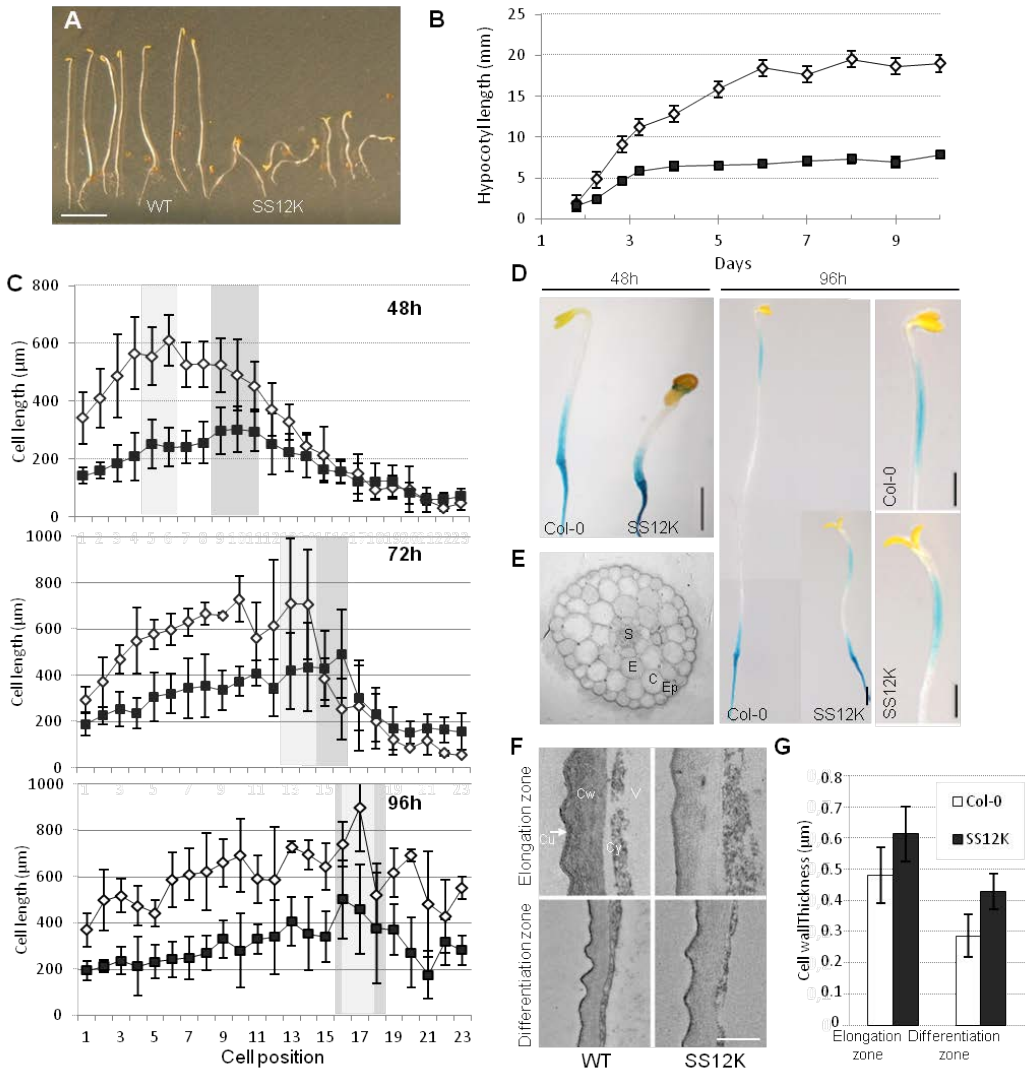


Figure 1 Characterization of the ABP1 loss of function phenotype

(A) Dark grown phenotype of seedlings of wild type and (left) and SS12K inactivated for ABP1 since germination (right). Bar = 5 mm. **(B)** Kinetics of hypocotyl elongation of ethanol induced WT and SS12K dark grown seedlings. Data represent mean ± SD ($n \geq 15$). **(C)** Length of epidermal cells in individual cell files along ethanol induced WT and SS12K dark grown seedlings at 48h, 72h and 96h. Error bars represent SD (n= 8 files from 6 or7 hypocotyls for SS12K; n=3 files from 3 WT hypocotyls). **(D)** Elongation zone visualized by expression of *pCESA6:GUS* in ethanol induced WT and SS12K of two and four day old dark grown seedlings. **(E)** Cross sections of three day-old dark grown hypocotyls of WT and SS12K. C, cortex; E, endodermis; Ep, epidermis; S, Stele **(F)** Ultra-thin transverse section of external epidermal cell wall of WT and SS12K dark grown hypocotyls. Sections were performed at the elongation zone and at the basis of three day-old hypocotyls. Bar = 500nm. (**G)** Cell wall thickness of external epidermal wall as in (**F**). Error bars represent SD. Measurements were performed on 16 to 19 cells from 3 hypocotyls for each. Cu:cuticule; Cy: cytoplasm; Cw: cell wall; V:vacuole.

RESULTS

ABP1 is required for skotomorphogenesis

ABP1 was shown to act on cell elongation and cell division in a context dependent manner and to control a large range of physiological processes (Braun et al., 2008; Tromas et al., 2009). To further investigate the role of ABP1 on cell expansion and get rid of the defects resulting from the action of ABP1 on cell division, we studied the effect of ABP1 inactivation in dark grown seedlings. Hypocotyl growth in darkness is known to rely mainly on enhanced cell elongation, pointing out dark grown hypocotyl as a developmental model for cell expansion (Gendreau et al., 1997). The skotomorphogenesis of wild type seedlings is characterized by an exaggerated elongation of the hypocotyl, a typical apical hook, small closed cotyledons and a short root (Figure 1A). Four day old SS12K seedlings inactivated for ABP1 since germination exhibited a partial de-etiolated phenotype with the length of the hypocotyl reduced by more than half compared to WT, no apical hook, open and epinastic cotyledons that remains however small. Hypocotyls are also agravitropic (Figure 1A). Similar alterations were observed on independent conditional lines for ABP1 (Figure S1), indicating that the partial de-etiolation is resulting from the loss of function of ABP1. To determine whether the decreased length of the hypocotyl was resulting from an early arrest of growth or from a reduced elongation over time, we measured hypocotyl elongation of dark grown seedlings over 10 days (Figure 1B). Hypocotyl elongation kinetics revealed a defect in hypocotyl growth from the early stages of development of ABP1 inactivated seedlings. In addition, the plateau is reached at least 2 days before the maximal elongation in WT seedlings indicating that the period of growth is also reduced after ABP1 inactivation.

To further investigate the difference of hypocotyl growth between WT and ABP1 inactivated seedlings, the length of individual epidermal cells distributed all along dark grown hypocotyls of ethanol induced seedlings was measured for both genotypes after 48, 72 and 96 hrs of culture (Figure 1C). The overall size of SS12K epidermal cells is reduced compared to WT however elongation defects are not equally distributed along the hypocotyl. In our experimental growth conditions, at 48h WT epidermal cells 1 to 12, numbered from the basis of the hypocotyl, underwent huge elongation with a maximum for cells 5 and 6 that measured more than 600 µm. At 48h, ABP1 inactivation inhibits the elongation of basal cells; cells 5 and 6 are 2,7 fold smaller than in WT. The maximal elongation in SS12K is shifted to cells 9 to11, their length being however reduced by 40% compared to the same rank of cells in WT. At later stages, the elongation zone moved up for both genotypes and the 40% decrease of cell length is maintained from the middle to the top of the hypocotyl.

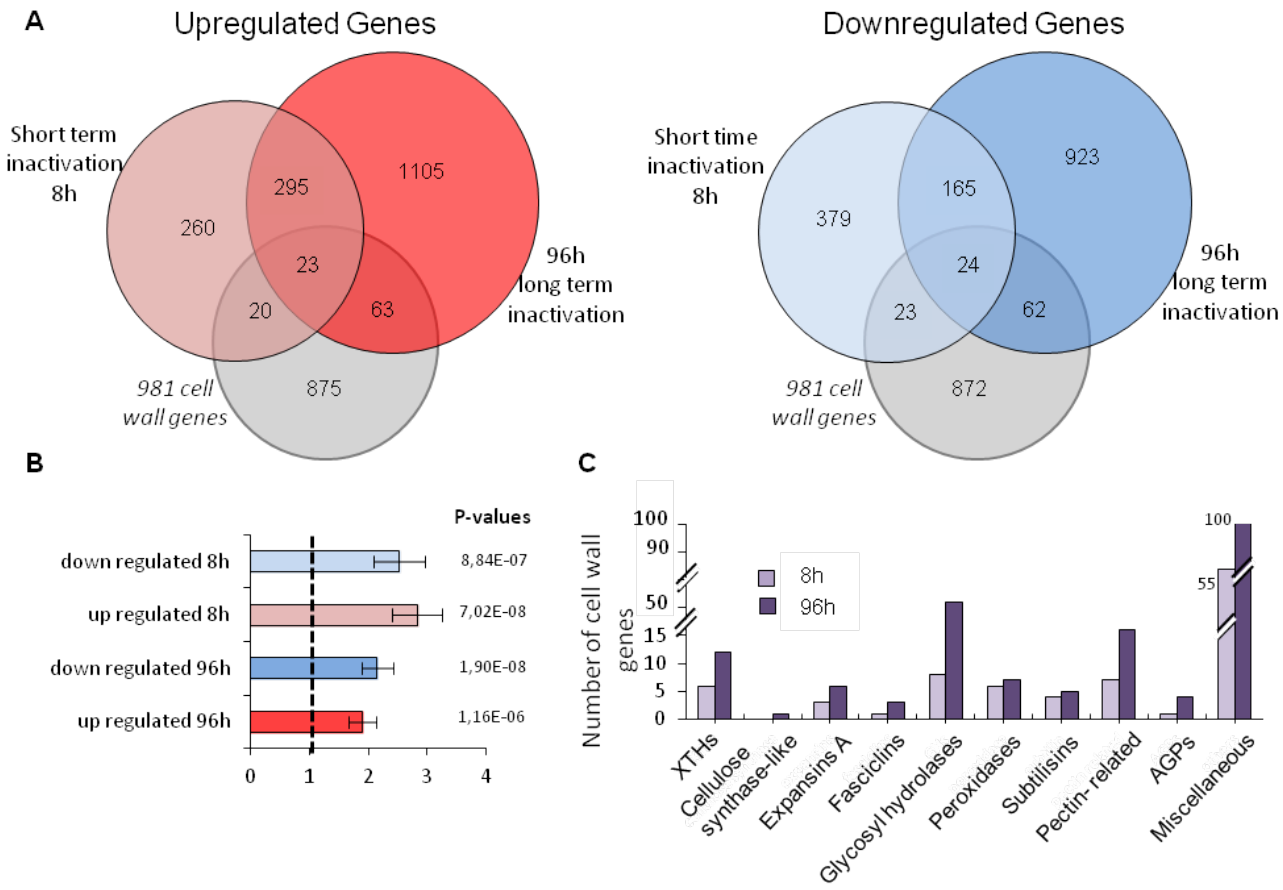


Figure 2 Comparative analysis of genes differentially expressed between ABP1 inactivated dark grown seedlings and WT, after short and long time of ABP1 inactivation.

(A) Venn diagram representing the number of overlapping and unique up-regulated (left) and down-regulated (right) genes after 8 and 96h of ethanol induction promoting scFv12 expression and resulting inactivation of ABP1. Differentially expressed genes are also compared to cell wall annotated genes (gray circle) in TAIR10 implemented by cell wall genes expressed in dark grown hypocotyl listed by (Jamet et al., 2009).

(B) Histograms illustrating the over-representation of cell wall related genes after inactivation of ABP1. The data takes into account normalization to the total number of cell wall genes present on the chip.

(C) Major classes of cell wall genes differentially expressed after short and long term inactivation of ABP1.

We also used pCESA6:GUS to visualize the elongation zone since its expression was shown to be restricted to expanding tissue (Desprez et al., 2007). GUS staining confirmed the progression of the elongation zone from the basis of the hypocotyl to the upper part upon time (Figure 1D). No significant change was observed in the organization of hypocotyl cell files or in radial expansion (Figure 1E).

We thus measured the thickness of the external epidermal cell wall at the basis and at the elongation zone of hypocotyls. In both genotypes, the cell wall is thinner at the basis for cells that have achieved their elongation despite the severe elongation defect of ABP1 inactivated cells at the basis of the hypocotyl (Figure 1F, G). The cell wall was significantly thicker in hypocotyls inactivated for ABP1 at both positions; reflecting the overall reduced cell elongation and suggesting that synthesis or deposition of cell wall material are not severely affected.

ABP1 affects expression of cell wall genes in dark grown seedlings

To further understand the involvement of ABP1 in the control of hypocotyl growth in darkness, a transcriptomic analysis was carried out in order to provide an overview of the biological processes that are disturbed after inactivation of ABP1. We compared gene expression of SS12K dark grown seedlings inactivated either since germination (96 h) or exposed only 8h to ethanol vapors to WT seedlings grown and treated in the same conditions. Statistical analysis was performed using a combination of two-fold change on the mean of the biological replicates and False Discovery Rate below 0.05. The first result that came out from this comparative analysis was that in both cases, a high number of genes exhibited a differential expression following ABP1 inactivation, confirming the broad and critical importance of the protein (Figure 2A). Even after 8h of ethanol induction, which corresponds roughly to 2h of effective inactivation of ABP1, 1185 genes exhibited differential expression; they are almost equally distributed between induced and repressed genes. About half of the up-regulated genes are consistently up regulated over time as they are common between short and long term inactivation samples. Other long term up-regulated genes (1168) are likely to result from rather indirect processes amongst which a significant proportion is related with plastid differentiation (Supplementary Figure 2). Interestingly, based on gene ontology classifications, cell wall related genes are overrepresented amongst up and down-regulated genes in short and long term ABP1 inactivation by more than two fold compared to random draw (Figure 2B ; sup Figure 2 and Table 1).

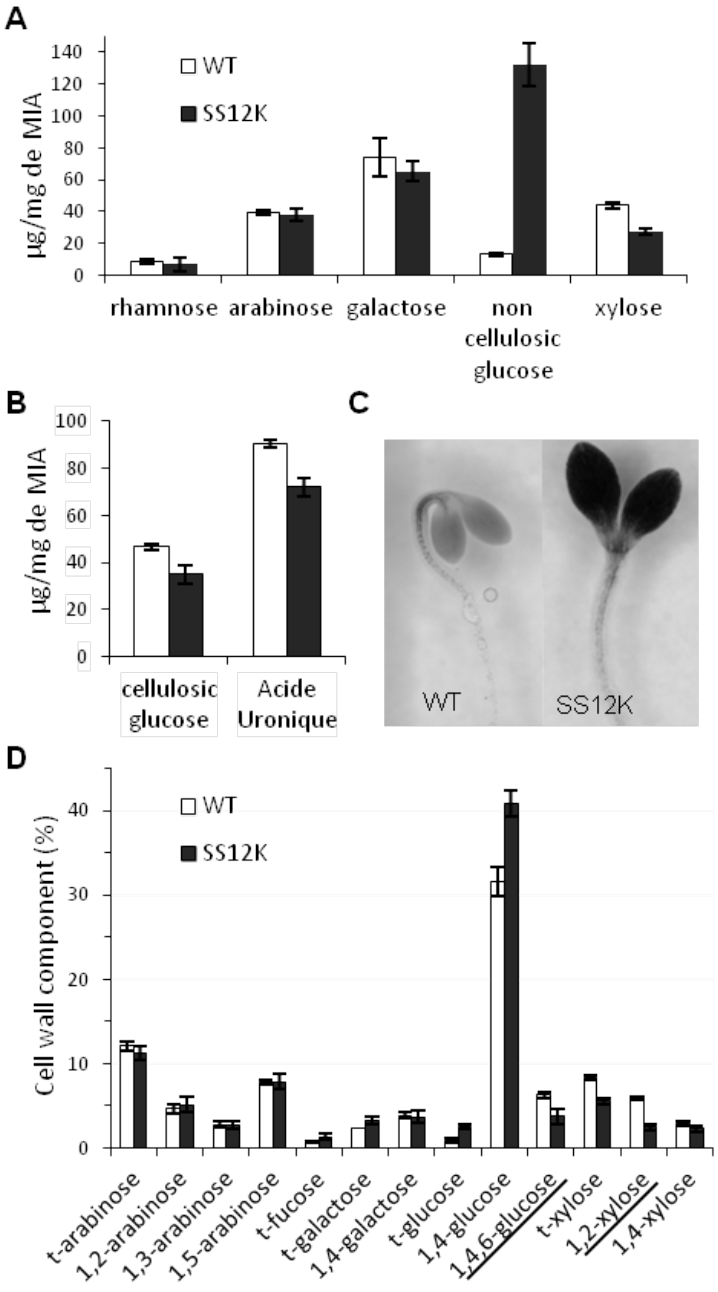


Figure 3 Monosaccharide composition in WT and SS12K

(A) Composition analysis of WT and SS12K . Bars represent SD (n=4 biological replicates)
(B) Quantification of cellulosic glucose and uronic acid.
(C) Lugol staining of WT and SS12K dark grown seedlings.
(D) Glycosidic linkage analysis of cell wall polysaccharides extracted from ethanol induced WT and SS12K dark grown hypocotyls.
Bars represent SD (biological replicates n=4)

To analyze more precisely the effect of ABP1 inactivation on gene expression of cell wall related genes, the list of annotated cell wall related genes in TAIR was supplemented up to 981 genes by the data reported by (Jamet et al., 2009). A total of 216 differentially expressed cell wall genes was thus recorded. Major changes concern genes involved in cell wall remodeling whereas few genes involved in cell wall biosynthesis are affected by ABP1 inactivation (Figure 2C). Genes involved in hemicellulose modifications, as glycosyl hydrolases or different classes of xyloglucan endo/trans glycosidases (XTHs) are among the most differentially affected by the loss of function of ABP1, in addition to expansins A that promote cell wall loosening in response to acidification (Park and Cosgrove, 2012b) . These differential expressions of cell wall related genes suggest a role of ABP1 in the modulation of cell wall extensibility to sustain cell expansion.

ABP1 affects xyloglucan structure

With the objective of evaluating the consequences of the differential expression of cell wall related genes on cell walls, we analyzed the composition of wall polysaccharides after inactivation of ABP1. We first quantified the composition in monosaccharides (Figure 3 A and B) which revealed that cell walls of ABP1 inactivated dark grown seedlings have a reduced content in xylose, cellulosic glucose and uronic acid. A tremendous increase in non cellulosic glucose is observed in SS12K. Lugol staining of the seedlings revealed that de-etiolated SS12K accumulate large amount of starch in cotyledons that can account for the difference in glucose. Lugol staining of *cop10.4* mutant, that exhibits similar de-etiolation and reduction of hypocotyl growth than SS12K, revealed that starch accumulation is not shared by all de-etiolated mutants (Supplementary Figure 3A-C). Further analysis was performed by glycosidic linkage analysis (Figure 3D). The increase in 1,4-glucose is still likely to reflect the presence of contaminating amidon into the cell wall fraction. More interestingly, 1,4,6-glucose is reduced as well as and 1,2-xylose that are both specific from XyGs (Zablackis et al., 1996). The decrease in t-xylose and 1,2-xylose confirms the global reduction of xylose monosaccharide in the composition analysis.

To further characterize XyG structure in hypocotyls inactivated for ABP1, we used Oligosaccharide Mass Profiling (OLIMP) coupled with Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) (Lerouxel et al., 2002). This fingerprinting method provides relative abundance of oligosaccharide XyG polymers based on their isotopic masses.

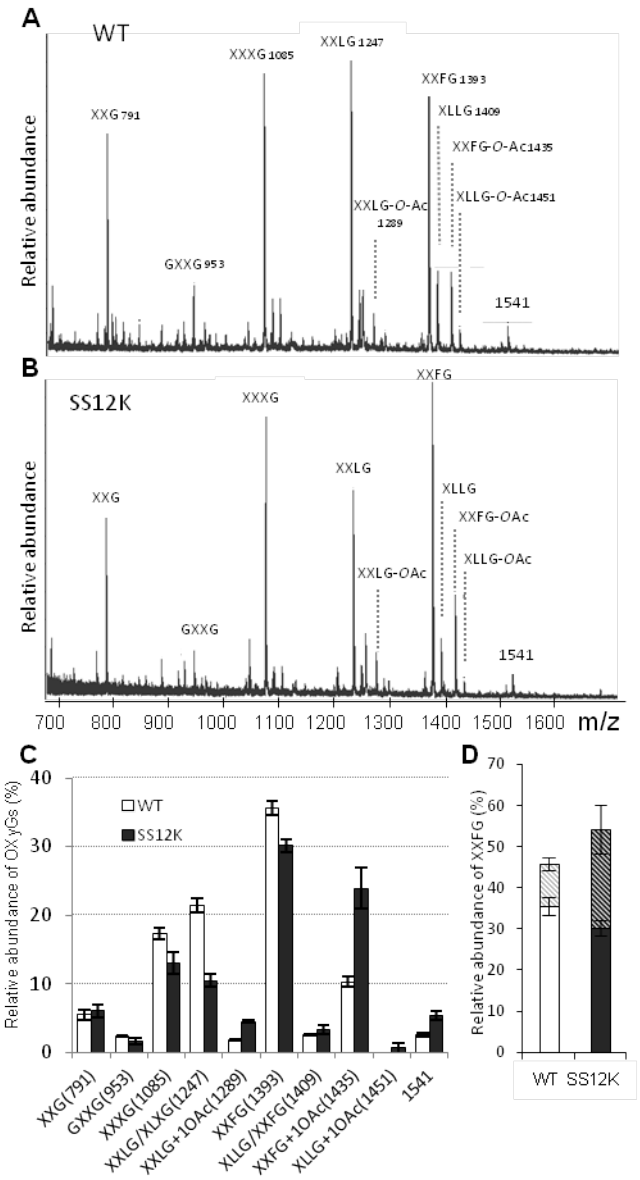


Figure 4: Xyloglucan composition in dark grown SS12K hypocotyls

(A) Representative spectrum of oligosaccharide mass profiling of OXyGs of ethanol induced WT hypocotyls grown in the dark for 4 days.
(B) OLIMP Spectrum of OXyGs from ABP1 inactivated hypocotyls grown as in (A).
(C) Quantitative statistical analysis of OLIMP data for WT and SS12K; Bars represent SD (biological replicates n=4).
(D) Relative amount of fucosylated OXyG fragments in WT and SS12K. Histograms represents the sum of O-acetylated and non-acetylated XXFG for each genotype.

XyG fragments were generated by endoglucanase enzymatic digestion that cleaves the XyG backbone after unsubstituted glucose. Inactivation of ABP1 results in robust changes in the relative abundance of specific XyG fragments (Figure 4 and Supplementary Figure 1). In particular XXXG and XXLG were decreased whereas O-acetylated XXLG and especially O-Ac- XXFG were increased. More complex fragments were also significantly increased as an uncharacterized 1541 m/z ion. The biological function of cell wall polymer O-acetylation is still unclear and the relative ratio varies to some extent, however the sum of unacetylated and O-acetylated XXFG was always increased after ABP1 inactivation revealing that XyGs were enriched in long and fucosylated side chains (Figure 4C). Considering the alteration of hypocotyl growth and broad changes in cell wall gene expression resulting from inactivation of ABP1, observed cell wall alterations appear to be rather specific to XyG and more precisely to modifications of XyG side chain length.

We verified that this XyG profile was not correlated with the de-etiolation phenotype of ABP1 inactivated seedlings *per se* by comparing with the XyG analysis of the *cop10.4* mutant (Supplementary Figure 3Dand E). Little changes were observed in *cop10.4* xyloglucan fragments compared to WT indicating that XyG structure in ABP1 inactivated is not a common feature of de-etiolated mutants and is directly or indirectly resulting from the loss of ABP1 function.

Modulation of xyloglucan fucosylation *in muro* restores hypocotyl elongation

We then addressed the question of the relative importance of XyG fucosylation towards the reduced cell expansion in ABP1 inactivated hypocotyls. We first took advantage of the previously reported *murus* mutants to decrease XyG fucosylation in ABP1 knock down. The conditional construct for ABP1 was introgressed by crossing into *mur2.1* mutant that is null for the fucosyl transferase *FUT1/MUR2* (Vanzin et al., 2002). In accordance with previous report (Vanzin et al., 2002), *mur2.1* mutant exhibits a drastic decrease in fucosylated XyG fragments and a reciprocal increase of XXLG/XLXG polymers (Figure 5A). Similar profile is observed in SS12K background, however a slight but significant increase of XXFG, O-acetylated XXLG and XXFG as well as the increase of the 1541 m/z ion were observed after inactivation of ABP1, suggesting that a weak fucosyl transferase activity is still effective in this background. Functional inactivation of ABP1 in *mur2* mutant background did not result in significant change in the phenotype, suggesting that the production of XyGs with shorter side chains is not sufficient to modify the elongation of hypocotyls inactivated for ABP1.

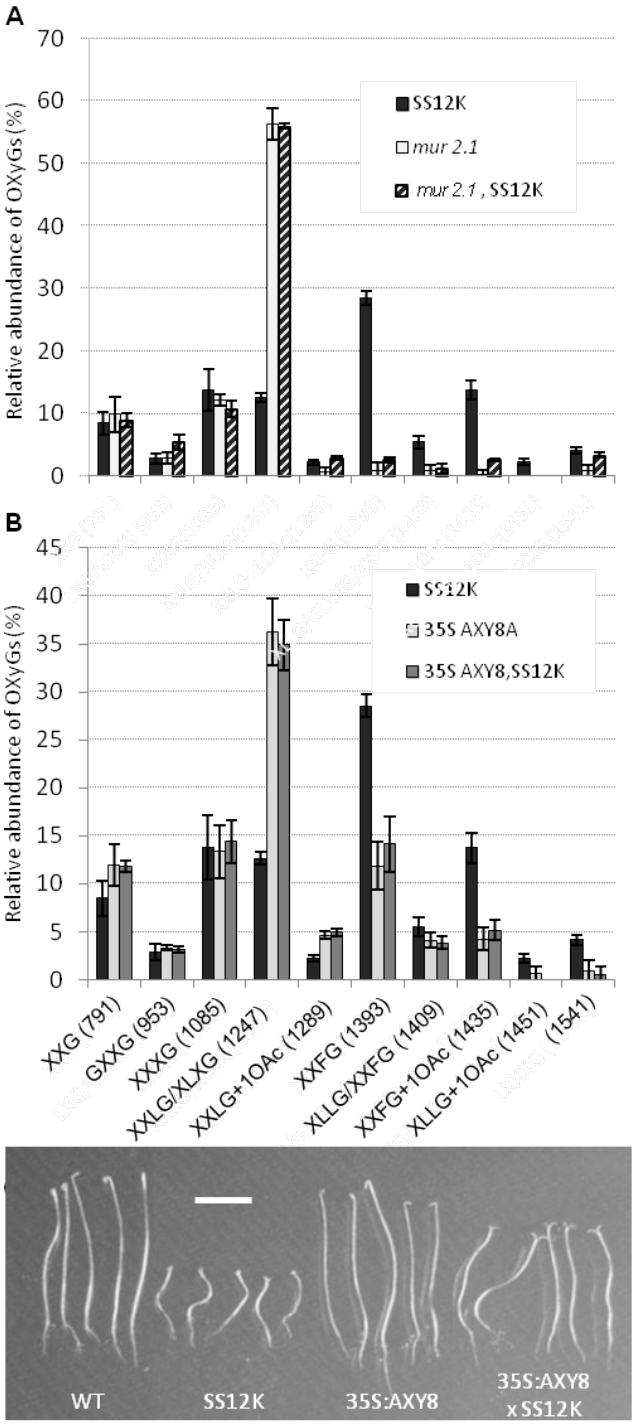


Figure 5: Partial restoration of cell expansion in ABP1 inactivated hypocotyls SS12K by fucosidase-mediated OXyG defucosylation

(A) Comparison of the relative abundance of a selection of OXyGs, quantified from OLIMP spectra, between ethanol induced hypocotyls of SS12K, *mur2-1* null mutant and SS12K in *mur2-1* background.
(B) Comparison of the relative abundance of a selection of OXyGs, quantified from OLIMP spectra, between ethanol induced hypocotyls of SS12K, 35S:AXY8 overexpressor and SS12K,35S:AXY8 double transformants. In (A) and (B) bars represent SD (biological repeats n=4)
(C) Phenotype of four day-old dark grown seedlings

This data first prompted us to conclude that the XyG hyperfucosylation observed after inactivation of ABP1 is not responsible for the alteration of hypocotyl elongation. We however questioned whether much more subtle control of XyG fucosylation during the elongation process would affect hypocotyl growth. We generated double transformants combining overexpression of *AtFUC95A* apoplastic fucosidase (35S:AXY8) (Günl et al., 2011) with the functional inactivation of ABP1 (SS12K). Overexpression of the fucosidase promoted partial defucosylation of XyGs (Figure 5B) and, very importantly, partially restored hypocotyl elongation in seedlings inactivated for ABP1. Hypocotyl length of dark grown 35S:AXY8,SS12K seedlings is twice the length of SS12K whereas agravitropic defect and cotyledon opening are still as in SS12K. This data suggests that cell wall fucosidase activity is defective in ABP1 loss of function, thus impairing the capacity of the cells to expand. Interestingly, *AXY8* was found to be down-regulated after inactivation of ABP1 (Figure 5C). It also points out the critical importance of the length and composition of XyG side chains for cell expansion with major differences between biosynthesis and modifications occurring within the cell wall.

ABP1 acts on xyloglucan structure through modulation of gene regulation via its effect on the $SCF^{TIR1/AFBs}$ pathway

We recently provided evidences demonstrating that ABP1 is modulating the $SCF^{TIR1/AFBs}$ pathway (Tromas et al., 2013 under revision – en annexe). In particular, we reported that multiple null mutations in *TIR1* and *AFBs* suppress the severe developmental alterations of light grown ABP1 inactivated seedlings. Here, we took advantage of this genetic material to investigate whether ABP1-dependent alterations of XyGs result from the activity of the protein at the plasma membrane or from the control exerted by ABP1 on the TIR1/AFB-AUX/IAA controlled gene expression. This question merit to be raised especially considering the partial restoration of hypocotyl growth resulting from *AXY8* overexpression. We first checked whether *tir1/afb* mutations suppress the deetiolation phenotype of dark grown SS12K seedlings. Inactivation of ABP1 in *tir1-1*,*afb2-1*,*afb3-1* background resulted in the etiolated phenotype of the triple mutant (Figure 6A) indicating that hypocotyl elongation and more broadly the skotomorphogenesis program is mainly restored. Irrespective of the functionality of ABP1, the hypocotyl length of the triple mutant is however 20% shorter than WT and the apical hook is less pronounced (Figure 6B).

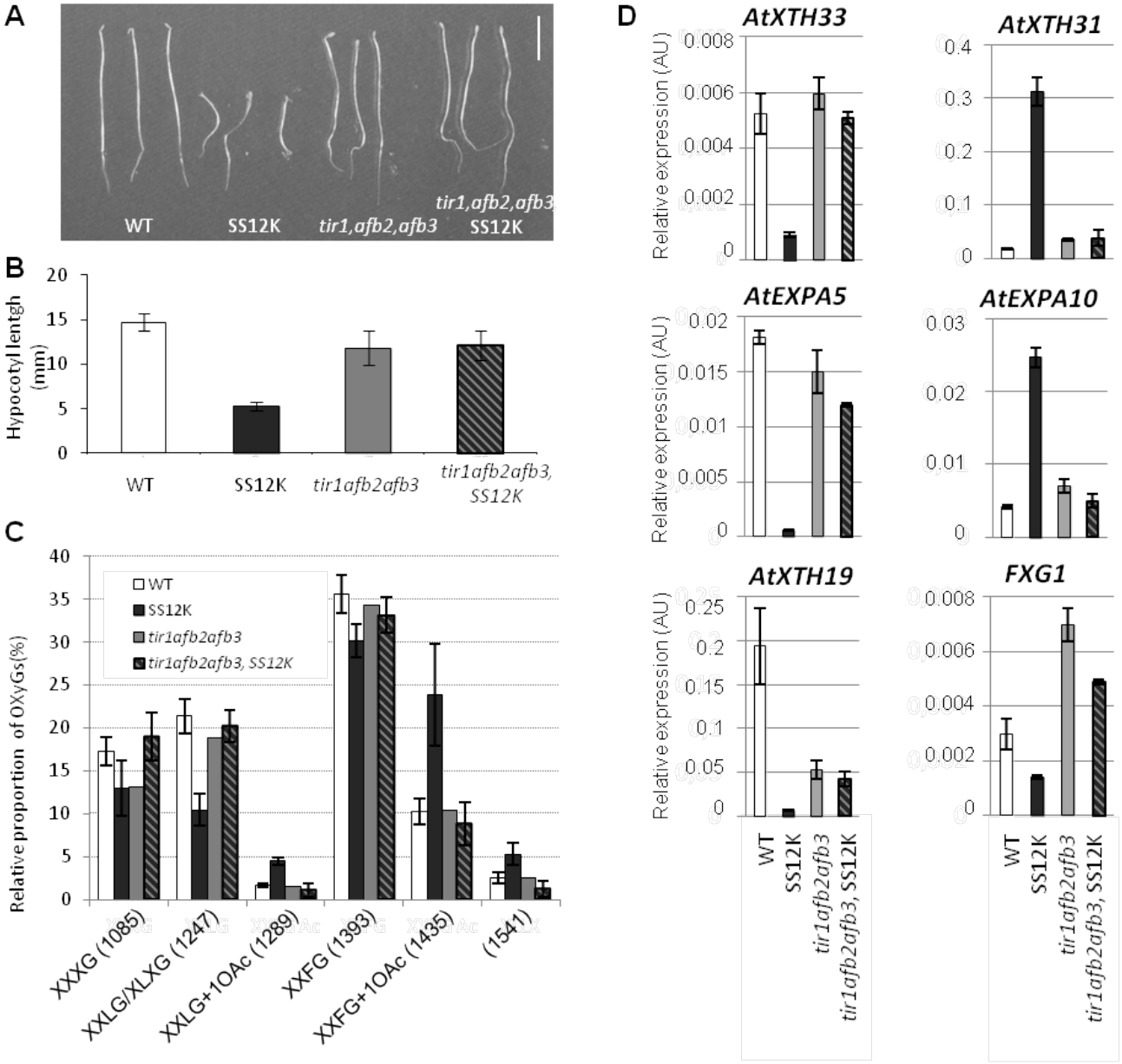


Figure 6: Suppression of ABP1 loss of function phenotype in *tir/afbs, ss12k* background

(A) Phenotype of four day-old dark grown seedlings as indicated.
(B) Hypocotyl length for four day old dark grown seedlings
(C) Comparison of the relative abundance of a selection of OXyGs, quantified from OLIMP spectra, between ethanol induced hypocotyls of WT, SS12K, *tir1-1,afb2-1,afb3-1* triple mutant and SS12K in the triple F-box mutant background. Bars represent SD (biological repeats n=4)
(D) RNA accumulation of a selection of XyG related genes in the distinct genotypes as indicated. All data were normalized with respect to *ACTIN2-8* and expressed in relative units. bars represent SD (biological repeats n=3, and two technical repeats for each)

The suppression of ABP1 loss of function phenotype by *TIR1/AFB* mutations while ABP1 is still inactive offered a unique opportunity to discriminate between genomic and non-genomic dependent role of ABP1 on cell wall composition. We focused on XyG fragments exhibiting consistent differences between WT and lines inactivated for ABP1. Analysis of the triple mutant *tir1-1,afb2-1,afb3-1* with or without inactivation of ABP1 revealed an OXyG profile very similar to the WT (Figure 6C). Loss of function for up to 3 members of the TIR1/AFB F-box family has no measurable effect on XyG structure but paradoxally is sufficient to suppress cell wall defects resulting from ABP1 inactivation. This data led to the conclusion that observed alterations in XyGs in ABP1 inactivated dark grown seedlings reflect the effect of ABP1 on the $SCF^{TIR1/AFB}$ pathway.

We thus analyzed whether *tir1/afb* mutations fully restored the steady state expression of cell wall related genes found to be altered after ABP1 inactivation. In the context of this study, we mainly focused on genes involved in XyG modifications (Figure 6D and Supplemental Figure 4). Figure 6D is a selection of representative genes exhibiting distinct steady state expression after alteration of the ABP1 and/or the $SCF^{TIR1/AFB}$ pathways. Importantly, real time RT-PCR analyses mainly confirmed ABP1-dependent differential expression identified from the transcriptomic data. Within the same gene family and even the same sub family, opposite effects of ABP1 inactivation are observed as for *AtXTH33* or *AtEXPA5* and *AtXTH31* or *AtEXPA10* that are down- and up- regulated, respectively. No or weak modification of expression was detected for these genes in the triple *tir1-1,afb2-1,afb3-1* mutant and in this background, inactivation of ABP1 has no longer any effect on the accumulation of their messengers that accumulate as in the triple mutant. *AtXTH18* illustrates genes that are down-regulated in ABP1 inactivated seedlings as well as in the triple *tir1/afbs* mutant, the combination of both being very similar to the triple mutant. Finally, the α-fucosidase *FXG1* was found to be down regulated after inactivation of ABP1 (as previously observed for *AXY8*, Figure 5C), up-regulated in the triple mutant and to be intermediate in the combination of both. In most cases, *tir1/afb* mutations restored the expression of genes altered after ABP1 inactivation either to a WT level or to the level of the mutant, confirming that ABP1 is mainly acting through the $SCF^{TIR1/AFB}$ pathway. As shown above, this observation concerns up- and to a lesser extent down- regulated genes.

DISCUSSION

>ABP1 is essential for control of gene expression

ABP1 is a unique plant protein and is a long-standing auxin receptor that remained enigmatic despite recent progresses. Null mutation and induced loss of function for ABP1 result in pleiotropic effects on Arabidopsis growth and development starting with embryo lethality for the *abp1-2* null mutant (Chen et al., 2001; Braun et al., 2008; Tromas et al., 2009; Xu et al., 2010). These broad effects come in the control of ABP1 on cell division (David et al., 2007; Tromas et al., 2009) and also the requirement of ABP1 for cell expansion in shoot tissues (Braun et al., 2008; Xu et al., 2010).

In addition to the reported role of ABP1 in rapid and non-genomic responses, the protein was also shown to be involved in the regulation of gene expression, at least for a subset of early auxin response genes (Braun et al., 2008; Tromas et al., 2009; Effendi et al., 2011). The microarray data generated on dark grown seedlings reveal that functional inactivation of ABP1 affects the expression of an extremely large number of genes even after a short term inactivation of the protein coherent with the pleiotropism and severity of observed phenotypes (Figure 1).

Genes impaired in ABP1 loss of function encompass a lot of cell wall related genes encoding structural cell wall proteins and enzymes involved in cell wall modifications or remodeling (Figure 2 and Table 1). Genes encoding glycosyl hydrolases, XTHs and A-type expansins were among the most affected. Within these families, most genes were repressed indicating that functional ABP1 is required for their expression during hypocotyl growth. Genes of a majority of AtXTH that were reported to have XET activity are repressed, as well as genes encoding α-fucosidases (*FXG1* and to a lesser extent *AXY8*) and β-galactosidases (Figure 6 and supplementary figure 4). All these enzymes, as well as expansins act on XyG remodeling or XyG- cellulose cross-links and concomitant decrease of their relative expression is susceptible to affect primary wall extension. Interestingly, *AtXTH31* and to a lesser extent *AtXTH32* that behave to the group III-A of *XTH* genes are expressed at a highest level after inactivation of ABP1. These enzymes were reported to be responsible for most of the hydrolysis of xylosylated or galactosylated xyloglucans occurring in parallel with primary wall expansion and were proposed to have integral roles in assembly or disassembly (Baumann et al., 2007; Kaewthai et al., 2012).

ABP1 acts mainly via the $SCF^{TIR1/AFB}$ pathway

Suppression of the developmental alterations resulting from ABP1 inactivation by loss of function mutations in *TIR1* and *AFB* F-box genes suggests that modifications of gene expression via the $SCF^{TIR1/AFB}$ pathway are predominantly responsible for the restoration of the dark grown phenotype. This restoration of gene expression includes a broad range of the above mentioned cell wall genes

whatever their expression was repressed or derepressed after ABP1 inactivation (Figure 6D and supplementary figure 4). However the variety of expression profiles indicates that ABP1-dependent gene expression is not only dependent from the $SCF^{TIR1/AFB}$ pathway.

For genes that are up- or down- regulated after ABP1 inactivation but unchanged in the triple mutants, there is a complete restoration of the expression. This is the case of *AtXTH33*, *AtXTH31*, *AtEXPA5*, *AtEXPA10* and several others (Figure 6D and Supplementary figure 4) for which null mutations in *TIR1* and *AFBs* do not impair their expression but are sufficient to restore expression when ABP1 is not functional. For genes that are impaired in the triple *tir1/afbs* mutant, there is an apparent partial restoration close to the level of expression in the triple mutant. It is for example the case of *AtXTH19* that is repressed in both SS12K and the triple *tir1,afbs* mutant. This gene was previously reported to be induced by auxin (Vissenberg et al., 2005). Its down regulation in all genotypes suggests that both ABP1 and TIR1/AFB pathways are required. Conversely, genes that were already reported as auxin-regulated genes in etiolated hypocotyls were not found to be differentially expressed in SS12K, as *AtEXPA1* for example (Esmon et al., 2006).

A simple and unique model of $SCF^{TIR1/AFB}$ dependent gene regulation is clearly not sufficient to account for the complexity of the distinct expression profiles found in the different genetic background. Previous transcriptomic analyses comparing gene expression in auxin signaling mutants or after auxin treatments have already reported important changes in cell wall related genes (Pufky et al., 2003; Okushima et al., 2005b; Overvoorde et al., 2005; Nemhauser et al., 2006). The correlation between the auxin-mediated regulation, including cell wall genes, and alteration of their expression in *axr3-1* (Overvoorde et al., 2005) or *nph4-1,arf19-1*(Okushima et al., 2005b) auxin signaling mutants was paradoxically not so well established. It appears that an ABP1-dependent pathway is acting massively on gene expression, sometimes in concert to the $SCF^{TIR1/AFB}$ pathway, sometimes exerting opposite effects.

Interestingly, whereas gene expression and dark grown phenotype of *tir1,afb,*SS12K, are those of class III *tir1,afbs* mutant (Dharmasiri et al., 2005b) (Figure 6A-B), XyG structure is fully restored as in wild-type hypocotyls (Figure 6C). This data suggest that gene alterations that are still observed in the triple mutant are not critical for XyG structure. In these seedlings with restored hypocotyl elongation, ABP1 is still inactivated thus indicating that the protein does not have a critical role on cell wall acidification and related cell wall loosening as originally hypothesized. Our data do not however allow ruling out such putative role but its relative importance appears to be rather minor compared to gene regulation together with the $SCF^{TIR1/AFB}$ pathway.

ABP1 affects xyloglucan structure

Considering the relatively large number of cell wall related genes that were found to be differentially expressed after inactivation of ABP1, it was somehow surprising that no massive changes in the cell wall composition were observed. Cell wall changes essentially concerned XyG and more specifically the length of side chains that were globally enriched into fucose and O-acetylated XyG.

XyG were reported to play a major role in the ability of a cell to expand (Cosgrove, 2005). XyG and cellulose microfibrils binds to each other's to form a complex network acting as a semi-rigid structure in the primary wall. Such framework can exert a mechanical constraint limiting cell expansion. Modifications of XyG-cellulose interaction or remodeling of XyG by metabolizing enzymes are believed to modulate cell wall extensibility thus to facilitate cell expansion. Whereas a whole set of experimental data support such major role of XyG in cell elongation (Cosgrove, 2005; Wolf et al., 2012), more recent characterizations of Arabidopsis mutants altered in XyG structure or even lacking substituted XyG questioned the critical function of XyGs in the cell wall and in plant growth as these mutants exhibited no or only subtle phenotypes when grown under standard laboratory conditions (Vanzin et al., 2002; Tamura et al., 2005; Cavalier et al., 2008; Zabotina et al., 2008; Günl et al., 2011).

Plant plasticity and compensation mechanisms were proposed to be accounted for the lack of apparent phenotype. It is worth to note that further studies of the double xyloglucan xylosyltransferase mutant , *xxt1xxt2*, lacking substituted XyG revealed alterations of cellulose organization suggesting more severe alteration of the cell wall than originally reported in these plants (Anderson et al., 2010). Involvement of other matrix components were proposed to compensate XyG structural defects (Park and Cosgrove, 2012b). Further characterization of wild-type versus *xxt1,xxt2* cell wall properties provided additional evidences supporting the importance of XyG for primary cell wall strength and wall loosening by expansin A (Park and Cosgrove, 2012b).

Arabidopsis mutants null for the α-fucosidase AXY8 where shown to exhibit increased XyG fucosylation but these changes in XyG structure were not associated to significant growth or developmental phenotypes(Günl et al., 2011). Similarly no growth defects were reported for a decrease in XyG fucosylation either in *mur2* mutant (Vanzin et al., 2002) or in plants overexpressing *AXY8* (Günl et al., 2011). However, in the absence of functional ABP1, the restoration of elongation resulting from *AXY8* overexpression in these plants revealed that the increased fucosylation of XyG was at least partially responsible for the impaired elongation of dark grown hypocotyls (Figure 5). This data highlights the importance of a tight regulation of XyG side chain fucosylation for expansion. This effect can be observed after ABP1 inactivation thank to the specific signature of gene expression in this background, especially for genes involved either in the metabolism of XyG or in XyG-cellulose interactions. Reciprocally, the combination of altered gene expression after ABP1 inactivation might

have significantly reduced possibilities of compensation, thus in this background changes in critical cell wall components generate obvious developmental default.

ABP1 and oligosaccharins

Group III-A *XTH* genes, that include *AtXTH31* and *AtXTH32*, were derepressed after inactivation of ABP1 whereas many other *XTH*s, except *AtXTH7*, were repressed. *AtXTH31* and *AtXTH32* genes encode proteins exhibiting predominantly xyloglucan hydrolases (Kaewthai et al., 2012). ABP1 inactivated hypocotyl might have an increased XEH activity thus increasing XyG hydrolysis. Cleavage of hyperfucosylated XyG would release an increased amount of fucosylated oligosaccharides that are susceptible to act as signaling molecules acting on cell elongation (Fry et al., 1993; Fry, 1994). The fucose residue is not strictly required to promote growth however XXFG fragments were the most effective to stimulate pea stem growth (McDougall and Fry, 1989). Interestingly, XXFG was shown to antagonize the promotive effect of the synthetic auxin 2,4-D on growth of pea stem segments whereas fragments lacking fucose were not able to counterbalance the auxin effect (York et al., 1984; McDougall and Fry, 1989; Augur et al., 1993).

To our knowledge, similar experiment has not been repeated in Arabidopsis however it is tempting to hypothesize that at least part of the hypocotyl growth inhibition in plants inactivated for ABP1 would result from an increase in fucosylated oligosaccharides. This might be an explanation for the partial restoration of hypocotyl elongation after overexpression of the α-fucosidase AXY8 however it is much less likely when considering the lack of growth restoration by *mur2* mutation. Up to now there are no evidence supporting that XEHs would differentially hydrolyze fucosylated versus non fucosylated XyG. Even if ABP1 somehow affects the relative amount of oligosaccharins produced at the cell wall, our data suggest that it is not sufficient to account for the observed difference between AXY8 overexpression and *mur2* mutation.

ABP1 makes the difference between XyG biosynthesis and metabolism

As indicated above, a critical difference was observed after ABP1 inactivation between the defect in fucosylated XyG biosynthesis in the *mur2* mutant and removal of XyG fucose within the cell wall by the apoplastic α-fucosidase AXY8 (figure 5). In the first case, no restoration of hypocotyl growth was observed, whereas *in muro* defucosylation efficiently restored cell elongation. Beyond the information on the importance of XyG fucosylation modification, this observation reveals that acting primarily on XyG biosynthesis diverges significantly from affecting XyG metabolism. Various and non-exclusive scenarios might explain the basis for such difference. First, it is not known whether the substitution pattern of newly synthetized XyGs might affect their incorporation into the polymer. Second, the length and nature of side chains are susceptible to modify the XyG-cellulose microfibrils

network. Analysis and modeling of XyG-cellulose interaction indicated that all XyGs were able to interact with cellulose however the length and nature of the side chains modify the interface between XyG and cellulose microfibrils thus resulting into various conformations (Pauly et al, 1999; Whitney et al 2006, Hanus &Mazeau 2006; Bootten et al 2004; Dick-Perez et al 2011).

The nature and diversity of XyG substitutions are potentially responsible for the reported or predicted behaviors of XyG (Pauly et al., 1999; Park and Cosgrove, 2012a). Third, XyG fucosylation and acetylation, and resulting changes in Xyg and Xyg-cellulose network conformations, might also affect the accessibility or substrate specificity to cell wall A type expansins or XTH enzymes. However, little is known on the possible specificity of various XTH towards XyG motifs. Many members of these two gene families were found to be differentially expressed after inactivation of ABP1 and we can hypothesize that these changes affect XyG remodeling. During hypocotyl growth in darkness, the elongation zone of the hypocotyl progresses from the basis to the upper part of the hypocotyl and cells request progressive changes in cell wall characteristics accordingly. Interestingly, ABP1-dependent regulation of the fucosylation/defucosylation combined with modification of gene expression might be an efficient mechanism to control and coordinate cell elongation in time and space.

MATERIAL and METHODS

Plant lines and growth conditions

Wild-type Col0 ecotype of Arabidopsis thaliana, conditional lines for ABP1 (SS12K, SS12S that express the recombinant antibody scFv12 blocking ABP1 function or the antisens line AS9) were surface sterilized, and grown under sterile conditions on plates containing 1/2 Murashige and Skoog (MS) basal salt mixture, buffered at pH 5.7 with 2.5 mM 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, and containing 0.9% vitro agar (Kalys, St Ismier, France). After stratification, plates were exposed 4h to light and transferred in a vertical position at 22°C for 4 days in darkness. These growth conditions were obtained using a dedicated growth chamber placed in a dark room equipped with green light. WT and SS12K were grown in the same plate for growth and cell wall composition analyses. Ethanol induction was performed as previously described (Braun et al., 2008). Inductions were performed either immediately after stratification of the seeds or 8 hours before harvesting the seedlings.

SS12K was crossed with *mur2-1* (Vanzin et al., 2002) and *tir1-1,afb2-1,afb3-1* (Dharmasiri et al., 2005b) mutants or with *p35S :AXY8* overexpressor (Günl et al., 2011) , *p35S:PIP2;1-GFP* (Luu et al., 2012) and *pCESA6: UidA* (Desprez et al., 2007) to introgress the ethanol inducible scFv12 construct into the corresponding background. Double homozygotes were selected in F3 for growth and cell wall analyses except for 35SAXY8,SS12K where heterozygous were used.

Cell measurements and Gus staining

Epidermal cell length of Col-0 and SS2K hypocotyls were performed using plants exhibiting *p35S::PIP2,1-GFP* construct (Luu et al., 2012). Dark-grown seedlings of two, three and four days were observed using an inverted confocal microscope TCS SP2 (Leica microsystems, Heidelberg, Germany). Hypocotyls were reconstructed using Photoshop and cell lengths were measured using ImageJ software (NIH).

The GUS assays were performed as described in Malamy and Benfey (1997). Two and four day-old dark-grown seedlings of Col-0 and SS12K exhibiting *pCESA6:UidA* construct were stained during three hours at 37°C. GUS-stained seedlings were observed without clearing with a MULTIZOOM AZ100 microscope (Nikon Corporation Instruments Company, Japan) under bright field.

Transmission Electron Microscopy and measurement of cell wall thickness

Three day-old dark-grown seedlings of Col-0 and SS12K were collected and fixed overnight at room temperature in 3% (w/v) glutaraldehyde/ 1% (w/v) paraformaldehyde in 0.2M sodium cacodylate pH 6.8 under gentle agitation. After 3 washes in the same buffer at 0.1M seedlings, post-fixation was

achieved in 1% (w/v) osmium tetroxide/ 1.5% potassium ferrocyanide (w/v) in water during 1h. After extensive washes in water, seedlings were dissected under water to select hypocotyl fragments from the basis and the elongation zone. Fragments were dehydrated through graded ethanol series, were then embedded in epoxy Resin (Agar low-viscosity premix kit medium, Oxford Instruments, Saclay, France) and polymerized for 20 h at 60°C.

Transversal ultrathin sections (~90nm) of embedded material were cut using an ultramicrotome (Ultracut UC6; Leica) and were picked up onto 200 mesh, formvar-coated copper grids. Sections were stained with aqueous 2% (w/v) uranyl acetate for 20min, rinsed, then silver stained for 6 min. Grids were examined under a JEOL 1400 TEM operating at 120 kV (JEOL, http://www.jeol.com). Images were acquired using a post-column high-resolution (11 megapixels) high-speed camera (SC1000 Orius; Gatan, http://www.gatan.com).

Cell wall thickness was measured on images previously acquired from three hypocotyls of each genotype using ImageJ software (NIH).

Hypocotyls transversal semi-thin sections of SS12K (~300nm) were stained by toluidine-blue and observed with a BX53 microscope (Olympus corporation, Japan). Images were captured with an Olympus digital camera DP73.

Microarray analysis

Four day-old dark grown seedlings of WT and SS12K ABP1 conditional line were harvested under green light at day 4 (96h) after culture in the dark. Seedlings were induced by ethanol vapor either since their transfer in darkness or 8h before harvesting. RNA was extracted using an Qiagen RNeasy kit and digested with RNAse free DNAse on the column following the manufacturer's instructions (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France) and RNA quantification and quality control were achieved using 2100 Bioanalyzer RNA chip (Agilent). Three independent biological replicates were used for each condition.

RNA labeling, hybridization of long oligonucleotide microarrays, and data analysis were as described (Stavange et al, 2009 or Bueso et al, 2007?)

Microarray raw data have been deposited in the NCBI's GEO database under accession XXX

Cell wall analyses

Composition analysis was performed on 4 day old seedlings induced with ethanol vapor since germination.

Oligosaccharide mass profiling (OLIMP) was performed as reported by (Gunl and Pauly (2011). Dark grown seedlings were collected under green light and stored in cold ethanol. Hypocotyl length was measured on individual seedlings and for each biological repeat 5 hypocotyls were dissected and used for the analysis.

Starch staining

4 day-old dark-grown seedlings of Col-0 and SS12K were incubated in Lugol's iodine solution (6 mm iodine, 43 mm KI, and 0.2 n HCl) to detect starch granules.

Real-time RT-PCR analysis

RNA was extracted from four day old dark grown seedlings using an Qiagen RNeasy kit and digested with RNAse free DNAse on the column following the manufacturer's instructions (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France). First-strand cDNAs were synthesized from 5 µg of total RNA using Superscript II reverse transcriptase according to the manufacturer's instructions. Quantitative RT-PCR analyses were performed using SYBR Green QPCR master mix (Roche) with specific primers as presented Supplementary Table 2. Three biological repeats were analysed in duplicates. Each sample was normalized with *ACTIN2-8*, and data are expressed in relative units to *ACTIN*.

SUPPLEMENTAL DATA

Supplemental Table 1:List of cell wall genes - **en annexe**

Supplemental Table 2: List of primers used in real-time RT-PCR - **en annexe**

Supplemental figure 1: Xyloglucan composition in dark grown hypocotyls of various lines inactivated for ABP1

Supplemental figure 2: Overview of classes of genes differentially expressed after ABP1 inactivation in dark grown seedlings ordered by cellular component.

Supplemental figure 3: Comparison of xyloglucan composition of dark grown hypocotyls *cop10-4* de-etiolated mutant with WT and SS12K

Supplemental figure 5: XyG gene expression analyzed by real-time RT-PCR

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Markus Pauly (University of California Berkeley) for kindly providing the seeds of AXY8 overexpressor, Mark Estelle (University of California San Diego, Howard Hughes Medical Institute) for seeds of the triple *tir1,afb2,afb3* mutant, Xing Wang Deng (Yale University) for seeds of *cop10-4* and Doan Luu (Montpellier, France) for seeds of 35S:PIP2;1-GFP line. We warmly thank Sylvie Citerne from the Plant Observatory from IJPB (INRA, Versailles) for cell wall composition analysis. This work has benefited from the facilities and expertise of the Imagif Cell Biology Unit of the Gif campus (www.imagif.cnrs.fr) which is supported by the Conseil Général de l'Essonne, France. We also thank Jessica Marion for technical assistance in electronic microscopy. This work was supported by the ANR blanc AuxiWall project ANR-11-BSV5-0007. C.P.R. team is also funded by the CNRS and G.M. by the INRA.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.P., G.M., C.P-R. designed the research; S.P., L.G., C.G., D.A., C.P.B., P.M., A.G. and R.S. performed research; S.P.,D.A. and M.B. performed transcriptomic analysis; S.P., L.G., G.M. and C. P-R. analyzed data; S.P., C.P-R. wrote the paper with critical reading from G.M., D.A. and M.B.

REFERENCES

Anderson, C.T., Carroll, A., Akhmetova, L., and Somerville, C. (2010). Real-time imaging of cellulose reorientation during cell wall expansion in Arabidopsis roots. Plant Physiol **152,** 787-796.

Augur, C., Benhamou, N., Darvill, A., and Albersheim, P. (1993). Purification, characterization, and cell wall localization of an alpha-fucosidase that inactivates a xyloglucan oligosaccharin. Plant J **3,** 415-426.

Barbier-Brygoo, H., Zimmermann, S., Thomine, S., White, I.R., Millner, P., and Guern, J. (1996). Elementary auxin response chains at the plasma membrane involve external abp1 and multiple electrogenic ion transport proteins. Plant Growth Regulation.

Baumann, M.J., Eklof, J.M., Michel, G., Kallas, A.M., Teeri, T.T., Czjzek, M., and Brumer, H., 3rd. (2007). Structural evidence for the evolution of xyloglucanase activity from xyloglucan endo-transglycosylases: biological implications for cell wall metabolism. Plant Cell **19,** 1947-1963.

Braun, N., Wyrzykowska, J., Muller, P., David, K., Couch, D., Perrot-Rechenmann, C., and Fleming, A.J. (2008). Conditional Repression of AUXIN BINDING PROTEIN1 Reveals That It Coordinates Cell Division and Cell Expansion during Postembryonic Shoot Development in Arabidopsis and Tobacco. Plant Cell **10,** 2746-2762. .

Calderon Villalobos, L.I., Lee, S., De Oliveira, C., Ivetac, A., Brandt, W., Armitage, L., Sheard, L.B., Tan, X., Parry, G., Mao, H., Zheng, N., Napier, R., Kepinski, S., and Estelle, M. (2012). A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. Nat Chem Biol **8,** 477-485.

Cavalier, D.M., Lerouxel, O., Neumetzler, L., Yamauchi, K., Reinecke, A., Freshour, G., Zabotina, O.A., Hahn, M.G., Burgert, I., Pauly, M., Raikhel, N.V., and Keegstra, K. (2008). Disrupting two Arabidopsis thaliana xylosyltransferase genes results in plants deficient in xyloglucan, a major primary cell wall component. Plant Cell **20,** 1519-1537.

Chapman, E.J., and Estelle, M. (2009). Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. Annu Rev Genet **43,** 265-285.

Chen, J.G., Ullah, H., Young, J.C., Sussman, M.R., and Jones, A.M. (2001). ABP1 is required for organized cell elongation and division in Arabidopsis embryogenesis. Genes Dev **15,** 902-911.

Christian, M., Steffens, B., Schenck, D., Burmester, S., Bottger, M., and Luthen, H. (2006). How does auxin enhance cell elongation? Roles of auxin-binding proteins and potassium channels in growth control. Plant Biol (Stuttg) **8,** 346-352.

Cosgrove, D.J. (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. Nature **407,** 321-326.

Cosgrove, D.J. (2005). Growth of the plant cell wall. Nat Rev Mol Cell Biol **6,** 850-861.

David, K.M., Couch, D., Braun, N., Brown, S., Grosclaude, J., and Perrot-Rechenmann, C. (2007). The auxin-binding protein 1 is essential for the control of cell cycle. Plant J **50,** 197-206.

Desprez, T., Juraniec, M., Crowell, E.F., Jouy, H., Pochylova, Z., Parcy, F., Hofte, H., Gonneau, M., and Vernhettes, S. (2007). Organization of cellulose synthase complexes involved in primary cell wall synthesis in Arabidopsis thaliana. Proc Natl Acad Sci U S A **104,** 15572-15577.

Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Weijers, D., Lechner, E., Yamada, M., Hobbie, L., Ehrismann, J.S., Jurgens, G., and Estelle, M. (2005). Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. Dev Cell **9,** 109-119.

Effendi, Y., Rietz, S., Fischer, U., and Scherer, G.F. (2011). The heterozygous abp1/ABP1 insertional mutant has defects in functions requiring polar auxin transport and in regulation of early auxin-regulated genes. Plant J **65,** 282-294.

Esmon, C.A., Tinsley, A.G., Ljung, K., Sandberg, G., Hearne, L.B., and Liscum, E. (2006). A gradient of auxin and auxin-dependent transcription precedes tropic growth responses. Proc Natl Acad Sci U S A **103,** 236-241.

Frankova, L., and Fry, S.C. (2012). Phylogenetic variation in glycosidases and glycanases acting on plant cell wall polysaccharides, and the detection of transglycosidase and trans-beta-xylanase activities. Plant J **67,** 662-681.

Fry, S.C. (1994). Oligosaccharins as plant growth regulators. Biochem Soc Symp **60,** 5-14.

Fry, S.C., Aldington, S., Hetherington, P.R., and Aitken, J. (1993). Oligosaccharides as signals and substrates in the plant cell wall. Plant Physiol **103,** 1-5.

Fry, S.C., McDougall, G.J., Lorences, E.P., Biggs, K.J., and Smith, R.C. (1990). Oligosaccharins from xyloglucan and cellulose: modulators of the action of auxin and H+ on plant growth. Symp Soc Exp Biol **44,** 285-298.

Gendreau, E., Traas, J., Desnos, T., Grandjean, O., Caboche, M., and Hofte, H. (1997). Cellular basis of hypocotyl growth in Arabidopsis thaliana. Plant Physiol **114,** 295-305.

Gille, S., and Pauly, M. (2012). O-acetylation of plant cell wall polysaccharides. Front Plant Sci **3,** 12.

Günl, M., Neumetzler, L., Kraemer, F., de Souza, A., Schultink, A., Pena, M., York, W.S., and Pauly, M. (2011). AXY8 encodes an alpha-fucosidase, underscoring the importance of apoplastic metabolism on the fine structure of Arabidopsis cell wall polysaccharides. Plant Cell **23,** 4025-4040.

Iglesias, N., Abelenda, J.A., Rodino, M., Sampedro, J., Revilla, G., and Zarra, I. (2006). Apoplastic glycosidases active against xyloglucan oligosaccharides of Arabidopsis thaliana. Plant Cell Physiol **47,** 55-63.

Jamet, E., Roujol, D., San-Clemente, H., Irshad, M., Soubigou-Taconnat, L., Renou, J.P., and Pont-Lezica, R. (2009). Cell wall biogenesis of Arabidopsis thaliana elongating cells: transcriptomics complements proteomics. BMC Genomics **10,** 505.

Jones, A.M., Im, K.H., Savka, M.A., Wu, M.J., Dewitt, N.G., Shillito, R., and Binns, A.N. (1998). Auxin-dependent cell expansion mediated by overexpressed auxin-binding protein 1. Science **282,** 1114-1117.

Kaewthai, N., Gendre, D., Eklof, J.M., Ibatullin, F.M., Ezcurra, I., Bhalerao, R., and Brumer, H., 3rd. (2012). Group III-A XTH genes of Arabidopsis thaliana encode predominant xyloglucan endo-hydrolases that are dispensable for normal growth. Plant Physiol.

Leblanc, N., Perrot-Rechenmann, C., and Barbier-Brygoo, H. (1999a). The auxin-binding protein Nt-ERabp1 alone activates an auxin-like transduction pathway. FEBS Letters **449,** 57-60.

Leblanc, N., David, K., Grosclaude, J., Pradier, J.M., Barbier-Brygoo, H., Labiau, S., and Perrot-Rechenmann, C. (1999b). A novel immunological approach establishes that the auxin-binding protein, Nt-abp1, is an element involved in auxin signaling at the plasma membrane. J Biol Chem **274,** 28314-28320.

Lerouxel, O., Cavalier, D.M., Liepman, A.H., and Keegstra, K. (2006). Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides - a complex process. Curr Opin Plant Biol **9,** 621-630.

Lerouxel, O., Choo, T.S., Seveno, M., Usadel, B., Faye, L., Lerouge, P., and Pauly, M. (2002). Rapid structural phenotyping of plant cell wall mutants by enzymatic oligosaccharide fingerprinting. Plant Physiol **130,** 1754-1763.

Levy, S., Maclachlan, G., and Staehelin, L.A. (1997). Xyloglucan sidechains modulate binding to cellulose during in vitro binding assays as predicted by conformational dynamics simulations. Plant J **11,** 373-386.

Luu, D.T., Martiniere, A., Sorieul, M., Runions, J., and Maurel, C. (2012). Fluorescence recovery after photobleaching reveals high cycling dynamics of plasma membrane aquaporins in Arabidopsis roots under salt stress. Plant J **69,** 894-905.

McDougall, G.J., and Fry, S.C. (1989). Structure-activity relationships for xyloglucan oligosaccharides with antiauxin activity. Plant Physiol **89,** 883-887.

Nemhauser, J.L., Hong, F., and Chory, J. (2006). Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. Cell **126,** 467-475.

Okushima, Y., Overvoorde, P.J., Arima, K., Alonso, J.M., Chan, A., Chang, C., Ecker, J.R., Hughes, B., Lui, A., Nguyen, D., Onodera, C., Quach, H., Smith, A., Yu, G., and Theologis, A. (2005). Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in Arabidopsis thaliana: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. Plant Cell **17,** 444-463.

Overvoorde, P.J., Okushima, Y., Alonso, J.M., Chan, A., Chang, C., Ecker, J.R., Hughes, B., Liu, A., Onodera, C., Quach, H., Smith, A., Yu, G., and Theologis, A. (2005). Functional genomic analysis of the AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID gene family members in Arabidopsis thaliana. Plant Cell **17,** 3282-3300.

Park, Y.B., and Cosgrove, D.J. (2012a). Changes in cell wall biomechanical properties in the xyloglucan-deficient xxt1/xxt2 mutant of Arabidopsis. Plant Physiol **158,** 465-475.

Park, Y.B., and Cosgrove, D.J. (2012b). A revised architecture of primary cell walls based on biomechanical changes induced by substrate-specific endoglucanases. Plant Physiol **158,** 1933-1943.

Pauly, M., Albersheim, P., Darvill, A., and York, W.S. (1999). Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. Plant J **20,** 629-639.

Pauly, M., Qin, Q., Greene, H., Albersheim, P., Darvill, A., and York, W.S. (2001). Changes in the structure of xyloglucan during cell elongation. Planta **212,** 842-850.

Pena, M.J., Ryden, P., Madson, M., Smith, A.C., and Carpita, N.C. (2004). The galactose residues of xyloglucan are essential to maintain mechanical strength of the primary cell walls in Arabidopsis during growth. Plant Physiol **134,** 443-451.

Provart, N., and Zhu, T. (2003). A Browser-based Functional Classification SuperViewer for Arabidopsis Genomics. *Currents in Computational Molecular Biology* **2003,** 271-272.

Pufky, J., Qiu, Y., Rao, M.V., Hurban, P., and Jones, A.M. (2003). The auxin-induced transcriptome for etiolated Arabidopsis seedlings using a structure/function approach. Funct Integr Genomics **3,** 135-143.

Rayle, D.L., and Cleland, R.E. (1992). The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. Plant Physiol **99,** 1271-1274.

Rose, J.K., Braam, J., Fry, S.C., and Nishitani, K. (2002). The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. Plant Cell Physiol **43,** 1421-1435.

Ryden, P., Sugimoto-Shirasu, K., Smith, A.C., Findlay, K., Reiter, W.D., and McCann, M.C. (2003). Tensile properties of Arabidopsis cell walls depend on both a xyloglucan cross-linked microfibrillar network and rhamnogalacturonan II-borate complexes. Plant Physiol **132,** 1033-1040.

Sanchez, M., Gianzo, C., Sampedro, J., Revilla, G., and Zarra, I. (2003). Changes in alpha-xylosidase during intact and auxin-induced growth of pine hypocotyls. Plant Cell Physiol **44,** 132-138.

Scheller, H.V., and Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. Annu Rev Plant Biol **61,** 263-289.

Steffens, B., Feckler, C., Palme, K., Christian, M., Bottger, M., and Luthen, H. (2001). The auxin signal for protoplast swelling is perceived by extracellular ABP1. Plant J **27,** 591-599.

Stepanova, A.N., Yun, J., Likhacheva, A.V., and Alonso, J.M. (2007). Multilevel interactions between ethylene and auxin in Arabidopsis roots. Plant Cell **19,** 2169-2185.

Swarup, K., Benkova, E., Swarup, R., Casimiro, I., Peret, B., Yang, Y., Parry, G., Nielsen, E., De Smet, I., Vanneste, S., Levesque, M.P., Carrier, D., James, N., Calvo, V., Ljung, K., Kramer, E., Roberts, R., Graham, N., Marillonnet, S., Patel, K., Jones, J.D., Taylor, C.G., Schachtman, D.P., May, S., Sandberg, G., Benfey, P., Friml, J., Kerr, I.,

Beeckman, T., Laplaze, L., and Bennett, M.J. (2008). The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. Nat Cell Biol **10,** 946-954.

Takeda, T., Furuta, Y., Awano, T., Mizuno, K., Mitsuishi, Y., and Hayashi, T. (2002). Suppression and acceleration of cell elongation by integration of xyloglucans in pea stem segments. Proc Natl Acad Sci U S A **99,** 9055-9060.

Tamura, K., Shimada, T., Kondo, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2005). KATAMARI1/MURUS3 Is a novel golgi membrane protein that is required for endomembrane organization in Arabidopsis. Plant Cell **17,** 1764-1776.

Thiel, G., Blatt, M.R., Fricker, M.D., White, I.R., and Millner, P. (1993). Modulation of K+ channels in Vicia stomatal guard cells by peptide homologs to the auxin-binding protein C terminus. Proc Natl Acad Sci U S A **90,** 11493-11497.

Tromas, A., Paque, S., Stierlé, V., Quettier A.L., Muller, P., Lechner, E., Genschik, P., and Perrot-Rechenmann, C. AUXIN BINDING PROTEIN 1 is a negative regulator of the SCFTIR1/AFB pathway.

Tromas, A., Braun, N., Muller, P., Khodus, T., Paponov, I.A., Palme, K., Ljung, K., Lee, J.Y., Benfey, P., Murray, J.A., Scheres, B., and Perrot-Rechenmann, C. (2009). The AUXIN BINDING PROTEIN 1 is required for differential auxin responses mediating root growth. PLoS One **4,** e6648.

Vanzin, G.F., Madson, M., Carpita, N.C., Raikhel, N.V., Keegstra, K., and Reiter, W.D. (2002). The mur2 mutant of Arabidopsis thaliana lacks fucosylated xyloglucan because of a lesion in fucosyltransferase AtFUT1. Proc Natl Acad Sci U S A **99,** 3340-3345.

Vissenberg, K., Oyama, M., Osato, Y., Yokoyama, R., Verbelen, J.P., and Nishitani, K. (2005). Differential expression of AtXTH17, AtXTH18, AtXTH19 and AtXTH20 genes in Arabidopsis roots. Physiological roles in specification in cell wall construction. Plant Cell Physiol **46,** 192-200.

Wolf, S., Hematy, K., and Hofte, H. (2012). Growth control and cell wall signaling in plants. Annu Rev Plant Biol **63,** 381-407.

Xu, T., Wen, M., Nagawa, S., Fu, Y., Chen, J.G., Wu, M.J., Perrot-Rechenmann, C., Friml, J., Jones, A.M., and Yang, Z. (2010). Cell surface- and rho GTPase-based auxin signaling controls cellular interdigitation in Arabidopsis. Cell **143,** 99-110.

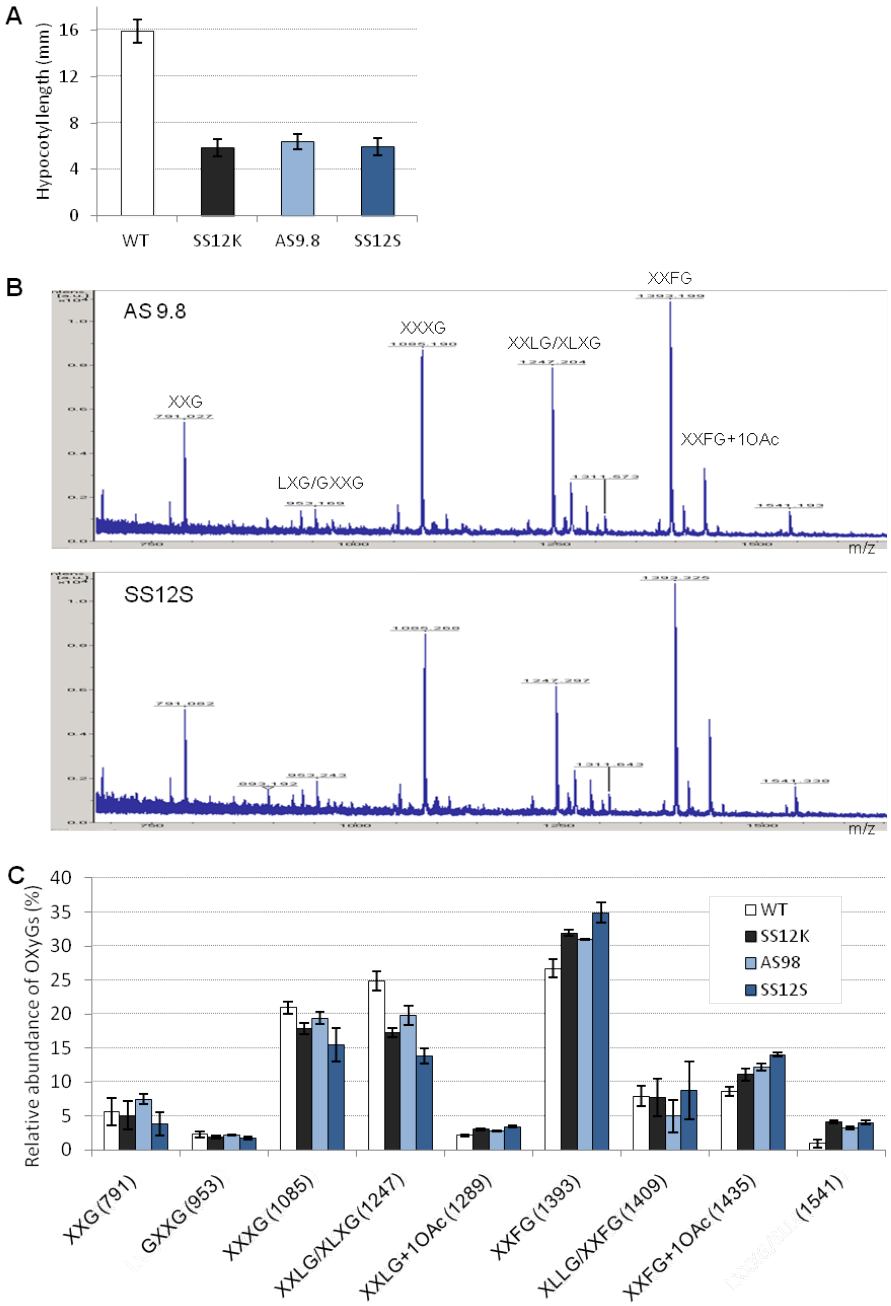
York, W.S., Darvill, A.G., and Albersheim, P. (1984). Inhibition of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid-stimulated elongation of pea stem segments by a xyloglucan oligosaccharide. Plant Physiol **75,** 295-297.

Zablackis, E., York, W.S., Pauly, M., Hantus, S., Reiter, W.D., Chapple, C.C., Albersheim, P., and Darvill, A. (1996). Substitution of L-fucose by L-galactose in cell walls of Arabidopsis mur1. Science **272,** 1808-1810.

Zabotina, O.A. (2012). Xyloglucan and its biosynthesis. Front Plant Sci **3,** 134.

Zabotina, O.A., van de Ven, W.T., Freshour, G., Drakakaki, G., Cavalier, D., Mouille, G., Hahn, M.G., Keegstra, K., and Raikhel, N.V. (2008). Arabidopsis XXT5 gene encodes a putative alpha-1,6-xylosyltransferase that is involved in xyloglucan biosynthesis. Plant J **56,** 101-115.

Supplementary Datas

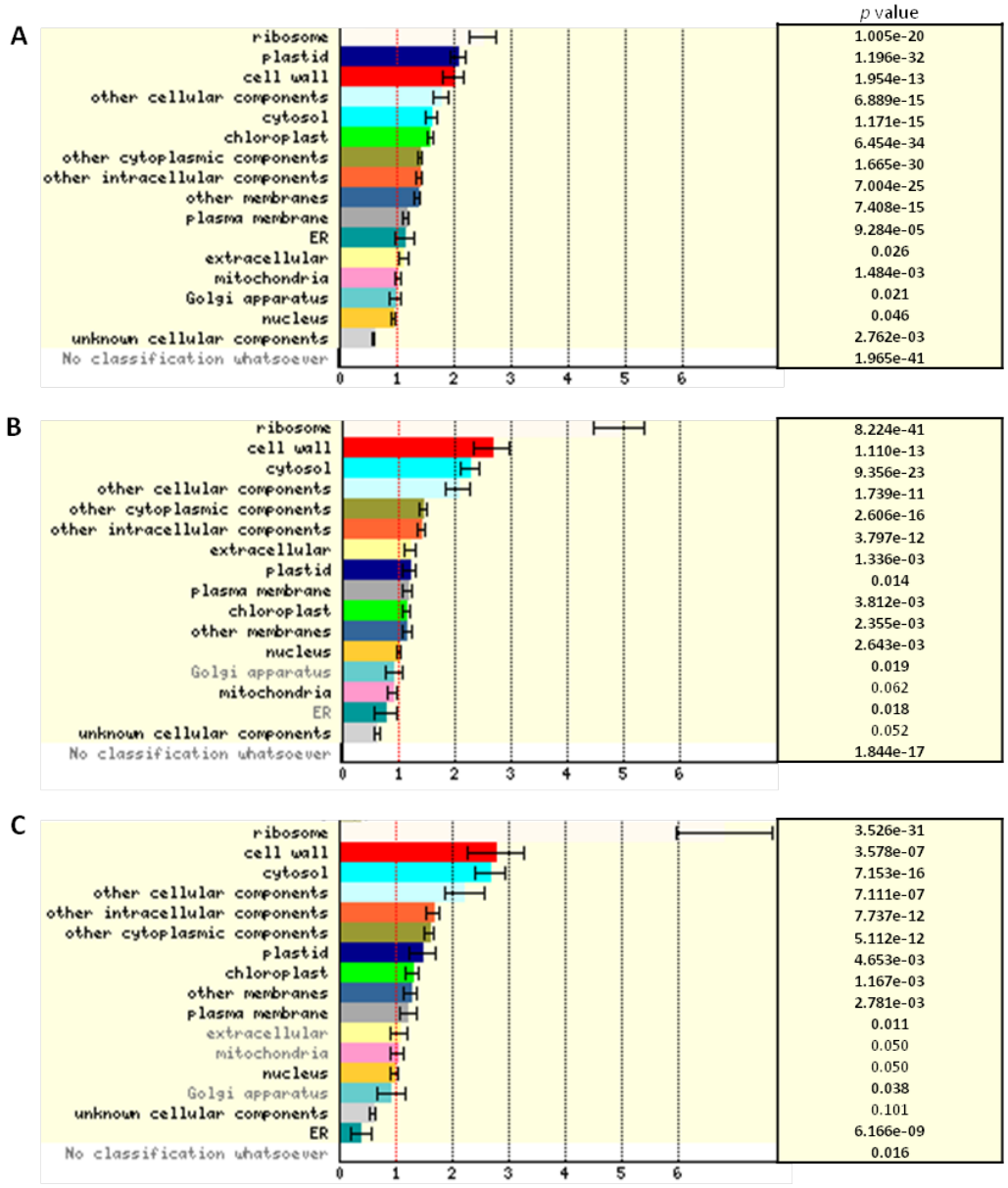


Supplementary figure 1 : Xyloglucan composition in dark grown hypocotyls of various lines inactivated for ABP1

(A) Hypocotyl length of 4 day-old dark grown seedlings

(B) Representative spectrum of oligosaccharide mass profiling of OXGs of ethanol induced hypocotyls grown in the dark for 4 days of SS12S and AS9.8 lines.

(C) Quantitative statistical analysis of OLIMP data for ethanol inducedSS12S and AS9.8 and comparison with WT and SS12K; Bars represent SD (biological replicates n=4).



Supplementary figure 2 : Overview of classes of genes differentially expressed after ABP1 inactivation in dark grown seedlings ordered by cellular component.

(A) Comparison between SS12K and WT ethanol induced since germination.

(B) Comparison between SS12K and WT ethanol induced only 8hours before harvesting.

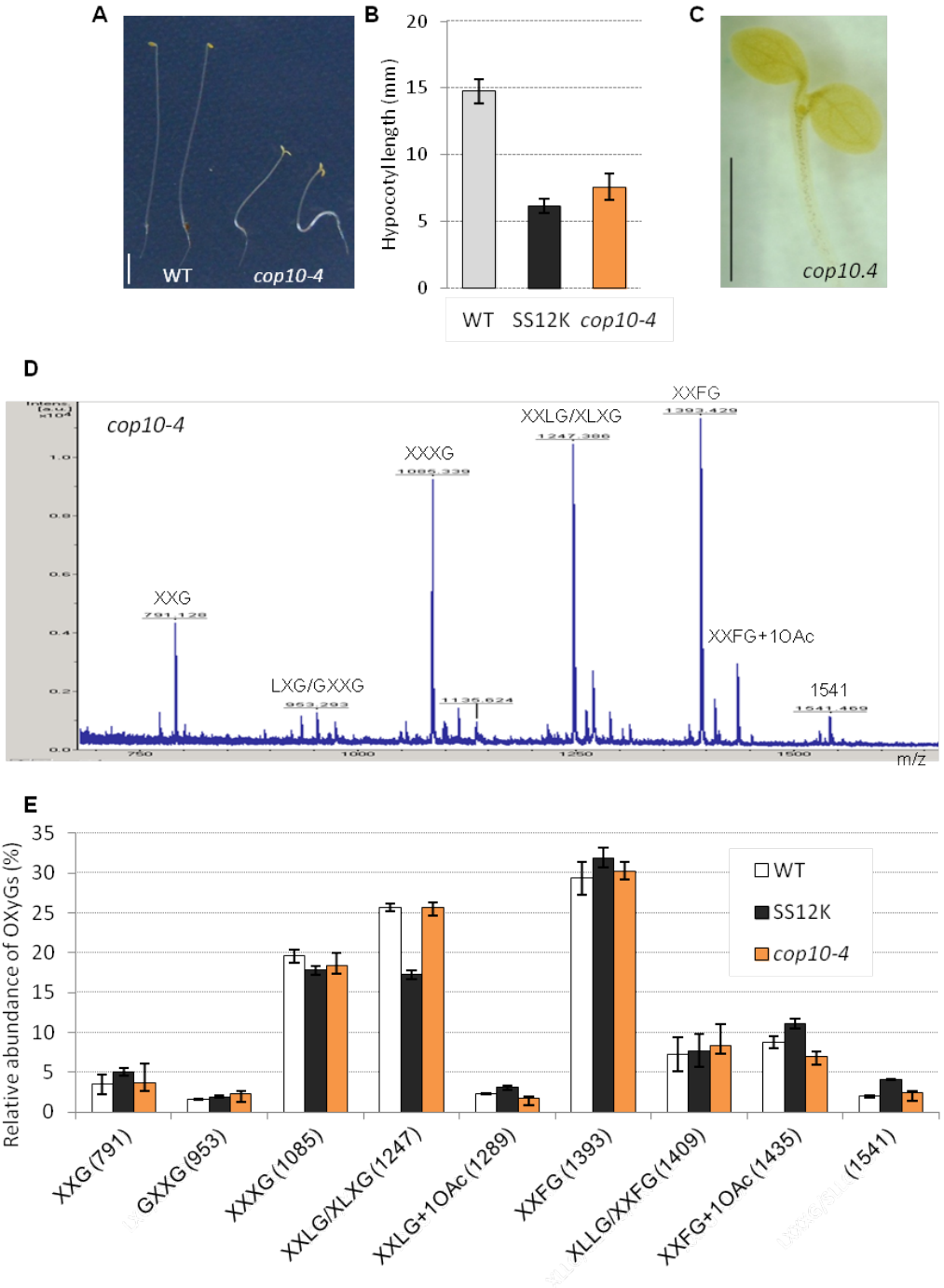
(C) Genes in common between short and long time ABP1 inactivation

Analysis were performed using Functional Classification Super Viewer available at (http://bar.utoronto.ca) (Provart and Zhu, 2003)

Cell Wall Genes Table in annexe

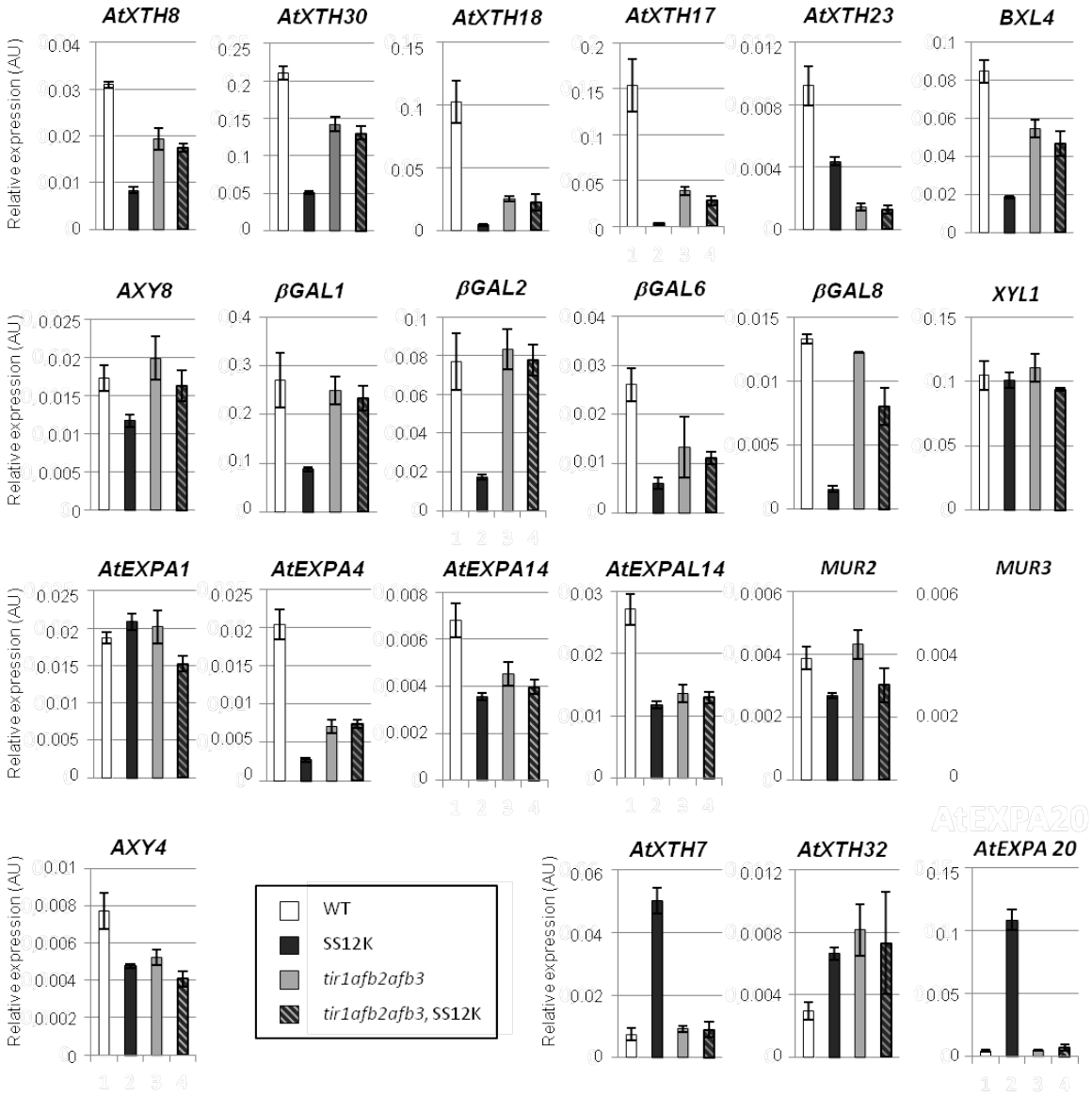
Supplementary bibliography

Provart, N., and Zhu, T. (2003). A Browser-based Functional Classification SuperViewer for Arabidopsis Genomics. *Currents in Computational Molecular Biology* **2003,** 271-272.



Supplementary figure 3: Comparison of xyloglucan composition of dark grown hypocotyls *cop10-4* de-etiolated mutant with WT and SS12K

(A) Phenotype of *cop10-4*, bar represents 25 mm
(B) Hypocotyl length of 4 day-old dark grown seedlings
(C) Lugol staining of *cop10-4*
(D) Representative spectrum of oligosaccharide mass profiling of OXGs of ethanol induced cop10-4 hypocotyls grown in darkness for 4 days.
(E) Quantitative statistical analysis of OLIMP data for ethanol induced *cop10-4* . Data are compared with WT and SS12K; Bars represent SD (biological replicates n=4).



Supplementary figure 4 : XyG gene expression analyzed by real-time RT-PCR

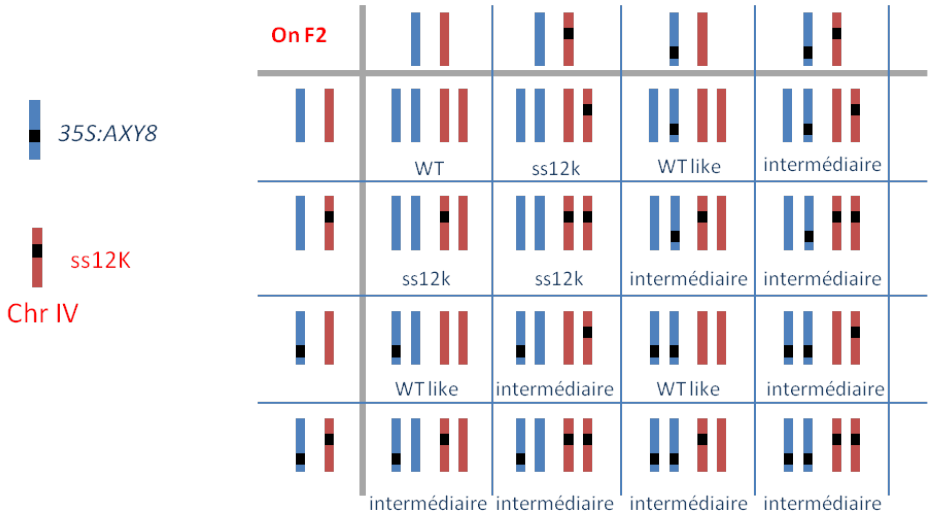
mRNA accumulation of XyG related genes as in Figure 6.

Primers sequences in annexe

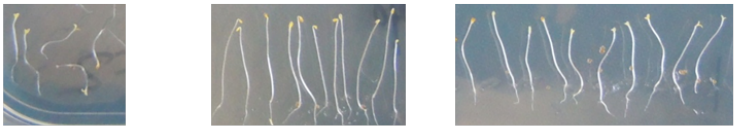
PARTIE PAROI

Résultats intermédiaires et Conclusion

A.



B.



catégories	ss12k like	WT like	intermédiaire
Ségregation attendue	3/16 = 18.75%	4/16 = 25%	9/16 = 56.25%
Ségrégation obtenue	74/301	77/301	150/301

Probabilité test χ^2 = 7.71
Pour p = 0.05, χ^2 = 5.99

Ségrégation cohérente avec AXY8 suppresseur partiel du phénotype ss12k

C.

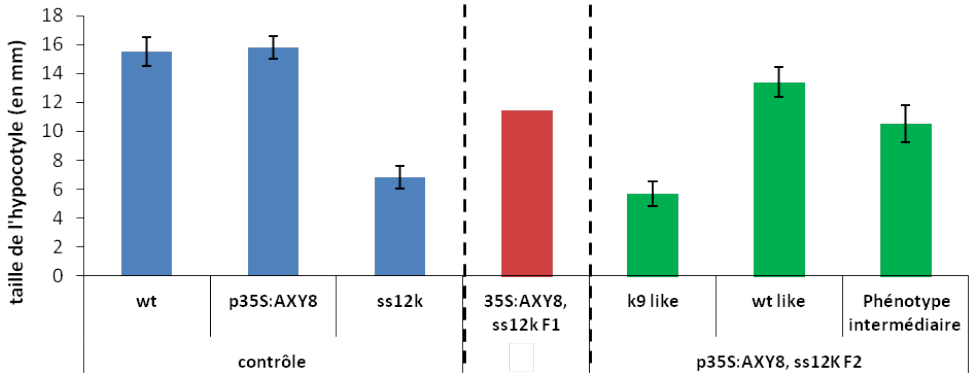


Figure 21 – Analyse de ségrégatation de la lignée pro35S:AXY8, ss12k

Tableau de ségrégation théorique (A) et obtenue (B) de la génération F2 issu du croisement entre pro35S:AXY8, ss12k. Les phénotypes des plantes des différentes classes montrent que la surexpression d'AXY8 provoque une suppression partielle du phénotype lié à l'inactivation d'ABP1 (B et C).

Résultats intermédiaires et Conclusion

Les résultats présentés dans le manuscrit concernant la lignée pro35S:AXY8, ss12k ont été obtenus sur des plantes de générations F1. A ce jour, seule la ségrégation de la génération F2 des plantes 35S:AXY8, ss12k a pu être analysé. L'analyse de cette ségrégation correspond avec l'hypothèse selon laquelle la surexpression d'AXY8 induit une suppression partielle du phénotype lié à l'inactivation d'ABP1 (Fig. 21). Le phénotype du double homozygote doit, selon l'analyse de la ségrégation à la génération F2, être similaire à celui de la F1, et donc présenter un phénotype partiellement suppresseur du phénotype de la lignée ss12k. L'obtention de plantes doubles homozygotes pro35S:AXY8, ss12k permettra de pratiquer de confirmer les mesures de tailles d'hypocotyles ainsi que de la composition pariétale.

Il est intéressant de noter que le dé-étiolement n'est pas restauré ni dans la F1, ni dans la F2 ce qui indique que le phénotype du double homozygote présentera toujours un dé-étiolement. Ce résultat implique la fucosylation des chaines ramifiées des xyloglucanes dans le processus d'expansion (Fig.21). Il indique également que l'expansion cellulaire et le dé-étiolement sont deux processus altérés dans le fond ss12k mais de manière indépendante. Enfin, il permet de nous assurer que le scFv est toujours correctement exprimé.

La lignée doubles homozygotes ss12k, pro35S:AXY8 pourra également servir de matériel pour des tests de qRT-PCR afin de regarder l'expression de gènes de paroi et ainsi de regarder si la restauration de l'expansion cellulaire impacte sur l'expression d'enzyme pariétales comme les XTHs. Cela permettrai de savoir si les modifications d'expression des XTHs observées dans le fond ss12k sont du au fait qu'ABP1 contrôle cette expression où si la modification des proportions d'OXGs qui a influé sur la transcription des XTHs, ce qui mettra en évidence un mécanisme de régulation des XTHs en fonctions de la disponibilité du substrat.

Enfin, il serait également intéressant de surexprimer les deux autres fucosidases recensées dans le génome d'*Arabidopsis (AtFXG1 et AtFUC1).* Toutefois, à ce jour, leurs activités de fucosidases n'ont pas été prouvées *in vivo* et les surexpresseurs ne sont pas disponibles et doivent donc être générés.

Le fait que les plantes *mur2.1*, ss12k présente toujours un hypocotyle court, similaire à celui observé dans la lignée ss12k fut une surprise. En effet, MUR2 code pour la seule fucosyl transférase capable d'ajouter un fucose sur la chaine latérale des xyloglucanes.

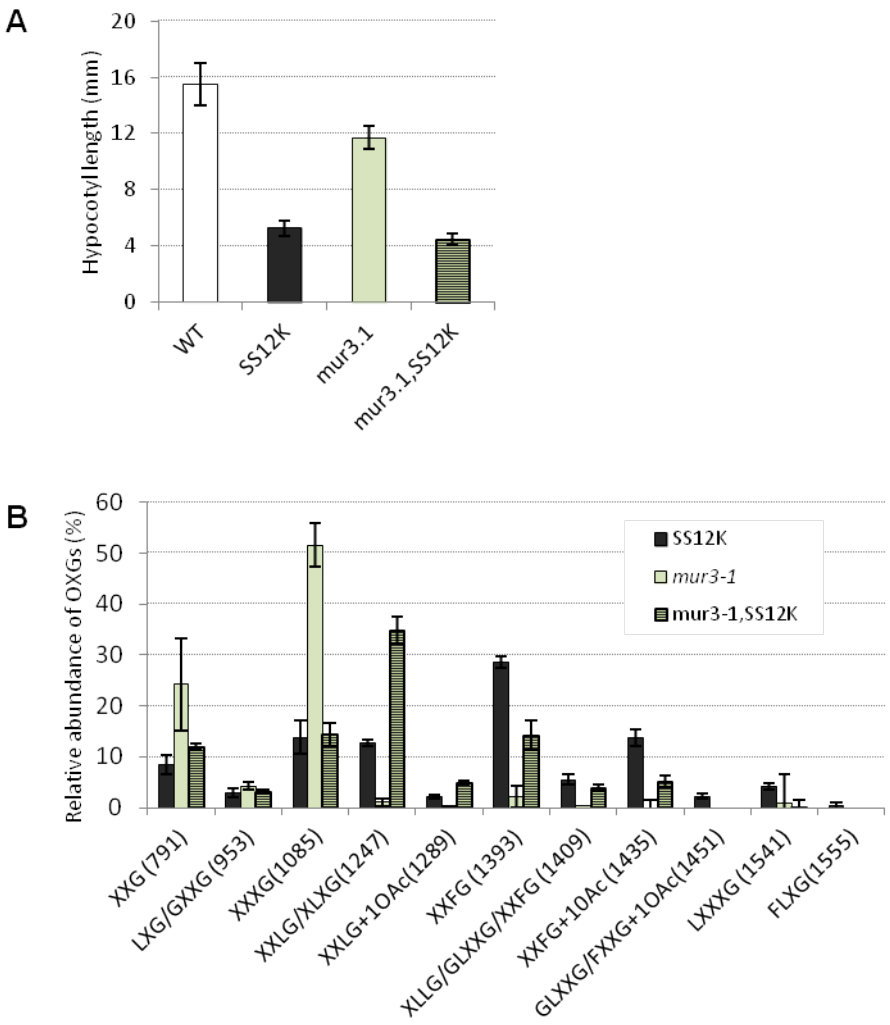


Figure 22: Composition en xyloglucanes de l'hypocotyle étiolé de *mur3.1*

Le mutant *mur3.1* a été comparé au sauvage et à des plantes ss12k au niveau de la longueur de l'hypocotyle (a) ou de sa composition en xyloglucanes (b). Les barres d'erreur représentent une moyenne de répétitions biologiques échantillons.

Etant donné le phénotype des plantes pro35S:AXY8, ss12k, où l'on potentialise l'activité d'une fucosidase chez *Arabidopsis*, on aurait pu s'attendre à une similarité de phénotypes pour une plante dont on a supprimé la capacité d'augmenter à fucosyler (pro35S:AXY8, ss12k et *mur2.1*, ss12k). Cette absence de suppression du phénotype ss12k dans la lignée mur2.1, ss12k fut observée dans la lignée *mur3.1*, ss12k. *mur3.1* étant un mutant perte de fonction pour la galactosyl transferase *MUR3*, chargée de placer le galactose sur les chaines latérales (Fig. 22). Cette disparité de phénotype montre qu'agir sur le remodelage *in muro* des xyloglucanes a un rôle biologique alors que la modification des composés pariétaux lors de leur biosynthèse ne joue pas sur l'expansion.

Depuis peu, le rôle des xyloglucanes était sujet à controverse avec l'absence de phénotype observé dans le double mutant *xxt1/xxt2* (Cavalier et al., 2008). Ce mutant ne présentait plus de chaines latérales sur ces xyloglucanes mais cette absence de xyloglucanes ne semblait pas perturber le développement de la plante. Les résultats présentés dans ce manuscrit d'article permettent donc d'apporter de nouveaux éléments de réflexion quant à l'importance des xyloglucanes dans le processus d'expansion cellulaire.

L'étude présentée a permis dans un premier temps de montrer l'implication d'ABP1 dans le processus d'expansion cellulaire et ainsi que le phénotype dé-étiolé des plantes inactivées pour ABP1 dans le contexte de la croissance à l'obscurité. Les données de puces présentées dans cet article montrent également à quel point ABP1 joue sur l'expression de gènes et place ABP1 comme un élément régulateur important du développement des plantes.

Enfin l'autre résultat important est que ce rôle d'ABP1 sur l'expansion cellulaire est dépendant de la voie $SCF^{TIR/AFBs}$ comme le montre la suppression totale du phénotype lié à l'inactivation d'ABP1 dans le fond *tir1.1, afb2.1, afb3.1*, ss12k. Le rôle d'ABP1 dans la composition des chaînes latérales des xyloglucanes est donc un mécanisme gène dépendant. Dans un premier temps, on aurait pu croire que, compte tenu de la localisation des *in muro* de la fucosidase et de l'implication de l'auxine dans la théorie de la croissance acide, ABP1 agissait sur la plasticité de la paroi sans passer par l'expression de gènes. Cela aurait pu être plausible compte que l'on sait qu'ABP1 peut agir directement sur l'activation de la pompe à proton dont le rôle est déterminant dans la théorie de la croissance acide (Rayle and Cleland, 1992; Tromas et al., 2010).

.

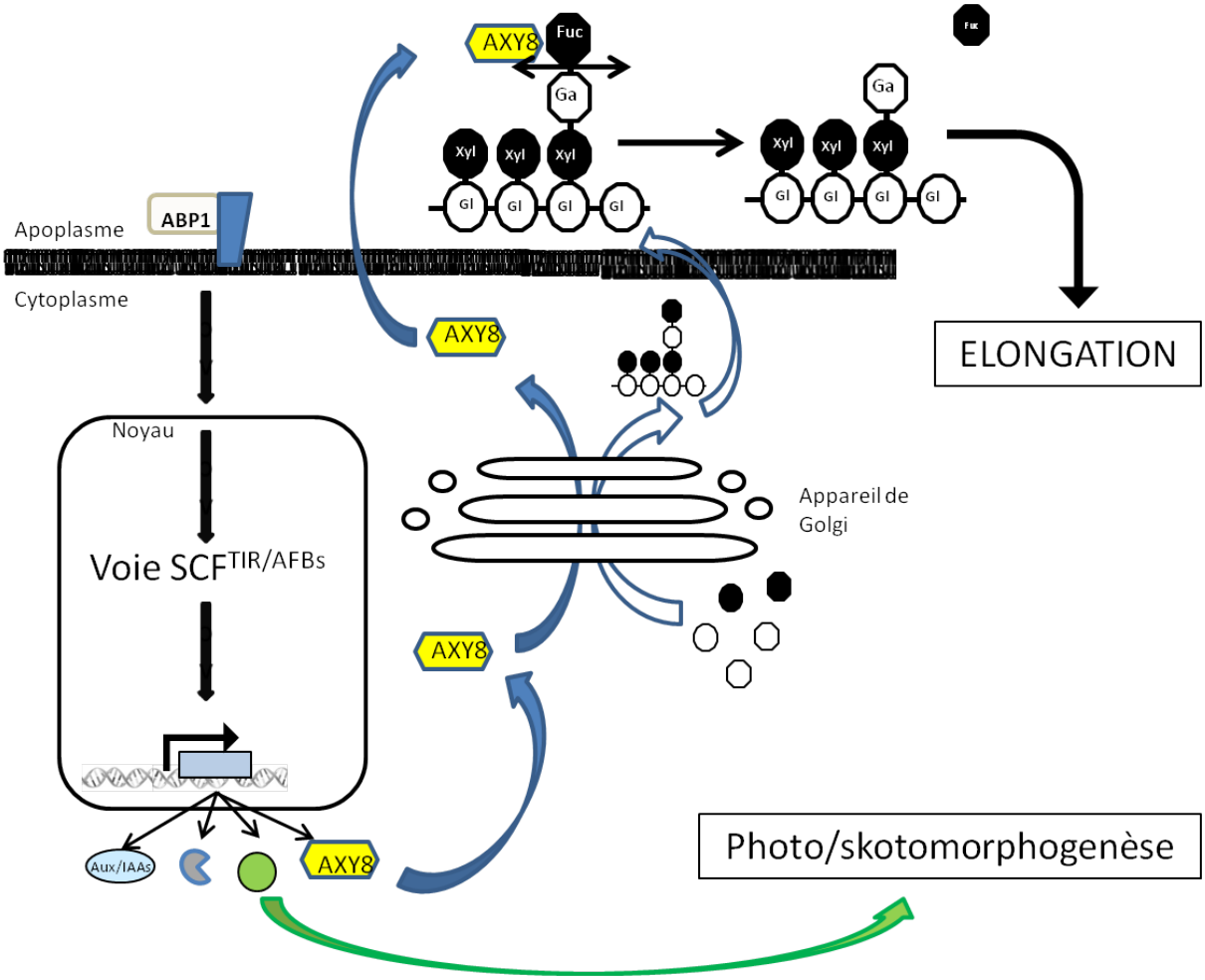


Figure 23 – modèle pour expliquer la suppression du phénotype dans le fond 35S:AXY8, ss12k

ABP1 contrôle, via la voie $SCF^{TIR/AFBs}$, des gènes qui jouent de manière indépendante sur la régulation de la skotomorphogenèse (ou photomorphogenèse) et de l'élongation de l'hypocotyle. Le contrôle de l'expansion se fait en jouant sur le degré de fucosylation des chaînes ramifiées des xyloglucanes au niveau de l'apoplasme. C'est l'action d'AXY8, une fucosidase qui agit *in muro* qui conditionne la capacité d'expansion.

Proposition d'un modèle pour expliquer ces résultats

D'après les résultats obtenus dans cette étude, je propose donc un modèle pour schématiser l'action d'ABP1 sur le processus d'élongation. Cette étude montre que dans l'hypocotyle étiolé, ABP1 est important pour le contrôle de l'expansion cellulaire et que le contrôle de l'expansion cellulaire semble lié à la dynamique ou la quantité de chaines ramifiés de xyloglucanes fucosylées.

La suppression partielle observée dans les plantes ss12k, pro35S:AXY8 permet de montrer que la défucosylation des chaines latérales des xyloglucanes *in muro* (en non lors de la biosynthèse) permet de modifier la capacité d'expansion de la cellule. Le phénotype du double homozygote ss12k, pro35S:AXY8 montre aussi que le dé-étiolement et l'expansion cellulaire ne sont pas dépendant des mêmes gènes. Toutefois, étant donné que la lignée *tir1.1, afb2.1, afb3.1*, ss12k présente une suppression de la composition pariétale et de l'étiolement, cela indique que ces deux processus sont dépendant de la voie $SCF^{TIR/AFBs}$.

Bien que ces résultats ne permettent pas d'éliminer un potentiel rôle d'ABP1 sur des réponses rapides à la membrane qui permettrait de jouer sur la capacité d'expansion des cellules. Il montre de manière claire que les régulations géniques sont plus importantes que les régulations non géniques concernant le processus d'élongation sur le long terme.

Bien que ce modèle ne prenne pas en compte l'auxine, et le rôle qu'ABP1 pourrait jouer en réponse à la perception d'auxine sur le contrôle de l'élongation cellulaire. Ces résultats confèrent à ABP1 un rôle fondamental dans le contrôle du processus d'expansion cellulaire.

Détailler le mécanisme par lequel la modification des chaînes latérales des xyloglucanes influent sur la plasticité pariétale et comment ABP1 influe sur ce mécanisme est un défi qui constitue en lui-même un projet à part entière. J'espère que ces résultats présentés dans cette partie permettront de mieux comprendre le processus d'expansion pariétale et ont permis de montrer l'importance d'ABP1 dans ce mécanisme.

Résultats – Partie II

Obtention de lignées suppressives du phénotype lié à l'inactivation d'ABP1

Le phénotype de suppression du phénotype lié à l'inactivation d'ABP1 dans le quadruple mutant *tir1.1, afb2.1, afb3.1*, ss12k (*tir/afbs*, ss12k) montre une relation d'épistasie des récepteurs nucléaires $SCF^{TIR/AFBs}$ sur le récepteur membranaire ABP1 (Fig. 15)(Tromas et al., 2013, en révision, en annexe). La suppression du phénotype lié à l'inactivation d'ABP1 lors de la croissance à l'obscurité (cf Résultats – Partie I) et à la lumière laisse supposer la pléiotropie de la suppression du phénotype d'inactivation d'ABP1 par les $SCF^{TIR/AFBs}$.

De plus, les données de stabilité de la construction rapportrice AXR3NtGUS montre qu'ABP1 module la durée de vie des Aux/IAAs dans la racine de plantules de 4 jours, en condition de jour continu (Tromas et al. 2013, en annexe). Enfin les données de transcriptomique pour des durées d'inactivation courtes (8h sur plantes de 96h) et longues (96h soit depuis la germination) de la lignée ss12k ainsi que la confirmation par des données de qPCR ont montré qu'ABP1 jouait principalement sur l'expression de gènes (cf Résultats - Partie I).

Ces éléments laissent supposer qu'il existe une voie de signalisation en aval d'ABP1 permettant d'agir sur l'homéostasie de la voie $SCF^{TIR/AFBs}$. Toutefois, encore peu d'éléments sont connus comme étant en aval d'ABP1 et cette voie de signalisation reste donc pour le moment encore à élucider. L'approche suppresseur est une technique sans a priori qui permet l'identification de nouveaux éléments de signalisation. Cette approche parait tout à fait adaptée à la problématique à laquelle nous sommes confrontés concernant ABP1.

Dans cette partie, je vais donc vous présenter le travail que j'ai effectué sur la population suppresseur générée au laboratoire. Je développerai cette partie jusqu'à l'isolement de lignées suppressives du phénotype ss12k. Ensuite, je me concentrerai sur une lignée et vous présenterai ma démarche pour l'indentification du gène responsable de la suppression dans une des lignées.

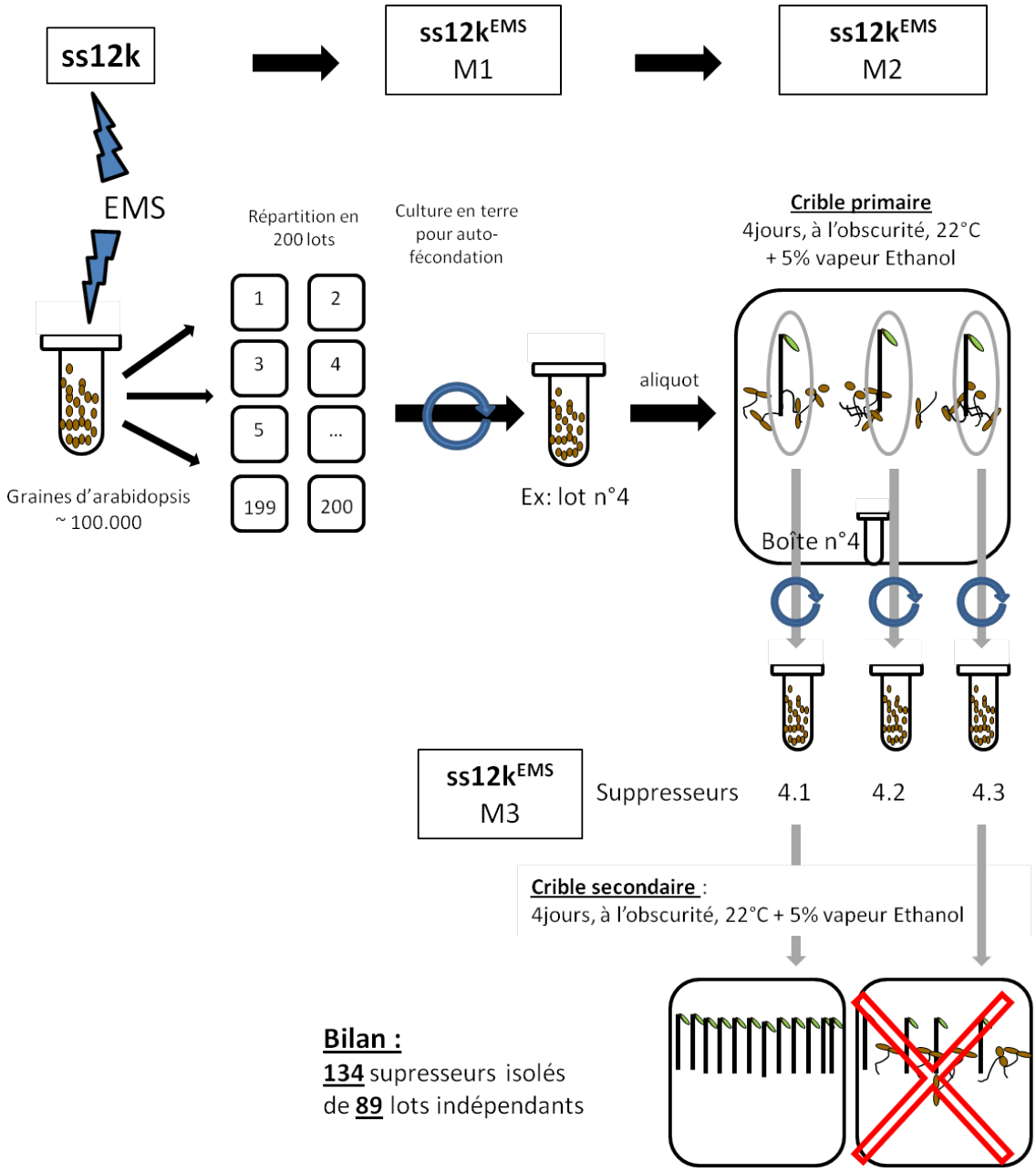


Fig 24 – schéma du crible ayant permis l'obtention des suppresseurs

Les graines ayant subis la mutagénèse à l'EMS ont été divisées en 200 lots qui ont été semés individuellement pour une amplification. Les graines récoltées ont alors hérités du numéro de lot duquel elles provenaient. Ensuite, un échantillon de cette récolte a été criblé pour la recherche de suppresseurs. Chaque suppresseur à alors été isolé et a hérité d'un deuxième numéro. Puis, ils ont été mis en terre pour une auto fécondation. Le lot de graines fraîchement récoltées a de nouveau subis un crible afin de confirmer la suppression.

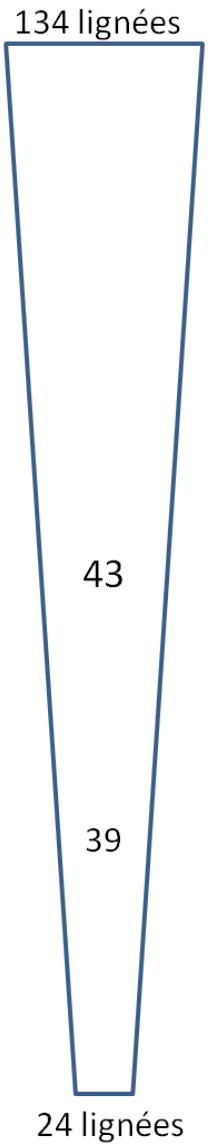
Le crible

L'objectif étant de trouver des suppresseurs du phénotype lié à l'inactivation d'ABP1, il était nécessaire de trouver un processus développemental affecté par ABP1 et l'auxine mais qui permettrait également de fournir de nouveaux éléments de signalisation auxinique. L'auxine, et potentiellement via l'action d'ABP1, module le développement de la plante dans sa quasi-totalité que ce soit en terme spatial, temporel ou dans la diversité des processus physiologiques affectés. L'auxine et ABP1 influent sur ces processus développementaux en jouant sur la division, l'endoréplication et l'expansion cellulaire (Perrot-Rechenmann, 2010). Ce rôle pléiotropique d'ABP1 accentue considérablement la difficulté d'analyse mais multiplie les modèles utilisables pour notre approche.

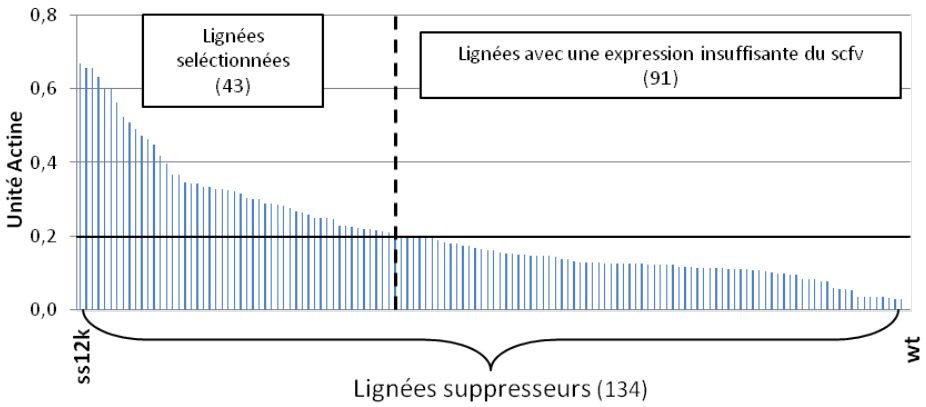
La racine primaire d'*A. thaliana* aurait pu, par exemple, être un modèle de choix compte tenu de l'expérience du laboratoire sur l'impact d'ABP1 sur le développement de la racine primaire *d'Arabidospis thaliana* (Tromas et al., 2009). Toutefois, par le passé, de nombreux cribles sur ce modèle ont été effectués afin de trouver des gènes impliqués dans la signalisation de l'auxine. De plus, le développement de la racine est le fruit d'un équilibre fin entre division et expansion ce qui complique potentiellement la compréhension du rôle des gènes suppresseurs.

La croissance de l'hypocotyle à l'obscurité se caractérise par le fait qu'elle ne requiert que l'expansion cellulaire (Gendreau et al., 1997) ce qui en fait un modèle de développement simplifié. De plus, nous avons montré que l'inactivation d'ABP1 affectait considérablement la skotomorphogenèse des plantes inactivées pour ABP1 (cf Résultats partie I). Le phénotype déétiolé et agravitropique résultant de l'inactivation d'ABP1 se distingue très nettement du phénotype de skotomorphogenèse. Il a donc été décidé de procéder à une mutagénèse aléatoire sur les plantes conditionnelles ss12k puis de cribler la population mutagénisée dans des conditions de croissance à l'obscurité pour la recherche de suppresseurs, c'est-à-dire d'une plante présentant un phénotype proche de celui du sauvage. Les graines de la lignée ss12k, conditionnelle pour ABP1, ont été mutagénéisées à l'aide d'EMS (ethyl methylsulfonate). L'EMS est un agent alkylant qui ajoute un groupement éthyl sur l'oxygène en position 6 de la guanine ce qui induit, après la transcription, une mutation de type G>A ou C>T. A mon arrivée au laboratoire, le crible était en cours et les premières générations de lignées suppressives issues du premier crible étaient disponibles (stade M3).

Une fois mutagénisées, les graines, dites M1, ont été réparties en 200 lots puis semées en terre afin d'obtenir des graines de génération M2. Après autofécondation de chacune des plantes



Test expression scfv :



Séquençage scFv et ABP1:

	lignées testées	mutation silencieuse	mutation faux sens	région UTR
scFv	43	8	1	
ABP1	43	2	1	2

Crible tertiaire

Basé sur l'intensité de suppression et l'homogénéité du phénotype

Dont 7 recessifs
5 semi dominants
12 dominants

Figure 25 – Schéma de sélection des suppresseurs

Plusieurs étapes ont permis de réduire le nombre de suppresseurs. L'expression du scFv a été testée par RT-qPCR. Puis le séquençage des gènes codant pour ABP1 et le scFv ont permis de confirmer les suppresseurs. Enfin un crible plus rigoureux, basé sur la qualité de la suppression du phénotype a permis de diminuer le nombre de suppresseurs à 24.

M1, les graines de chaque lot ont été récoltées et annotées selon le lot d'origine (de 1 à 200, dans la (Fig. 25), le lot 4 a été pris pour exemple pour la suite du processus de sélection). Un échantillon d'environ 300 graines a ensuite été semé sur boîte afin de subir le crible primaire, ce dernier était relativement permissif, collectant l'ensemble des plantes présentant un phénotype moins sévère que la majorité des plantes inactivées pour ABP1. Chaque mutant a été transféré à la lumière puis mis en terre afin d'être amplifié (un deuxième numéro lui a donc été attribué dans l'exemple : 4.1, 4.2 et 4.3). Après cette nouvelle autofécondation (stade M3), le phénotype de suppression d'inactivation d'ABP1 a été confirmé ou infirmé lors d'un crible secondaire, plus rigoureux.

Lors de ce second crible, les suppresseurs ont été classés selon la restauration du phénotype en se focalisant sur les trois paramètres caractéristiques du phénotype étiolé que sont la taille de l'hypocotyle, le gravitropisme ou l'ouverture des cotylédons. C'est à cette phase que j'ai pris en main le projet. A l'issue de ces deux cribles, les lignées étaient à la génération M3 et 134 mutants potentiels provenant de 89 lots indépendants avaient été isolés. Sur 200 lots criblés, cette proportion de mutants montrant un phénotype au moins partiellement restauré apparaissait anormalement élevée ; la première tâche fut donc de confirmer la robustesse de ces suppresseurs en vérifiant notamment que l'inactivation d'ABP1 était toujours fonctionnelle.

validation du caractère suppresseur des lignées

Compte tenu de la relative complexité du système inductible permettant l'inactivation d'ABP1, il nous a semblé indispensable de procéder à une vérification concernant l'efficacité de l'inactivation d'ABP1 dans les lignées suppressives.

Dans un premier temps, l'analyse de l'expression du scFv par qPCR a permis d'éliminer un grand nombre de « faux positifs », qui ne devaient leur phénotype suppresseur, qu'à une forte diminution voire un défaut de production du scFv (Fig. 25) malgré l'induction par l'éthanol. Ce premier test nous a donc permis de sélectionner des lignées pour lesquelles le scFv était exprimé à un niveau permettant l'inactivation fonctionnelle d'ABP1. Un seuil de sécurité a été fixé à 0,2 unité d'actine, ce que nous avions confirmé comme étant suffisant pour induire le phénotype déétiolé dans les plantes ss12k. Beaucoup de suppresseurs présentaient un niveau d'expression relativement

faible et inférieur au seuil que nous avions fixé. Très peu de mutants présentaient toutefois une perte complète de l'expression du transgène en présence d'éthanol. Le nombre de candidats a été ainsi réduit à 43.

Toutefois, bien que le scFv soit correctement exprimé, il restait à vérifier que les séquences codantes d'ABP1 et du scFv n'avaient pas subi de mutations intragéniques pouvant altérer la liaison de l'anticorps sur ABP1 et ainsi compromettre son inactivation (Fig. 25). Les lignées possédant des mutations silencieuses ont été gardées. A l'inverse, les lignées contenant des mutations faux sens ou présentes dans les régions non traduites (région UTR) ont été écartées afin d'éviter tout risque. Seules deux lignées présentaient des mutations susceptibles d'affecter la capacité de liaison de l'anticorps recombinant scFv sur ABP1 ; les deux autres pouvant affecter la stabilité de l'ARN ou la production de l'anticorps.

Ces étapes de tests ont permis d'éliminer une grosse partie des mutants potentiels et ont permis de réduire la liste des lignées sur lesquelles les efforts devaient être portés. Parmi les trente neuf mutants restant à ce stade, tous ne présentaient pas des phénotypes de suppression équivalents. Chaque lignée a été remise en culture dans les conditions du crible et une dizaine de lignées présentant une taille de l'hypocotyle proche de celle du sauvage (avec ou sans restauration de la crosse apicale, ou du tropisme) ont été sélectionnées pour la suite du travail. Le modèle de développement à l'obscurité ayant été choisi comme une modèle d'étude de l'expansion cellulaire, la restauration de la longueur de l'hypocotyle apparaissait être un critère cohérent avec la recherche de gènes impliqués dans le contrôle de la croissance en aval d'ABP1.

Les suppresseurs partiels n'ont pas été traités en priorité en dépit de leur intérêt potentiel. Trois raisons majeures ont guidé ce choix :

- La suppression partielle pourrait résulter d'une expression plus faible du scFv et donc une inactivation moins efficace. A l'inverse d'une approche suppresseur sur un mutant d'insertion, je me posais systématiquement des questions quant à la robustesse des suppresseurs sélectionnés, bien que des analyses d'expression par qRT-PCR aient été souvent pratiquées.

- Il pouvait être beaucoup plus délicat de sélectionner les plantes mutantes dans les ségrégations. En effet les analyses se faisant, pour des raisons pratiques, avec une densité de plantules relativement élevée, il était préférable de travailler avec un phénotype clair de suppression plutôt que sur la base d'un phénotype moins prononcé, ce qui pouvait grandement compliquer l'analyse et m'induire en erreur dans la détection des phénotypes suppresseurs (homozygotes/hétérozygotes pour les semi-dominants par

exemple). Ainsi, Les lignées présentant une grande hétérogénéité de phénotypes, ou un important défaut de germination compromettant les analyses ultérieures ont été mises de côté.

- Tout élément de signalisation agissant potentiellement en aval d'ABP1 est très intéressant mais plus la restauration est partielle, plus on peut suspecter une mutation dans un gène situé très en aval, voire dans une autre voie interférant avec la voie ABP1.

J'ai donc fait le choix de travailler sur des lignées présentant la plus grande suppression du phénotype lié à l'inactivation d'ABP1. Il est évidemment difficile de faire des choix à priori, d'autant que nous n'avions aucun recul sur cette approche appliquée à la recherche des suppresseurs du phénotype d'inactivation d'ABP1. Bien qu'élégante, cette approche peut susciter des doutes permanents et reste délicate à entreprendre.

L'application de ces consignes de sélection à réduit à 13, le nombre de lignées suppressives entrant dans le processus ultérieur qui doit mener à l'identification des gènes responsables de la suppression.

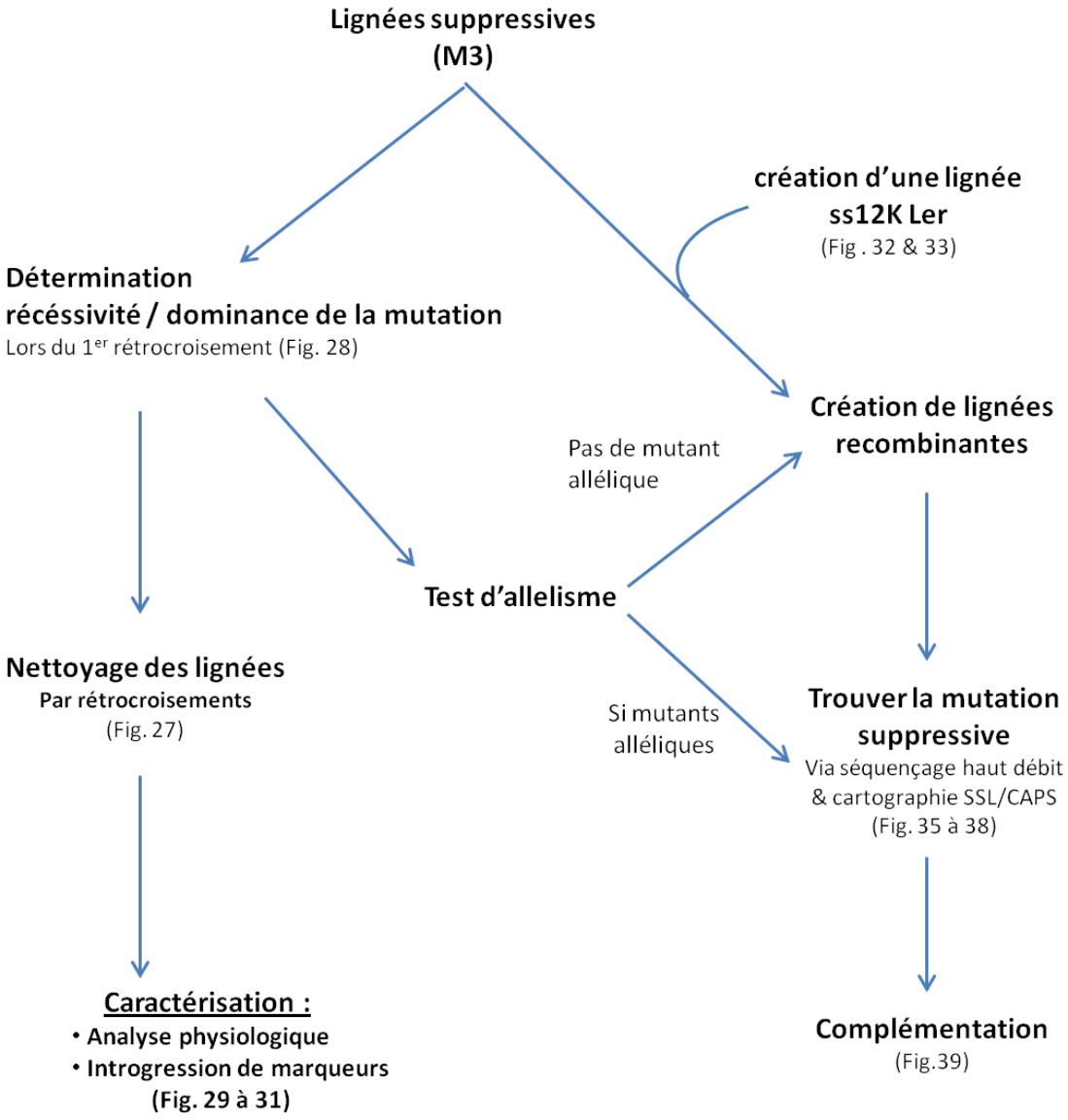


Figure 26 – Schéma explicatif du plan de travail

Après l'obtention des suppresseurs, j'ai, dans un premier temps, chercher à savoir le caractère récessif/dominant de la mutation en croisant le suppresseur avec la plante ss12k. Ce rétrocroisement rentrait également dans le processus de nettoyage des lignées afin d'avoir des plantes possédant moins de mutations parasites qu'au stade M3. En parallèle, l'obtention de lignées recombinantes fut indispensable afin de localiser la mutation suppressive à l'aide de la cartographie SSLP/CAPS et des techniques de séquençage haut débit.

Plan de travail

La figure 26 présente une représentation schématique de l'approche mise en œuvre durant ma thèse et permettant de gérer les différentes étapes du projet « suppresseur ». Le travail peut être divisé en trois principales tâches :

- Les lignées possédant un nombre très élevé de mutations, il était indispensable d'en réduire le nombre par des rétrocroisements successifs avec la lignée parentale ss12k avant de procéder à l'analyse détaillée des phénotypes et des tests physiologiques avec et sans inactivation d'ABP1. De plus, le phénotype des plantes issues du premier rétrocroisement permet de déterminer si la mutation responsable de la suppression est un allèle récessif, semi dominant ou dominant. L'étude de la descendance confirme le type de mutant obtenu en particulier pour les mutants semi-dominants ou dominants. Il s'agit d'informations primordiales qui impactent directement sur la gestion des lignées. Enfin, c'est dans ces lignées nettoyées que j'ai introgressé différents marqueurs afin de permettre une caractérisation plus fine du suppresseur.

- L'obtention de lignées recombinantes entre les écotypes Col0 (écotype de la collection de mutants) et Ler a permis la localisation des mutations suppressives. Pour chaque mutant, les lignées homozygotes pour la mutation constituent le matériel d'où est extrait l'ADN pour le séquençage à haut débit du génome ainsi que pour la cartographie.

- Les mutants sont également croisés entre eux pour rechercher un éventuel allélisme. L'obtention de mutants alléliques permet de découvrir un nouveau gène de façon potentiellement plus rapide, par comparaison de la présence/absence des mutations identifiées par séquençage dans les différents mutants.

Quelle que soit la procédure permettant d'identifier les mutations candidates, il est essentiel de valider que la mutation identifiée est bien responsable de la suppression. Selon le type de mutant ou de gène, la méthode utilisée pour confirmer la mutation candidate est différente. Dans le cas d'une mutation récessive, la complémentation par transformation du mutant EMS à l'aide de l'allèle sauvage du gène candidate est nécessaire. Si la mutation candidate induit précocement un codon STOP, on peut penser à mimer la suppression en croisant un mutant d'insertion (s'il est disponible) avec la plante ss12k. On peut également envisager de procéder à un test d'allélisme avec des mutants disponibles. Dans le cas d'une mutation semi-dominante ou dominante, la phénocopie de la suppression par clonage du gène muté et transformation des plantes ss12k est indispensable.

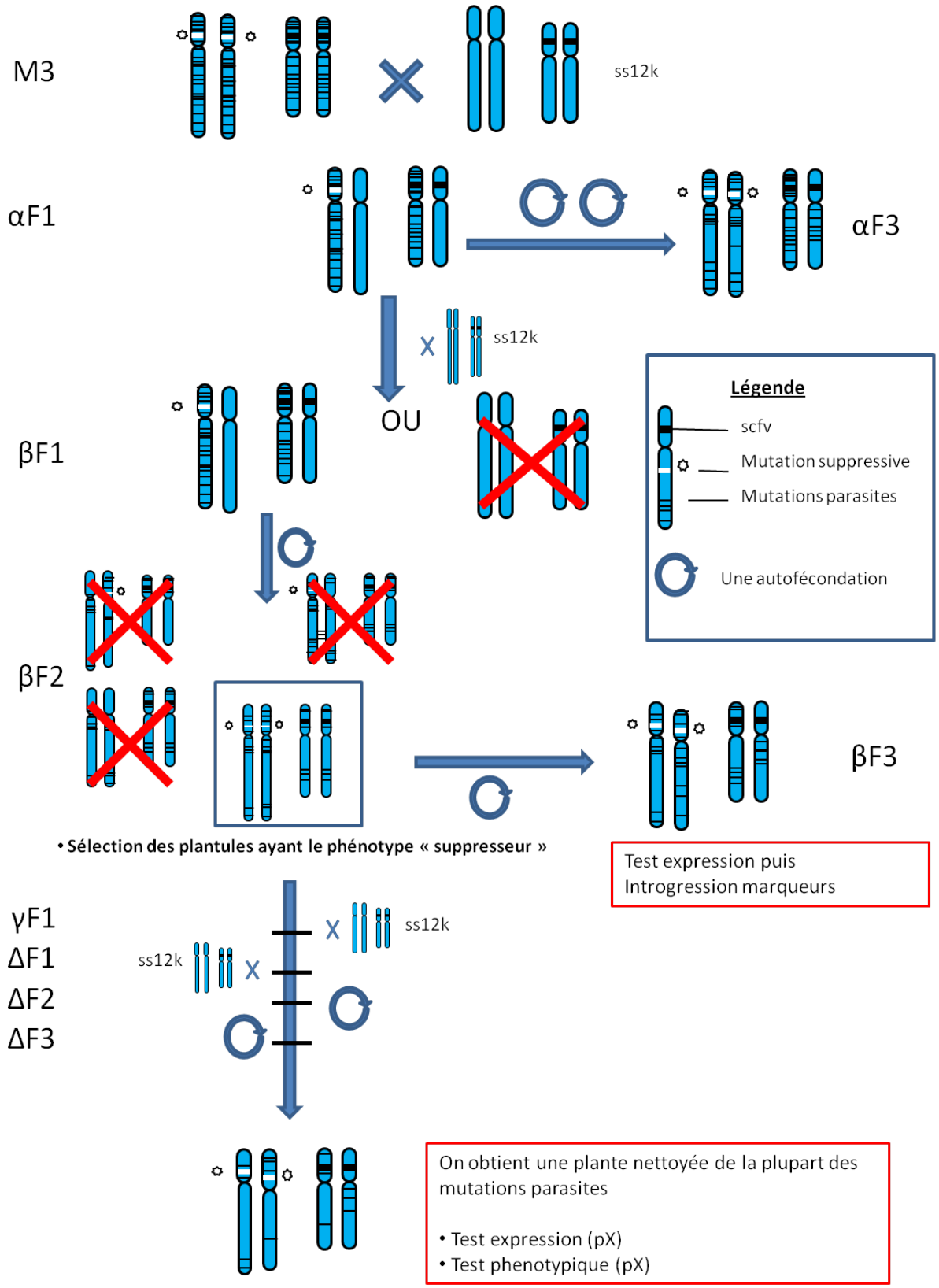


Figure 27 – Procédure pour le nettoyage des lignées suppressives

Le nettoyage des lignées s'est fait par plusieurs rétrocroisements avec la plante ss12k. Deux rétrocroisements consécutifs étaient opérés puis une autofécondation a permis de récupérer le phénotype suppresseur (βF2). Le même processus a été répété afin d'obtenir des plantes nettoyées appelées ΔF3.

« Nettoyage » des lignées

Une tâche importante a été de générer des lignées portant moins de mutations « parasites » c'est-à-dire qui ne soient pas responsables du phénotype de suppression. Cette importante étape a été effectuée via plusieurs rétrocroisements avec les plantes conditionnelles pour ABP1 (non mutées, lignée parentale ss12k) afin de toujours conserver les lignées homozygotes pour le scFv et donc de pouvoir observer le phénotype de suppression. La figure 27 présente de manière schématique les différentes étapes.

A partir des produits du premier rétrocroisement, j'ai d'une part produit des populations ségrégeantes (en αF2) qui m'ont permis de déterminer la récessivité ou la dominance de la mutation. D'autre part, j'ai poursuivi le nettoyage des lignées en effectuant un deuxième rétrocroisement (β), directement consécutif au premier (α) ce qui permettait d'optimiser les étapes en temps et en efficacité de nettoyage pour éviter de fixer des mutations parasites. Toutefois, cette pratique comporte un risque plus grand de perdre la mutation, car après deux rétrocroisements consécutifs, seule la moitié des plantules possède la mutation suppressive et uniquement à l'état hétérozygote.

Afin de récupérer la mutation à l'état homozygote, j'ai pratiqué deux autofécondations (notées βF2 puis βF3). Ce sont les plantes homozygotes pour la mutation suppressive et ayant subi deux rétrocroisements consécutifs suivi de deux cycles d'autofécondations (βF3) que les premières expériences d'expression de gènes, de caractérisation phénotypique et de sensibilité aux hormones ont été faites. Elles ont également été utilisées pour l'introgression de marqueurs.

Pour certaines lignées, deux autres rétrocroisements à partir des plantes βF2, ont été réalisés afin d'éliminer un plus grand nombre de mutations non liées à la suppression (pour arriver à des plantules ΔF3). A ce stade, la plante est débarrassée d'une bonne partie des mutations parasites. Toutefois, il faut bien garder à l'esprit, qu'il reste toujours des mutations parasites fortement liées à la mutation suppressive ou au transgène scFv12, lesquelles sont compliquées à éliminer (Fig. 27).

Lors de ces multiples rétrocroisements et cycles d'autofécondation, j'ai écarté trois lignées qui ne présentaient pas une ségrégation mendélienne ou une atténuation du phénotype de suppression. J'attribue ces faits à la présence de plusieurs mutations affectant la croissance des plantules à l'obscurité. Travailler sur ces lignées présentait donc un risque trop grand de perte de temps. A la fin de ce crible, seulement dix lignées ont été sélectionnées et constituent le produit de cette approche suppresseur.

N°lignée	Proportion des phénotype αF2			conclusion
	ss12k like	intermédiaire	WT like	
3.3	61	x	142	Dominante
11.5	32	62	28	Semi-dominante
12.4	45	100	49	Semi dominante
24.5	28	x	100	Récessive
36.4	59	85	46	Semi dominante
51.9	28	45	17	Semi dominante
99.8	81	x	31	Récessive
115.4	37	x	100	Dominante
138.4	201	x	68	Récessive
173.7	25	x	78	Dominante

Figure 28 – Détermination du caractère récessif/dominant des mutations suppressives.

Le comptage de la proportion des différents phénotypes observés dans les lignées ségrégeantes permet d'estimer la récessivité ou la dominance de la mutation. Trois classes de phénotypes ont été recensées : similaire aux phénotypes des plantes ss12k, phénotype suppresseur ou phénotype intermédiaire.

Détermination du caractère récessif/dominant des mutations

Le fait que la mutation soit récessive ou dominante est important pour adapter la stratégie de complémentation. Mais il s'agit aussi d'un critère de sélection essentiel pour le choix des lignées sur lesquelles je devais concentrer mes efforts. Souvent, les mutations récessives sont le fruit d'une perte de fonction d'un gène alors que le caractère dominant ou semi dominant se traduit la plupart du temps par un gain de fonction.

D'autre part, d'après les données récentes obtenues au laboratoire, ABP1 module la durée de vie des Aux/IAAs et influence donc la voie $SCF^{TIR/AFBs}$. Beaucoup de mutants de cette voie sont résistants à l'auxine, c'est le cas notamment des mutants de gain de fonction Aux/IAAs, ce qui fait que j'ai porté plus de considération aux mutations récessives afin d'éviter de sélectionner ce type de mutants qui pouvaient théoriquement sortir de ce crible compte tenu de l'impact d'ABP1 sur la voie $SCF^{TIR/AFBs}$.

Le premier rétrocroisement (αF1) a permis entre autres de savoir si la mutation suppressive était récessive ou dominante en se basant sur le phénotype des plantules F1 dont la mutation était à l'état hétérozygote. Toutefois, compte tenu de la conditionnalité des plantes et du nombre de mutations que contenait chaque lignée, il n'était pas forcément évident d'identifier avec assurance le caractère récessif/dominant de la mutation. J'ai donc attendu un cycle de développement (αF2) afin d'analyser la ségrégation des phénotypes afin d'assurer mon analyse. A l'issue de ces premières étapes, j'ai abandonné un certain nombre de lignées présentant une ségrégation non mendélienne ou affectée par des problèmes de germination. Ainsi le nombre de lignées a été ramené à dix.

Sur les dix lignées restantes, j'ai analysé le caractère récessif/dominant de la mutation au stade α puis une autofécondation après ce rétrocroisement (αF2) afin de confirmer si la lignée avait une ségrégation mendélienne. J'ai ainsi déterminé que trois mutations suppressives sont récessives (24.5, 99.8, 138.4), trois sont dominantes (3.3, 67.1 et 173.7) et enfin quatre sont semi dominantes (11.5, 12.4, 36.4 et 51.9). Les plantes semi dominantes présentaient lorsque la mutation était à l'état hétérozygote (α et 50% des plantules αF2) un phénotype intermédiaire.

Test d'allélisme

Après le classement des différents suppresseurs selon le caractère récessif ou semi-dominant de la mutation, les mutants ont été croisés deux à deux au sein d'une même classe pour rechercher un éventuel allélisme.

Pour les allèles récessifs, le résultat était visible sans ambiguïté dès de la population F1. Aucune plante F1 ne présentant un phénotype suppresseur il était possible de conclure que les trois mutants récessifs, 24, 99 et 138, ne sont pas alléliques.

Pour les mutants semi-dominants et dominants, un phénotype intermédiaire est observé sur les plantes F1 et ce n'est qu'en F2 que l'analyse des phénotypes et le dénombrement des plantes donne des indications sur un possible allélisme ; toutefois les conclusions restent délicates puisque des phénomènes d'additivité peuvent compliquer la lecture des phénotypes. Bien que délicate, l'analyse de la descendance des différents croisements n'a pas permis de découvrir des mutants alléliques.

L'absence de mutants suppresseurs alléliques amène plusieurs réflexions. On peut penser que des mutants alléliques été présents dans l'ensemble des suppresseurs. Ces allèles ont été ensuite perdus dans les étapes antérieures et notamment lors de l'élimination de dizaines de lignées sur la base de l'expression du scFv ou de la robustesse du phénotype.

Bien que l'hypocotyle étiolé semble être un modèle simple, on peut supposer que de nombreuses interconnexions entre voies de signalisations peuvent influer sur la skotomorphogenèse, ce qui implique que de nombreux gènes différents peuvent être découverts. Enfin, compte tenu que l'auxine est une hormone essentielle pour le développement de la plante, elle est fortement régulée et le nombre de gènes impliqués dans cette signalisation est surement élevé.

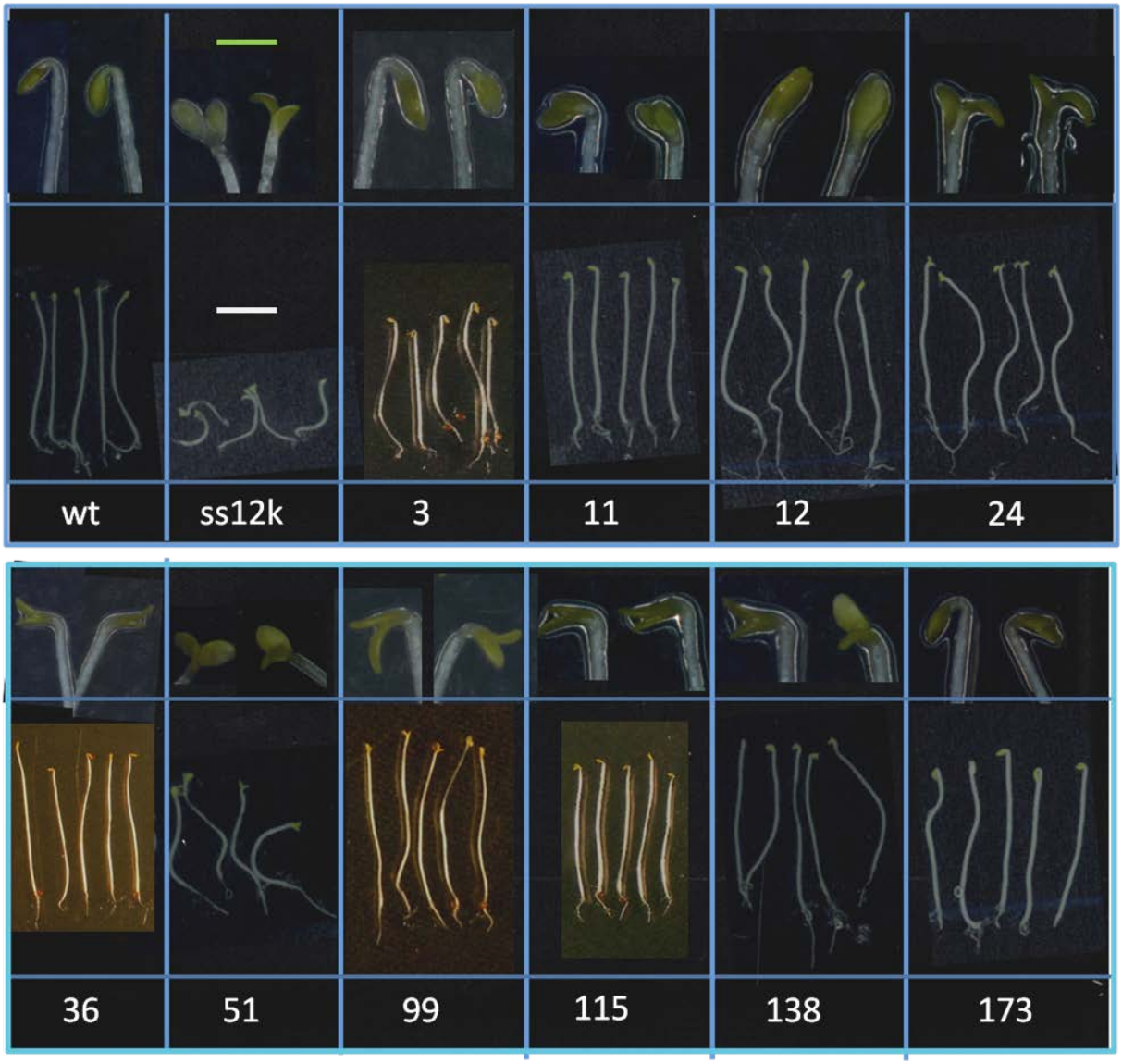


Figure 29 – Phénotype des lignées suppressives

Phénotype des 10 lignées suppressives du phénotype ss12k après 4 jours de croissance à l'obscurité à 22°C. Un zoom sur les cotylédons permet de voir le degré de restauration de l'étiolement.

Barre d'échelle blanche = 5mm / barre d'échelle verte = 1 mm

Phénotypes des lignées

Suite à la validation des lignées, une première exploration des phénotypes des suppresseurs a été menée sur des plantes rétrocroisées une ou deux fois selon leur disponibilité. Comme évoqué précédemment, il faut donc garder à l'esprit que de nombreuses mutations parasites existent dans ces plantes et peuvent interférer avec le développement ou les réponses aux hormones sans être liées à la suppression de l'inactivation d'ABP1. L'analyse des premiers tests effectués m'a néanmoins permis de prendre en compte de nouveaux critères de sélection des lignées et me focaliser sur trois à quatre lignées.

Restauration de la skotomorphogenèse

La skotomorphogenèse est caractérisée par l'étiolement de l'hypocotyle, la présence de la crosse apicale et la fermeture des cotylédons. D'un point de vue macroscopique, on remarque que toutes les lignées ne présentent pas une restauration équivalente du phénotype sauvage. Le mutant 51 est le suppresseur ayant la morphologie la plus proche des plantes ss12k ; elle présente toujours un dé-étiolement et diffère des plantes ss12k par un hypocotyle plus grand, elle conserve encore un agravitropisme de l'hypocotyle (Fig.29 et 30). Mis à part la lignée 3 qui parait être plus petite, les autres lignées suppressives présentent une taille d'hypocotyle équivalente à celle du sauvage. Mais certaines possèdent toujours un léger agravitropisme (comme les lignées 12, 24, 99 et 138) au contraire des lignées 173 et 11 qui ont le même gravitropisme qu'une plantule sauvage (Fig. 29). La lignée 173 pousse même le mimétisme avec le sauvage jusqu'à posséder des cotylédons fermés et une crosse apicale. Il s'agit de la plante présentant la restauration du phénotype sauvage la plus complète (Fig. 29).

Concernant le dé-étiolement, les lignées 24 et 51 sont celles qui présentent des cotylédons les plus semblables à ceux observés dans la lignée ss12k (Fig.29) alors que les lignées 3 et 173 possèdent des cotylédons fermés et une crosse apicale. Les lignées restantes présentent des phénotypes intermédiaires, la lignée 12 a perdu la crosse apicale mais les cotylédons restent clos et la lignée 138 forme un groupe de plantes avec un grand hypocotyle et des cotylédons bien ouverts similaires à ceux observés dans la lignée inactivée pour ABP1. Les lignées 36, 99, 12 et 11 ont un phénotype intermédiaire au niveau de leurs cotylédons (Fig. 29 et 30).

Figure 30 – Poursuite de la caractérisation de la réversion pour les lignées suppressives à l'obscurité

Analyse de l'effet de l'inactivation d'ABP1 sur les différentes lignées suppressives (A) et test de sensibilité à l'auxine (B). Mesures effectuées sur 25 plantules minimum. Les barres d'erreurs représentent les écarts type.

La sélection des mutants s'est appuyée principalement sur l'observation visuelle de la restauration de la croissance de l'hypocotyle à l'obscurité et en présence d'éthanol. Toutefois, il était intéressant de regarder quelle était la taille de l'hypocotyle en l'absence d'éthanol, c'est-à-dire avec ABP1 active. L'un des dangers étant de trouver des plantes exagérément grandes en absence d'éthanol ce qui signifierait que le phénotype du suppresseur aurait été du à une moyenne entre un hypocotyle court chez ss12k et un hypocotyle trop long chez la mutation suppressive. Comme le montre la figure 30, sans éthanol, les lignées suppressives ne présentent pas d'hypertrophie de l'hypocotyle. Elles possèdent au contraire une taille relativement similaire à celle du sauvage ou de la lignée ss12k sans la présence de vapeur d'éthanol. Seules les lignées 3 et 51 possèdent des hypocotyles plus courts que les autres.

En présence d'éthanol, on observe bien une diminution drastique de la taille de l'hypocotyle pour la lignée ss12k. Pour les lignées suppressives, sur les dix lignées testées, huit ne présentent aucune baisse significative de la taille de l'hypocotyle et deux, les lignées 51 et 115 présentent une diminution de celle-ci en présence d'éthanol. Pour ce crible, mon intérêt s'est porté sur les plantes ne possédant pas de variations majeures de taille d'hypocotyle entre les deux conditions ce qui rend moins intéressante les lignées 51 et 115.

La sensibilité à l'auxine

A l'inverse du sauvage, une plante ss12k est résistante à l'auxine, j'ai donc décidé d'analyser la sensibilité des lignées suppressives à la concentration de 10 µM. A cette concentration, l'hypocotyle du sauvage diminue de moitié (fig.30B). L'ensemble des lignées testées présentaient une restauration de la sensibilité à l'auxine bien que l'amplitude de celle-ci varie selon les lignées : certaines avaient une sensibilité exacerbée par rapport à celle du sauvage (3, 99 et 173), d'autres une sensibilité similaire (11, 115, 138, 173) et enfin les lignées restantes étaient moins sensibles que le sauvage (12, 24, 51). Pour la lignée 24, présentant la plus faible sensibilité, l'hypocotyle perdait toutefois 25% de sa taille par rapport au contrôle, ce qui n'élimine aucune lignée. Sur la base d'une seule concentration d'auxine testée et non d'une gamme de concentrations, il est difficile de conclure quant à la sensibilité des suppresseurs, mais cela donne une première idée intéressante pour faire un choix. Compte tenu du modèle de développement particulier des hypocotyles à l'obscurité, l'effet de l'auxine exogène sur l'élongation traduit une inhibition de l'élongation cellulaire. Les premières observations suggèrent par conséquent une restauration de l'inhibition de l'élongation cellulaire.

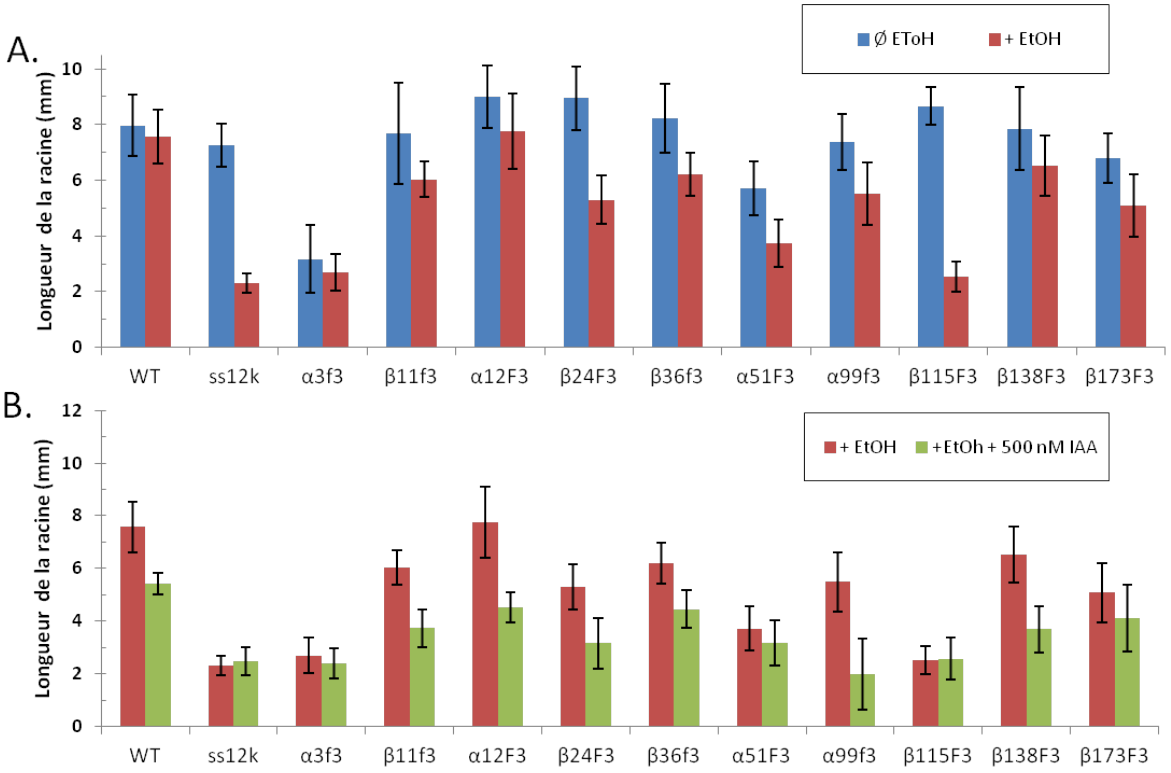


Figure 31 - Caractérisation des lignées suppressives à la lumière

Mesures des racines des lignées suppressives avec ou sans éthanol (A) et test de sensibilité à l'auxine (B) en condition d'inactivation. Les barres d'erreurs représentent les écarts-type. n>15

Impact des mutations suppressives sur le phénotype racinaire à la lumière

Contrairement à la croissance de l'hypocotyle, la croissance de la racine primaire résulte d'un processus développemental plus complexe combinant la division et l'expansion cellulaire : l'activité et le maintien du méristème apical puis l'élongation des cellules cessant de se diviser et quittant le méristème basal. Il était donc intéressant de regarder si le phénotype de suppression était seulement restreint à l'hypocotyle étiolé ou s'il s'appliquait également à d'autres processus développementaux. Dans les plantes inactivées pour ABP1, il a été montré que la division cellulaire des cellules du méristème racinaire était arrêtée et que le maintien du méristème apical était compromis, les cellules méristématiques entrant prématurément en élongation. L'élongation en elle-même de ces cellules n'est pas altérée (Tromas et al., 2009).

Les analyses ont été faites sur des plantules de quatre jours ayant poussé en condition de lumière continue avec ou sans induction par l'éthanol dès la germination (Fig. 31.A). Trois lignées (3, 51 et plus modestement 173) présentent des racines significativement plus courtes que les plantes Col0, indépendamment de l'inactivation d'ABP1, ce qui suggère que ces lignées possèdent une ou des mutations (suppressive ou parasites) inhibant le développement de la racine primaire. Trois autres (12, 24 et 115) ont des racines de 10 à 15% plus longues que le témoin.

En présence des vapeurs d'éthanol, les effets de l'inactivation d'ABP1 sont encore très perceptibles pour la plupart des suppresseurs avec une inhibition de la croissance racinaire allant de 17 à 70% selon les lignées. La lignée 115, qui apparaissait déjà comme un suppresseur partiel à l'obscurité, est un cas extrême et présente un phénotype très similaire à celui des plantes ss12k induites ce qui la place parmi les mutants les moins intéressants. Les lignées 11, 12, 36, 99, 138 et 173 montrent les effets les plus faibles de l'inactivation d'ABP1, indiquant une restauration au moins partielle de la croissance racinaire ce qui suggère que les mutations suppressives de ces lignées restaurent également un minimum d'activité méristématique et confirme la restauration partielle du phénotype sauvage (Fig. 31.A).

La lignée 24 est la lignée présentant le plus fort impact de l'inactivation car la taille de la racine est 40% plus petite en présence d'éthanol par rapport à la condition contrôle. Ce comportement suggère une relative spécificité des effets de la mutation soit dans le processus d'élongation cellulaire, soit dans la régulation de la skotomorphogenèse.

Sensibilité à l'auxine

Suite à ce constat, la question se posait également de savoir quelle était la réponse à l'auxine des racines, celle-ci affectant à la fois la division cellulaire et surtout l'élongation. Un test classique d'inhibition de croissance par l'auxine a été réalisé sur des plantules développées à la lumière pour une concentration d'AIA induisant environ 30% d'inhibition de croissance chez les plantes Col0 et pas de réponse des plantes inactivées pour ABP1.

Dans les racines, la réponse d'inhibition de croissance à l'auxine est plus hétérogène que dans les hypocotyles aussi bien d'une lignée à l'autre qu'entre plantes d'une même lignée (Fig.31.A). Une fois de plus la présence de mutations non responsables de la suppression sont vraisemblablement responsables de cette hétérogénéité d'autant que la sélection des plantes pendant le nettoyage du fond génétique s'est toujours faite sur les conditions du crible initial donc sur le phénotype des plantes à l'obscurité ce qui peut induire la fixation de mutations parasites affectant d'autres processus développementaux.

L'auxine induit une inhibition de la croissance racinaire pour les lignées 11, 12, 24, 36, 99 et 138 (Fig. 31.B). Ces lignées présentent une sensibilité à l'auxine restaurée et comparable voire supérieure à celle des plantes sauvages. Les racines des lignées 3, 51, 115 et 173 sont quant à elles résistantes à l'auxine. La lignée 173 montrait pourtant une sensibilité restaurée dans l'hypocotyle suggérant une différence qualitative de réponse entre les deux types d'organe ou de conditions expérimentales (Fig.31.B).

D'autres auxines auraient pu être testées étant donné les affinités relatives des différentes protéines interagissant avec les auxines. Ainsi TIR1 et les AFBs, les PINs et même ABP1 semblent posséder des affinités différentes selon les auxines utilisées. Étant donné qu'il s'agit d'une première exploration des caractéristiques des différents mutants sélectionnés, j'ai préféré reporter ce genre de tests à une étape ultérieure qu'il sera néanmoins intéressant de faire pour une caractérisation plus poussée.

Choix des lignées

L'accumulation des données phénotypiques et génétiques a permis de procéder à un choix réfléchi sur les lignées les plus prometteuses. Le premier choix a été de se concentrer sur les suppresseurs présentant la suppression du phénotype ss12k la plus complète. Ensuite, il a fallu réduire le nombre de lignées suppresseurs puis enfin, à partir d'une caractérisation succincte, établir un classement de priorité.

Quelques tests nous ont permis d'identifier les lignées les plus prometteuses. C'est notamment le cas de la qualité de la suppression du phénotype lié à l'inactivation d'ABP1 à l'obscurité mais également à la lumière. Les tests de sensibilité à l'auxine ont également été déterminants. A l'issue de cette analyse succincte du phénotype des lignées, les lignées 3, 51 et 115 sont les lignées qui possèdent les caractéristiques les plus éloignées du sauvage. Ce sont donc, à mon sens, les moins intéressantes. Au contraire des lignées 12, 36, 99 et 138 qui présentent des phénotypes les plus proches du sauvage et restaurent le mieux la croissance racinaire. Ces lignées apparaissent donc comme les plus intéressantes.

Enfin le caractère récessif/semi dominant/dominant a été pris en compte. De manière générale, on envisage le plus souvent une perte de fonction pour les mutants récessifs et des mutations de gain de fonction pour les lignées semi-dominantes et dominantes.

L'ensemble de ces données m'ont permis d'effectuer un choix concernant les lignées sur lesquelles je souhaitais poursuivre l'étude. J'ai donc décidé de me concentrer sur les lignées 36, 99 et 138. Toutefois, selon les résultats obtenus, et les moyens du laboratoire, il reste intéressant de travailler sur les autres lignées suppressives.

Conclusion partie crible

L'approche suppresseurs a donc permis d'identifier des lignées présentant un phénotype proche du sauvage bien qu'ABP1 soit toujours inactivée. L'une des difficultés majeures de ce crible est qu'il est basé sur la suppression d'un phénotype du à une plante conditionnelle pour ABP1. J'ai assumé le choix des suppresseurs totaux mais elle présente un inconvénient majeur. En effet, si cette capacité d'inactivation d'ABP1 est perdue, la lignée ressemble à une plante sauvage. Le contrôle de l'expression a donc été une obsession constante et a ralenti l'avancée de la recherche.

L'un des problèmes soulevés par la mutagénèse sur des plantes contenant un promoteur inductible à l'éthanol est que l'éthanol peut-être utilisé par la plante comme source d'énergie. Dans le cas de l'inactivation d'ABP1, l'impact est tellement fort, que la plante stoppe sa croissance. Pour les plantes « suppresseurs », qui peuvent donc s'affranchir de l'arrêt du développement, j'avance l'hypothèse que certains des problèmes d'expression que j'ai rencontrés durant toute cette approche sont dus à une consommation de l'éthanol. Dans un premier temps, l'inactivation a été efficace, mais la plante suppresseur pouvant outrepasser l'inactivation d'ABP1, elles peuvent alors poursuivre leur développement. On peut alors se demander si le fait d'avoir été très stricte sur l'expression du scFv sur les lignées au stade M3 ne m'a pas fait écarter des lignées intéressantes. Toutefois, compte tenu du caractère essentiel qu'est l'expression du scFv pour mon approche suppresseur, ce choix se justifiait totalement. On peut également envisager que par mon contrôle régulier de l'expression du scFv, j'ai potentiellement sélectionné des plantes qui n'utilisaient pas l'éthanol comme source de carbone.

La qualité de la réversion a donc été une qualité constamment recherchée. La suppression du phénotype lié à l'inactivation d'ABP1 sur des plantules ayant poussé à la lumière a également été observée. Ceci afin de confirmer la pléiotropie de la restauration du phénotype. J'ai pu constater qu'aucune lignée ne supprimait complètement le phénotype lié à l'inactivation d'ABP1, mais seulement une restauration partielle de la croissance racinaire. L'effet de l'induction sur la taille de la racine est un résultat surprenant qui souligne les différences fondamentales qui existent entre les régulations de croissance dans l'hypocotyle et dans la racine ; dans la racine la régulation apparait encore plus complexe.

De manière intéressante l'ouverture et le défaut d'expansion des cotylédons ne sont pas restaurés dans toutes les lignées. Travailler sur des lignées restaurant totalement le dé-étiolement peut permettre de découvrir des interconnexions entre la voie auxine et la voie de perception de la lumière. Alors que le choix d'une lignée gardant des cotylédons ouverts favorise à priori plutôt l'identification de gènes impliqués dans l'expansion cellulaire. De façon intéressante un certain nombre de suppresseurs partiels sont toujours agravitropiques, ce qui découple ce phénotype des mécanismes de croissance de l'hypocotyle. Les réponses tropiques font intervenir le transport de l'auxine; le défaut de gravitropisme pourrait être imputable à l'altération du recyclage des transporteurs quand ABP1 n'est pas fonctionnelle ce qui suggère que le mécanisme d'endocytose n'est pas restauré dans ces mutants. Lors d'une caractérisation plus approfondie de ces mutants, il sera intéressant de vérifier cette hypothèse.

La sensibilité aux hormones et notamment à l'auxine a permis de faire des groupes en fonction de leur comportement. D'après les données récentes, ABP1 agit sur la voie $SCF^{TIR/AFBs}$ en modulant la durée de vie des Aux/IAAs. Ces Aux/IAAs sont les acteurs clefs de cette voie nucléaire et contrôlent les phénomènes de résistances à l'auxine. Les mutants dominants des Aux/IAAs sont résistants à l'auxine (Overvoorde et al., 2005) et paradoxalement la perte de fonction d'ABP1, qui induit une dégradation des Aux /IAAs, induit également une résistance à l'auxine. Travailler sur des mutants sensibles était donc pour moi une façon d'éviter les mutations dans les Aux/IAAs. Compte tenu du rôle d'ABP1 sur la durée de vie des Aux/IAAs, on peut penser qu'elles auraient pu sortir de ce crible.

Enfin, beaucoup de gènes de la signalisation de l'auxine ont été identifiés par des mutants possédant une résistance à l'auxine. C'est le cas des gènes provenant du crible *axr* (auxin resistant mutant), mais également d'*aux1*, de tir*1*, d'*ibr5* etc. (Lincoln et al., 1990; Bennett et al., 1996; Ruegger et al., 1998; Monroe-Augustus et al., 2003). Notre but étant de trouver de nouveaux éléments de signalisation, se concentrer sur les plantes sensibles à l'auxine est une façon d'optimiser nos chances de découvrir de nouveaux gènes impliqués dans la signalisation de l'auxine. La sélection des lignées sensibles à l'auxine peut donc nous permettre d'éviter les mutations déjà connues et d'augmenter nos chances de trouver de nouveaux éléments de signalisation.

Identification d'une mutation suppressive

Le cas de la lignée 99

N.B : Dans ce manuscrit, je ne vous montrerai que le déroulement de l'identification de la mutation suppressive pour la lignée 99. La même approche a été appliquée pour les deux autres lignées, des mutations candidates ont également été isolées, mais la complémentation n'ayant pas été faite, il est prématuré de les évoquer. Je préfère me concentrer sur la lignée 99. Toutefois, les données de séquençage des lignées 138 et 36 m'ont indirectement servi pour l'identification de la mutation 99 et seront donc évoquées.

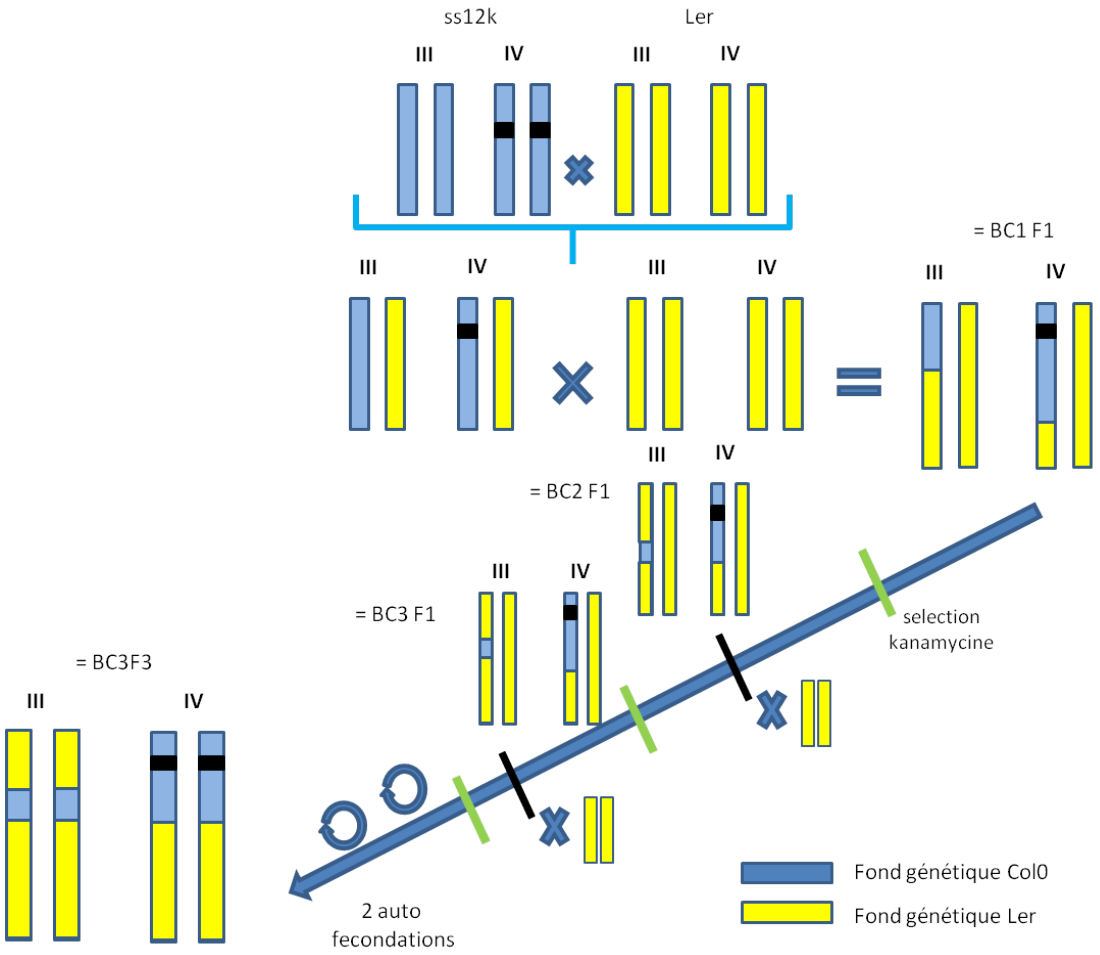


Figure 32 – Introgression du scFv dans le fond génétique Lansberg et test d'enrichissement.

Introgression du scFv par croisement, suivie d'une succession de trois rétrocroisements consécutifs avec la lignée Lansberg (Ler). Cela a permis d'obtenir une plante à grande majorité constituée du fond génétique Lansberg. C'est la plante ss12k Ler BC3F3 qui a été utilisée pour la création de populations recombinantes. Pour l'exemple, les chromosomes III et IV sont illustrés.

Obtention de lignées recombinantes

Etant donné que je n'ai obtenu aucun mutant allélique, il est apparu comme indispensable d'utiliser des populations recombinantes afin de localiser la mutation suppressive. Pour ce faire, j'ai combiné la cartographie classique à l'aide de marqueurs SSLP et CAPS aux nouvelles techniques de séquençage haut débit du génome. Cependant, dans les deux cas, l'obtention de lignées recombinantes fut nécessaire.

Création d'une plante ss12k Ler

L'identification d'un gène responsable d'un phénotype se fait classiquement par cartographie de la mutation en utilisant la descendance d'un croisement entre deux lignées avec un fond génétique proche. Dans le cas de ce crible, la mutagénèse ayant été faite sur des plantes de l'écotype Columbia (Col0), l'écotype Lansberg (Ler) a été utilisé pour la création des lignées recombinantes, en raison des nombreux polymorphismes identifiés et répertoriés entre les deux écotypes. Dans une situation simple, il suffit de croiser le mutant Col0 avec une plante Ler et d'analyser la population F2. Dans le cas présent, les suppresseurs sont des plantes qui portent une construction dont l'expression permet l'inactivation d'ABP1. La présence de cette construction est donc indispensable pour réussir à discriminer les plantes portant ou non la mutation suppressive au sein d'une descendance. Il était donc nécessaire d'insérer le scfv dans le fond (Ler). Deux choix se proposaient :

- Insertion par transformation via *Agrobacterium tumefaciens*
- Introgression par croisement puis enrichissement en fond génétique Ler par rétrocroisement.

Sur la base de l'expérience du laboratoire, il est clairement apparu que l'obtention de lignées conditionnelles pour ABP1 n'est pas une tâche aisée notamment en raison des possibles effets de position du transgène et des fuites du système éthanol. De plus, il y aurait nécessairement ségrégation des constructions issues des parents Col0 et Ler et donc le risque de sélectionner une plante n'étant plus conditionnelle pour ABP1 à un moment donnée du processus. Ce risque existe d'autant plus qu'à l'obscurité, la sélection kanamycine n'est pas opérationnelle. Nous avons jugé préférable d'introgresser la construction scFv12 des plantes ss12k Col0 dans le fond génétique Ler par croisement.

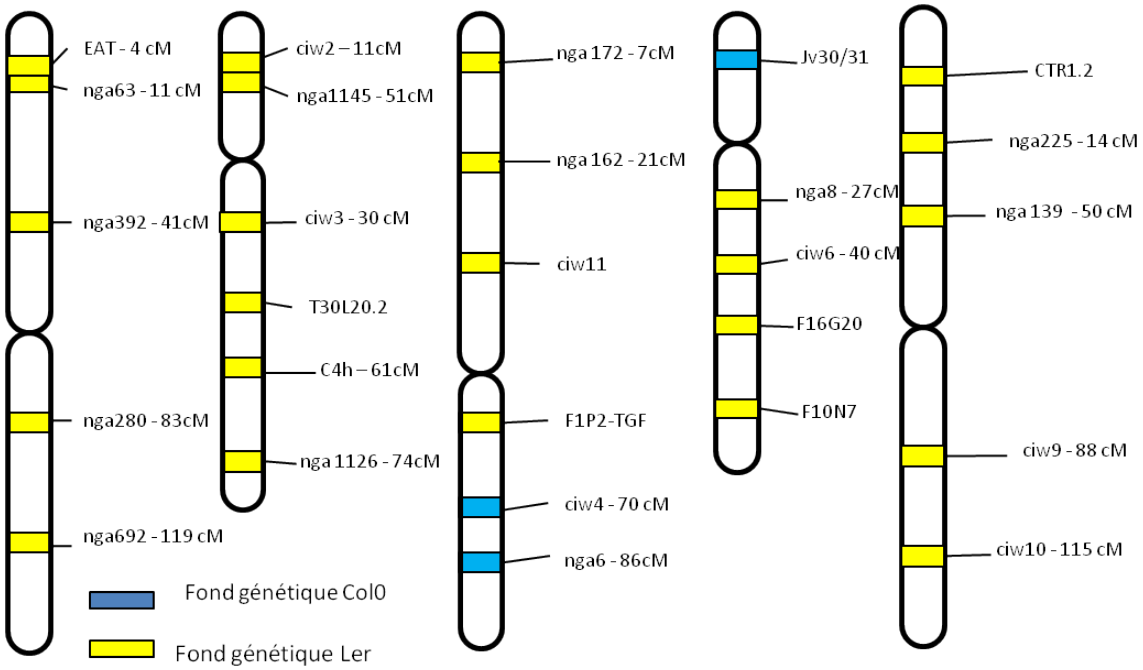


Figure 33 – Test de l'enrichissement en fond génétique Ler de la lignée BC3F3

L'enrichissement de la lignée ss12k Ler BC3F3 a été testé sur un mélange de dix plantes et a requis l'utilisation de marqueurs de polymorphisme SSLP ou CAPS. Cette analyse succincte a permis de révéler deux zones n'ayant pas recombiné avec l'écotype Ler.

Bien évidemment, des rétrocroisements avec des plantes sauvages de l'écotype Ler ont été faits dans le but d'enrichir en fond génétique Ler les lignées recombinantes, bien que cela prenne du temps afin d'avoir une plante suffisamment enrichie en fond génétique Lansberg.

Analyse de l'enrichissement en fond génétique Ler de la lignée BC3F3

Lors de ces rétrocroisements, j'ai pris avantage du caractère dominant de la construction ss12k pour confirmer à chaque génération la capacité à inactiver ABP1 en me basant sur les phénotypes de plantules à l'obscurité (Fig.31). Après trois rétrocroisements successifs et deux autofécondations permettant de sélectionner une lignée homozygote pour la construction, j'ai décidé d'évaluer l'enrichissement de cette lignée, nommée BC3F3, en fond génétique Ler (Fig.31). Ainsi, j'ai utilisé des marqueurs de polymorphisme SSLP et CAPS, sur un pool de plantules issues de la lignée BC3F3. Il est assez vite apparu que les plantes étaient largement enrichies en fond génétique Ler. Plusieurs informations ont émergé de cette analyse :

- Les plantules étudiées possédaient, selon les marqueurs utilisés, trois chromosomes ne faisant apparaitre que des marqueurs Ler, révélant ainsi que les chromosomes I, II et V sont majoritairement de fond génétique Ler.
- Les chromosomes III et IV possèdent un enrichissement en séquences Ler mais deux zones montrent des marqueurs correspondant à l'écotype Col0. L'une d'elle, se situe au nord du chromosome IV qui d'après une cartographie partielle de la construction scFv effectuée au préalable sur la génération BC1F2 pouvait correspondre à la région d'insertion du transgène. Sur le chromosome III, une partie du bras sud de ce chromosome apparait également être toujours Col0.

Des rétrocroisements supplémentaires auraient pu enrichir davantage en séquences Ler mais les impératifs de temps nous ont amené à utiliser cette lignée BC3F3 pour générer les lignées recombinantes avec les premiers mutants suppresseurs sélectionnés. La présence d'au moins une région Col0 non liée au transgène (bras sud du chromosome III) constitue une difficulté potentielle pour les étapes ultérieures de cartographie et d'analyse des séquences dont j'ai bien sûr tenu compte par la suite. Avant d'utiliser la lignée BC3F3, j'ai vérifié que l'induction par l'éthanol permettait l'induction du transgène et que dans un fond majoritairement Ler, l'inactivation d'ABP1 induisait un phénotype comparable à celui observé dans le fond col0.

Production des lignées recombinantes

Après avoir validé la lignée ss12k BC3F3 Ler comme suffisamment enrichie en Ler, j'ai pu commencer la création des lignées recombinantes en croisant cette lignée avec des suppresseurs qui eux, étaient encore au stade M3. L'analyse du phénotype étiolé des plantules de la génération F2 a permis de vérifier la bonne ségrégation du phénotype suppresseur d'une part et celui caractéristique de l'inactivation d'ABP1 d'autre part. Seules les plantes présentant un phénotype de suppression propre à chaque lignée (c'est-à-dire une restauration quasi-totale pour la majorité d'entre-eux), lié à l'homozygotie de la mutation suppressive pour les mutants récessifs et semi-dominants, et homozygotie plus hétérozygotie pour les mutants dominants, ont été transplantés en terre. Des tissus de feuilles de ces plantes de génération F2 ont été prélevés afin de réaliser une cartographie.

Après une autofécondation, le phénotype de la descendance F3 a été vérifié dans les conditions du crible à l'obscurité pour vérifier que les plantes F2 sélectionnées étaient bien homozygotes pour la mutation suppressive. Cette étape de validation en F3 était essentielle pour s'assurer que pour une lignée donnée, la mutation suppressive était non seulement présente mais homozygote dans 100% des échantillons, donc avec un score prédictible de 100 % dans les séquences génomiques.

J'ai décidé de me focaliser sur les trois lignées que j'ai estimé être les plus prometteuses (à savoir les lignées 36, 99 et 138). Toutefois, j'ai également croisé la plantes ss12k Ler avec les autres lignées suppressives. Ainsi, selon les futurs moyens du laboratoire, il sera possible de poursuivre mon travail sur les autres lignées suppressives. Un long travail de préparation et de validation des lignées a donc été réalisé pour les lignées 36, 99 et 138.

La première question qui s'est alors posée était de savoir quelle(s) plante(s) il fallait utiliser en vue de la préparation de l'ADN destiné au séquençage à haut débit. Nous n'avions pas vraiment de recul quant aux options possibles. La discussion avec différentes personnes développant ce type d'approche, avec les membres de la plateforme de séquençage et du mon comité de thèse nous ont amené à utiliser les plantes F3 comme matériel pour le séquençage. Ce choix nous permettait de vérifier que les lignées sélectionnées étaient bien homozygote pour la mutation au niveau du phénotype. Ainsi, 20 plantules de chaque F3 validée ont été semées à la lumière et récoltées puis rassemblées toutes ensembles pour former l'échantillon à séquencer. La question du nombre de plantes recombinantes indépendantes a également été soulevée. Les premiers articles de la littérature évoquent des populations de plusieurs centaines de plantes recombinantes mais

différentes équipes venant de procéder à ce type d'approche nous ont indiqué qu'un nombre beaucoup plus restreint, de l'ordre de quelques dizaines de lignées, était largement suffisant.

A ce stade, le pragmatisme l'a emporté et j'ai utilisé les lignées recombinantes F3 validées et immédiatement disponibles pour préparer les échantillons d'ADN pour les suppresseurs 36, 99 et 138. Leur nombre était respectivement de 45, 48 et 100 plantes recombinantes F3. A ces échantillons, nous avons ajouté la lignée ss12k d'origine n'ayant pas subi la mutagénèse, de façon à identifier aisément les mutations déjà présentes dans cette lignée parentale.

Vérification de l'expression du scFv dans les lignées F3

Les plantes recombinantes F3 des lignées 36 et 99 (disponibles en premier) ayant servi à préparer l'ADN ont été validées sur la base de l'homogénéité du phénotype suppresseur des plantes à l'obscurité. Par la suite, j'ai testé l'expression du scFv12 dans certaines de ces lignées. Il est apparu que certaines d'entre-elles présentaient un défaut d'expression du scFv en utilisant des plantules de 4 jours induites depuis la germination et placées à l'obscurité (conditions du crible). Ce résultat remettait en cause au moins en partie la validation des plantes recombinantes F3 (mais le séquençage était en cours). Jusqu'alors, nous n'avions jamais été confrontés à une perte ou la baisse de l'expression du scFv12 suite à l'induction par l'éthanol dans les plantes ss12k ou dans différentes lignées rapportrices générées par croisement. L'expression du scFv avait été l'un des premiers critères utilisés pour sélectionner les suppresseurs et les ségrégations observées en F2 ne révélaient aucune anomalie quantitative justifiant une vérification plante à plante de l'expression. J'ai dû tenir compte de ce problème lors de l'analyse des données de séquences. Par la suite, les nouveaux échantillons ont fait systématiquement l'objet d'une analyse d'expression par RT-qPCR pour chaque plante recombinante F3.

Cette vérification a éliminé la lignée 173 car nous nous sommes aperçus que la quasi-totalité des lignées recombinantes présentaient une très faible expression du scFv. Cette perte d'expression massive fait penser à un « silencing » de l'expression du scFv, rendant la sélection des lignées portant la mutation suppressive impossible. On peut également imaginer une utilisation de l'éthanol par la plante ce qui empêche l'inactivation d'ABP1 par absence de l'inducteur.

A.

	Chr I	Chr II	Chr III	Chr IV	Chr V	total
nombre de mutations	366	544	505	493	291	2 199

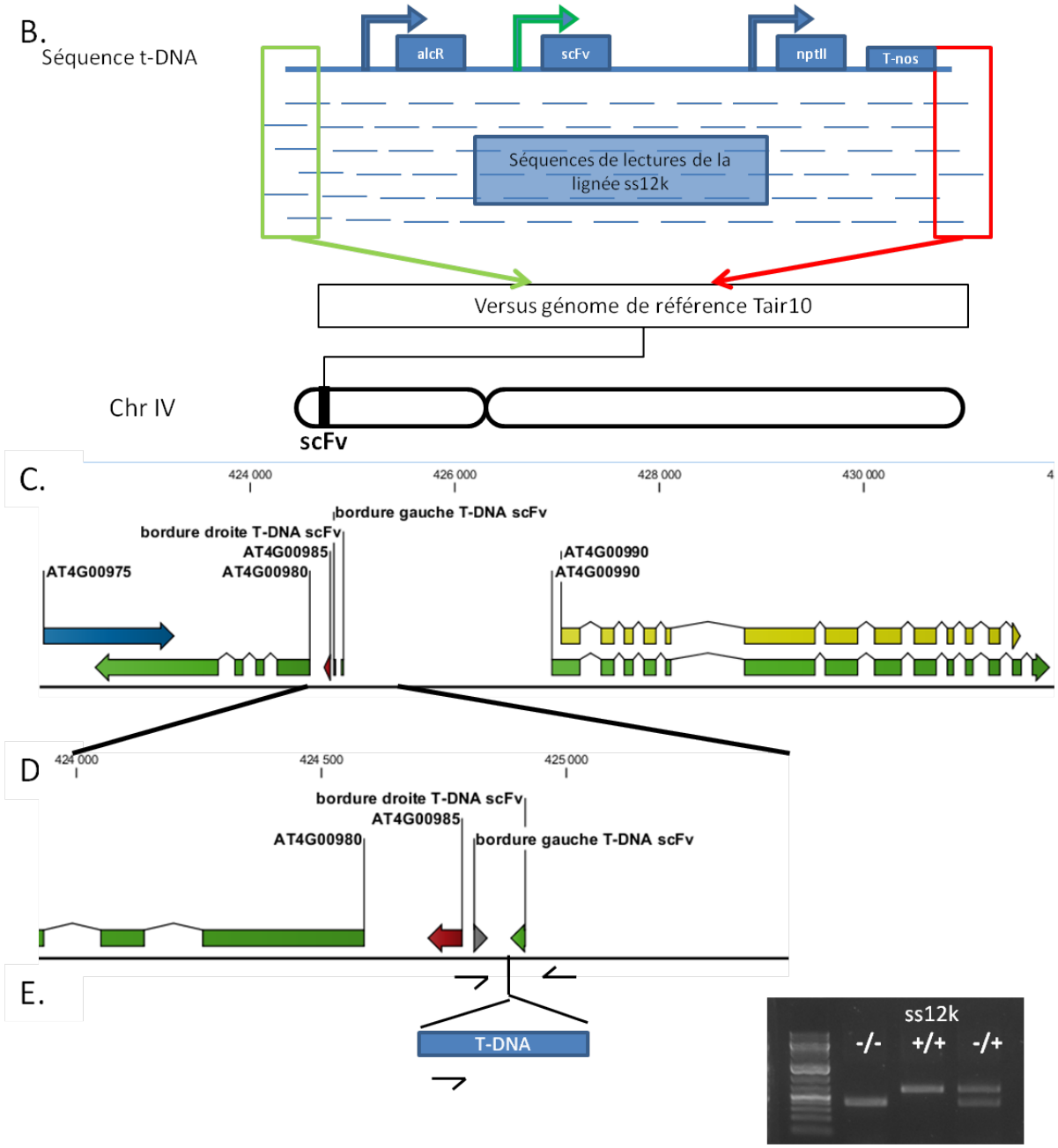


Figure 34 - Résultats obtenus après le séquençage de la lignée parent ss12k

Le séquençage de la lignée ss12k a permis de recenser les mutations naturelles de la lignée ss12k par rapport au génome de référence de la base de données TAIR (A). L'alignement des séquences sur celle du plasmide utilisé pour insérer la construction éthanol inductible a permis d'isoler des séquences chevauchantes entre le T-DNA et le génome de référence(B). Une recherche a permis de localiser la position de ces séquences chevauchantes et donc le site d'insertion du T-DNA (Cet D). Des amorces spécifiques ont donc pu être dessinées (E).

Seulement deux plantes des lignées recombinantes 99 présentaient un défaut d'expression. Bien que ces plantes aient pu contaminer les données de séquençage. Leur faible nombre peut laisser espérer que les données soient toujours utilisables.

Certaines des plantes de la lignée 36 présentaient un défaut d'expression du scFv. Nous avons donc préféré refaire un séquençage du génome sur des lignées contrôlés individuellement par RT-qPCR.

Pour les lignées recombinantes de la lignée 138, que nous avons séquencées plus tard que les autres, j'ai préféré augmenter le nombre de plantules pour voir si cela pouvait permettre d'obtenir un intervalle de localisation de la mutation plus fin que pour les autres lignées.

Analyse des données de séquençage

Données issues du séquençage du parent

Le séquençage du parent ss12k nous a permis de lister les mutations spontanées étant présentes dans le génome de la plante avant la mutagenèse. Au total 2199 bases différant du génome de référence ont été relevées (Fig.34.A). Ces mutations peuvent être soustraites de la liste des mutations recensées dans les régions Col0 lors du séquençage des lignées recombinantes. Ce jeu de données m'a permis de localiser avec précision le site d'insertion du transgène permettant l'inactivation d'ABP1, ce qui n'avait pas été possible au préalable.

Pour ce faire, j'ai utilisé la séquence du T-DNA portant la construction permettant l'inactivation d'ABP1 par immunisation cellulaire et qui a permis l'obtention de la lignée ss12k. J'ai aligné l'ensemble des pistes de lectures sur la séquence du T-DNA en utilisant des paramètres d'alignement peu rigoureux pour retrouver les séquences correspondantes (50% de similarité de séquence sur 50% de la longueur d'une piste de lecture). J'ai ensuite utilisé les pistes de lecture ayant été alignées à la marge de la séquence du T-DNA, ces parties de pistes de lecture ne s'alignant pas sur la séquence de référence du T-DNA (Fig.34.B). J'ai alors comparé ce bout de séquence au génome d'*Arabidopsis* écotype Columbia et localisé le site d'insertion du transgène portant le scFv dans le nord du chromosome IV (425 000 pb), ce qui a confirmé la cartographie que j'avais réalisée du scFv avec les plantes recombinantes ss12k Ler BC1F2 (Fig34.C et D). Cette localisation précise du site d'insertion de la construction permettant l'inactivation d'ABP1 (ss12k) m'a permis de dessiner des amorces spécifiques capables de distinguer une lignée hétérozygote ou homozygote pour la construction ss12k (Fig34.E).

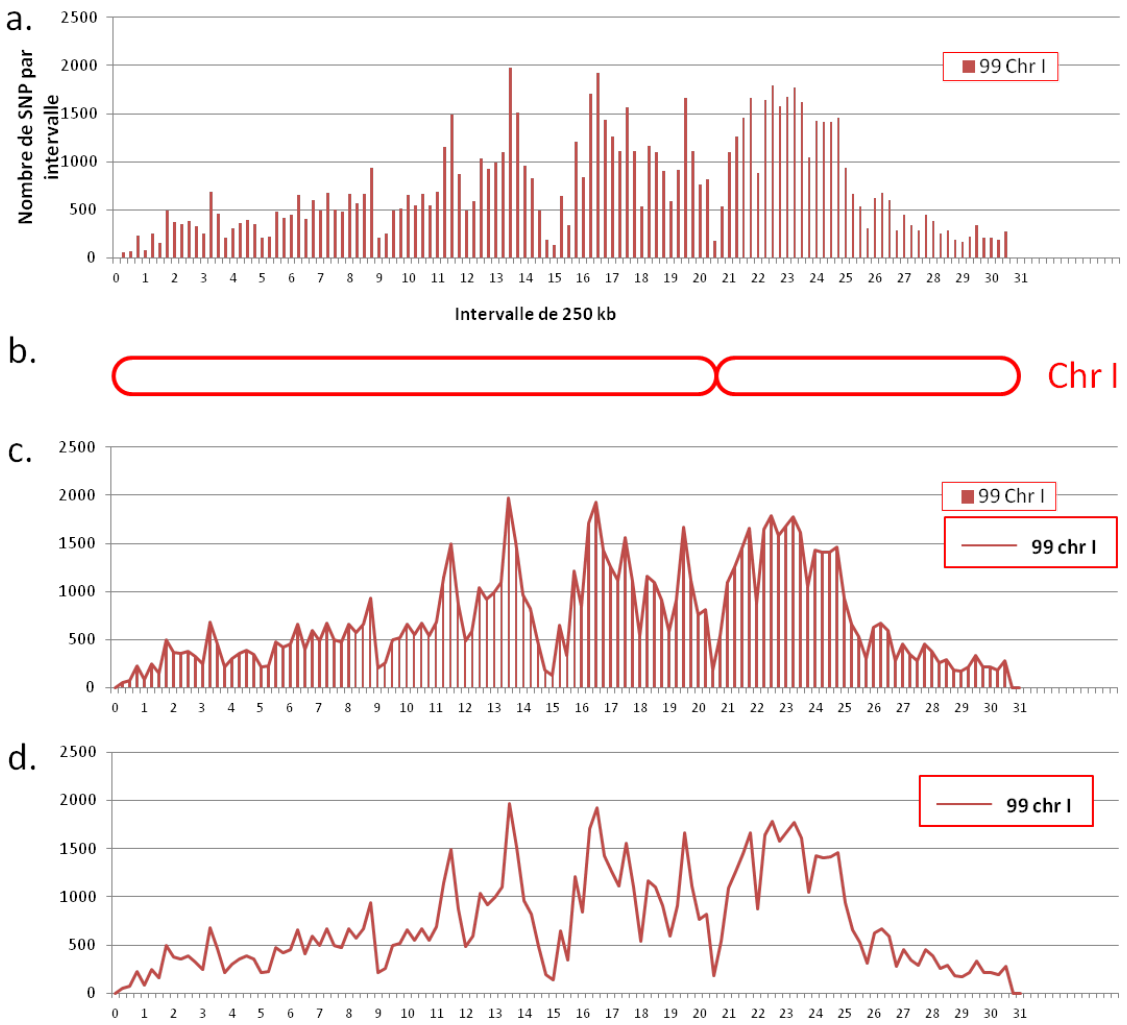


Figure 35 – Représentation des mutations sur le chromosome.

L'ensemble des mutations ayant une fréquence d'apparition supérieure à 45% ont été recensées en comparant la séquence des lignées recombinantes du suppresseur à celle du génome de référence (TAIR). Elles ont ensuite été réparties par intervalles de 250 kb (A). Elle permet d'observer le polymorphisme entre Col et Ler. La région du centromère présente beaucoup moins de polymorphisme (B). Cette représentation est surtout utile pour localiser la mutation suppressive. Le graphique (C) vous présente la représentation intermédiaire m'ayant permis d'aboutir à la représentation du graphe (D). Ces profils de fréquence de SNP m'ont permis de comparer facilement la répartition des mutations sur un même chromosome pour plusieurs lignées suppressives.

Localisation des mutations

Les séquences provenant du mélange des lignées recombinantes pour les différentes lignées (45, 48 et 100 pour les lignées 36, 99 et 138 respectivement) furent obtenues grâce à l'aide de la plateforme de séquençage haut débit IMAGIF. Après un tri pour éliminer les séquences de qualités, j'ai utilisé le logiciel CLCgenomimcs ® afin d'aligner l'ensemble des ces séquences sur le génome de référence. Ainsi chaque séquence fut placée par similarité de séquence. Une fois l'ensemble des séquences alignées, je put recenser les mutations ponctuelles ou les insertions/délétions différentes de la séquence d'origine.

En utilisant la répartition des SNPs le long des chromosomes du génome de référence *d'Arabidospis thaliana*, on peut identifier la zone où se trouve la mutation suppressive. Pour ce faire, j'ai utilisé le logiciel d'analyse de données de séquençage CLC qui m'a permis de recenser la totalité des mutations retrouvées dans les lignées recombinantes en comparaison du génome de référence Columbia (source : TAIR), celui de Lansberg n'étant pas disponible, et sélectionné celles présentant une fréquence supérieure ou égale à 45%. J'ai ensuite comptabilisé l'ensemble des mutations présentes par intervalle de 250 kb afin d'avoir une vision d'ensemble de la répartition des SNPs sur chacun des chromosomes (Fig.35 et 36). Cette représentation permet de visualiser le polymorphisme entre les écotypes Columbia et Lansberg et d'identifier les zones à dominante Columbia puisque ces zones où la séquence de la lignée suppresseur ne présente que très peu de différences avec la séquence de référence se traduit par une faible amplitude des histogrammes.

Théoriquement, on pourrait s'attendre à ce qu'une seule zone par suppresseur, celle entourant la mutation suppressive, n'ait pas recombiné. Dans les faits, cela est un peu plus compliqué, dans la mesure où comme je l'ai mentionné précédemment, la plante ss12k BC3F3 Ler n'était pas totalement constituée de fond génétique Ler. En revanche ces zones sont nécessairement partagées par toutes les lignées recombinantes de tous les suppresseurs (Fig. 36) :

- Le nord du chromosome IV, puisque c'est le site d'insertion du scFv (Fig. 34 et 36)
- Le sud du chromosome III (entre 18 et 23 Mb) : Il s'agit d'une longue région qui n'avait pas recombiné dans la plante ss12k BC3F3Ler et que j'avais déjà décelée lors de la recherche du polymorphisme de cette lignée par cartographie.
- La comparaison des séquences fait également apparaitre une région Col0 à l'extrémité nord du chromosome V (0 < zone < 1Mb) (Fig. 36).

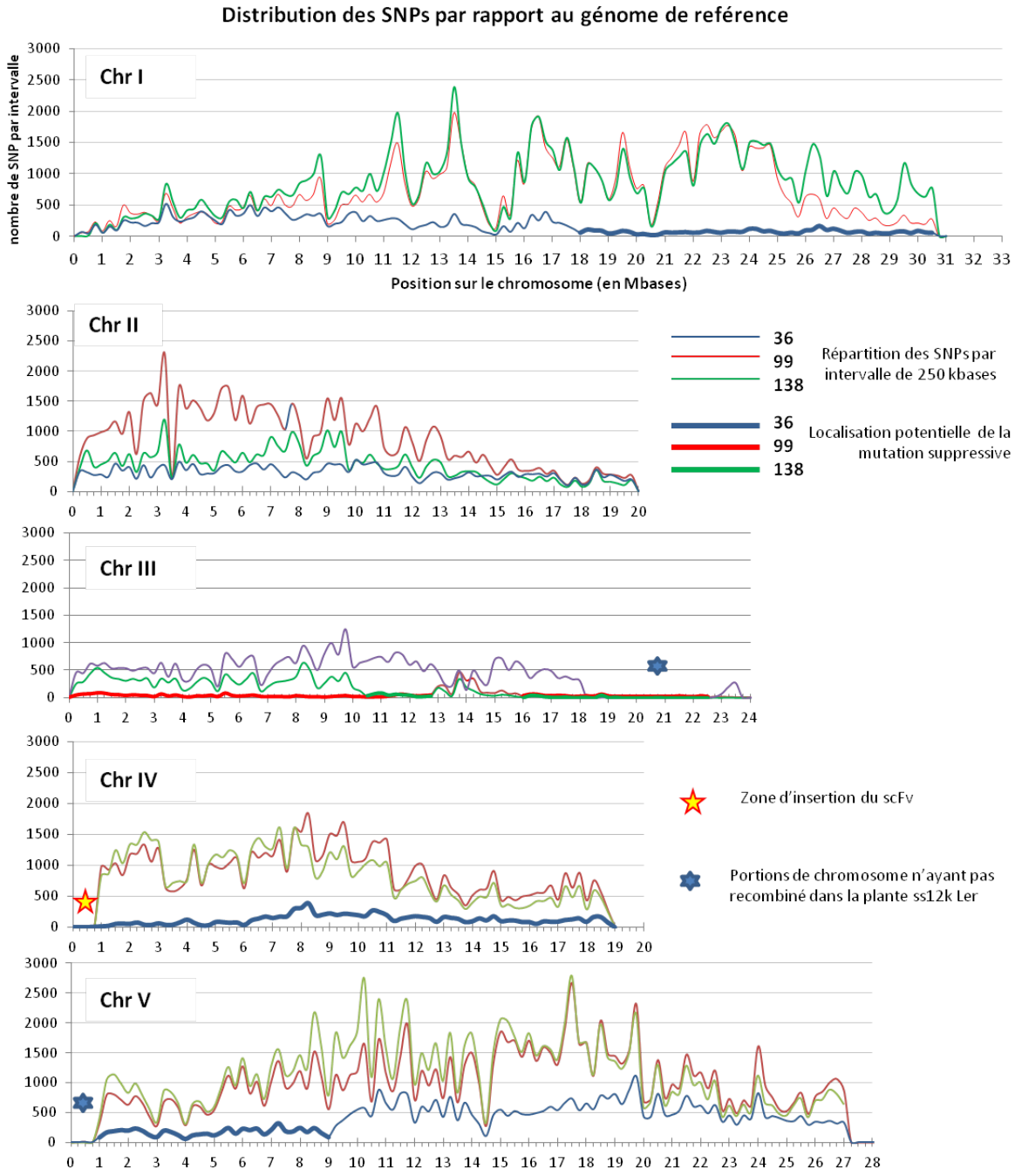


Figure 36- Distribution des mutations le long des chromosomes.

La comparaison de la répartition des SNPs des différentes lignées suppresseurs permet de localiser sur quelles parties de chromosomes se localisent les mutations suppressives. Le but de cette méthode est d'identifier les zones n'ayant pas recombiné avec la plante ss12k Ler (peu de mutations dans cette zone). Les régions partagées par les trois lignées sont marquées d'une étoile (bleue ou rouge selon la cause) et montrent les zones n'ayant pas été enrichie en fond Lansberg dans la plante ss12k Ler. La mutation suppressive se situe dans une zone n'ayant pas recombiné et cette zone doit être unique à la lignée suppressive. Ces régions sont identifiées par une courbe en gras.

La région entourant la mutation suppressive pour chaque mutant doit également se trouver dans une zone de fond génétique Columbia, donc proche du génome de référence mais à la différence des régions mentionnées ci-dessus elle n'est a priori pas partagée par les autres lignées. L'observation des profils de répartition des SNPs sur les différents chromosomes révèle à la fois des similarités et des disparités dans les profils.

Par exemple, la comparaison des mutants 99 et 138 montre des répartitions assez comparables sur les chromosomes I, II, IV et V. En revanche, le chromosome III ne présente que peu de différences avec la séquence de référence mais les profils sont tout de même différents. Les plantes portant la mutation 99 semblent avoir très peu recombiné avec la lignée BC3F3Ler sur la quasi-totalité du chromosome alors que pour les plantes 138 le polymorphisme avec les séquences Ler apparait sur le bras nord. Néanmoins, dans les deux cas ces profils désignent le chromosome III comme étant celui qui porte les mutations suppressives.

Pour la lignée 36, l'observation des profils n'est pas aussi aisée et trois zones de trois chromosomes distincts présentent une faible abondance de SNPs : le sud du chromosome I, le chromosome IV dans son intégralité et le nord du chromosome V. Paradoxalement, l'analyse globale des données de séquences ne permet même pas de définir sur quel chromosome se trouve la mutation responsable de la suppression pour cette lignée.

Que ce soit pour réduire la région portant la mutation sur le chromosome III (pour 99 et 138) ou identifier le chromosome portant la mutation pour 36, il s'est avéré incontournable de réaliser une cartographie classique utilisant des marqueurs SSLP ou CAPS sur des plantes recombinantes F2. Une localisation plus précise est destinée à faciliter l'identification des mutations suppressives parmi les multiples SNPs identifiés par séquençage.

A.

Marqueur	NGA172	NGA162	ciw11	trans	ubox	SNP	SNP	SNP	SNP	NIT1,2	MLO	TOPP5	PLC	NGA6
Enzyme utilisée						AciI						RsaI	AluI	
Position (cM)	6,91	20,56										59,2		86,41
Position (Mb)	0,80	4,61	9,77	11,91	15,647	15,681	15,734	15,76	15,923	15,99	16,619	17,24	17,421	23,03
1	L	h	h	h	h	mut	mut	c	mut	c	mut	c	mut	c
2	h	c	c	mut	mut	mut	mut	c	mut	c	mut	h	h	c
3	c	c	c	mut	wt	h	mut	c	mut	h	h	h	h	c
4	h	h	c	mut	mut		x	c	mut	c	mut	c	mut	c
5	c	c	c	mut	mut					c	mut	c	mut	c
6	L	h	c	mut	mut					c	mut	c	mut	c
7	h	L	c	mut	mut					c	mut	h	h	c
8	h	h	h	mut	mut					c	mut	mut	mut	c
9	c	c	c	mut	mut			c		c	h	h	h	c
10	h	L	h	mut	h	mut	mut	c		c	h	h	h	c
11	c	L	c	x	mut			c		c	mut	c	mut	c
13	L	h	c	x	mut		x	c		c	mut	x	mut	c
14	c	c	c	mut	mut			c		c	h	x	h	c
16	c	c	c	mut	mut			c		c	mut	x	wt	c
17	h	h	h	h	mut			c		c	mut	c	h	c
18	L	L	c	mut	mut			c		c	mut	x	h	c
19	c	c	c	mut	mut			c		c	mut	c	h	c
20	c	c	c	mut	h		x	c		c	mut	c	h	c
21	L	L	c	x	wt		x	c	mut	c		x	x	c
22	h	h	c	mut	mut					c	mut	c	h	c
23	h	h	c	mut	mut					c	mut	c	h	c
25	h	h	h	h	mut					c	mut	x	mut	c
26	h	h	c	mut	h		x	c	mut	c	mut	c	mut	c
27	L	L	h	mut	mut					c	mut	c	mut	c
28	h	h	h	mut	mut					c	mut	c	mut	c
29	h	h	h	h	mut		x	c	mut	c	mut	c	h	c
31	c	c	c	h	mut			c	mut	h	mut	c	mut	c
32	c	c	c	x	mut			c		c	h	x	x	c
33	L	h	h	mut	mut	mut	mut	c	mut	h	mut	x	h	c
34	h	h	L	x	mut					c	mut	c	h	c
35	c	c	c	x	mut					c	mut	c	mut	c
36	L	L	L	h	mut					c	mut	c	mut	c
37	h	h	H	mut	mut	mut	mut	c		c	mut	c	mut	c
40	h	h	c	mut	mut					c	mut	c	mut	c
41	c	c	c	mut	mut					c	mut	c	mut	c
42	c	c	c	mut	mut					c	mut	c	mut	c
43	h	c	c	mut	mut					c	mut	c	mut	c
44	c	h	h	mut	mut			c		c	mut	c	mut	c
46	c	c	c	mut	h	h	mut	c		c	mut	c	mut	c
47	h	h	c	mut	mut					c	mut	c	mut	c
48	c	c	c	h	mut					c	mut	c	mut	c
Marqueur	NGA172	NGA162	ciw11	trans	ubox	SNP	SNP	SNP	SNP	NIT1,2	MLO	TOPP5	PLC	NGA6
Position (Mb)	0,80	4,61	9,77	11,91	15,647	15,681	15,734	15,76	15,923	15,99	16,619	17,24	17,421	23,03
nbr L	8	7	2	0	2			0	0	0	0	0	1	0
nbr H	17	18	11	7	5	2		0	0	3	5	5	15	0
nbr C	16	16	28	28	34	35	36	23	40	38	35	< 27	23	41
%C	39,0	39,0	68,3	< 80	82,9	< 85,4	< 87,8	100	100	92,7	87,5	< 81,8	57,5	100

Marqueur SSLP/CAPS
Mutation candidate
c Marqueur Columbia
h Marqueur hétérozygote
L Marqueur Lansberg
mut Mutation candidate présente
h Mutation candidate hétérozygote
wt Mutation candidate absente

B.

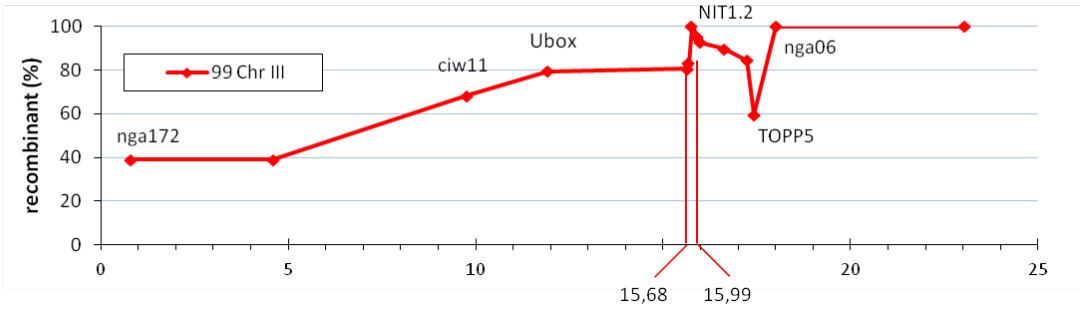


Figure 37 - Localisation de la zone contenant la mutation suppressive 99

Identification de la mutation zone où se trouve la mutation candidate par cartographie (a) à l'aide de marqueurs SSLP/CAPS (en grisé) ou de gènes candidats (en blanc), identifiés par les données de séquençage. La représentation en graphique (b) permet un autre type de visualisation.

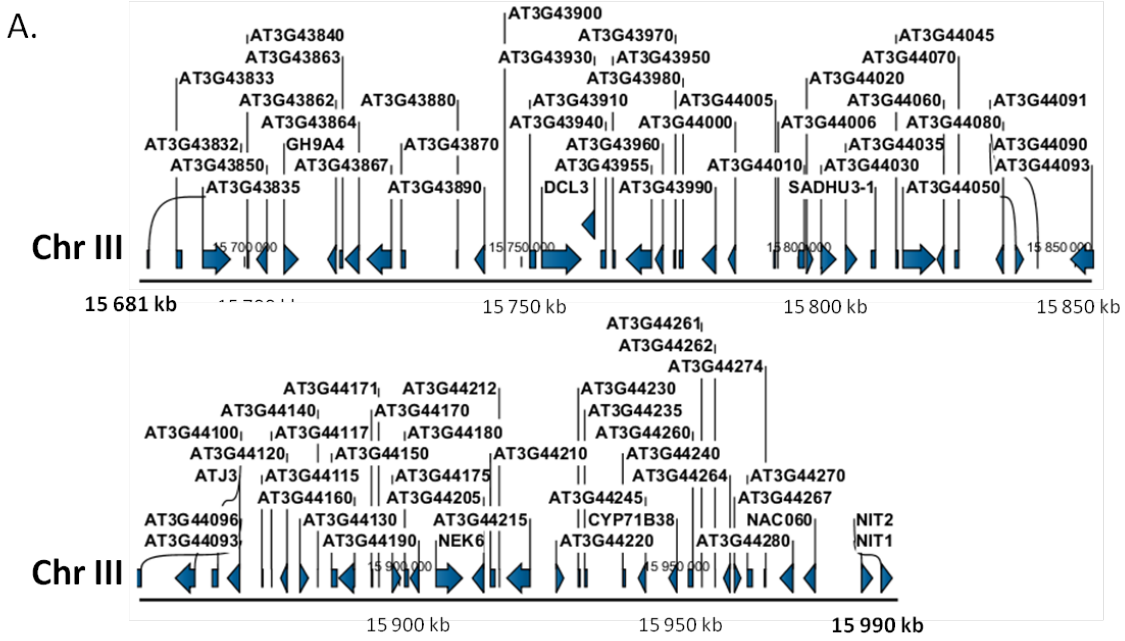
Cartographie des mutations pour la lignée 99

L'utilisation de marqueurs SSLP ou CAPS m'a permis de réduire considérablement les zones dans lesquelles se trouvent les mutations suppressives. Cette approche se base sur le calcul du pourcentage de recombinants pour les différents marqueurs répartis dans la région d'intérêt afin de réduire l'intervalle. Ainsi, on recherche une région où la totalité des plantes recombinantes possèdent un fond génétique Columbia. Pour se faire, j'ai utilisé dans un premier temps les marqueurs CAPS et SSLP disponibles sur TAIR, mais rapidement, j'ai été confronté à un problème de densité insuffisante de marqueurs répertoriés dans les régions d'intérêt.

Sur le chromosome III, où semblent se trouver les mutations suppressives des lignées 99 et 138, il n'existe que très peu de marqueurs CAPS et SSLP décrits dans les bases de données (Fig. 37.A). Pour affiner tout de même la cartographie, j'ai utilisé les données de séquençage à haut débit comme source de marqueurs. En effet l'analyse de données m'a fourni une longue liste de mutations présentes dans les lignées recombinantes avec une fréquence plus ou moins élevée. J'ai donc utilisé ces mutations candidates comme marqueur. Selon les cas, ces mutations candidates pouvaient être utilisées comme marqueur CAPS (si polymorphisme de restriction) ou comme marqueur SNP (nécessitant un séquençage) (Fig. 37.B). En combinant ces différents marqueurs, connus ou générés lors de la mutagénèse. J'ai pu réduire de manière significative l'intervalle encadrant les mutations ponctuelles :

Je n'ai utilisé qu'un nombre réduit de plantes pour cette cartographie car assez vite, l'intervalle s'est réduit à des zones relativement restreintes de 309 kb pour la lignée 99. Dans cet intervalle, on trouve 78 gènes (Fig. 38.A). Mais compte tenu du fait que je dispose des données de séquençage, il s'agit d'une zone assez restrictive pour identifier les mutations suppressives. Il est certain que cette zone aurait pu être plus faible si le nombre de lignées recombinantes avait été plus important.

A.



B.

	nombre de mutations candidates
total SNPs (fréquence >45%)	339 594
zone identifiée par cartographie	42
mutation typique d'une mutagénèse EMS (G>A et C>T)	8
mutation **non partagée** par les autres lignées suppresseurs	6

C.

position	base reference	mutation	fréquence	nombre de séquences alignées	gène muté	changement d'acide aminé
15 733 749	G	A	97,30	36		
15 759 051	G	A	90,63	29	Gene: DCL3	Trp1125*; Trp1086*; Trp1135*
15 813 260	G	A	51,35	19	Gene: SADHU3-1	
15 923 198	G	A	94,29	33	Gene: AT3G44215	
15 963 205	G	A	91,30	21	Gene: AT3G44270	
15 966 290	G	A	91,89	34		

Figure 38 - choix de la mutation candidate

L'environnement de la région identifiée a ensuite été analysé afin d'identifier les gènes candidats (a). A partir des données de séquençage de la lignée 99, l'application de différents filtres a permis de réduire le nombre de mutations candidates (b) et a permis d'obtenir une liste de six mutations susceptibles d'être responsable de la suppression du phénotype ss12k.

Toutefois, l'application de filtres comme le fait qu'une mutation soit commune aux autres lignées (ce qui l'élimine comme candidate potentielle) ou le fait qu'une mutation soit typique d'une mutagénèse à l'EMS (à savoir G>A et C>T) permet de diminuer la liste des mutations candidates de manière considérable (Fig. 38.B).

Liste des mutations candidates pour la lignée 99

Ainsi, dans ces intervalles, il reste six mutations pour la lignée 99. A ce stade, il devient possible de regarder plus attentivement les données de séquençage. Ainsi, les données de fréquences de présence des SNPs ainsi que leurs positionnements sur le génome (dans un gène, intro/exon, induisant un changement d'acide aminé) deviennent des informations qui aident à identifier la ou des mutations candidates. Pour la lignée 99, la liste de mutations de type EMS, G>A, présentes dans la région identifiée et qui ne soient partagées par les autres suppresseurs ou la lignée parentale ss12k comprend six mutations candidates (Fig. 38.C).

Parmi elles, cinq présentent une fréquence supérieure à 90%, et l'une d'elle est à 51,35%. En théorie nous attendions 100% pour la mutation responsable de la suppression puisque la mutation suppressive est théoriquement partagée par toutes les lignées recombinantes qui ont été séquencées.

Parmi les mutations identifiées, trois d'entre elles sont positionnées dans des rétrotransposons. Les gènes At3g44215 et At3g44270 sont des rétrotransposons de la famille *COPIA*-like qui inclut environ 500 loci dans le génome et la mutation At3g44042 de faible fréquence apparente est dans un rétrotransposon non codant de la famille SADHU. Bien que les transposons jouent un rôle prépondérant dans l'évolution du génome, il semblait peu probable que la mutation suppressive soit due à une mutation dans un tel gène. Selon l'analyse des données NGS, ce transposon n'a pas changé de localisation mais présente juste une mutation dans sa séquence. Par conséquent, la probabilité que cette mutation induise un phénotype de suppression de l'inactivation d'ABP1 alors que le transposon n'a pas bougé est très faible.

Deux autres mutations se trouvent dans des régions intergéniques, ce qui en soit ne permet pas de les éliminer totalement car elles pourraient affecter directement ou indirectement la régulation transcriptionnelle. Néanmoins, j'ai fait le choix de m'intéresser en priorité à la sixième mutation, positionnée dans la séquence du gène At3g43920 qui est nommé *DICER-LIKE 3* (*DCL3*).

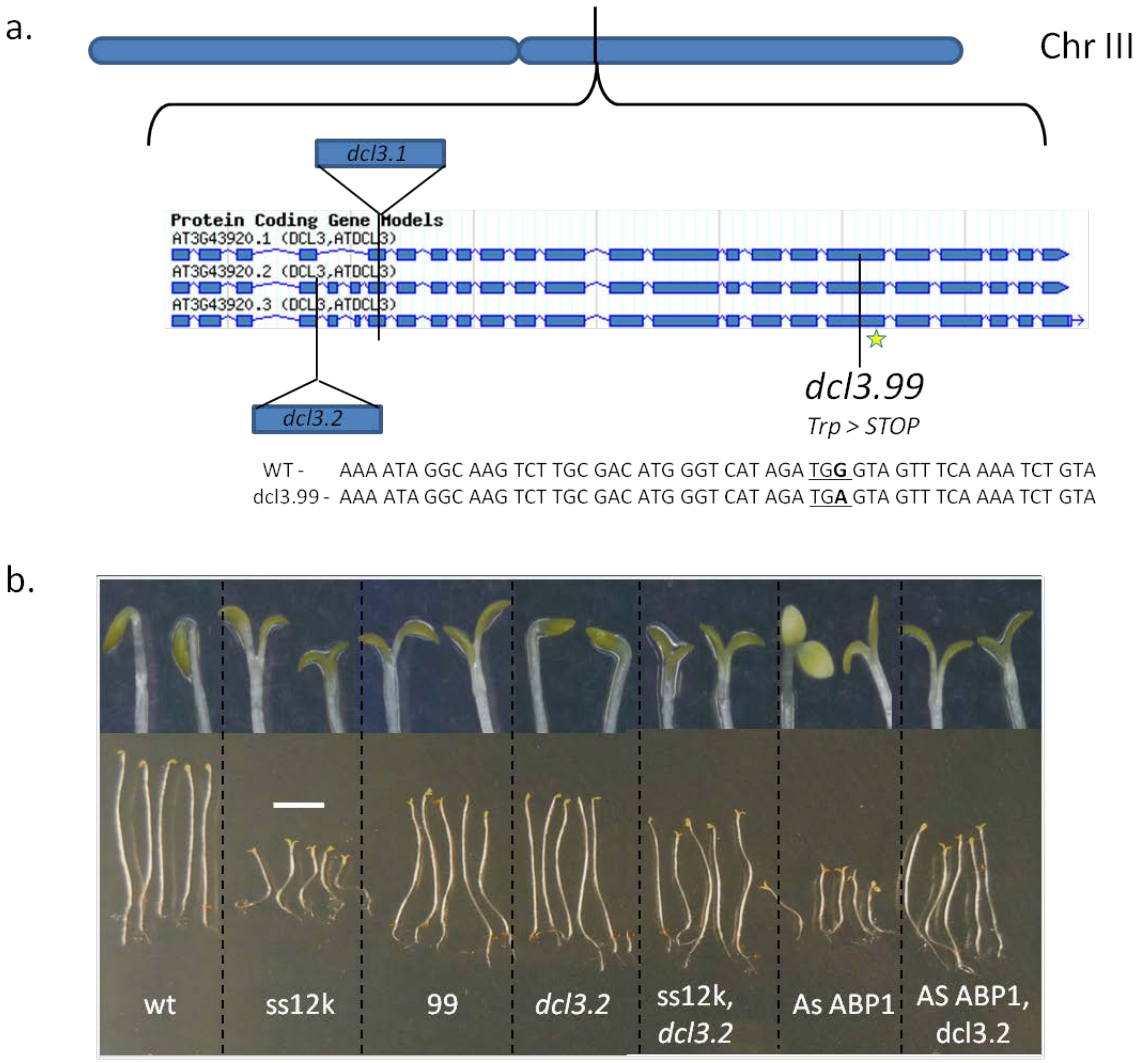


Figure 39 – Identification de la mutation dcl3.99 comme étant la mutation suppressive

La mutation affectant le gène *DCL3* est localisée dans le derniers tiers du gène est appelée *dcl3.99*. La substitution de base induit une mutation « faux sens » (a). La confirmation que la mutation *dcl3.99* est bien la mutation suppressive a été permise grâce à la phénocopie du phénotype via l'utilisation du mutant nul *dcl3.2*. Le croisement AS ABP1, dcl3.2 permet d'affirmer que la suppression du phénotype n'est pas lié à un problème lié à au scFv (b).

Cette mutation affecte la région codante de *DCL3* et induit un arrêt de la séquence protéique. Il s'agit d'une mutation non-sens dans l'exon 17 (pour At3g43920.1) induisant un codon stop à la place du tryptophane (selon différents épissages proposés 1086 pour AT3G43920.1) (Fig. 39.A). De plus, la mutation 99 est récessive or on assimile souvent les mutations non-sens à des pertes de fonction, ce qui est bien le cas ici.

Toutefois la fréquence de mutation sur les séquences alignées n'est que de 90% alors que théoriquement elle devrait être de 100%. Cela peut s'expliquer par le fait que le génome d'*Arabidospis thaliana* comprend de nombreuses zones répétées, des familles multigéniques aux séquences parfois très proches qui font qu'une séquence peut se retrouver alignée à un mauvais endroit du génome. De plus, des erreurs de séquençage peuvent aussi intervenir et fausser l'alignement des séquences. Tous ces facteurs font que la cartographie de la mutation sur les lignées recombinantes prise indépendamment permet d'affiner la zone autour de la mutation et aussi de confirmer si une mutation candidate s'avère être la mutation responsable de la suppression

.

Confirmation de DCL3 comme suppresseur de l'inactivation d'ABP1 dans la lignée

La mutation 99 est une mutation récessive qui implique que pour la complémentation, il soit nécessaire de cloner l'allèle sauvage et de transformer le mutant 99. L'alternative à la complémentation est l'introgression de la construction permettant l'inactivation d'ABP1 dans des mutants nuls pour le gène candidat pour rechercher le phénotype suppresseur. La mutation de la lignée 99, identifiée dans *DCL3* induit l'apparition précoce d'un codon STOP dans le dernier tiers de la protéine. Il se trouve qu'il existe déjà plusieurs mutants d'insertion décrits dans le gène *DCL3*. Cette approche génétique présente l'avantage de s'affranchir des contraintes inhérentes au clonage de gènes de grande taille dans un vecteur binaire (ce qui est le cas pour *DCL3* dont le gène est de 7283 pb et l'ADNc de 4743 pb) et aux biais liés à la transformation par *Agrobacterium* (nombre d'insertions, effet positionnel, insertion complexe ou partiellement tronqué affectant l'expression).

Afin de chercher à mimer le phénotype suppresseur, deux mutants d'insertions dans le gène *DCL3*, *dcl3.1* et *dcl3.2* ont été croisés avec trois lignées conditionnelles distincts pour ABP1 à savoir ss12k (c'est-à-dire la lignée parentale utilisée pour la mutagénèse et où scFv12 est retenu dans le réticulum endoplasmique), ss12s (une autre lignée conditionnelle où le scFv12 est secrété) et AS9.8 (une lignée conditionnelle anti-sens pour ABP1) afin de confirmer que la mutation candidate est bien

la mutation suppressive. Le comptage de la ségrégation des phénotypes en F2 suggérait qu'il y avait bien suppression du phénotype d'inactivation d'ABP1 dans des plantes homozygotes. Toutefois, j'ai préféré attendre la génération F3, génotyper les plantes ayant un phénotype suppresseur avant de conclure. Le phénotype de certains doubles homozygotes (*dcl3* et plantes conditionnelles pour ABP1) a confirmé que la suppression du phénotype observé dans les plantes 99 était bien du à la mutation candidate dans le gène *DCL3* (Fig. 39) et que la suppression du phénotype n'était pas du à un défaut de production du scFv ou du site d'insertion de la construction scFv.

Une hypothèse pourrait être que la perte de fonction de *DCL3* induit une modification post traductionnelle du scFv qui empêche la liaison entre les deux molécules. Une co-immunoprécipitation pourrait être faite mais cette hypothèse paraît peu probable compte tenu du rôle de DCL3 (cf Partie résultat III). La vérification de la bonne expression du scFv par western blot est toutefois envisagée pour confirmer au niveau protéique l'expression du scFv. Mais le fait que la plante *dcl3.2,* AS ABP1 supprime le phénotype ss12k permet d'écarter l'hypothèse que DCL3 agirait d'une manière ou d'une autre sur le scFv (Fig. 39).

Un dosage par RT-qPCR a permis de montrer que le scFv était bien exprimé dans les lignées *dcl3.1*, ss12k et *dcl3.2*, ss12k. Vérifier cette expression est essentiel pour valider le phénotype. De plus, le croisement entre ss12k et *dcl3.1* et *dcl3.2* n'a pas subi de mutagénèse, ce qui lève le doute sur le potentiel impact de mutations parasites sur la liaison entre ABP1 et le scFv.

J'ai pu grâce à cette approche suppresseur identifier DCL3 comme une protéine importante dans la signalisation d'ABP1 étant donné que son absence permet de supprimer le phénotype lié à l'inactivation d'ABP1. La poursuite de la caractérisation de *dcl3.99* se fera dans la partie suivante.

Perspectives

L'approche suppresseur a donc porté ses fruits grâce à l'identification de *dcl3.99* comme suppresseur du phénotype lié à l'inactivation d'ABP1. *DCL3* est un gène déjà connu et caractérisé pour son implication dans la production de petits ARNs interférents (Wierzbicki, 2012). Le fait que DCL3 soit un suppresseur ouvre un pan insoupçonné de la signalisation en aval d'ABP1 et révèle la potentielle implication des ARNs interférents dans la signalisation de l'auxine. La compréhension du mécanisme qui amène un mutant nul pour *DCL3* à supprimer le phénotype lié à l'inactivation d'ABP1 est un défi stimulant mais qui implique un investissement conséquent. Dans la partie suivante, je vous présenterai les premières étapes de caractérisation de la lignée *dcl3.99* mais aussi les toutes premières étapes de compréhension de cette suppression. Concernant cette lignée, les premières expériences de caractérisation et de tentatives de compréhension seront abordées dans la partie suivante et constitue un nouveau projet de recherche à part entière.

J'ai confirmé à l'aide de différents allèles de *DCL3* (dcl3.1 et dcl3.2) et plusieurs lignées conditionnelles pour ABP1 (ss12s, ss12k, AS ABP1) que *DCL3* était bien responsable de la suppression du phénotype lié à l'inactivation d'ABP1. J'ai entrepris de croiser les plantes *dcl3.2* et *dcl3.1* avec le mutant nul *abp1.2*. Le mutant *abp1.2* est un mutant d'insertion qui induit l'arrêt du développement de l'embryon à l'état homozygote en raison de plans de divisions anormales et d'un défaut d'expansion au stade globulaire (Chen et al., 2001). Compte tenu de l'embryolétalité du mutant *abp1.2,* 25% des graines ne germent pas et l'on ne peut travailler qu'avec les plantes hétérozygotes pour l'insertion. A ce jour, les produits de ce croisement ne sont qu'au stade F2. Toutefois, l'analyse du nombre de graines non germées ainsi que le génotypage du double homozygote pourra nous permettre de savoir si le double mutant *dcl3.1, abp1.2* est viable. Ce résultat permettra de savoir si la perte de fonction de DCL3 permet d'outrepasser l'embryolétalité ce qui constitue une réelle question biologique. Pour chaque nouveau gène responsable de la suppression d'ABP1 identifié, il sera intéressant de faire ce croisement.

Lors de cette approche, j'ai réussi à isoler plusieurs autres suppresseurs pour lesquels j'ai produit des lignées recombinantes. Ils pourront, je l'espère, permettre de découvrir de nouveaux gènes en aval d'ABP1. Pour ces lignées, j'ai également poursuivi le nettoyage du fond génétique des lignées afin que des tests plus robustes de caractérisation puissent être entrepris. De manière intéressante, les lignées présentent toutes une restauration du phénotype qui leur est propre. On n'observe peu de différence au niveau de la taille de l'hypocotyle mais la suppression de

l'agravitropisme ou du dé-étiolement est différent dans chaque lignée. Les gènes présentant une restauration de l'étiolement pourrait permettre de mieux comprendre le dé-étiolement observé dans la lignée ss12k car, à ce jour, nous ne savons toujours pas les raisons de ce phénomène.

Le séquençage des lignées recombinantes pour les lignées 36 et 138 a permis de trouver deux nouveaux gènes pouvant supprimer le phénotype d'inactivation d'ABP1, mais la complémentation est une étape incontournable avant de pouvoir affirmer la découverte de deux nouveaux éléments de signalisation. Si la complémentation confirme ces deux gènes, deux nouveaux thèmes de recherche pourront s'ouvrir s'ils permettent des perspectives intéressantes. Une perspective potentielle pourrait être de reprendre l'ensemble des lots de graines générés pendant la mutagénèse et procéder à l'application d'un nouveau crible. Ceci est quelque peu risqué compte tenu de l'âge avancé des graines de la population M3. Le choix du nouveau crible devrait être fait en fonction des connaissances sur ABP1. On peut imaginer soit un crible plus en rapport avec le lien établi entre ABP1 et l'endocytose des vésicules à clathrines, soit un crible basé sur la suppression du phénotype au niveau de la racine. Le laboratoire ayant déjà bien caractérisé le développement de la racine primaire. Compte tenu que dans les dix lignées sélectionnées, aucune ne présente une restauration totale de la croissance racinaire, on peut penser qu'il s'agirait d'un crible intéressant.

Conclusion

Une approche suppresseur est un travail de longue haleine et il faut du temps pour obtenir des résultats valorisables, il ne s'agit que d'un moyen d'obtenir des nouvelles perspectives et ne constitue pas un résultat en soi. Toutefois, cette approche est un outil puissant de découverte de nouveaux gènes dans une voie de signalisation et cette approche était plus que nécessaire dans le cas d'ABP1 car la voie de signalisation en aval de la protéine est largement inconnue même si depuis peu, des études montrent l'importance d'ABP1 dans différents aspects de la signalisation de l'auxine. (Tromas et al., 2009; Robert et al., 2010; Xu et al., 2010)(Tromas el al., en révision)(Paque et al., soumis).

Le crible

Le choix du crible est évidemment important. Le fait d'avoir mutagénéisé les lignées conditionnelles constitue une approche intéressante mais toutefois source de risques compte tenu de la relative complexité de la construction permettant l'inactivation d'ABP1. Ainsi le contrôle régulier de l'expression est relativement contraignant. Toutefois, il me semble que l'approche entreprise est la meilleure façon d'obtenir des gènes en aval d'ABP1, la mutagénèse du mutant *abp1.2* s'avérant particulièrement compliquée compte tenu de l'embryolétalité du mutant nul.

La sélection de l'hypocotyle étiolé est également un paramètre majeur dans cette approche. Compte tenu du phénotype particulier des plantes ss12k à l'obscurité, et que la croissance de l'hypocotyle étiolé est un phénomène apparemment plus simple que la croissance racinaire, nous avons pensé qu'il s'agissait d'un moyen efficace de trouver des éléments de signalisation encore inconnus.

Lors de mes multiples discussions avec des personnes ayant des connaissances et une expertise sur l'approche suppresseur, les deux grandes interrogations portaient sur l'absence de mutants alléliques et sur la grande proportion de mutants semi dominant ou dominants. Sur les dix lignées sélectionnées, seules trois étaient récessives et cette proportion était de 7 sur 24 avant la sélection plus drastique.

Pour expliquer l'absence de mutants alléliques, j'avance l'hypothèse que cela est dû au crible utilisé et à ma démarche expérimentale. De plus, ABP1 est potentiellement au sommet d'une chaine

de signalisation de par sa localisation et son rôle de perception de l'auxine. On peut donc supposer qu'une multitude de gènes soient en aval d'ABP1 et que cela augmente le nombre de lignées nécessaires pour trouver des mutants alléliques, qui statistiquement se doivent d'exister. Si cette probabilité était plus élevée que sur un crible bien plus strict, le fait d'avoir travaillé avec seulement dix lignées a pu m'empêcher de les trouver et ces mutants alléliques sont peut-être stocké et attendent d'être découverts. Initialement, j'avais entrepris de travailler avec plus de lignées, mais devant la charge de travail et le temps imparti de la thèse, j'ai fait le choix, fortement encouragé par ma directrice de thèse, de réduire le nombre de lignées.

Si l'on accepte le postulat qu'il existe potentiellement plusieurs gènes capables de supprimer le phénotype d'ABP1, alors on peut imaginer qu'il peut y avoir des régulateurs positifs et négatifs. On imagine facilement que les mutations récessives sont dues à des pertes de fonctions et que les mutations semi-dominantes/dominantes sont dues à des gains de fonctions. On trouve en général des mutations de gains de fonction au sein des familles multigéniques puisque les pertes de fonctions sont potentiellement compensées par les autres membres de la famille. Toutefois, compte tenu de la complexité des systèmes de régulation de voie de signalisation, je me garderai bien de conjecturer sur les éventuels éléments de signalisation en aval d'ABP1.

Apport de la cartographie pour l'identification de la SNP

L'approche « suppresseurs » a été entreprise au laboratoire suite au fort développement des techniques de séquençage haut débit qui permettent de séquencer l'ensemble d'un génome en un temps court et pour un coût qui a décru en permanence durant ma thèse. Les données NGS sont un outil précieux pour identifier des mutations. Dans le cas où l'on possède des mutants alléliques, elles peuvent même se suffire à elle-même pour obtenir le gène impliqué dans la suppression.

Toutefois, si aucun mutant allélique n'est apparu, ce qui a été mon cas dans cette mutagénèse, les données NGS ne suffisent pas. Elles peuvent dans un premier temps permettre d'identifier le chromosome sur lequel se trouve la mutation mais ensuite l'utilisation de la cartographie classique à l'aide de marqueurs SSLP ou CAPS est la seule qui permet de réduire suffisamment la zone supposée de la localisation de la mutation. Ensuite, les données NGS permettent de n'utiliser qu'une population de plantes recombinantes bien moindre et permettent d'avoir une liste des mutations, ce qui évite de faire une marche chromosomique qui peut prendre beaucoup de temps. C'est donc la combinaison de ces deux techniques qui m'a permis de localiser les mutations suppressives.

Apprentissages et enseignements acquis lors de cette approche

Travailler sur des F3

Initialement, je pensé que travailler sur des F3 aurait permis d'obtenir une zone n'ayant pas recombiné avec la plante ss12k Ler plus précise que si on travaillait sur des F2 puisque des phénomènes de recombinaison aurait eu lieu lors du passage de la génération F2 à F3. Il se trouve que cette réflexion ne s'est pas avérée des plus judicieuses. J'ai pu, lors de ma thèse utiliser un logiciel de traitement de données de séquençage haut débit (http://bar.utoronto.ca/ngm/) mais le fait d'avoir utilisé des lignées recombinantes au stade F3 a compliqué l'analyse qui semble être beaucoup plus puissante et efficace si les échantillons sont prélevés au stade F2. Finalement, il se trouve qu'une génération supplémentaire a plutôt compliqué l'analyse des données bien que l'identification ait été possible. Le résultat de ces analyses n'est pas présenté dans ce manuscrit. Néanmoins il est certain que la vérification de l'homozygotie pour la mutation en F3 était une étape incontournable.

Avoir séquencé la lignée parent

Avec le recul et compte tenu que nous avons à ce jour séquencé les lignées recombinantes pour trois suppresseurs, le séquençage de la lignée parent n'apparait pas comme ayant été essentielle. En effet les mutations partagées par les différents mutants peuvent être écartées sans avoir recours à la séquence des plantes ss12k. La localisation du scFv aurait pu également être faite sur des lignées suppresseur. Nous aurions ainsi pu faire l'économie de ce séquençage et séquencer un autre mutant. Toutefois, d'un point de vue théorique, le séquençage de la lignée parent paraissait légitime.

Les problèmes liéé au promoteur inductible

L'un des problèmes récurrents a été le contrôle de l'expression et les questionnements perpétuels sur son efficacité. Avec l'expérience du travail sur ces lignées, je me demande si les problèmes d'expression n'aurait pu être du à une consommation d'éthanol des plantes suppresseurs. Cela ne remet pas en cause leur validité, puisque bien que l'inactivation soit moins efficace, ils ont à

un moment, réussi à outrepasser le blocage lié à l'absence d'ABP1 active. Si c'était le cas, et compte tenu des retards de croissance engendrés par la perte de fonction d'ABP1, les lignées aurait du avoir une taille d'hypocotyle plus faible du à un retard de croissance d'autant que l'analyse fine des cinétiques d'élongation de l'hypocotyle ont révélé un défaut très prononcé de croissance dans les premières 24h (cf manuscrit d'article – Résultat Partie I).

Par la sélection des lignées exprimant correctement le scFv, j'ai peut-être favorisé des plantes ne consommant pas l'éthanol. Afin de s'affranchir de ce problème pour la caractérisation de la lignée, je préconise donc le croisement avec la lignée *abp1.2*, sous réserve que la suppression marche pour ce stade de développement. De manière plus générale, je me demande si un promoteur inductible avec une molécule non assimilable par la plante ne serait pas une meilleure option. Evidemment, ses considérations n'avaient pas lieu d'être lors de la création de ces lignées conditionnelles, et l'éventail des promoteurs inductibles n'est pas si large. Qui plus est, chacun présente ses avantages mais aussi ses inconvénients.

Résultats - PARTIE IV

Implication de DCL3 dans la suppression du phénotype ss12k

Introduction

L'approche suppresseur a permis l'identification de *DCL3* comme gène dont l'activité peut contribuer à la voie de signalisation en aval d'*ABP1*. Cette relation génétique entre *ABP1* et *DCL3* peut être un effet direct ou indirect qui pourrait être dû à une connexion entre deux voies de signalisation. Le but de cette partie est donc de vous présenter les premières expériences de caractérisation de la lignée *dcl3.99* mais aussi de tenter de proposer les premiers éléments de compréhension pour expliquer comment une perte de fonction du gène *DCL3* peut conduire à la suppression partielle du phénotype lié à l'inactivation d'ABP1.

Les régulations post-transcriptionnelles de l'expression de gènes constituent un niveau de régulation à part entière et ont remis en cause le dogme « gène > ARN > protéine » historiquement admis. Les ARN messagers, qui permettent la synthèse de protéines, ne représentent qu'une partie minime du pool d'ARNs d'une cellule. Les ARNs non codants jouent un rôle primordial dans ce niveau de régulation. Parmi les différentes classes d'ARNs, on retrouve les ARN de transfert et les petits ARNs. La découverte des petits ARNs double brins a été mise en évidence à la fin du XXème siècle chez *Caenorhabditis elegans* et chez les plantes peu de temps après (Llave et al., 2002; Reinhart et al., 2002). Les connaissances sur le sujet ont depuis explosé et chaque jour permet de découvrir de nouveaux aspects de ce monde.

Chez les plantes, il n'existe à ce jour que deux classes de petits ARNs qui ne codent pas pour des protéines : les microRNAs (miRNAs) et les siRNAs (pour small interfering RNAs). Ils dérivent tous de petits hétéroduplexes de 21 à 24 nucléotides de long mais leurs rôles diffèrent (Parent et al., 2012). Les microRNAs et les 21nt siRNAs contrôlent de manière post transcriptionnelle l'expression de gènes (on parle de post transcriptional gene silencing ou PTGS) en s'hybridant avec les ARNs codants alors que les 24nt siRNAs contrôlent directement la transcription de gènes (transcriptional gene silencing ou TGS) en induisant des modifications de la chromatine. Les 24nt siRNAs sont largement majoritaires dans la cellule par rapport aux 21nt siRNAs. Ces mécanismes de régulations sont conservés chez la levure, la mouche ou la drosophile, bien que des spécificités demeurent (Castel and Martienssen, 2013). Les siRNAs interférents sont issus d'ARNs double brins qui sont clivés par des protéines appelées DICER-like (ou DCL) en petits ARNs de 21 à 24 nucléotides.

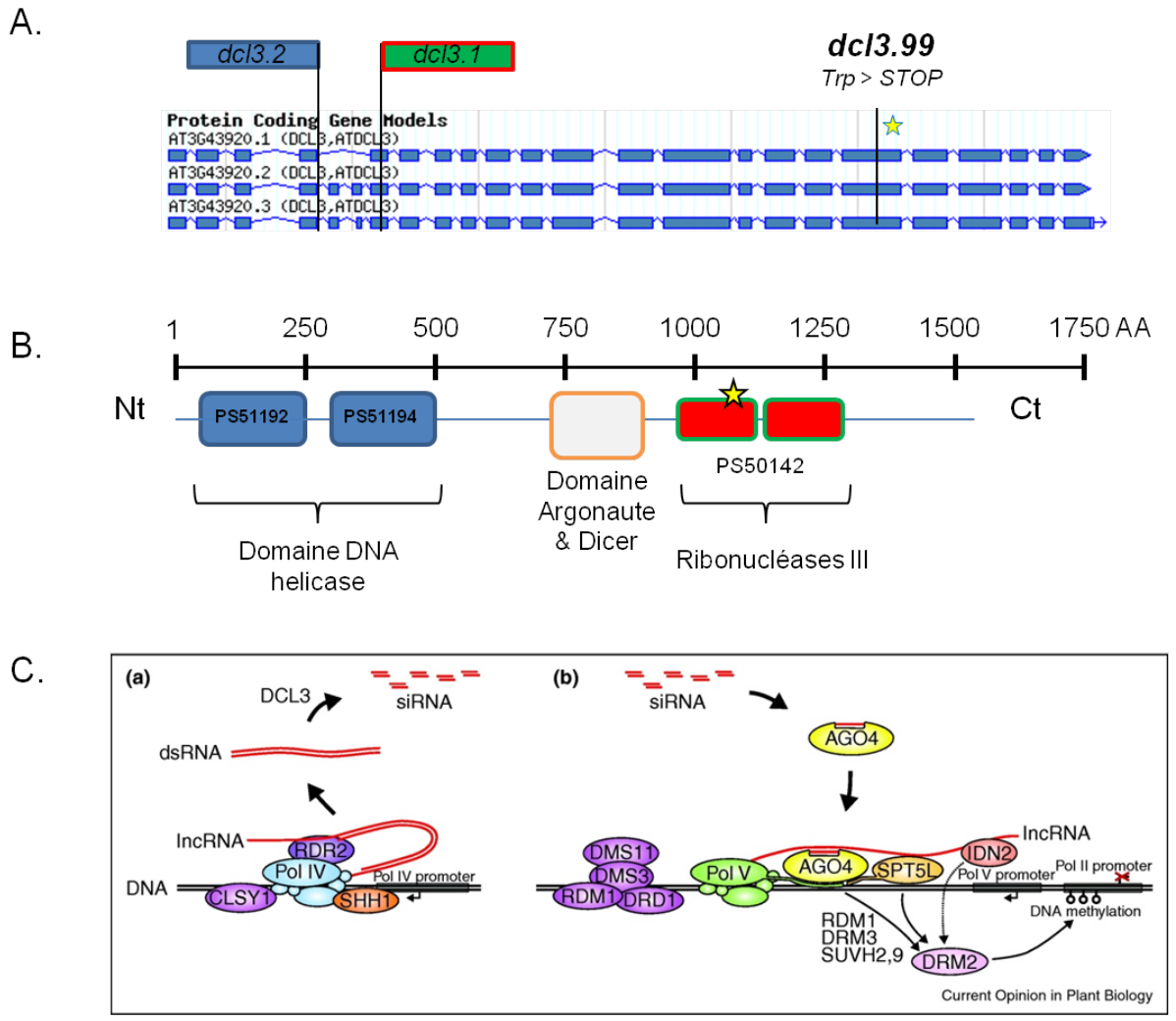


Figure 40 – DCL3 et la voie RdDM

Présentation de la structure du gène et la position des différents mutants utilisés au cours de ma thèse (a). Schéma montrant les différents domaines recensés dans la protéine DCL3 (b). Schéma de la voie RdDM dans laquelle DCL3 joue un rôle prépondérant puisqu'il est responsable du clivage des ARNs doubles brins (dsRNA dans le schéma) (c).

Source schéma C : (Wierzbicki, 2012)

Ensuite, selon leurs tailles, ils sont utilisés dans diverses voies et participent à la régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle de l'expression de gènes cibles.

Les DICER like (ou *DCL*) forment un groupe monophylétique spécifique aux plantes. Chaque DCL possède une fonction distincte au sein de la plante que ce soit pour le métabolisme de miARNs (*DCL1*), la résistance virale (*DCL2*), la régulation épigénétique (*DCL3*) et le métabolisme des tasiARNs (*DCL4*). Toutefois, des complémentarités fonctionnelles pourraient expliquer l'absence de phénotype fort chez les simples mutants (Henderson et al., 2006).

La protéine DCL3

DCL3 a été caractérisée comme étant responsable de la production des 24nt siARNs chez *Arabidopsis* (Xie et al., 2004). Toutefois, les mutants d'insertion *dcl3.1* (banque SALK) et *dcl3.2* (banque Wisconsin) ne présentent pas de phénotype. La protéine DCL3 est une protéine de 1580 acides aminés (pour l'isoforme 2) et possède plusieurs domaines protéiques (Fig. 40.A et B). Deux domaines hélicases sont présents dans la région N-terminale de la protéine. Les hélicases sont des protéines qui utilisent l'énergie d'hydrolyse de l'ATP ou du GTP pour catalyser l'ouverture d'acides nucléiques appariés sous forme double brins. Un domaine de fonction inconnue mais spécifique aux protéines ARGONAUTEs et DICERs est identifié au centre de la séquence protéique. Enfin, la région C-terminale contient deux domaines ribonucléase III successifs. Les ribonucléases III sont capables de cliver et digérer de l'ARN double brin (Fig. 40.B). Les protéines DICER ont donc la capacité de cliver des ADNs double brins en petits fragments. La mutation *dcl3.99* se trouve dans le premier domaine ribonucléase ce qui laisse entendre que dans le fond *dcl3.99*, on a bien une perte de fonction pour le gène *DCL3*.

DCL3 est localisée dans le noyau. Les mutants nuls *dcl3* sont incapables de produire les 24nt siARNs et DCL3 a été caractérisée comme étant une protéine capable de cliver les ARNs double brins en fragments de 24 nucléotides de longs (Xie et al., 2004). Ces fragments ont la capacité d'induire la mise en place de marques épigénétiques. Toutefois, le mutant *dcl3.1* ne présente pas de phénotype (Xie et al., 2004). La voie de signalisation impliquée dans ce processus a été appelée RdDM (pour RNA directed DNA methylation). Cette fonction particulière de DCL3 était déjà acquise chez la mousse modèle *Physcomitrella patens* (Cho et al., 2008).

La voie RdDM

La fonction de la voie RdDM est à ce jour majoritairement liée au maintien de l'extinction de l'expression de transposons. Toutefois, des modifications d'expressions de gènes codant pour des protéines ont été montrées comme étant régulées par la voie RdDM (Jia et al., 2009; Zemach et al., 2013).

La voie RdDM commence par la synthèse de longs ARNs non codants (lncRNA) par le complexe Pol IV, qui est une ARN polymérase spécifique des plantes (Fig 40.C). Les mécanismes contrôlant Pol IV impliquent différents partenaires protéiques. En particulier, la protéine à homéodomaine SHH1 (SAWADEE HOMEODOMAIN HOMOLOG 1) semble nécessaire au recrutement de Pol IV aux loci génomiques portant une combinaison donnée de marques histones. La protéine à domaine SNF2, CLASSY1 (CLSY1) et la protéine RNA-dependent RNA polymerase 2 (RDR2) agissent respectivement dans le contrôle de l'activité de Pol IV ou la synthèse d'un ARN double brin à partir du lncARN. *DCL3* agit en aval du complexe Pol IV et coupe les ARNs double brins produits en petits fragments de 24 nucléotides de long, les 24nt siARNs.

Ces 24nt siARNs sont ensuite fixés par ARGONAUTE 4 (AGO4)(Fig. 40.C). Le couple AGO4-siARN peut ensuite s'hybrider par similarité de séquence du siARN avec un lncARN synthétisé par une autre polymérase spécialisée de plante, la polymérase V (Pol V). AGO4 a aussi la capacité d'interagir avec Pol V (Wierzbicki, 2012). En effet, Pol V produit des transcrits à partir de l'ADN sous forme de lncARNs liés à différentes protéines de liaison à l'ARN. La présence et l'activité de Pol V au niveau de la région à méthyler est dépendante d'un complexe multi-protéique impliquant des protéines de méthylation de l'ADN telles que RDM1 ou DMS3. La présence combinée d'AGO4-siARN et de Pol V permet le recrutement de méthyltransferases (DRM2, CMT3) qui procèdent à la mise en place de marques épigénétiques (Law and Jacobsen, 2010).

La méthylation de l'ADN induit ensuite l'inhibition de l'expression du gène ciblé pour la modification de l'état chromatinien. Comment la méthylation *de novo* fonctionne et quels sont les mécanismes de régulation qui la sous-tendent font à ce jour encore partie des questions non résolues concernant la voie RdDM. C'est donc la reconnaissance et l'hybridation des siARNs apportés par AGO4 avec les lncARNs qui permettent de cibler le locus qui va subir la méthylation ; les autres acteurs font partie de la machinerie de méthylation. Le fait que dans le fond *dcl3.99*, ss12k, le phénotype résultant de l'inactivation d'ABP1 soit supprimé suggère que les ARNs interférents régulent l'expression d'un gène ou de gènes agissant sur la voie de signalisation en aval d'ABP1.

De manière assez intrigante, les mutants de la voie RdDM ne sont pas connus pour présenter des phénotypes. Toutefois, étant donné l'importance de cette voie pour le contrôle de l'extinction de l'expression des transposons, il faut se méfier de l'apparition de phénotypes au fil des générations.

L'épigénétique regroupe l'ensemble des modifications post-traductionnelles de la chromatine ou de protéines agissant sur la chromatine (comme les histones) qui agissent sur l'expression de gènes sans modifications de la séquence nucléotidique. Ces marques épigénétiques induisent une modification de l'état chromatinien qui impacte directement l'activité transcriptionnelle du gène. L'hyperméthylation de l'ADN est corrélé avec une inhibition de l'expression des gènes de la région. Les histones sont des protéines qui interagissent avec l'ADN et permettent la compaction/le relâchement de la chromatine. Elles sont la cible privilégiée des marques épigénétiques et le degré d'acétylation ou de méthylation de certaines de leurs lysines influence directement sur la compaction de l'ADN. Pour exemple la diméthylation de l'histone H3 sur les lysines 9 (H3K9me) ou 27 (H3K27me) est liée à l'inhibition de l'expression des gènes (Vaillant and Paszkowski, 2007). DCL3 via la voie RdDM est donc impliquée dans la mise en place et le contrôle de ces marques épigénétiques et inhibe ainsi l'expression de gènes.

Toutefois, d'autres rôles biologiques peuvent être attribués aux protéines DICER. On ne peut exclure que la suppression du phénotype ss12k par *dcl3.99* soit du à un déficit de production de siARNs. Il a en effet été récemment montré que DCL4 pouvait intervenir dans la terminaison de la transcription (Liu et al., 2012). Ce nouveau rôle a été découvert pour le gène d'Arabidopsis *FCA*, qui code une protéine de liaison à l'ARN qui induit le « silencing » du régulateur de floraison FLOWERING LOCUS C (FLC). Il a été montré que DCL4 interagissait directement dans la région 3' chromatinienne de FCA pour cliver le transcrit naissant en aval du site de polyadénylation quand la terminaison de la transcription n'a pas lieu notamment en raison d'une région poly(A) trop courte. En l'absence de DCL4, un phénomène appelé « read through » amène à un transcrit dont la région 3' est anormalement longue. Ces « read throughs » provoquent un silencing du gène FCA par ARN interférent. Il s'agit donc d'un mécanisme de contrôle de la qualité des transcrits ; DCL4 ayant pour rôle de se fixer sur ces ARNs anormaux et de les digérer (Liu et al., 2012).

Ce nouveau rôle de *DCL4* soulève la question de l'universalité possible d'un tel mécanisme pour les autres protéines DICER et avec quelle spécificité de cible ce processus est-il opérationnel? En particulier, on peut se demander si DCL3 pourrait jouer un rôle biologique du même ordre et agir autrement que par la production de 24nt siARNs. Mais reste à savoir quelles seraient les cibles potentielles et quel serait le mécanisme sous-jacent ?

Quelque soit la réponse à cette question, il restera à comprendre le mécanisme qui conduit la perte de fonction de DCL3 à induire la restauration de croissance des plantes inactivées pour ABP1.

Une caractérisation de la lignée suppressive permettra peut-être de mieux envisager cette énigme. Ainsi une analyse phénotypique préliminaire est présentée dans la partie suivante et sera discutée. Les réponses moléculaires et physiologiques de *dcl3.99* ont été comparées à celles des plantes inactivées ou non pour ABP1.

Comme exposé précédemment, les plantes inactivées pour ABP1 ne présentent pas que des altérations du développement des plantules à l'obscurité. Au contraire, l'inactivation d'ABP1 affecte le développement des plantes à tous les stades du développement et des effets délétères ont été rapportés en particulier sur la croissance racinaire où ABP1 est nécessaire à la division cellulaire et au maintien du méristème de la racine primaire (Tromas et al., 2009). Le laboratoire a récemment montré que la voie $SCF^{TIR/AFBs}$ était située en aval d'ABP1 et qu'ABP1 assurait la répression de réponses transcriptionnelles en contrôlant la durée de vie des répresseurs Aux/IAAs. Les outils permettant d'affiner l'analyse de ces paramètres ont été introgressés dans les plantes *dcl3.99,* ss12k de façon à mieux comprendre l'implication de la perte de fonction de DCL3 dans la suppression du phénotype lié à l'inactivation d'ABP1. Leur exploitation n'a pu être menée en totalité dans le temps imparti de cette thèse mais le matériel est disponible pour des études à venir.

N.B : la lignée 99 est un double mutant *dcl3.99*, ss12k. Les deux nomenclatures peuvent donc être utilisées dans le manuscrit. La mention *dcl3.99*, fait référence à une plante *dcl3.99*, ss12k sans induction éthanol. L'obtention de la plante homozygote *dcl3.99* dépourvue de la construction ss12k sera discutée.

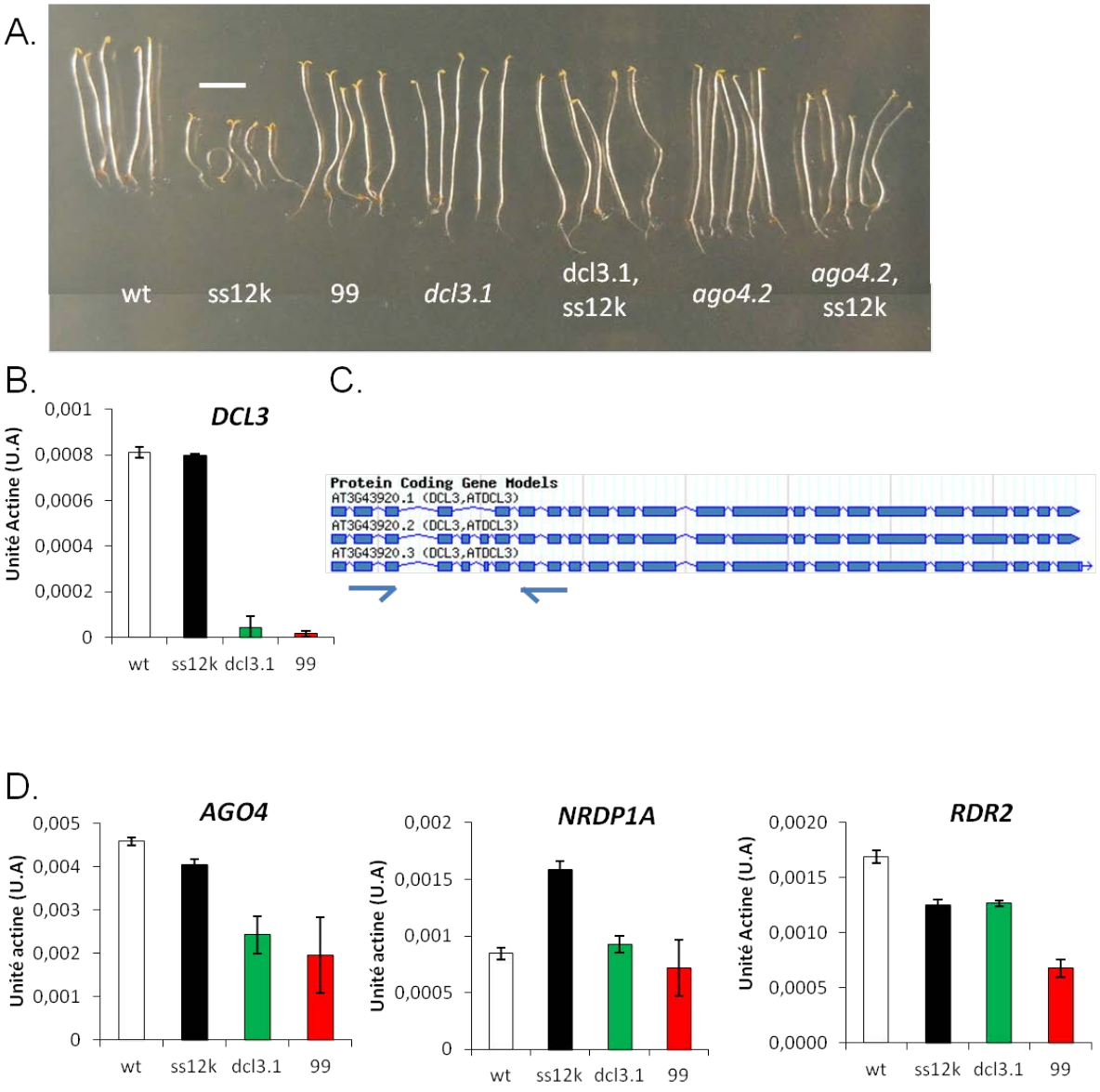


Figure 41 – Implication de la voie RdDM dans la suppression du phénotype ss12k

Phénotypes des différentes combinaisons de mutants de la voie RdDM (ago4.2, dcl3.1, dcl3.99) avec les plantes conditionnelles pour ABP1 (a). Données de qRT-PCR montrant le niveau d'expression de *DCL3* dans le fond sauvage (blanc), inactivé pour ABP1 (noir), *dcl3.1* (vert) et 99 (rouge) de plantes induites par l'éthanol (b). Le modèle du gène *DCL3* permet de voir la zone amplifiée par les amorces pour la qRT-PCR (c). Enfin l'expression d'acteurs importants de la voie RdDM a été testée (c) dans les mêmes fonds génétiques qu'en (b).

Résultats

Implication de la voie RdDM

Pour savoir si la suppression du phénotype lié à l'inactivation d'ABP1 est due à la fonction connue de *DCL3* ou à une autre fonction biologique, j'ai entrepris de croiser la lignée ss12k avec un des mutants de la voie RdDM. D'après la bibliographie, AGO4 est un partenaire privilégié de DCL3. La protéine AGO4 a pour rôle de lier les 24nt siARNs générés par DCL3 et de les d'acheminer au niveau la région à méthyler où elle interagit avec polV (Wierzbicki, 2012). Le mutant *ago4.2* est un mutant EMS dont la mutation induit un changement d'acide aminés (E>K). *ago4.2* est une mutation dominante négative qui possède le même phénotype que le mutant récessif *ago4.1*. Il a été caractérisé comme étant un mutant hypersensible à l'infection par *Pseudomonas syringae* mais ce phénotype ne semble pas lié à la voie RdDM (Agorio and Vera, 2007). J'ai donc procédé à un croisement entre les lignées *ago4.2* et ss12k afin de voir si le double homozygote présentait le phénotype de suppression observé dans la lignée *dcl3.99, ss12k*. Après sélection du double homozygote (Fig. 41.A), j'ai constaté que la lignée *ago4.2*, ss12k induite par l'éthanol présentait une suppression du phénotype lié à l'inactivation d'ABP1 similaire à celle observée dans la lignée suppressive 99 et les lignées *dcl3.1*, ss12k et *dcl3.2*, ss12k (Fig41. A) alors que les mutants simples de la voie RdDM étaient similaires à un sauvage. La similarité de la suppression partielle du phénotype d'inactivation d'ABP1 dans le fond mutant *ago4.2* indique que la voie RdDM est impliquée dans la suppression du phénotype lié à l'inactivation d'ABP1.

Afin de confirmer l'implication de cette voie et son importance vis-à-vis de la signalisation en aval d'ABP1, j'ai entrepris de croiser les plantes ss12k avec d'autres mutants de type perte de fonction pour des acteurs spécifiques de la voie RdDM comme par exemple *nrpd1a4*. *NRPD1A4* code pour une sous unité du complexe protéique pol IV qui est la RNA polymérase responsable de la synthèse du double brin d'ADN (Law and Jacobsen, 2010). Ces gènes interviennent donc respectivement dans les étapes en amont de DCL3 et en aval de DCL3 et AGO4. D'autre part des croisements avec des acteurs spécifiques d'autres voies impliquant des ARNs non codants, comme la voie des miARN ou des tasiARN qui feront, je l'espère, office de contrôle négatifs. Ces croisements ont été initiés il y a peu mais l'analyse de leur ségrégation me permettra d'affirmer avec conviction que la perte de fonction de la voie RdDM est impliquée dans la suppression du phénotype lié à l'inactivation d'ABP1. Ce qui constitue un résultat tout à fait original et ouvre des perspectives de recherches excitantes.

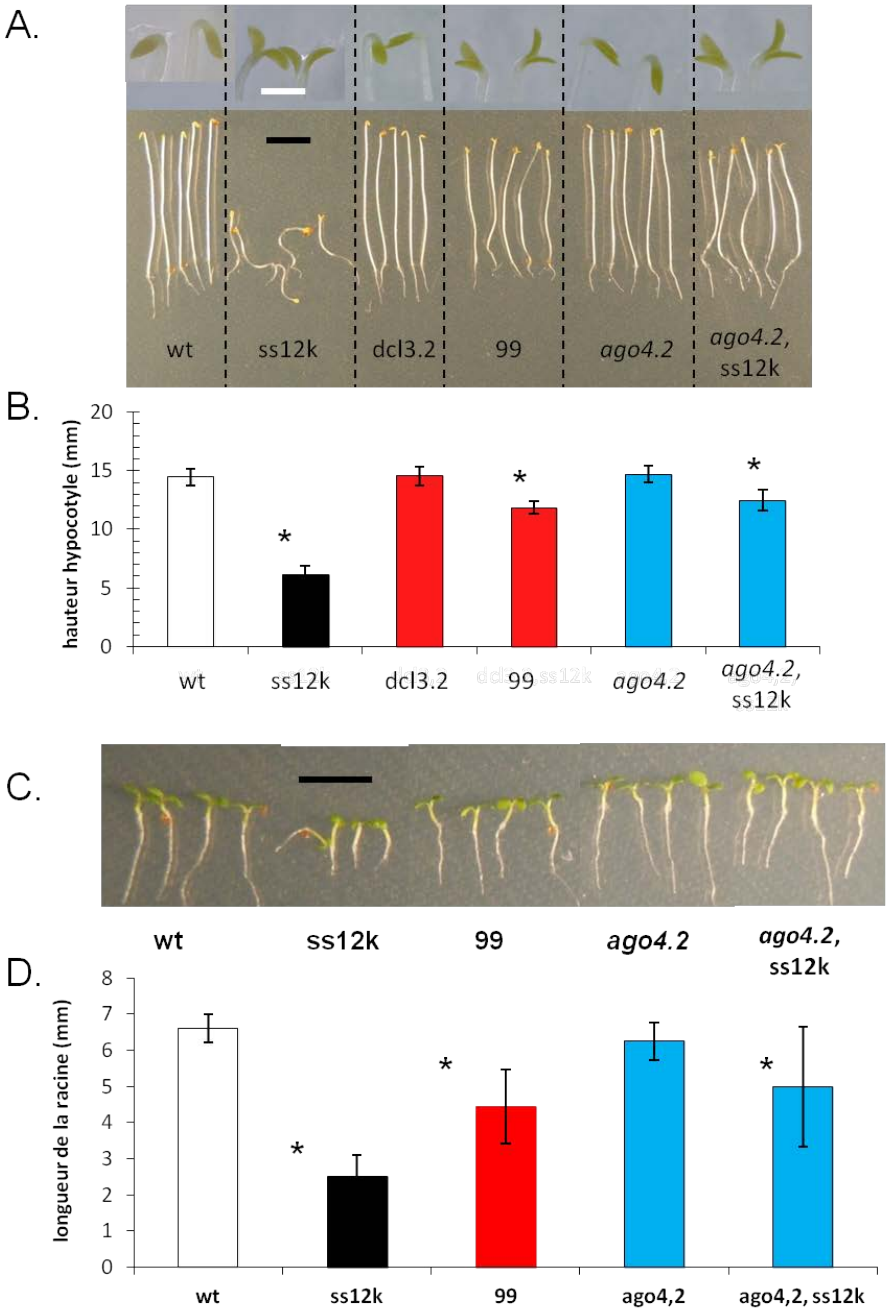


Figure 42 - phénotype des plantes 99

Photos (A) et quantification (B) des hypocotyles ayant poussés à l'obscurité dans les fonds sauvage (blanc), inactivé pour ABP1 (noir) muté pour DCL3 (rouge) ou pour AGO4 (bleu). Mesures des racines (n<25) à partir des photos. Phénotype des plantules de quatre jours ayant poussés sous lumière continue (C) et mesures de la racine primaire (D). Mesures faites sur n>15.

*= p> 0.1. Barre d'échelle noire = 5mm / blanche = 1mm

En résultats préliminaires, j'ai testé l'expression de gènes clés de la voie RdDM. Bien évidemment, dans le fond *dcl3.1* et dans la lignée *99*, l'expression de *DCL3* a disparu (Fig. 41.B). L'analyse des courbes de fusion chez le sauvage et les plantes ss12k laisse entendre qu'une seule isoforme est exprimée mais je n'ai pas encore pris le temps de me pencher sur cette question. Il est toutefois intéressant de noter que l'inactivation d'ABP1 ne modifie pas l'expression de DCL3. Concernant les autres acteurs de la voie, la perte de fonction d'ABP1 semble affecter légèrement l'expression de NRDP1A4 et de RDR2 (Fig. 41.C). Dans le fond *dcl3.1* ainsi que dans le fond 99, on remarque une légère baisse de l'expression des trois acteurs de la voie RdDM. Des différences d'expression des acteurs de la voie RdDM ont déjà été observées dans le mutant *rdr2* lorsque l'un des gènes de la voie est dérégulé (Jia et al., 2009). Compte tenu du phénotype des plantes inactivées pour ABP1 et de celui des plantes *dcl3.1* (similaire au sauvage), on ne peut pas attribuer le phénotype de dé-étiolement aux variations d'expression des acteurs de la voie RdDM. La démonstration de l'implication de la voie RdDM rend la caractérisation de la lignée 99 d'autant plus intéressante puisque, outre la caractérisation de cette lignée, on peut ainsi espérer, *via* l'analyse du phénotype de la lignée suppressive, comprendre l'implication de la voie RdDM dans la voie de signalisation en aval d'ABP1.

Caractérisation préliminaire de la lignée dcl3.99, ss12k

Le phénotype à l'obscurité est la base du crible suppresseur qui a permis l'isolement de l'allèle *dcl3.99*. La quantification de la taille des hypocotyles a confirmé les premières observations faites sur la lignée 99. A l'obscurité, les plantes sauvages, *dcl3.1* ou *ago4.2*, ne présentent pas de différence que ce soit au niveau de la taille ou de l'agravitropisme. Les cotylédons sont toujours fermés et la crosse apicale est bien présente. Lorsque l'on compare les plantes *dcl3.2* et *ago4.2* aux plantes *dcl3.2*, ss12k et *ago4.2*, ss12k, on constate que l'aspect général des plantules diffère (Fig. 42 A et B). Les hypocotyles sont statistiquement plus petits de 15 à 20% et présentent toujours un léger agravitropisme qui n'est à ce jour pas quantifié. Quant au dé-étiolement, on constate que bien que différent de celui observé dans les plantes ss12k, on ne peut parler de réversion totale. Les cotylédons semblent plus petits, ils sont seulement entrouverts et la crosse n'a pas totalement disparu mais ces observations devront être faites plus finement sur un grand nombre de plantules afin de conclure avec précision sur ce point (Fig. 42.A et B).

L'observation du phénotype à la lumière de ces différents mutants est un point essentiel de la caractérisation de la suppression du phénotype ss12k dans la lignée 99. Il se trouve que comme à l'obscurité, la lignée 99 présente une restauration partielle du phénotype ss12k, que ce soit au niveau de la racine ou de l'épinastie des cotylédons (typique de l'inactivation d'ABP1) (Fig 42.C). Toutefois les longueurs de racine ont des tailles assez variables (Fig 42.D). La suppression du phénotype à la lumière indiquerait que la voie RdDM n'est pas juste liée à la signalisation dépendante d'ABP1 dans l'hypocotyle étiolé mais que cette interconnexion des deux voies concernerait plus largement les effets liés à l'inactivation d'ABP1 dans plusieurs organes. La pléiotropie de cette connexion est une donnée intéressante.

La comparaison des plantes 99 avec la lignée *ago4.2*, ss12k permet d'éliminer l'hypothèse que le phénotype racinaire, quelque peu variable, observé dans la lignée 99 soit du à la présence d'une mutation parasite puisque les deux lignées présentent les mêmes tailles de racines et la même variabilité. Cette variabilité pourrait s'expliquer par un effet seuil de la mutation ou des mécanismes de compensation. Il faut également prendre en compte, que contrairement à l'étiolement de l'hypocotyle qui ne requiert que l'expansion cellulaire, le développement de la racine primaire est le fruit de la division, de l'endoréplication et de l'expansion. Dans chaque plantule la balance entre ces trois phénomènes peut donc conduire à une certaine hétérogénéité de phénotypes.

La réponse à l'auxine de la lignée 99

Résistance à l'auxine

Nous savons que, contrairement à la plantule sauvage qui est sensible à l'auxine, la plantule ss12k est résistante à l'auxine que ce soit dans le modèle de l'hypocotyle ou de la racine primaire. J'ai donc testé la résistance à l'auxine de la lignée 99 afin de voir si la suppression du phénotype s'accompagnait d'une restauration de la sensibilité à l'auxine (Fig. 43.A et B). J'ai bien entendu pris en compte les sensibilités différentielles des deux tissus pour ce test, les racines étant beaucoup plus sensibles. Dans les deux conditions, la lignée *dcl3.1* a servi de contrôle pour voir l'influence de la perte de fonction de DCL3 sur la sensibilité à l'auxine. Il s'avère que la perte de fonction du gène *DCL3* n'induit pas de résistance à l'IAA. Les deux lignées suppressives du phénotype ss12k utilisées dans ce test, les lignées 99 et *dcl3.1*, ss12k possèdent une sensibilité à l'auxine proche de celle du sauvage au niveau de la racine ou de l'hypocotyle étiolé (Fig. 43.A et B).

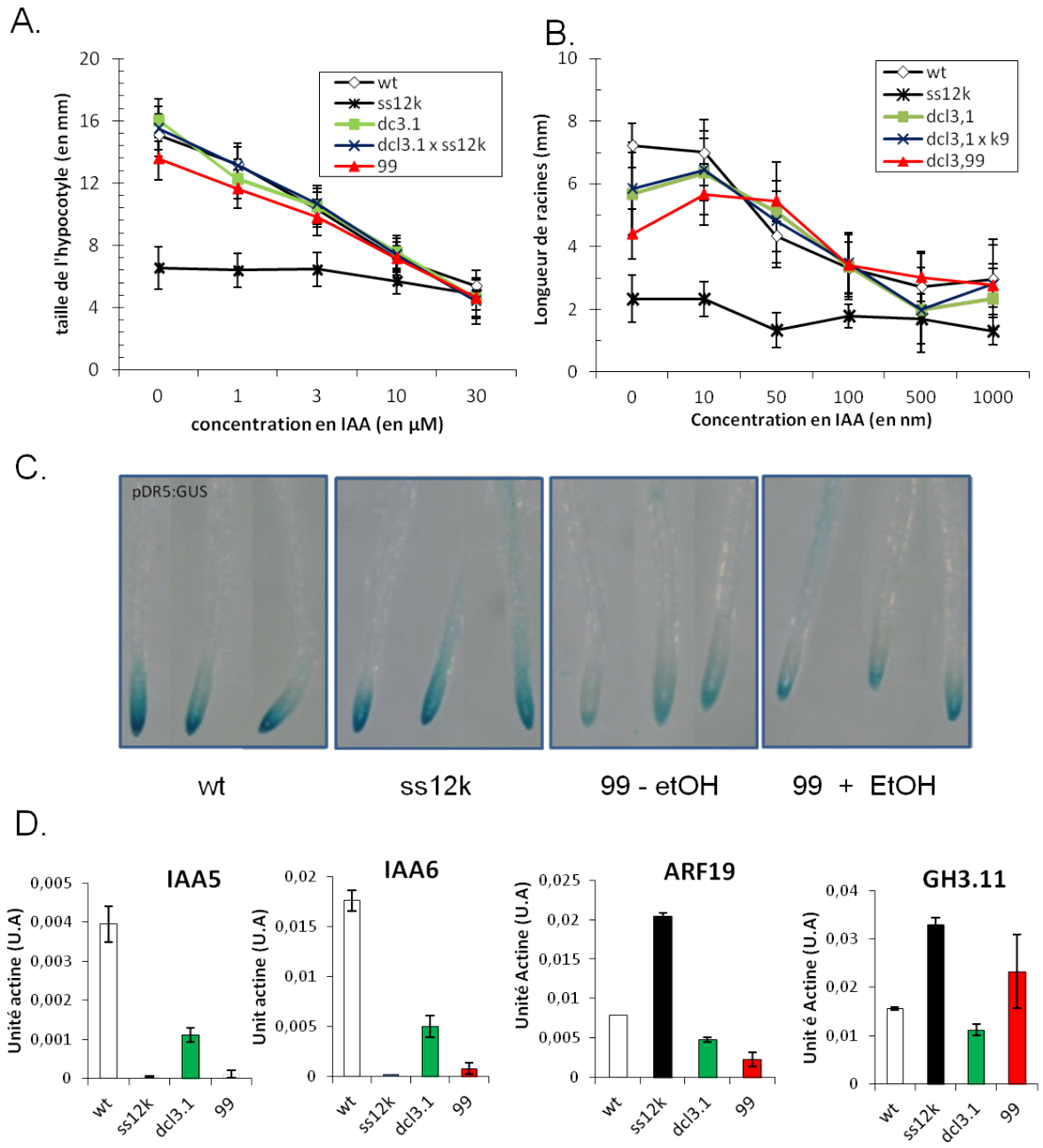


Figure 43 – analyse de la sensibilité à l'auxine de la lignée 99

Test de la sensibilité à l'auxine sur les hypocotyles de plantules ayant poussé à l'obscurité (a) ou de racines ayant poussé sous lumière continue en conditions d'inactivations (b). L'expression du marqueur proDR5:GUS a été testé afin d'observer la capacité de réponse maximale à l'auxine (c). Une analyse préliminaire de l'expression de gènes de réponse à l'auxine a été effectuée dans le fond sauvage (blanc), inactivé pour ABP1 (noir), muté pour DCL3 (vert) ou dans la lignée suppressive 99 (rouge).

En condition contrôle, la longueur de la racine des deux lignées est, comme préalablement signalé inférieur à celle du sauvage (Fig.43 B). Les faibles concentrations d'auxine augmentent la taille de leurs racines primaires ce qui leur permet d'obtenir une taille similaire à celle du sauvage à partir de 50 nM d'IAA. La sensibilité des suppresseurs aux autres auxines (2,4-D, NAA…) fait partie des perspectives à courts termes.

Capacité de réponse auxinique

La construction proDR5:GUS est un outil permettant d'estimer la capacité de réponse maximale à l'auxine de la plante (Ulmasov et al., 1997). Le promoteur DR5 est une juxtaposition des domaines sur lesquels les ARFs se fixent (AuxRE). Ce marqueur permet donc de savoir si la cellule/le tissu est capable de répondre à l'auxine mais ne permet pas une estimation du contenu en auxine. Il s'agit néanmoins d'un marqueur très utilisé dans la communauté scientifique et qui donne une première approximation des maxima de réponse à l'auxine. Dans les plantes ss12k, il a déjà été montré que l'expression de ce marqueur n'était pas significativement modifiée dans la racine (Fig. 43.C).

Dans la lignée 99, avec ou sans inactivation d'ABP1, on constate une relative diminution du rapporteur GUS à la pointe de la racine (Fig. 43.B). Ce résultat suggère une diminution de la réponse à l'auxine à la pointe de la racine dans les plantes dépourvues de *DCL3* fonctionnelle et cela indépendamment d'ABP1. Toutefois, il est important de rappeler que les plantes *dcl3.99 ou dcl3.1* répondent à l'application d'auxine exogène en terme d'inhibition de croissance de la racine et de l'hypocotyle (Fig. 43.A). Il serait intéressant de tester le profil de proDR5:GUS avec un temps de révélation plus court et également de tester la réponse en présence d'auxine exogène (temps court). Alternativement une construction proDR5:GFP a été introgressée dans ces plantes.

Expression de gènes

Afin de savoir si les réponses transcriptionnelles de gènes de réponse à l'auxine était également reversée dans la lignée 99, j'ai testé quelques uns d'entre eux parmi ceux connus pour être dérégulés dans les plantes ss12k. Dans les jeunes plantules à la lumière, il a été montré que *IAA5* et *IAA6* étaient fortement réprimés dans le fond ss12k. Il en est de même dans les plantules ss12k à l'obscurité. Pour la plante 99, on remarque que ces niveaux sont similaires à ceux observés dans les plantes ss12k (Fig. 43.D). Il est à noter que l'accumulation des ARNm *IAA5* et *IAA6* est également réduite dans le mutant *dcl3-1* seul. Il n'est donc guère surprenant qu'il n'y ait pas de restauration de l'expression de ces deux gènes dans la lignée 99. Le cas est différent pour les deux gènes dé-réprimés lors de l'inactivation d'ABP1, *ARF19* et *GH3.11*. La mutation DCL3 réduit faiblement l'expression de ces gènes par rapport aux plantules sauvages, en revanche dans le fond 99 l'expression est réduite par rapport à ss12k. Pour *ARF19*, l'accumulation des messagers est même inférieure au sauvage et à *dcl3-1* alors qu'elle reste intermédiaire pour *GH3.11* (Fig. 43.D). Pour ces deux gènes, il y a donc restauration de l'expression en même temps que la suppression du phénotype. Ces premières indications laissent penser que les gènes inhibés par l'inactivation d'ABP1 restent à des niveaux comparables à ceux observés dans la plante ss12k alors que les niveaux d'expression des gènes déréprimés dans le fond ss12k retrouvent un niveau plus proche de celui du sauvage. Toutefois, je me garderai bien de tirer des conclusions de ces résultats compte tenu du faible nombre de gènes testés. La disparité de comportements me pousse à vouloir approfondir les analyses d'expression avec d'autres gènes.

La stabilité des Aux/IAAs

L'utilisation de la construction proHS:AXR3NtGUS est utilisée couramment pour analyser la stabilité des Aux/IAAs. Il s'agit d'une protéine de fusion constituée de la partie amino terminale de l'IAA17 (qui regroupe le domaine I et le dégron) qui est fusionnée à la glucuronidase. On obtient alors un marqueur dont la durée de vie dépend de la voie $SCF^{TIR/AFBs}$ pour sa dégradation mais qui ne perturbe pas la signalisation de l'auxine car il ne peut interagir avec les Aux/IAAs ou les ARFs (Gray et al., 2001). L'expression inductible, par choc thermique, permet de s'affranchir de la régulation par l'auxine de l'IAA17 et ainsi de suivre la dégradation de ce marqueur au cours du temps soit par fluorimétrie soit par coloration des tissus. Cette construction a également déjà été étudiée dans le

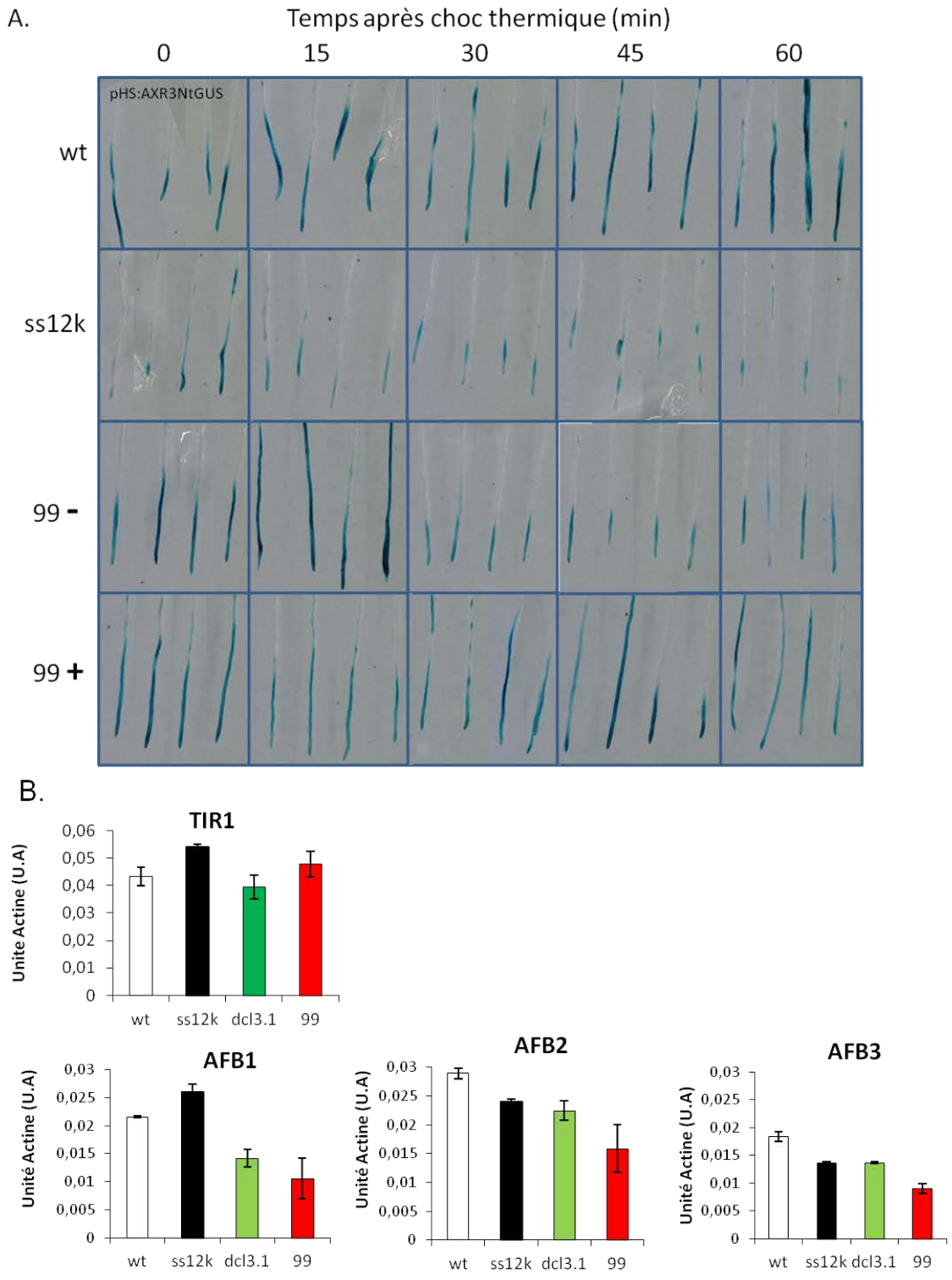


Figure 44 – Test de l'homéostasie de système $SCF^{TIR/AFBs}$ – Aux/IAAs

Coloration GUS de racine de plantules de 4 jours ayant poussés à la lumière et ayant subit un choc thermique permettant l'expression du marqueur de la stabilité des Aux/IAAs, la construction pHS:AXR3Nt-GUS (A). L'expression des transcrits de certains TIR/AFBs a été testé dans les fonds inactivées pour ABP1 et/ou muté dans le gène *DCL3* (b).

fond inactivé pour ABP1 et a permis de montrer que la demi vie des Aux/IAAs était considérablement réduite dans le fond ss12k (Tromas et al., 2013, en révision, en annexe). Dans cette expérience, on retrouve cette différence de stabilité du marqueur AXR3NtGUS entre le sauvage et les plantes ss12k (Fig 44.A). Dans un premier temps, la comparaison de la lignée 99 sans inactivation éthanol avec les contrôles montre que la mutation *dcl3.99* n'impacte pas significativement sur la stabilité du marqueur. Toutefois, en présence d'éthanol, et donc lorsqu'ABP1 est inactivée, la stabilité des Aux/IAAs ne semble pas diminuée comme dans ss12k. Une heure après la fin du choc thermique, la protéine marqueur est toujours présente, ce qui montre qu'à ce niveau, il y aurait restauration de la stabilité du marqueur pouvant si elle se confirme expliquer le phénotype de suppression comme dans le fond triple mutant *tir1, afb2, afb3* (Fig. 43.A).

Les colorations GUS fournissent des données qualitatives et une forte variabilité de marquage est observée entre les racines d'un même génotype (quelque soit le génotype). Une quantification plus précise d'AXR3NtGUS dans les racines sera prochainement réalisée à partir d'un nombre élevé de plantules par fluorimétrie afin de confirmer la restauration de la stabilité de AXR3NtGUS .La répétition de cette expérience permettra d'avoir une indication solide sur la stabilité des Aux/IAAs dans la lignée 99 et ainsi de confirmer si dans la lignée 99 la mutation nulle pour *DCL3* agit sur l'homéostasie des Aux/IAAs. Cette expérience présente la stabilité des Aux/IAAs sans ajout exogène d'auxine. Elle ne reflète que la stabilité des Aux/IAAs dans les différents génotypes avec les concentrations endogènes en auxine. Si l'augmentation de stabilité est confirmée dans la lignée 99, il sera alors intéressant d'étudier la stabilité du marqueur avec l'ajout d'auxine.

L'expression des $SCF^{TIR/AFBs}$

Je vous ai déjà présenté les résultats montrant la suppression du phénotype ss12k dans le fond *tir1.1, afb2.1, afb3.1*, ss12k (cf Résultats Partie I). Les corécepteurs nucléaires de l'auxine sont des acteurs majeurs de la signalisation de l'auxine à laquelle participe ABP1. J'ai donc regardé l'expression des quatre principaux AFBs dans le fond 99. *TIR1*, *AFB2* et *AFB3* étant la cible de miR393, j'ai utilisé des amorces qui entourent le site de fixation du miR393 permettant ainsi de s'assurer que la quantification des transcrits correspond aux ARNm pleine longueur et pas au 3' résiduel après l'action de miR393 (Navarro et al., 2006; Parry and Estelle, 2006). Dans le fond ss12k, on remarque de légères fluctuations d'expressions pour les quatre gènes analysés (Fig 44.B). Dans le fond *dcl3.1*, l'expression d'*AFB1*, *AFB2* et *AFB3* est légèrement inférieure à celle du sauvage mais *TIR1* n'est pas significativement modifié. Compte tenu du phénotype macroscopique des plantes *dcl3.1* à

l'obscurité, similaire à celui des plantes Col0, on peut déjà dire que ces modifications d'expression des TIR1/AFBs ne permettent pas d'expliquer le phénotype typique des plantes inactivées pour ABP1. Dans le fond 99, l'expression de *TIR1* n'est toujours pas modifiée alors que pour les trois gènes *AFBs* testés, on observe une diminution de 20 à 25% de leur expression par rapport à *dcl3.1*. Même si cette diminution est significative, elle reste modérée et l'expression de TIR1 n'est pas modifiée. Cette diminution ne peut, à mon sens, expliquer la restauration de la stabilité d'AXR3NtGUS et la suppression du phénotype. Bien que leur rôle dans la signalisation de l'auxine reste encore très flou, il faudra poursuivre cette analyse en étudiant également l'expression d'*AFB4* et *AFB5*, d'autant qu'ils semblent jouer un rôle dans la croissance de l'hypocotyle au moins à la lumière (Greenham et al., 2011).

Bien qu'il s'agisse de résultats préliminaires, nous pouvons tirer quelques conclusions de ces expériences. Ainsi la stabilité du marqueur AXR3NtGUS dans la lignée 99 est proche de celle du sauvage. La faible diminution d'expression des gènes AFBs testés ne semble pas suffir pour expliquer la restauration de la stabilité de AXR3NtGUS dans la lignée 99, en particulier parce que TIR1 n'est pas altéré. En accord avec une restauration de la stabilité des Aux/IAAs, les deux gènes de réponse à l'auxine ARF19 et GH3.11 dont l'expression est accrue dans ss12k sont restaurés dans la lignée 99. En revanche, l'expression des gènes IAA5 et IAA6, fortement réprimés dans ss12k n'est pas restaurée dans 99, ce qui suggère que la régulation de ces gènes échappe au simple modèle de régulation transcriptionnelle dépendante de la voie $SCF^{TIR1/AFBs}$. Avec ou sans éthanol, la lignée 99 présente une diminution de l'intensité du marquage de la construction proDR5:GUS dans la racine ce qui soulève de nouvelles questions quant à l'influence de la perte de fonction de *DCL3* sur l'expression ou la stabilité de ce rapporteur. Enfin, en ce qui concerne la réponse à l'auxine, les plantules 99 répondent à l'auxine de manière assez similaire au sauvage que ce soit pour l'inhibition de l'élongation de l'hypocotyle ou l'inhibition de la croissance racinaire. La faible stimulation de croissance de la racine aux faibles concentrations d'AIA devra être confirmée pour 99.

Cette caractérisation doit clairement être consolidée et approfondie mais les premiers éléments permettent de dire que la plante 99 a récupéré une capacité de réponse à l'auxine proche de celle du sauvage. Le phénotype macroscopique de la lignée 99, la présence une heure après le choc thermique du marqueur AXR3NtGUS, la restauration de l'expression d'ARF19 et GH3-11 sont pour moi des arguments forts. Bien évidemment, l'analyse doit être poursuivie notamment en augmentant le nombre de gènes testés mais aussi en se penchant sur les réponses à l'auxine et les différences de coloration du marqueur proDR5:GUS.

Perspectives

Pour affiner cette analyse de réponse à l'auxine, j'ai entrepris d'utiliser la construction pro35S:dII-VENUS dans la lignée ss12k et 99. Il s'agit d'un outil qui a été produit selon la même démarche que le marqueur proHS:AXR3NtGUS mais n'a pas les mêmes propriétés (Brunoud et al., 2012). Pour DII-VENUS, seul le dégron de l'*IAA28* est couplé à une YFP modifiée (Venus). L'expression de ce marqueur est sous le contrôle d'un promoteur constitutif fort. Le fait d'avoir un fluorophore plutôt que la glucuronidase permet une étude au microscope confocal sur matériel vivant. De plus, l'expression constitutive fait que l'on peut ici procéder à des expériences où l'on peut tester la dynamique du système en analysant la perte de signal due à une dégradation du marqueur par la voie $SCF^{TIR/AFBs}$. Tout comme la construction proDR5:GUS, ce rapporteur ne permet pas de quantifier le contenu de la cellule en auxine. Dans ce cas, c'est la sensibilité du système TIR/AFBs dans la cellule qui est évalué. D'un point de vue cinétique, il est plus rapide que le marqueur AXR3NtGUS car aucune synthèse *de novo* de protéine n'est nécessaire pour apprécier les différences de réponses.

Au niveau macroscopique, la suppression du phénotype ss12k dans le fond 99 chez la plantule ayant poussé à la lumière montre une certaine pléiotropie de la restauration. Or la croissance de la racine est le fruit de la division, de l'endoréplication et de l'expansion. La caractérisation de la croissance de la racine des plantes 99 s'avérera donc plus compliqué mais potentiellement pourra permettre d'en apprendre plus sur les mécanismes conduisant à la restauration de la croissance de la racine primaire dans le fond *dcl3.99*, ss12k. Afin de caractériser le développement de la racine primaire, j'ai entrepris d'introgresser des marqueurs de division, de différentiation ou d'identité du méristème racinaire dont le profil ou l'intensité d'expression sont modifiés dans le fond ss12k (Tromas et al., 2009).

Avant toute chose, il sera intéressant de s'attarder sur une analyse de la morphologie du méristème (sa taille, son épaisseur, sa structure). On sait en effet que le méristème dans les plantes ss12k, l'inactivation d'ABP1 induit un arrêt de la division engendrant une forte diminution du méristème apical, les cellulles quittant le méristème pour entrer en élongation et en différenciation. Le diamètre de la racine est aussi inférieur à celui des plantules sauvage mais la structure concentrique des files cellulaires n'est pas altéré (Galinha et al., 2007; Tromas et al., 2009). Une cinétique de croissance pourrait également apporter des informations intéressantes. Parmi les marqueurs introgréssés, la fusion transcriptionnelle proPLT2:CFP permet d'analyser le méristème racinaire. Il s'agit d'un facteur de transcription qui est lié au maintien de l'identité méristématique au niveau de la racine (Galinha et al., 2007). Dans la lignée ss12k, le gradient de PLT2 est réduit ce qui

contribue à modifier le devenir des cellules méristématiques lorsqu'ABP1 est inactivée (Tromas et al., 2009).

De plus, l'utilisation du marqueur proCYCB1:CYCB1-Dbox-GUS permet de visualiser l'activité mitotique des cellules (Colon-Carmona et al., 1999). Dans les plantes ss12k, l'expression de ce rapporteur est éteinte. Savoir si la division est restaurée, et dans quelle mesure, dans la lignée 99 permettra de savoir si DCL3 est impliqué dans ce processus. La restauration partielle et hétérogène de croissance de la racine ne pourrait en effet que très faiblement agir sur la restauration de la division mais plutôt accroitre la capacité d'expansion cellulaire dans la racine. L'observation en microscopie des racines sera un premier indicateur mais le marqueur CYCB1-Dbox-GUS témoignera des évènements de division au sein du méristème.

Enfin, un marqueur de différentiation du protoxylème, proS17:GFP, permettra de savoir si les cellules dans la lignée 99 rentrent plus rapidement en phase de différentiation comme dans ss12k ou si la transition est également restaurée (Lee et al., 2006).

Ces analyses, couplées à des mesures précises de taille du méristème de la racine primaire permettront de connaître mieux le degré de restauration des différences réponses cellulaires impliquées dans la croissance racinaire. L'observation du méristème racinaire est donc l'une des prochaines étapes dans la caractérisation de la lignée 99. Toutefois, d'autres processus physiologiques ou développementaux impliquent ABP1 et devront être étudiés. Comme je l'ai présenté dans l'introduction, une succession de papiers ont montré l'implication d'ABP1 dans le contrôle de l'endocytose des vésicules à clathrines. De multiples protéines sont concernées par ce mécanisme. C'est le cas notamment de l'aquaporine PIP2;1, qui à l'inverse des PINs ne présente pas de localisation polarisée (Luu et al., 2011). Afin de savoir si l'endocytose est restaurée dans la lignée 99, des fusions traductionnelles de la protéine PIP2;1-GFP sous contrôle d'un promoteur endogène ou constitutif ont été introgressées par transformation dans la lignée 99.

Concernant les marqueurs permettant la caractérisation de la suppression du phénotype ss12k, l'obtention des triples homozygotes est en cours (99, ss12k et le marqueur). Toutefois, d'autres marqueurs ou constructions pourront être introgressés dans la lignée 99 afin de poursuivre la caractérisation de la lignée. Cette caractérisation a pour but de permettre de comprendre le rôle de DCL3 dans la suppression du phénotype ss12k. Toutefois, avant d'approfondir la caractérisation, il me semblait important de comprendre un peu plus le mécanisme de suppression et notamment de

savoir si la suppression du phénotype était du au rôle biologique connu pour DCL3 où s'il s'agissait d'un autre rôle, encore non décrit.

Enfin l'analyse de l'expression de gènes impliqués dans la signalisation de l'auxine pourra être poursuivie. Bien évidemment, les gènes impliqués dans le dé-étiolement seront aussi des indicateurs importants pour quantifier la suppression du phénotype ss12k. D'autre part, mes résultats obtenus dans la caractérisation de la paroi des plantules ss12k ont permis de montrer des modifications de la paroi importantes pour le phénotype ce qui rend l'analyse de l'expression de certains gènes impliqués dans le remodelage de la paroi intéressantes. Afin de ne pas perdre trop de temps à tester des cibles identifiées dans divers processus, nous sommes sur le point de procéder à une analyse transcriptomique des lignées 99 afin d'avoir une idée globale des processus affectés ou non par la suppression d'un phénotype ss12k du à la perte de fonction du gène *DCL3*. Compte tenu de l'implication de DCL3 dans la synthèse des 24nt siARNs, nous procèderons à une analyse par RNAseq plutôt que des hybridations sur les puces CATMA. Ces données globales nous donnerons une image exhaustive des modifications d'accumulation de l'ensemble des ARNs.

Conclusion

Pour percer le mystère de cette suppression du phénotype ss12k dans la lignée 99, il faut comprendre l'implication de la voie RdDM dans la voie de signalisation auxinique. A ce jour aucune étude n'a établi ce lien. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées :

- DCL3, par l'intermédiaire de la voie RdDM, joue sur le niveau d'expression d'un acteur clé de la voie.
- La non production de 24nt siRNA peut permettre l'expression d'un gène qui va par son activité, jouer sur la voie $SCF^{TIR/AFBs}$. Il peut activer la transcription de gènes directement impliqués dans la signalisation ou jouer de manière indirecte sur l'expression de gènes agissant par exemple sur des modifications post traductionnelles modulant l'activité d'éléments de signalisation.

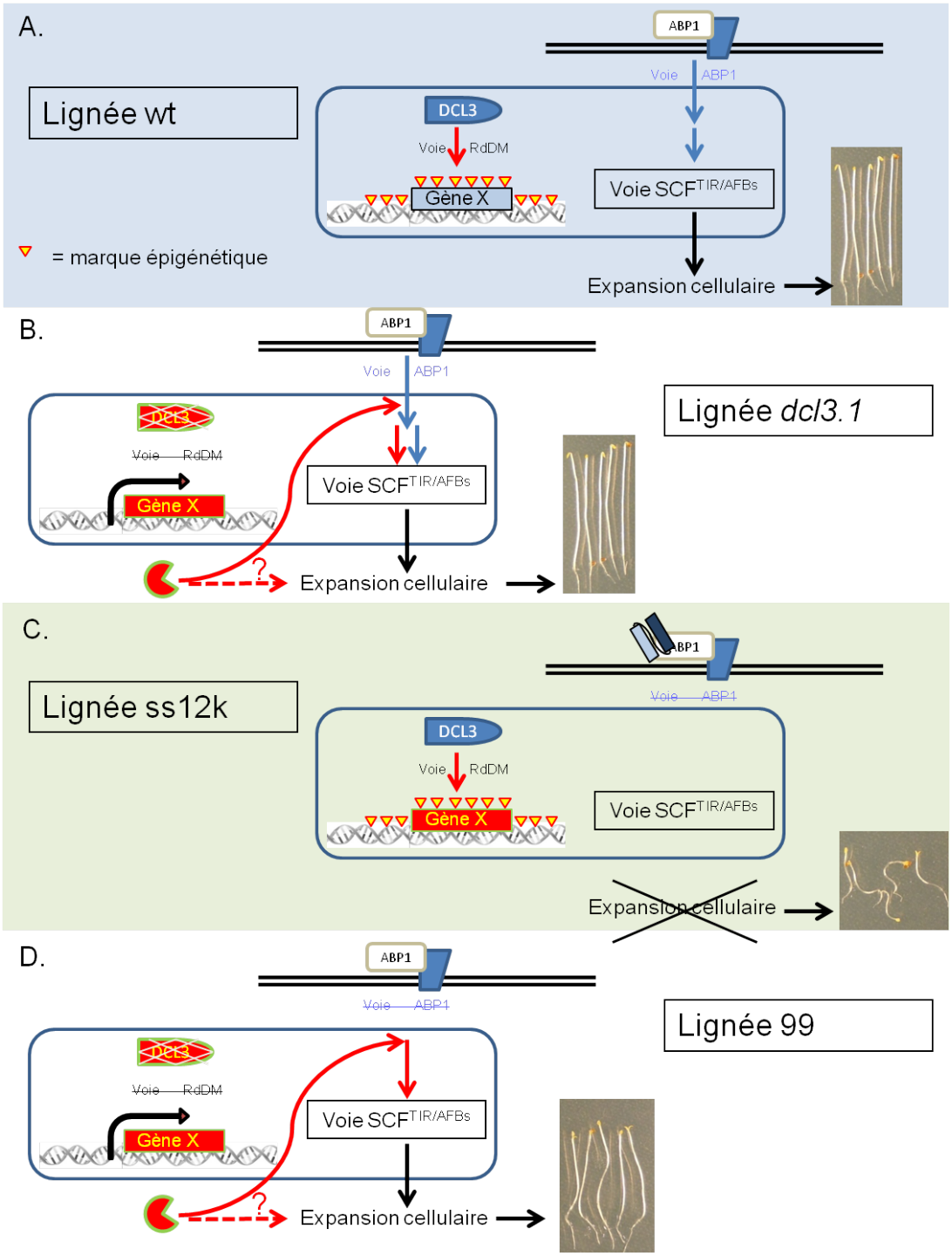


Figure 45 – modèle pour expliquer la suppression du phénotype ss12k dans la lignée 99

Modèle hypothétique pour expliquer la suppression du phénotype ss12k dans la lignée 99. Ce modèle propose que la voie RdDM agisse indirectement sur la voie ABP1. L'action des différents acteurs a été schématisée dans les divers fonds génétiques étudiés dans cette partie. (fonds génétiques sauvage (a), *dcl3.1* (b), ss12k (c) et 99(d)).

Dans le fond sauvage, on peut émettre l'hypothèse que ce gène X est méthylé, donc pas ou peu exprimé et qu'il ne peut donc agir sur la voie en aval d'ABP1 (Fig 45.A). Quoiqu'il en soit, le fait que ce gène X soit dé-réprimé dans le fond *dcl3.1* ne semble pas jouer sur l'élongation de l'hypocotyle lorsqu'ABP1 est actif (Fig 45.B) comme le laisse supposer l'absence de phénotype observable dans les fonds des simples mutants *dcl3.1*, *dc3.2* ou *ago4.2*. Lorsqu'ABP1 est inactivée (Fig 45.C), je suppose que la perturbation de cette voie en aval d'ABP1 est dérégulée voire abolie. Ceci entraîne des perturbations majeures dépendantes ou indépendantes de l'expression de gènes et a pour répercussions de graves problèmes développementaux ((Braun et al., 2008a; Tromas et al., 2009; Robert et al., 2010; Xu et al., 2010) partie résultat I). Dans le fond *dcl3.99* (Fig. 45.D), la voie en aval d'ABP1 est abolie et la machinerie RdDM ne fonctionne plus. Le gène X ne serait donc plus méthylé et sa transcription serait activée. La protéine X pourrait être produite et pourrait alors contrebalancer la perte de fonction d'ABP1 (Fig 45.B). Compte tenu que la stabilité des Aux/IAAs semble rétablie, on peut émettre l'hypothèse que la protéine X agit en amont des Aux/IAAs.

DCL3 n'est donc vraisemblablement pas directement en aval d'ABP1 dans la voie de signalisation mais révèle l'implication de la voie RdDM dans la régulation transcriptionnelle d'un ou de plusieurs éléments de signalisation en aval d'ABP1. L'objectif désormais est de trouver quel est ou quels sont les gènes X. La caractérisation plus fine de la suppression du phénotype dans la croissance racinaire à la lumière de la lignée 99 à l'aide de marqueurs permettra peut-être de savoir si le phénotype de suppression est spécifique de l'expansion cellulaire comme le laisse supposer la restauration de l'expansion cellulaire lors de la skotomorphogenèse de la lignée 99.

La voie RdDM étant impliquée dans la méthylation de l'ADN et compte tenu qu'une méthylation de l'ADN induit plutôt une inhibition de l'expression, on peut s'attendre à ce que la cible de ces méthylations médiées par les 24nt siRNA soit un gène dont l'expression est augmentée dans le fond *dcl3.99*. Toutefois, trouver ce gène X, régulé par la voie RdDM ne permettrait pas de résoudre totalement l'énigme et il resterait à comprendre comment ce gène X peut influencer la voie de signalisation d'ABP1 au point de supprimer le phénotype des plantes ss12k et ce, à la lumière comme à l'obscurité.

DISCUSSION GENERALE

Le travail réalisé au cours de la thèse a permis d'aborder différents aspects touchant aux mécanismes de signalisation en aval d'ABP1, que ce soit concernant l'interconnexion entre la voie ABP1 et la voie $SCF^{TIR1/AFBs}$ (en annexe), le contrôle d'ABP1 sur l'expansion cellulaire (Partie I) notamment par le biais de modifications pariétales et enfin sur l'implication possibles de régulations épigénétiques dans les voies de signalisation de l'auxine (Partie IV). Le travail réalisé soulève aussi de nombreuses questions, notamment comment la voie RdDM peut participer à la signalisation de l'auxine ou comment des formes fucosylées des xyloglucanes peuvent-elles affecter à ce point la capacité d'expansion d'une cellule de l'hypocotyle étiolé ?

La confrontation de mes résultats avec les connaissances dans ces domaines scientifiques m'amène à me poser un ensemble de questions, émettre des hypothèses discuter les résultats et proposer quelques éléments de perspectives. Je me propose de vous faire partager ces éléments au cours de cette dernière partie de mon manuscrit.

ABP1 et l'expansion cellulaire

Durant ce travail de thèse, j'ai identifié deux gènes impliqués dans la suppression du phénotype lié à l'inactivation d'ABP1 dans le modèle de l'hypocotyle étiolé. L'un est issu de la mutagénèse des plantes ss12k et l'autre provient d'une approche gène candidat. Dans les deux cas, le dé-étiolement caractéristique des plantes ss12k n'est pas aboli, au contraire de l'expansion cellulaire dans l'hypocotyle. Bien que le phénotype reste encore à analyser dans la racine pour savoir si la restauration affecte un autre processus que l'expansion, on peut dire, sur la base du phénotype à l'obscurité, que l'expansion cellulaire est restaurée dans ces deux lignées.

La lignée pro35S:AXY8, ss12k

Pour la lignée pro35S:AXY8, ss12k, son utilisation a permis de confirmer l'importance des formes fucosylées des chaines latérales des xyloglucanes. Ce phénotype indique qu'AXY8 joue spécifiquement sur l'expansion cellulaire, voire même spécifiquement sur l'élongation des cellules de l'hypocotyle, l'expansion des cotylédons restant tout de même limitée. Conjugué à la modification de l'expression d'AXY8 dans le fond ss12k et à la restauration de l'expression et de la composition pariétale dans les fond *tir1.1, afb2.1, afb3.1,* ss12k, il a été possible de montrer que les modifications pariétales affectant l'expansion cellulaire dans l'hypocotyle étiolé étaient dues à des expressions de gènes sous le contrôle de la voie $SCF^{TIR/AFBs}$ plutôt qu'à des réponses non géniques comme le laissait sous entendre la théorie de la croissance acide (acid growth theory).

Toutefois, je tiens à préciser que je ne remets en aucun cas les fondements de la théorie de la croissance acide. Elle demeure essentielle pour jouer sur la plasticité de la paroi au niveau local et sur des temps courts. L'exemple de l'émergence des racines latérales est un exemple élégant de relâchement pariétal local et contrôlé qui permet à la racine latérale de se frayer un chemin au travers des cellules du cortex puis de l'épiderme lors de son développement (Swarup et al., 2008). La lignée surexpresseur de la fucosidase AXY8 ne reverse pas en totalité le phénotype ss12k puisque le double transformant possède toujours des cotylédons ouverts et épinastiques.

De manière très intéressante, on n'obtient pas de suppression du phénotype ss12k dans la lignée *mur2.1*, ss12k, alors que, par rapport à sa fonction de fucosyl transférase, on aurait pu s'attendre à une réversion du phénotype. La fucosyl transferase *MUR2* agit au niveau du golgi, lors de la biosynthèse, alors qu'AXY8 est localisé dans l'apoplasme. La différence de phénotype entre *mur2.1*, ss12k, *mur3.1*, ss12k et pro35S:AXY8, ss12k sous-entend que la défucosylation des chaînes

latérales des xyloglucanes dans l'apoplasme est un facteur important de l'expansion cellulaire et cette implication des modifications *in muro* devra être inspectée dans d'autres organes car elle soulève de nombreuses questions. Il sera ainsi important de déterminer en quoi les formes fucosylées des xyloglucanes affectent l'expansion. Et comment expliquer que cette modification de la composition des chaînes latérales des xyloglucanes modifie la plasticité pariétale. Est-ce que les formes fucosylées modifient l'interaction avec la cellulose ? Est ce que qu'elles influencent la capacité des XTHs a interagir avec les xyloglucanes ?

Les analyses de qRT-PCR faites sur la lignée ss12k et *tir1.1, afb2.1, afb3.1,* ss12k montrent également une dérégulation de certaines XTHs, les enzymes qui régule l'assemblage des xyloglucanes dans la paroi. La plupart sont diminuées par l'inactivation d'ABP1 à l'inverse de XTH31 et XTH32, qui ont été caractérisés pour leur activité d'hydrolases et qui possèdent une expression augmentée par rapport au sauvage lorsqu'ABP1 est inactivée. Cette corrélation entre l'inactivation d'ABP1 et les régulations différentielles de sous groupe de XTHs est intriguante mais à ce stade, on ne sait pas s'il s'agit d'une régulation directe ou d'une adaptation de la plante aux modifications de la composition des chaînes latérales des xyloglucanes. En effet, les XTH possèdent des susceptibilités de substrats et les changements de proportions des différentes chaines latérales pourraient entrainer des régulations géniques des XTHs (Maris et al., 2009).

La lignée suppressive 99

La lignée 99 présente également une restauration de la croissance de l'hypocotyle et un léger agravitropisme persiste. Bien que la lignée présente encore une ouverture des cotylédons, celle-ci reste très limitée et la crosse apicale n'est pas totalement perdue. Bien évidemment ces paramètres nécessitent une analyse plus approfondie avant de tirer des conclusions. Mais on peut considérer que la protéine *DCL3* via la voie RdDM joue un rôle dans l'expansion cellulaire.

La caractérisation approfondie du phénotype 99 permettra sans doute de mieux comprendre comment la perte de fonction de DCL3 permet de supprimer le phénotype ss12k. Une analyse de l'expression de gènes d'expansion cellulaire (notamment ceux dérégulés dans ss12k) est au programme, et compte tenu de l'implication de DCL3 dans la voie RdDM, il sera intéressant de regarder les marques de méthylation au niveau de ces gènes lié à l'expansion cellulaire.

Récemment, une étude a montré que certains gènes liés à l'expansion étaient la cible de régulations par des modifications chromatiniennes (Jing et al., 2013). C'est l'utilisation d'un mutant

nul pour le gène *PICKLE* qui code pour une déacétylase qui a permis cette étude. La perte de fonction de *PICKLE* (*pkl*) a également été caractérisée comme supprimant le phénotype racinaire (absence de racines latérales*)* du double mutant *arf7, arf19* (Fukaki et al., 2006). Ce résultat place *PICKLE* dans la signalisation de l'auxine sans que l'on sache encore son rôle précis.

Dans le mutant *pkl*, les auteurs de l'étude montrent que certains gènes (préalablement sélectionnés pour leurs implications potentielles dans l'élongation) possèdent plus de marques épigénétiques (H3K27me) au niveau des promoteurs et des séquences codantes et qu'en parallèle, leurs expressions sont diminuées (Jing et al., 2013). Cette utilisation couplée de la qPCR et de la CHIP qPCR permet de montrer l'importance des régulations de la structure de la chromatine pour l'expression des gènes d'expansion. De ce fait, regarder l'expression et la méthylation de tels gènes dans les lignées *dcl3.1* et *dcl3.1*, ss12k devient une perspective à court terme qui pourrait apporter des réponses concernant l'implication de *DCL3* dans l'expansion cellulaire.

En analysant leur modèle et mes résultats, et compte tenu que les fonctions de PIKCLE et de la voie RdDM consistent à inhiber l'expression de gènes via des modifications épigénétiques, il me semble qu'il serait intéressant de se pencher plus sérieusement sur *PICKLE* et ses cibles. Mais aussi de se pencher sur les marques épigénétiques des gènes impliqués dans l'expansion cellulaire.

Mes résultats permettent de montrer l'implication d'ABP1 dans l'élongation cellulaire. Toutefois, lorsque l'on sait à quel point ABP1 affecte la division et l'endoréplication (en plus de l'expansion) dans les autres organes (Braun et al., 2008b; Tromas et al., 2009), il reste encore beaucoup à faire pour comprendre le rôle de DCL3 dans la signalisation de l'auxine.

ABP1 et la photomorphogenèse

Les plantes inactivées pour ABP1 possèdent un phénotype dé-étiolé marqué (cf partie résultat I). L'une des questions qui s'est toujours posée a été de comprendre pourquoi les plantes inactivées pour ABP1 présentent un dé-étiolement. Durant mon travail de thèse, je n'ai pu me pencher sérieusement sur cette question. Toutefois, lors de mes différentes expériences, j'ai pu mettre en évidence plusieurs éléments qui méritent d'être discuté.

Premièrement, les données de transcriptomiques montrent que le dérèglement des gènes liés à la différenciation des plastes et la mise en place des systèmes photosynthétiques est en partie visible dès 8h d'exposition aux vapeurs d'éthanol. La surreprésentation de ces gènes dits « de lumière » s'accentue lorsque les plantules sont soumises aux vapeurs d'éthanol depuis la germination. Il semble donc qu'ABP1 soit directement ou indirectement impliquée dans la répression de la photomorphogenèse ou le maintien de la skotomorphogenèse.

Deuxièmement, l'étude de la suppression du phénotype ss12k permet d'émettre des hypothèses sur ces régulations. Le premier suppresseur du phénotype lié à l'inactivation d'ABP1 a été obtenu en introgressant la construction ss12k dans le fond *tir1.1, afb2.1, afb3.1*. La suppression du phénotype et surtout par rapport à l'ouverture des cotylédons est alors totale. Ces trois protéines F-box étant les piliers de la voie $SCF^{TIR1/AFBs}$, on peut supposer que le mécanisme par lequel ABP1 influe sur la photo/skotomorphogenèse passe par la voie $SCF^{TIR/AFBs}$. Ce résultat n'est pas étonnant si l'on considère que plusieurs mutants de la signalisation auxine possèdent un phénotype dé-étiolé lorsqu'ils poussent à l'obscurité. C'est le cas par exemple des mutants *shy2* et *axr3.1* dont les gènes codent pour des Aux/IAAs (Kim et al., 1996; Leyser et al., 1996) ou du mutant *axr1* qui joue un rôle prépondérant dans l'assemblage du complexe SCF (Leyser et al., 1993).

Troisièmement, ni la lignée pro35S:AXY8, ss12k, ni la lignée suppressive 99 qui présentent une restauration importante de l'expansion cellulaire ne parviennent à restaurer les autres phénotypes de dé-étiolement liés à l'inactivation d'ABP1. Le découplage entre élongation de l'hypocotyle et ouverture des cotylédons/absence de crosse peut signifier que ces réponses, bien qu'en aval d'ABP1, résultent de deux processus indépendants. Ces éléments sont des preuves de l'implication d'ABP1 dans la régulation de la skoto/photomorphogenèse et bien qu'ils semblent appuyer l'hypothèse de l'implication de la voie $SCF^{TIR/AFBs}$ dans ce processus, ils ne permettent pas de proposer d'explication au dé-étiolement des plantes ss12k.

L'une des perspectives pour déterminer le rôle d'ABP1 dans la photomorphogenèse et la skotomorphogenèse serait de s'intéresser aux acteurs clefs deux programmes de développement de la jeune plantule mis en place à l'obscurité et à la lumière. Pour la skotomorphogenèse, les facteurs de transcription PIFs sont des protéines essentielles pour la mise en place de la skotomorphogenèse. De la même manière, les facteurs de transcription HY5 et HYH, en aval de la voie DET/COP, sont les piliers de la photomorphogenèse. L'homéostasie des PIFs et des HY5/HYH est sous le contrôle de photorécepteurs (phytochromes/cryptochromes) ou de voies de signalisations hormonales (brassinostéroïdes/gibbérellines). L'étude de la stabilité et de l'état (actif/inactif) des différents acteurs des voies de la skotomorphogenèse et de la photomorphogenèse pourrait être un projet de recherche à part entière qu'il serait intéressant de développer et qui pourrait permettre de comprendre comment ABP1 et/ou l'auxine joue sur ces voies.

L'étude montrant l'implication de PICKLE dans le contrôle de la méthylation des gènes de réponse à l'auxine permet aussi de dévoiler un autre aspect de la fonction de *PICKLE*. En effet, les auteurs montrent l'implication de PICKLE dans la régulation de la photomorphogenèse en montrant une liaison directe entre PICKLE et HY5 (double hybride, biFc, coIP) (Jing et al., 2013). Or HY5 est un facteur de transcription essentiel pour la régulation de la photomorphogenèse. L'implication du remodelage chromatinien en réponse à la lumière n'est pas si étonnant lorsque l'on prend en compte des études passées montrant que l'acétylation des histones est importante pour l'expression de gènes de réponse à la lumière (Benhamed et al., 2006; Guo et al., 2008). Il a également été montré que DET1 est un répresseur de la photomorphogenèse, et qu'il se lie à des histones dé-acétylées (Benvenuto et al., 2002). Une approche à large échelle ont permis de mettre à jour que la transition entre la skotomorphogenèse et la photomorphogenèse occasionne d'importantes modifications chromatiniennes et que la méthylation des histones étaient également une marque épigénétique importante dans ce processus (Fisher et al.; Charron et al., 2009). Etant donné que *PICKLE* a déjà été caractérisé comme étant un acteur de la signalisation de l'auxine, on peut y voir un point d'interconnexion entre la voie auxine et la voie lumière. On connaissait déjà les interconnexions entres ces deux voies par le fait que de nombreux mutants de la signalisation auxine présentent un phénotype dé-étiolé (*axr3, shy2, fin219, lignée ss12k…)*

L'acide gibbérellique est également une hormone qui joue un rôle important dans la skotomorphogenèse. Un traitement de plantules sauvages ayant poussé à l'obscurité (donc étiolées) avec un inhibiteur de la biosynthèse des gibbérellines, le paclobutrazol, conduit à un dé-étiolement des plantules (Alabadi et al., 2004). En parallèle, nous avons testé la durée de vie des RGA dans la racine après l'ajout exogène de GAs dans le fond sauvage et inactivé pour ABP1. La cinétique mise en

place a révélé que les RGA étaient dégradé moins vite dans la lignée ss12k (Tromas et al., 2013 en révision et en annexe). Regarder l'interconnexion entre les GA et ABP1 dans l'hypocotyle étiolé est assurément une expérience à faire prochainement.

Pour finir cette partie, j'aimerais souligner qu'il reste d'autres lignées suppressives du phénotype ss12k à l'obscurité isolées lors du crible (cf partie Résultats - Partie I), celles-ci pourraient permettre de découvrir pourquoi les plantes ss12k sont dé-étiolés à l'obscurité grâce à l'identification de nouveaux gènes suppresseurs. Certaines de ces lignées suppressives restaurent le phénotype déétiolé (par exemple la lignée 24), au contraire d'autres (lignée 12). La découverte de gènes issus de nouvelles lignées suppressives du phénotype ss12k présentant une restauration de l'étiolement pourrait permettre d'apporter des éléments de compréhension du lien entre ABP1 et la régulation de skoto/photomorphogenèse.

ABP1 est-il un récepteur ?

ABP1 a été découverte en 1985 est a été la première candidate au rôle de récepteur d'auxine. Toutefois, devant les manques de preuves définitives pour l'établir comme récepteur, des interrogations ont été soulevées au sein de la communauté scientifique, comme le fit publiquement Michael Venis qui se demandait si ABP1 n'était pas un mirage (Hertel, 1995; Venis, 1995). Dans les années 2000, les $SCF^{TIR/AFBs}$ et le modèle de régulation transcriptionnel ont largement supplanté l'intérêt pour ABP1. La difficulté de travailler avec le mutant nul *abp1.2*, qui, est létal au stade embryonnaire, a contribué à freiner les progrès même si ce phénotype sévère confirmait l'importance de la protéine au moins pour l'embryogenèse (Chen et al., 2001). En parallèle, le travail accompli sur la voie $SCF^{TIR/AFBs}$ a clairement permis des avancées majeures dans la compréhension de la signalisation de l'auxine mais a, en contrepartie, totalement occulté ABP1 et un ensemble d'éléments de régulation de cette signalisation (Gray et al., 2001; Dharmasiri et al., 2005a; Calderon Villalobos et al., 2012)

L'obtention des plantes conditionnelles pour ABP1 a permis de la remettre au gout du jour. Depuis cinq ans, les études se succèdent pour montrer le rôle d'ABP1 dans le développement (Braun et al., 2008a; Tromas et al., 2009; Xu et al., 2011)(Paque et al., 2013, soumis), la régulation de l'endocytose des vésicules à clathrines (Robert et al., 2010; Chen et al., 2012) ou la signalisation de la voie $SCF^{TIR/AFBs}$ (Tromas et al., 2013 en révision)(Paque et al., 2013, soumis).

Il me semble intéressant dorénavant de tenter d'intégrer ABP1 dans la signalisation de l'auxine en commentant les dernières avancées et de soulever certaines questions qu'il reste à élucider pour comprendre le rôle d'ABP1 au sein de la cellule.

Tout d'abord, on peut se demander si ABP1 est vraiment un récepteur. A mon sens, un récepteur est une protéine qui possède une sensibilité particulièrement et exclusive pour un stimulus. De plus la perception de ce stimulus doit induire une transduction du signal de perception à l'aide d'une voie de signalisation. Un récepteur est donc au sommet d'une voie de signalisation. Enfin, selon moi, cette perception du signal doit amener à une adaptation de la cellule, de l'organisme qui peut se traduire par une réponse génique ou non génique mais qui permettra au système de répondre à la perception de ce stimulus.

Il se trouve qu'ABP1 remplit les conditions pour que je le considère comme un récepteur. Etant donné qu'ABP1 a été isolé sur sa capacité à fixer l'auxine à des doses physiologiques, il ne fait aucun doute qu'ABP1 puisse lier l'auxine (Lobler and Klambt, 1985; Shimomura et al., 1986). Plusieurs expériences indépendantes utilisant diverses techniques ont montré que la fixation d'auxine change la conformation de la protéine *in vitro* (Shimomura et al., 1986; Venis and Napier, 1990; David et al., 2001; Warwicker, 2001). D'autre part, on sait que la fixation d'auxine sur ABP1 provoque des réponses physiologiques. Les anciennes expériences d'électrophysiologie ont ainsi montré que la fixation de l'auxine sur ABP1 induisait l'activation de flux d'ions dont l'activation de la pompe à protons.

Plus récemment, une étude à prouvé que l'activité des ROPs était augmenté après un traitement à l'auxine et que la perte de fonction d'ABP1 empêchait cette activation (Xu et al., 2010). L'utilisation de plantes conditionnelles pour ABP1 a permis de montrer qu'ABP1 était essentiel pour l'expression correcte de gènes et que son inactivation induisait de graves problèmes développementaux (Braun et al., 2008b; Tromas et al., 2009)(Paque et al., 2013 soumis – Partie Résultats I). Enfin l'épistasie des AFBs sur ABP1 et le fait que marqueur de la durée de vie des Aux/IAAs, la protéine AXR3NtGUS soit plus sensible à la dégradation lorqu'ABP1 n'est plus fonctionnelle mettent en avant qu'ABP1 influence la voie nucléaire de signalisation de l'auxine. Il doit donc exister une voie de de signalisation entre ABP1 et la voie $SCF^{TIR/AFBs}$.

Ces éléments suffisent, à mon sens à considérer ABP1 comme un récepteur à l'auxine. Mais une fois son rôle de récepteur établit et accepté au sein de la communauté scientifique, il reste à déterminer son rôle au sein de la cellule (Sauer and Kleine-Vehn (2011); Shi and Yang (2011)).

Implication d'ABP1 dans la signalisation de l'auxine

A ce jour, deux rôles sont conférés à la seule ABP1. L'un au niveau de la membrane plasmique où ABP1 agit sur l'endocytose des PINs et l'autre où ABP1 a pour rôle de jouer sur la voie de signalisation nucléaire de l'auxine, la voie $SCF^{TIR/AFBs}$.

ABP1 et la voie $SCF^{TIR/AFBs}$

La suppression du phénotype ss12k par les mutations dans les gènes *TIR1*, *AFB2* et *AFB3* change quelque peu notre idée de la signalisation de l'auxine. Il révèle la relation d'épistasie des récepteur $SCF^{TIR/AFBs}$ sur ABP1 et implique de manière très claire ABP1 dans la signalisation de l'auxine. Pour expliquer le phénotype, on peut imaginer que l'absence de certaines $SCF^{TIR/AFBs}$ contrebalance la sensibilité exacerbée des Aux/IAAs à la dégradation dans un fond inactivé pour ABP1. Cela pourrait expliquer l'absence de suppression du phénotype ss12k dans le fond *tir1.1* où les autres AFBs pourraient, par redondance fonctionnelle, suppléer l'action de TIR1. Dans le fond *tir1.1*, *afb2.1, afb3.1,* les AFBs restants ne suffisent plus, le système est dépassé.

La façon dont ABP1 agit sur les cibles Aux/IAAs est encore inconnue bien qu'il semble vraisemblable qu'il s'agisse de modifications post-transcriptionnelles. Des travaux ont montrée que des inhibiteurs de kinases n'influençaient pas la stabilité des Aux/IAAs (Ramos et al., 2001; Dharmasiri et al., 2003). Mais les travaux de l'équipe de Mark Estelle laissent entendre que d'autres types de modifications post traductionnelles pourraient être importantes pour la stabilité des Aux/IAAs. La nitrosylation des cystéines et l'hydroxylation des prolines du dégron sont à ce jour des modifications ayant été montrées comme importantes pour la stabilité des Aux/IAAs (Terrile et al., 2012)(Dharmasiri et al., 2003).

Afin de savoir si ABP1 modifiait la stabilité des Aux/IAAs en induisant ce type de modification, j'avais entrepris d'isoler le marqueur AXR3NtGUS dans différents dans le fond sauvage ou inactivé pour ABP1 répondre à cette question, l'un de mes projets de thèse était d'isoler les Aux/IAAs modifiées post-traductionnellement par ABP1 puis de les soumettre à une analyse par spectrométrie de masse. Cette approche fut malheureusement abandonnée suite à divers problèmes expérimentaux, notamment la difficulté d'isoler le marqueur AXR3NtGUS qui était censé porter des modifications post traductionnelles différentes entre le fond sauvage et le fond ss12k.

Ce rôle d'ABP1 sur la stabilité des Aux/IAAs est conforté par la fait que les gènes de réponses à l'auxine sont dérégulés dans le fond inactivé pour ABP1. On peut supposer que cette dérégulation implique une hypersensibilité des plantules à l'auxine. Or, dans le fond ss12k, on observe une forte résistance à l'auxine des plantes inactivées pour ABP1 que ce soit dans la racine ayant poussé en lumière continue ou dans l'hypocotyle à l'obscurité (cf partie résultat III), ce qui va à rebours du modèle théorique. Toutefois on peut aussi considérer que cette dé-répression des ARFs a pour conséquence l'expression, parmi les gènes de réponse à l'auxine, d'Aux/IAAs et des enzymes de conjugaison. Une dérégulation de ces gènes pourrait conduire à bloquer le système plutôt qu'à conduire à un emballement de la réponse à l'auxine et donc à une résistance plutôt qu'à une sensibilité.

Le lien entre ABP1 et la voie $SCF^{TIR/AFBs}$ semble clair et place ABP1 a un rôle prépondérant dans la signalisation de l'auxine. Cependant, on ignore encore les mécanismes par lesquels ABP1 joue sur la durée de vies des Aux/IAAs. Approfondir l'analyse de cette relation génétique entre les deux récepteurs et découvrir les différentes étapes de signalisation est un challenge passionnant qui, je l'espère, aboutira dans les prochaines années.

ABP1 et la voie endocytose

Depuis trois ans, les équipes de Z.Yang et J.Friml ont décrit un élégant modèle (présenté en introduction) où il semble qu'ABP1 soit indispensable pour l'endocytose des vésicules à clathrines. Ce modèle donne à ABP1 un rôle important dans le contrôle de l'endocytose des vésicules à clathrines. Parmi les protéines figurent les PINs, les transporteurs d'efflux de l'auxine dans la localisation polaire est importante pour la transporte de l'auxine.

Toutefois, à ce jour, les conséquences de l'inactivation d'ABP1 n'ont porté que sur la localisation de PIN2 dans la racine et de PIN1 dans les cellules en pavement des cotylédons. Dans la racine, ces analyses se basent exclusivement sur le comptage de corps BFA, des structures obtenues par l'ajout de BFA et de cycloheximide. On peut se demander si l'ajout de ces deux drogues aux effets pléiotropies ne perturbe pas grandement la biologie de la cellule et peuvent compromettre certaines conclusions (notamment celles évoquant la transcytose où il faut un traitement long (Kleine-Vehn et al., 2008). Enfin, dans une étude du laboratoire, la quantité de PIN1 et PIN2 dans les cellules inactivées pour ABP1 ne semblait pas différente de celle observé chez le sauvage (Tromas et al., 2009). Il a donc été prouvé que l'endocytose des PINs était modifiée dans le fond ss12k, mais il reste à comprendre si cette dérégulation à un rôle biologique puisque la quantité de PINs à la membrane ne semble pas modifiée. Je me demande néanmoins si l'utilisation de fluorophores

photoconvertibles ou de nouvelles techniques de microscopie permettant le suivi de protéine ne pourraient pas nous permettre de s'affranchir des différentes drogues utilisées et lever cette ambigüité. Il serait également intéressant d'utiliser les connaissances sur le rôle d'ABP1 à la membrane obtenus dans les années 90 et regarder si les flux d'ions et notamment l'activation de la pompe à proton joue un rôle dans l'endocytose. Ceci permettrait de relier ces deux conséquences physiologiques relatives à la perception d'auxine et ayant lieu au niveau de la membrane plasmique et qui, pour l'instant, ne sont pas reliées. L'utilisation de la fusicoccine, une drogue provoquant l'activation de la pompe à proton pourrait être utile pour mener ces expériences.

La succession d'articles montrant le même effet laisse supposer qu'ABP1 agit effectivement sur l'endocytose des vésicules à clathrines via les ROP (Lin et al.; Robert et al., 2010; Xu et al., 2010; Chen et al., 2012; Lin et al., 2012). Les faits sont donc, qu'à ce jour, deux rôles différents d'ABP1 ont été mis en évidence. L'un concerne l'endocytose, l'autre montre qu'ABP1 affecte l'homéostasie de la voie $SCF^{TIR/AFBs}$. Les deux voies menant à ces réponses sont elles complètement indépendantes, sont elles liées?

Relation entre les deux voies

Est-ce l'endocytose qui fait qu'ABP1 joue sur l'homéostasie de la voie?

Comme élément de réponse, j'aimerai insister sur le fait que j'ai montré qu'en inhibant l'endocytose avec une drogue (tyrphostin A23 ou l'ikarugamycine), on ne touchait pas à la quantité d'AXR3NTGUS à la sortie du choc thermique qui permet la production de la protéine marqueur. Ce résultat apporte une preuve montrant que les régulations de l'endocytose des vésicules à clathrines ne sont pas responsables de la modification de la stabilité du rapporteur et que cette modification est donc indépendante de la voie « endocytose ».

Une autre façon de prouver le fait que la régulation de l'endocytose n'est joue pas sur l'homéostasie de la voie $SCF^{TIR/AFBs}$ serait de regarder le phénotype des plantes ss12k, *rop6.1* ou ss12k, *ric1.1.* Il se trouve que, dans ce double mutant, l'endocytose de PIN1, qui est perturbée dans le fond ss12k, est restaurée (Chen el 2012). La question qui se pose alors est de savoir qu'elle est le phénotype du double mutant ss12k, *rop6.1.* Si la plante présente un phénotype sauvage malgré l'inactivation d'ABP1, alors on pourra dire que la régulation de l'endocytose participe à la voie de signalisation ABP1 permettant le développement de la plante. Dans le cas où la plante ss12k, *rop6.1*possède un phénotype ss12k, alors il s'agira d'un argument supplémentaire pour dissocier les effets d'ABP1 sur l'endocytose et sur l'homéostasie de la voie $SCF^{TIR/AFBs}$.

Est-ce la modulation de la voie $SCF^{TIR/AFBs}$ qui module l'endocytose.

Il semble que l'endocytose des vésicules à clathrines soit indépendante de la voie $SCF^{TIR/AFBs}$. Certaines molécules sont capables de découpler les réponses auxiniques au niveau de la membrane plasmique et au niveau du noyau. C'est le cas de l'acide α-phenyl ethyl-2-1-indole-3-acetic (PEO-IAA) qui n'induit pas l'expression du marqueur de réponse génique à l'auxine, proDR5:GFP alors que l'acide 5-fluoroindole-3-acetic (5-F-IAA) ne semble activer que l'expression de gènes (Robert et al., 2010). L'utilisation des ces deux auxines a permis de montrer que l'endoctyose des PINs n'était pas sensible au 5-F-IAA contrairement au PEO-IAA qui parvient inhiber ce mécanisme. Il semble donc que la voie $SCF^{TIR/AFBs}$ n'intervienne pas dans ce mécanisme. En utilisant un panel d'auxine plus large, les auteurs d'une autre étude ont mis en avant que la dégradation des PINs était, elle, dépendante de la voie $SCF^{TIR/AFBs}$ (Baster et al., 2013). Agir sur la dégradation, c'est agir quelque part sur la voie, donc finalement, il semble que la réponse ne soit pas si tranchée. Toutefois, il faut signaler que l'inhibition de l'endocytose a lieu peu de temps après l'ajout d'auxine, contrairement au mécanisme de dégradation qui nécessite plus de temps.

Quelles sont leurs importances relatives?

J'aimerais évoquer un point concernant les rôles biologiques de ces deux mécanismes. Je me questionne en effet sur la conséquence biologique de la relocalisation des PINs. Je n'ai, d'après mes recherches, jamais vu les conséquences développementales du défaut de relocalisation des PINs. Bien évidemment, le traitement par la BFA ou par la cycloheximide se font sur des temps courts, et un traitement prolongé tuerait la plante. Toutefois, certains mutants ont été récemment utilisés et leurs défauts de localisation des PINs a été caractérisé. C'est notamment le cas de l'étude menée par l'équipe de Christian Luschnig (Leitner et al., 2012). Ils ont obtenu une protéine PIN2 mutée dans toutes ces lysines, ce qui empêche la mono-ubiquitination des différentes lysines qui permet l'adressage à la vacuole et conduit à leur dégradation. Dans cette étude, la polarisation des PINs est donc perturbée mais aucun phénotype n'est présenté. On peut se poser la question de savoir dans quelle mesure ce processus affecte le développement. Le mutant nul *pin2* est quant à lui seulement affecté dans le tropisme de la racine primaire et ne présente pas de défaut majeur de développement.

Enfin, une partie des expériences menées pour montrer le rôle d'ABP1 sur l'endocytose des PINs a été mené à l'aide du mutant *abp1.5* qui possède une mutation dans le site de liaison à l'auxine. Dans ce mutant, on observe une résistance aux phénomènes d'endocytose. Or, au niveau macroscopique, ce mutant possède toutes les caractéristiques d'une plante sauvage. Ceci pose

également la question de l'importance biologique des modifications d'endocytose des PINs (Robert et al., 2010; Wang et al., 2013).

A quelle échelle ce processus d'endocytose est il important? L'est -il seulement à l'échelle d'une cellule ou à l'échelle du tissu? L'absence de phénotype laisse supposer qu'il s'agisse d'un phénomène à l'échelle de la cellule et la question du rôle biologique reste en suspend. L'absence de phénotype me pousserait à considérer comme mineures ces phénomènes de modifications d'endocytose concernant la biologie de l'auxine. En contrepartie, on connaît l'importance de la voie $SCF^{TIR/AFBs}$ dans la signalisation de l'auxine. Son importance sur le développement de la place la place comme le cœur de la signalisation de l'auxine.

J'aurai ainsi tendance à considérer que l'hypothétique voie ABP1- $SCF^{TIR/AFBs}$ est, sur un point de vue développemental plus importante que la voie « endoctyose » qui pourrait alors avoir un rôle local pour la gestion des contenus en auxine. Le rôle de l'endoyctose des PINs doit donc être déterminé avec précision.

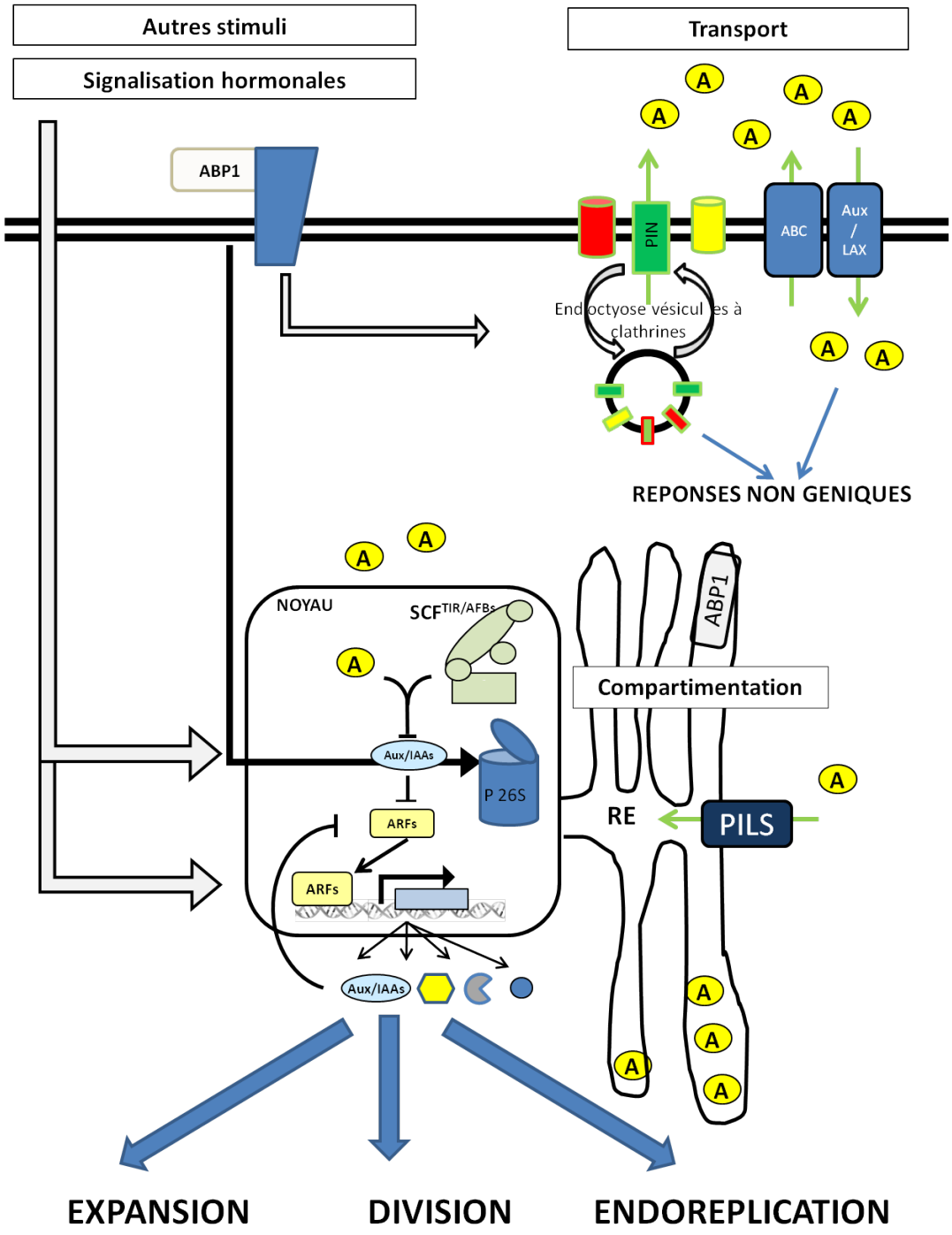


Figure 46 – Modèle hypothétique de signalisation de l'auxine

Dans mon modèle de la voie de signalisation de l'auxine, la voie $SCF^{TIR/AFBs}$ est le cœur de la signalisation de l'auxine. L'homéostasie de la voie est dépendante de plusieurs facteurs comme les interconnexions avec d'autres voies de signalisations (GA, brassino, pathogènes etc). Le transport et la compartimentation sont des moyens de contrôler les concentrations cellulaires de l'auxine (flèches vertes = flux d'auxine). ABP1 est une protéine majeure de la signalisation de l'auxine et pourrait intervenir à deux niveaux différents. Dans un premier temps, en modulant l'endocytose des PINs pour des réponses locales et non géniques et dans un second temps en modifiant la susceptibilité à la dégradation des répresseurs de la voie $SCF^{TIR/AFBs}$. C'est la modulation de l'homéostasie de la voie $SCF^{TIR/AFBs}$ qui permet la plasticité de la voie et donc la réaction de la plante en réponse à des changements physiologiques ou environnementaux.

Ma vision de la signalisation de l'auxine

Si l'on part du principe qu'ABP1 est important pour le contrôle de l'endocytose des vésicules à clathrines (ce qui concerne entre autres les PINs) et que l'on admette qu'ABP1 médie le signal de perception de l'auxine par les ROPs.

La théorie actuelle veut que le contrôle très fin de l'endocytose des PINs soit un moyen d'obtenir des accumulations locales d'auxine. Le modèle de la formation des cellules en pavements des cotylédons est un bel exemple de la fine résolution de ces événements avec des quantités différents de PINs, de ROP et de RIC entre les lobes et les indentations (Xu et al., 2010).

On pourrait aussi imaginer que lorsqu'ABP1 perçoit l'auxine, le blocage de manière rapide et non génique de l'endocytose des PINs permet de maintenir les transporteurs d'efflux à la surface de la cellule et donc d'empêcher une suraccumulation d'auxine intracellulaire. Ce système serait une sorte de moyen de lutte contre les accumulations non désirées d'auxine intracellulaire. Un processus de détoxification.

D'autre part, ABP1 pourrait envoyer alors un message de perception d'auxine via une voie de signalisation qui reste, malgré mes efforts, encore inconnue. Ce signal permettrait à la cellule de se préparer à répondre à une éventuelle hausse de la concentration en auxine dans le noyau. Ce système aurait pour mérite de contrôler la signalisation de l'auxine afin d'éviter l'emballement ou le dérèglement de la réponse auxinique. Compte tenu de l'importance fondamentale de cette phytohormone, on peut imaginer que la plante possède de multiples moyens de contrôles de l'homéostasie de la signalisation de l'auxine. Ce système pourrait faire partie de l'arsenal de méthodes déjà évoquées dans l'introduction de cette thèse pour contrôler le contenu en auxine dans la cellule (conjugaison, compartimentalisation, transport).

Compte tenu des phénotypes qu'occasionnent la surexpression à la membrane d'ABP1 (Robert et al., 2010), ou son inactivation fonctionnelle (Braun et al., 2008; Tromas et al., 2009)(Paque et al (2013) soumis - en annexe), on ne peut que conclure qu'ABP1 joue un rôle fondamentale dans la signalisation de l'auxine.

Toutefois, bien qu'ayant travaillé plus de quatre années sur ABP1, je ne pense pas qu'il s'agisse de la pierre angulaire de la signalisation de l'auxine mais plutôt d'un régulateur essentiel de sa signalisation. Nos résultats montrent qu'ABP1 influe sur le développement de la plante en ciblant la voie $SCF^{TIR/AFBs}$ (Tromas et al., (2013) en révision, Paque et al. (2013) soumis – tous deux en annexe). Ainsi, je pense que c'est la voie nucléaire de l'auxine $SCF^{TIR/AFBs}$ qui est le cœur de la voie de signalisation de l'auxine. La diversité de profils d'expression des trois éléments de cette voie, les

ARFs, Les Aux/IAAs et les $SCF^{TIR/AFBs}$ et les affinités relatives entre les différents éléments autorisent des centaines de possibilités différentes qui peuvent permettre à la plante, selon les tissus, l'environnement, de donner une réponse adapté (Rademacher et al., 2011; Calderon Villalobos et al., 2012; Havens et al., 2012).

J'envisage ainsi les différents moyens de contrôle de l'homéostasie de l'auxine comme des moyens de contrôle de la voie $SCF^{TIR/AFBs}$. Le contrôle du transport, de la compartimentalisation, ou la modification de la stabilité des Aux/IAAs par ABP1 sont pour moi des moyens de contrôler la plasticité de la voie $SCF^{TIR/AFBs}$. Toutefois, loin de moi l'idée de minorer ces processus, il reste en effet des facteurs essentiels puisque ce sont de potentiels puissants leviers pour contrôler la voie $SCF^{TIR/AFBs}$. Leurs importances sont révélées par les phénotypes forts de plantes dont le transport est inhibé par le NPA, des mutants déplétés ou surproduisant de l'auxine ou encore des plantes avec une stabilité des Aux/IAAs modifiées (plante ss12k, mutant gaine de fonction des Aux/IAAs).

Le contrôle des flux d'auxine est aussi un paramètre permettant de modifier l'homéostasie de l'auxine puisque la répartition des différents transporteurs d'auxine au niveau local permet la création de routes de l'auxine. Ces circuits permettent, notamment dans l'exemple de la racine, une accumulation d'auxine qui permettra l'initiation et le développement d'une racine latérale. Les gradients d'auxine au sein de la plante sont connus pour être fondamentaux pour des processus développementaux comme la gamétogenèse ou la formation des racines.

Il s'agit, et je l'assume, d'une vision très génétique de ce système où l'expression ou l'absence de l'expression de gènes est la base du système et ou la physiologie autorise la plasticité de ce système et permet de moduler les réponses de manière fine et en adéquation avec l'environnement. Les concentrations locales en auxine sont évidemment très importantes et servent à activer ou réprimer des réponses physiologiques. Mais les différentes sensibilités des tissus, les réponses développementales associées à la perception de l'auxine (racines latérales dans les racines, floraison au niveau des méristèmes apicaux) sont spécifiques de tissus grâce à la présence d'éléments de signalisation spécifiques qui permettent une réponse adapté à la perception de l'auxine. Ce raisonnement s'applique également pour d'autres stimuli, d'autres hormones. Ainsi je pense que sans les éléments de signalisation, la physiologie ne peut se faire correctement, mais que sans physiologie, le système est rigide, figé. C'est donc la génétique et la physiologie qui permettent à elles deux d'obtenir un organisme vivant, capable de s'adapter aux contraintes du milieu et d'évoluer au fil des générations selon les pressions évolutives subies par l'organisme.

Bibliographie

Achard, P., Vriezen, W.H., Van Der Straeten, D., and Harberd, N.P. (2003). Ethylene regulates arabidopsis development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. Plant Cell **15,** 2816-2825.

Achard, P., Liao, L., Jiang, C., Desnos, T., Bartlett, J., Fu, X., and Harberd, N.P. (2007). DELLAs contribute to plant photomorphogenesis. Plant Physiol **143,** 1163-1172.

Agorio, A., and Vera, P. (2007). ARGONAUTE4 is required for resistance to Pseudomonas syringae in Arabidopsis. Plant Cell **19,** 3778-3790.

Alabadi, D., and Blazquez, M.A. (2008). Integration of light and hormone signals. Plant Signal Behav **3,** 448-449.

Alabadi, D., Gil, J., Blazquez, M.A., and Garcia-Martinez, J.L. (2004). Gibberellins repress photomorphogenesis in darkness. Plant Physiol **134,** 1050-1057.

Alabadi, D., Gallego-Bartolome, J., Orlando, L., Garcia-Carcel, L., Rubio, V., Martinez, C., Frigerio, M., Iglesias-Pedraz, J.M., Espinosa, A., Deng, X.W., and Blazquez, M.A. (2008). Gibberellins modulate light signaling pathways to prevent Arabidopsis seedling de-etiolation in darkness. Plant J **53,** 324-335.

Anderson, C.T., Carroll, A., Akhmetova, L., and Somerville, C. (2010). Real-time imaging of cellulose reorientation during cell wall expansion in Arabidopsis roots. Plant Physiol **152,** 787-796.

Augur, C., Benhamou, N., Darvill, A., and Albersheim, P. (1993). Purification, characterization, and cell wall localization of an alpha-fucosidase that inactivates a xyloglucan oligosaccharin. Plant J **3,** 415-426.

Barberon, M., Zelazny, E., Robert, S., Conejero, G., Curie, C., Friml, J., and Vert, G. (2011). Monoubiquitin-dependent endocytosis of the iron-regulated transporter 1 (IRT1) transporter controls iron uptake in plants. Proc Natl Acad Sci U S A **108,** E450-458.

Barbez, E., Kubes, M., Rolcik, J., Beziat, C., Pencik, A., Wang, B., Rosquete, M.R., Zhu, J., Dobrev, P.I., Lee, Y., Zazimalova, E., Petrasek, J., Geisler, M., Friml, J., and Kleine-Vehn, J. (2012). A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants. Nature **485,** 119-122.

Barbier-Brygoo, H., Ephritikhine, G., Klambt, D., Ghislain, M., and Guern, J. (1989). Functional evidence for an auxin receptor at the plasmalemma of tobacco mesophyll protoplasts. Proc Natl Acad Sci U S A **86,** 891-895.

Barbier-Brygoo, H., Zimmermann, S., Thomine, S., White, I.R., Millner, P., and Guern, J. (1996). Elementary auxin response chains at the plasma membrane involve external abp1 and multiple electrogenic ion transport proteins. Plant Growth Regulation.

Barbier-Brygoo, H., Ephritikhine, G., Klämbt, D., Maurel, C., Pälme, K., Schell, J., and Guern, J. (1991). Perception of the Auxin Signal at the Plasma Membrane of Tobacco Mesophyll Protoplasts. Plant Journal **1,** 83-93.

Baster, P., Robert, S., Kleine-Vehn, J., Vanneste, S., Kania, U., Grunewald, W., De Rybel, B., Beeckman, T., and Friml, J. (2013). SCF(TIR1/AFB)-auxin signalling regulates PIN vacuolar trafficking and auxin fluxes during root gravitropism. EMBO J **32,** 260-274.

Bauly, J.M., Sealy, I.M., Macdonald, H., Brearley, J., Droge, S., Hillmer, S., Robinson, D.G., Venis, M.A., Blatt, M.R., Lazarus, C.M., and Napier, R.M. (2000). Overexpression of auxin-binding protein enhances the sensitivity of guard cells to auxin. Plant Physiol **124,** 1229-1238.

Baumann, M.J., Eklof, J.M., Michel, G., Kallas, A.M., Teeri, T.T., Czjzek, M., and Brumer, H., 3rd. (2007). Structural evidence for the evolution of xyloglucanase activity from xyloglucan endo-transglycosylases: biological implications for cell wall metabolism. Plant Cell **19,** 1947-1963.

Benhamed, M., Bertrand, C., Servet, C., and Zhou, D.X. (2006). Arabidopsis GCN5, HD1, and TAF1/HAF2 interact to regulate histone acetylation required for light-responsive gene expression. Plant Cell **18,** 2893-2903.

Benjamins, R., and Scheres, B. (2008). Auxin: the looping star in plant development. Annu Rev Plant Biol **59,** 443-465.

Bennett, M.J., Marchant, A., Green, H.G., May, S.T., Ward, S.P., Millner, P.A., Walker, A.R., Schulz, B., and Feldmann, K.A. (1996a). Arabidopsis AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. Science **273,** 948-950.

Benvenuto, G., Formiggini, F., Laflamme, P., Malakhov, M., and Bowler, C. (2002). The photomorphogenesis regulator DET1 binds the amino-terminal tail of histone H2B in a nucleosome context. Curr Biol **12,** 1529-1534.

Blakeslee, J.J., Bandyopadhyay, A., Lee, O.R., Mravec, J., Titapiwatanakun, B., Sauer, M., Makam, S.N., Cheng, Y., Bouchard, R., Adamec, J., Geisler, M., Nagashima, A., Sakai, T., Martinoia, E., Friml, J., Peer, W.A., and Murphy, A.S. (2007). Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in Arabidopsis. Plant Cell **19,** 131-147.

Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K., and Scheres, B. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. Nature **433,** 39-44.

Braun, N., Wyrzykowska, J., Muller, P., David, K., Couch, D., Perrot-Rechenmann, C., and Fleming, A.J. (2008a). Conditional Repression of AUXIN BINDING PROTEIN1 Reveals That It Coordinates Cell Division and Cell Expansion during Postembryonic Shoot Development in Arabidopsis and Tobacco. Plant Cell **10,** 2746-2762. .

Braun, N., Wyrzykowska, J., Muller, P., David, K., Couch, D., Perrot-Rechenmann, C., and Fleming, A.J. (2008b). Conditional repression of AUXIN BINDING PROTEIN1 reveals that it coordinates cell division and cell expansion during postembryonic shoot development in Arabidopsis and tobacco. Plant Cell **20,** 2746-2762.

Brunoud, G., Wells, D.M., Oliva, M., Larrieu, A., Mirabet, V., Burrow, A.H., Beeckman, T., Kepinski, S., Traas, J., Bennett, M.J., and Vernoux, T. (2012). A novel sensor to map auxin response and distribution at high spatio-temporal resolution. Nature **482,** 103-106.

Calderon-Villalobos, L.I., Tan, X., Zheng, N., and Estelle, M. (2010). Auxin perception--structural insights. Cold Spring Harb Perspect Biol **2,** a005546.

Calderon Villalobos, L.I., Lee, S., De Oliveira, C., Ivetac, A., Brandt, W., Armitage, L., Sheard, L.B., Tan, X., Parry, G., Mao, H., Zheng, N., Napier, R., Kepinski, S., and Estelle, M. (2012). A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. Nat Chem Biol **8,** 477-485.

Cardozo, T., and Pagano, M. (2004). The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. Nat Rev Mol Cell Biol **5,** 739-751.

Castel, S.E., and Martienssen, R.A. (2013). RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. Nat Rev Genet **14,** 100-112.

Cavalier, D.M., Lerouxel, O., Neumetzler, L., Yamauchi, K., Reinecke, A., Freshour, G., Zabotina, O.A., Hahn, M.G., Burgert, I., Pauly, M., Raikhel, N.V., and Keegstra, K. (2008). Disrupting two Arabidopsis thaliana xylosyltransferase genes results in plants deficient in xyloglucan, a major primary cell wall component. Plant Cell **20,** 1519-1537.

Chapman, E.J., and Estelle, M. (2009). Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. Annu Rev Genet **43,** 265-285.

Charron, J.B., He, H., Elling, A.A., and Deng, X.W. (2009). Dynamic landscapes of four histone modifications during deetiolation in Arabidopsis. Plant Cell **21,** 3732-3748.

Chen, J.G., Ullah, H., Young, J.C., Sussman, M.R., and Jones, A.M. (2001). ABP1 is required for organized cell elongation and division in Arabidopsis embryogenesis. Genes Dev **15,** 902-911.

Chen, X., Naramoto, S., Robert, S., Tejos, R., Lofke, C., Lin, D., Yang, Z., and Friml, J. (2012). ABP1 and ROP6 GTPase Signaling Regulate Clathrin-Mediated Endocytosis in Arabidopsis Roots. Curr Biol **22,** 1326-1332.

Cho, S.H., Addo-Quaye, C., Coruh, C., Arif, M.A., Ma, Z., Frank, W., and Axtell, M.J. (2008). Physcomitrella patens DCL3 is required for 22-24 nt siRNA accumulation, suppression of retrotransposon-derived transcripts, and normal development. PLoS Genet **4,** e1000314.

Christian, M., Steffens, B., Schenck, D., Burmester, S., Bottger, M., and Luthen, H. (2006). How does auxin enhance cell elongation? Roles of auxin-binding proteins and potassium channels in growth control. Plant Biol (Stuttg) **8,** 346-352.

Colon-Carmona, A., You, R., Haimovitch-Gal, T., and Doerner, P. (1999). Technical advance: spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. Plant J **20,** 503-508.

Cosgrove, D.J. (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. Nature **407,** 321-326.

Cosgrove, D.J. (2005). Growth of the plant cell wall. Nat Rev Mol Cell Biol **6,** 850-861.

Craddock, C., Lavagi, I., and Yang, Z. (2012). New insights into Rho signaling from plant ROP/Rac GTPases. Trends Cell Biol **22,** 492-501.

David, K., Carnero-Diaz, E., Leblanc, N., Monestiez, M., Grosclaude, J., and Perrot-Rechenmann, C. (2001). Conformational dynamics underlie the activity of the auxin-binding protein, Nt-abp1. J Biol Chem **276,** 34517-34523.

David, K.M., Couch, D., Braun, N., Brown, S., Grosclaude, J., and Perrot-Rechenmann, C. (2007). The auxin-binding protein 1 is essential for the control of cell cycle. Plant J **50,** 197-206.

Daviere, J.M., de Lucas, M., and Prat, S. (2008). Transcriptional factor interaction: a central step in DELLA function. Curr Opin Genet Dev **18,** 295-303.

De Grauwe, L., Vandenbussche, F., Tietz, O., Palme, K., and Van Der Straeten, D. (2005). Auxin, ethylene and brassinosteroids: tripartite control of growth in the Arabidopsis hypocotyl. Plant Cell Physiol **46,** 827-836.

De Smet, I., Voss, U., Lau, S., Wilson, M., Shao, N., Timme, R.E., Swarup, R., Kerr, I., Hodgman, C., Bock, R., Bennett, M., Jurgens, G., and Beeckman, T. (2011). Unraveling the evolution of auxin signaling. Plant Physiol **155,** 209-221.

del Pozo, J.C., Boniotti, M.B., and 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.

Desprez, T., Juraniec, M., Crowell, E.F., Jouy, H., Pochylova, Z., Parcy, F., Hofte, H., Gonneau, M., and Vernhettes, S. (2007). Organization of cellulose synthase complexes involved in primary cell wall synthesis in Arabidopsis thaliana. Proc Natl Acad Sci U S A **104,** 15572-15577.

Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., and Estelle, M. (2005a). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. Nature **435,** 441-445.

Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Jones, A.M., and Estelle, M. (2003). Auxin action in a cell-free system. Curr Biol **13,** 1418-1422.

Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Weijers, D., Lechner, E., Yamada, M., Hobbie, L., Ehrismann, J.S., Jurgens, G., and Estelle, M. (2005b). Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. Dev Cell **9,** 109-119.

Dhonukshe, P., Aniento, F., Hwang, I., Robinson, D.G., Mravec, J., Stierhof, Y.D., and Friml, J. (2007). Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in Arabidopsis. Curr Biol **17,** 520-527.

Dhonukshe, P., Huang, F., Galvan-Ampudia, C.S., Mahonen, A.P., Kleine-Vehn, J., Xu, J., Quint, A., Prasad, K., Friml, J., Scheres, B., and Offringa, R. (2010). Plasma membrane-bound AGC3 kinases phosphorylate PIN auxin carriers at TPRXS(N/S) motifs to direct apical PIN recycling. Development **137,** 3245-3255.

Dohrmann, U., Hertel, R., and Kowalik, H. (1978). Properties of auxin binding sites in different subcellular fractions from maize coleoptiles. Planta **140,** 97-106.

Effendi, Y., Rietz, S., Fischer, U., and Scherer, G.F. (2011). The heterozygous abp1/ABP1 insertional mutant has defects in functions requiring polar auxin transport and in regulation of early auxin-regulated genes. Plant J **65,** 282-294.

Eklof, J.M., and Brumer, H. The XTH gene family: an update on enzyme structure, function, and phylogeny in xyloglucan remodeling. Plant Physiol **153,** 456-466.

Eklof, J.M., and Brumer, H. (2010). The XTH gene family: an update on enzyme structure, function, and phylogeny in xyloglucan remodeling. Plant Physiol **153,** 456-466.

Elrouby, N., and Bureau, T.E. (2000). Molecular characterization of the Abp1 5'-flanking region in maize and the teosintes. Plant Physiol **124,** 369-377.

Esmon, C.A., Tinsley, A.G., Ljung, K., Sandberg, G., Hearne, L.B., and Liscum, E. (2006). A gradient of auxin and auxin-dependent transcription precedes tropic growth responses. Proc Natl Acad Sci U S A **103,** 236-241.

Feckler C., M.G., Feser W., Römer A. and Palme K. (2001). Mass spectrometric analysis reveals a cysteine bridge between residues 2 and 61 of the auxin-binding protein from Zea mays L. FEBS Lett **in press**.

Fellner, M., Ephritikhine, G., Barbier-Brygoo, H., and Guern, J. (1996). An antibody raised to a maize auxin-binding protein has inhibitory effects on cell division of tobacco mesophyll protoplasts. Plant Physiology and Biochemistry **34,** 133-138.

Feng, S., Martinez, C., Gusmaroli, G., Wang, Y., Zhou, J., Wang, F., Chen, L., Yu, L., Iglesias-Pedraz, J.M., Kircher, S., Schafer, E., Fu, X., Fan, L.M., and Deng, X.W. (2008). Coordinated regulation of Arabidopsis thaliana development by light and gibberellins. Nature **451,** 475-479.

Feraru, E., Vosolsobe, S., Feraru, M.I., Petrasek, J., and Kleine-Vehn, J. (2013). Evolution and Structural Diversification of PILS Putative Auxin Carriers in Plants. Front Plant Sci **3,** 227.

Fisher, A.J., Franklin, K.A., and (2011). Chromatin remodelling in plant light signalling. Physiol Plant **142,** 305-313.

Frankova, L., and Fry, S.C. (2012). Phylogenetic variation in glycosidases and glycanases acting on plant cell wall polysaccharides, and the detection of transglycosidase and trans-beta-xylanase activities. Plant J **67,** 662-681.

Friml, J. (2003). Auxin transport - shaping the plant. Curr Opin Plant Biol **6,** 7-12.

Friml, J., Wisniewska, J., Benkova, E., Mendgen, K., and Palme, K. (2002). Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. Nature **415,** 806-809.

Friml, J., Yang, X., Michniewicz, M., Weijers, D., Quint, A., Tietz, O., Benjamins, R., Ouwerkerk, P.B., Ljung, K., Sandberg, G., Hooykaas, P.J., Palme, K., and Offringa, R. (2004). A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. Science **306,** 862-865.

Fry, S.C. (1994). Oligosaccharins as plant growth regulators. Biochem Soc Symp **60,** 5-14.

Fry, S.C., Aldington, S., Hetherington, P.R., and Aitken, J. (1993). Oligosaccharides as signals and substrates in the plant cell wall. Plant Physiol **103,** 1-5.

Fry, S.C., McDougall, G.J., Lorences, E.P., Biggs, K.J., and Smith, R.C. (1990). Oligosaccharins from xyloglucan and cellulose: modulators of the action of auxin and H+ on plant growth. Symp Soc Exp Biol **44,** 285-298.

Fukaki, H., Taniguchi, N., and Tasaka, M. (2006). PICKLE is required for SOLITARY-ROOT/IAA14-mediated repression of ARF7 and ARF19 activity during Arabidopsis lateral root initiation. Plant J **48,** 380-389.

Fukaki, H., Tameda, S., Masuda, H., and Tasaka, M. (2002). Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of Arabidopsis. Plant J **29,** 153-168.

Galinha, C., Hofhuis, H., Luijten, M., Willemsen, V., Blilou, I., Heidstra, R., and Scheres, B. (2007). PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. Nature **449,** 1053-1057.

Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y.D., Jurgens, G., and Palme, K. (2001). Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. Nature **413,** 425-428.

Gendreau, E., Traas, J., Desnos, T., Grandjean, O., Caboche, M., and Hofte, H. (1997). Cellular basis of hypocotyl growth in Arabidopsis thaliana. Plant Physiol **114,** 295-305.

Gille, S., and Pauly, M. (2012). O-acetylation of plant cell wall polysaccharides. Front Plant Sci **3,** 12.

Gray, W.M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., and Estelle, M. (2001). Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. Nature **414,** 271-276.

Greenham, K., Santner, A., Castillejo, C., Mooney, S., Sairanen, I., Ljung, K., and Estelle, M. (2011). The AFB4 auxin receptor is a negative regulator of auxin signaling in seedlings. Curr Biol **21,** 520-525.

Grunewald, W., and Friml, J. (2010). The march of the PINs: developmental plasticity by dynamic polar targeting in plant cells. EMBO J **29,** 2700-2714.

Guilfoyle, T.J., and Hagen, G. (2007). Auxin response factors. Curr Opin Plant Biol **10,** 453-460.

Guilfoyle, T.J., and Hagen, G. (2012). Getting a grasp on domain III/IV responsible for Auxin Response Factor-IAA protein interactions. Plant Sci **190,** 82-88.

Günl, M., Neumetzler, L., Kraemer, F., de Souza, A., Schultink, A., Pena, M., York, W.S., and Pauly, M. (2011). AXY8 encodes an alpha-fucosidase, underscoring the importance of apoplastic metabolism on the fine structure of Arabidopsis cell wall polysaccharides. Plant Cell **23,** 4025-4040.

Guo, L., Zhou, J., Elling, A.A., Charron, J.B., and Deng, X.W. (2008). Histone modifications and expression of light-regulated genes in Arabidopsis are cooperatively influenced by changing light conditions. Plant Physiol **147,** 2070-2083.

Gupta, A., Singh, M., Jones, A.M., and Laxmi, A. Hypocotyl directional growth in Arabidopsis: a complex trait. Plant Physiol **159,** 1463-1476.

Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (1985). Rapid induction of selective transcription by auxins. Mol Cell Biol **5,** 1197-1203.

Hardtke, C.S., and Berleth, T. (1998). The *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. The EMBO Journal **17,** 1405-1411.

Harper, R.M., Stowe-Evans, E.L., Luesse, D.R., Muto, H., Tatematsu, K., Watahiki, M.K., Yamamoto, K., and Liscum, E. (2000). The NPH4 locus encodes the auxin response factor ARF7, a conditional regulator of differential growth in aerial Arabidopsis tissue. Plant Cell **12,** 757-770.

Havens, K.A., Guseman, J.M., Jang, S.S., Pierre-Jerome, E., Bolten, N., Klavins, E., and Nemhauser, J.L. (2012). A synthetic approach reveals extensive tunability of auxin signaling. Plant Physiol **160,** 135-142.

Hayashi, T., and Kaida, R. (2010). Functions of xyloglucan in plant cells. Mol Plant **4,** 17-24.

Henderson, I.R., Zhang, X., Lu, C., Johnson, L., Meyers, B.C., Green, P.J., and Jacobsen, S.E. (2006). Dissecting Arabidopsis thaliana DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. Nat Genet **38,** 721-725.

Henderson, J., Bauly, J.M., Ashford, D.A., Oliver, S.C., Hawes, C.R., Lazarus, C.M., and Venis, M.A. (1997). Retention of maize auxin-binding protein in the endoplasmic reticulum: quantifying escape and the role of auxin. Planta **202,** 313-323.

Hertel, R. (1995). Auxin binding protein 1 is a red herring (Opinion). Journal of Experimental Botany **46,** 461-462.

Hesse, T., Feldswisch, J., Balshusemann, D., Bauw, G., Puype, M., Vandekerckhove, J., Löbler, M., Klämbt, D., Schell, J., and Palme, K. (1989). Molecular cloning and structural analysisof a gene from Zea mays (L.) coding for a putative receptor for the plant hormone auxin. EMBO Journal **8,** 2453-2461.

Hsieh, H.L., Okamoto, H., Wang, M., Ang, L.H., Matsui, M., Goodman, H., and Deng, X.W. (2000). FIN219, an auxin-regulated gene, defines a link between phytochrome A and the

downstream regulator COP1 in light control of Arabidopsis development. Genes Dev **14,** 1958-1970.

Huang, F., Zago, M.K., Abas, L., van Marion, A., Galvan-Ampudia, C.S., and Offringa, R. (2010). Phosphorylation of conserved PIN motifs directs Arabidopsis PIN1 polarity and auxin transport. Plant Cell **22,** 1129-1142.

Iglesias, N., Abelenda, J.A., Rodino, M., Sampedro, J., Revilla, G., and Zarra, I. (2006). Apoplastic glycosidases active against xyloglucan oligosaccharides of Arabidopsis thaliana. Plant Cell Physiol **47,** 55-63.

Inohara, N., Shimomura, S., Fukui, T., and Futai, M. (1989). Auxin-binding protein located in the endoplasmic reticulum of maize shoots : molecular cloning and complete primary structure. Proceedings of the National Academy of Sciences USA **86,** 3564-3568.

Ito, J., Sono, T., Tasaka, M., and Furutani, M. (2011). MACCHI-BOU 2 is required for early embryo patterning and cotyledon organogenesis in Arabidopsis. Plant Cell Physiol **52,** 539-552.

Jamet, E., Roujol, D., San-Clemente, H., Irshad, M., Soubigou-Taconnat, L., Renou, J.P., and Pont-Lezica, R. (2009). Cell wall biogenesis of Arabidopsis thaliana elongating cells: transcriptomics complements proteomics. BMC Genomics **10,** 505.

Jang, I.C., Henriques, R., Seo, H.S., Nagatani, A., and Chua, N.H. (2010). Arabidopsis PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR proteins promote phytochrome B polyubiquitination by COP1 E3 ligase in the nucleus. Plant Cell **22,** 2370-2383.

Jensen, P.J., Hangarter, R.P., and Estelle, M. (1998). Auxin transport is required for hypocotyl elongation in light-grown but not dark-grown Arabidopsis. Plant Physiology **116,** 455-462.

Jia, Y., Lisch, D.R., Ohtsu, K., Scanlon, M.J., Nettleton, D., and Schnable, P.S. (2009). Loss of RNA-dependent RNA polymerase 2 (RDR2) function causes widespread and unexpected changes in the expression of transposons, genes, and 24-nt small RNAs. PLoS Genet **5,** e1000737.

Jing, Y., Zhang, D., Wang, X., Tang, W., Wang, W., Huai, J., Xu, G., Chen, D., Li, Y., and Lin, R. (2013). Arabidopsis chromatin remodeling factor PICKLE interacts with transcription factor HY5 to regulate hypocotyl cell elongation. Plant Cell **25,** 242-256.

Jones, A.M., and Herman, E.M. (1993). KDEL-Containing Auxin-Binding Protein Is Secreted to the Plasma Membrane and Cell Wall. Plant Physiology **101,** 595-606.

Jones, A.M., Im, K.H., Savka, M.A., Wu, M.J., Dewitt, N.G., Shillito, R., and Binns, A.N. (1998). Auxin-dependent cell expansion mediated by overexpressed auxin-binding protein 1. Science **282,** 1114-1117.

Jurado, S., Trivino, S.D., Abraham, Z., Manzano, C., Gutierrez, C., and Del Pozo, C. (2008). SKP2A protein, an F-box that regulates cell division, is degraded via the ubiquitin pathway. Plant Signal Behav **3,** 810-812.

Jurado, S., Abraham, Z., Manzano, C., Lopez-Torrejon, G., Pacios, L.F., and Del Pozo, J.C. (2010). The Arabidopsis cell cycle F-box protein SKP2A binds to auxin. Plant Cell **22,** 3891-3904.

Kaewthai, N., Gendre, D., Eklof, J.M., Ibatullin, F.M., Ezcurra, I., Bhalerao, R., and Brumer, H., 3rd. (2012). Group III-A XTH genes of Arabidopsis thaliana encode predominant xyloglucan endo-hydrolases that are dispensable for normal growth. Plant Physiol.

Kakar, K., Zhang, H., Scheres, B., and Dhonukshe, P. (2013). CLASP-mediated cortical microtubule organization guides PIN polarization axis. Nature **495,** 529-533.

Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P., and Fankhauser, C. (2010). Light-regulated plant growth and development. Curr Top Dev Biol **91,** 29-66.

Kepinski, S., and Leyser, O. (2004). Auxin-induced SCFTIR1-Aux/IAA interaction involves stable modification of the SCFTIR1 complex. Proc Natl Acad Sci U S A **101,** 12381-12386.

Kepinski, S., and Leyser, O. (2005). The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. Nature **435,** 446-451.

Khan, G.A., Declerck, M., Sorin, C., Hartmann, C., Crespi, M., and Lelandais-Briere, C. (2011). MicroRNAs as regulators of root development and architecture. Plant Mol Biol **77,** 47-58.

Kim, B.C., Soh, M.C., Kang, B.J., Furuya, M., and Nam, H.G. (1996). Two dominant photomorphogenic mutations of Arabidopsis thaliana identified as suppressor mutations of hy2. Plant J **9,** 441-456.

Kleine-Vehn, J., and Friml, J. (2008). Polar targeting and endocytic recycling in auxin-dependent plant development. Annu Rev Cell Dev Biol **24,** 447-473.

Kleine-Vehn, J., Dhonukshe, P., Sauer, M., Brewer, P.B., Wisniewska, J., Paciorek, T., Benkova, E., and Friml, J. (2008). ARF GEF-dependent transcytosis and polar delivery of PIN auxin carriers in Arabidopsis. Curr Biol **18,** 526-531.

Kovtun, Y., Chiu, W.L., Zeng, W., and Sheen, J. (1998). Suppression of auxin signal transduction by a MAPK cascade in higher plants. Nature **395,** 716-720.

Kowalczyk, M., and Sandberg, G. (2001). Quantitative analysis of indole-3-acetic acid metabolites in Arabidopsis. Plant Physiol **127,** 1845-1853.

Krecek, P., Skupa, P., Libus, J., Naramoto, S., Tejos, R., Friml, J., and Zazimalova, E. (2009). The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. Genome Biol **10,** 249.

Lau, O.S., and Deng, X.W. (2012). The photomorphogenic repressors COP1 and DET1: 20 years later. Trends Plant Sci **17,** 584-593.

Lau, S., Shao, N., Bock, R., Jurgens, G., and De Smet, I. (2009). Auxin signaling in algal lineages: fact or myth? Trends Plant Sci **14,** 182-188.

Lavy, M., Prigge, M.J., Tigyi, K., and Estelle, M. (2012). The cyclophilin DIAGEOTROPICA has a conserved role in auxin signaling. Development **139,** 1115-1124.

Law, J.A., and Jacobsen, S.E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. Nat Rev Genet **11,** 204-220.

Leblanc, N., Perrot-Rechenmann, C., and Barbier-Brygoo, H. (1999a). The auxin-binding protein Nt-ERabp1 alone activates an auxin-like transduction pathway. FEBS Letters **449,** 57-60.

Leblanc, N., Roux, C., Pradier, J.M., and Perrot-Rechenmann, C. (1997). Characterization of two cDNAs encoding auxin-binding proteins in *Nicotiana tabacum*. Plant Molecular Biology **33,** 679-689.

Leblanc, N., David, K., Grosclaude, J., Pradier, J.M., Barbier-Brygoo, H., Labiau, S., and Perrot-Rechenmann, C. (1999b). A novel immunological approach establishes that the auxin-binding protein, Nt-abp1, is an element involved in auxin signaling at the plasma membrane. J Biol Chem **274,** 28314-28320.

Lee, J.Y., Colinas, J., Wang, J.Y., Mace, D., Ohler, U., and Benfey, P.N. (2006). Transcriptional and posttranscriptional regulation of transcription factor expression in Arabidopsis roots. Proc Natl Acad Sci U S A **103,** 6055-6060.

Leitner, J., Petrasek, J., Tomanov, K., Retzer, K., Parezova, M., Korbei, B., Bachmair, A., Zazimalova, E., and Luschnig, C. (2012). Lysine63-linked ubiquitylation of PIN2 auxin carrier protein governs hormonally controlled adaptation of Arabidopsis root growth. Proc Natl Acad Sci U S A **109,** 8322-8327.

Lerouxel, O., Cavalier, D.M., Liepman, A.H., and Keegstra, K. (2006). Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides - a complex process. Curr Opin Plant Biol **9,** 621-630.

Lerouxel, O., Choo, T.S., Seveno, M., Usadel, B., Faye, L., Lerouge, P., and Pauly, M. (2002). Rapid structural phenotyping of plant cell wall mutants by enzymatic oligosaccharide fingerprinting. Plant Physiol **130,** 1754-1763.

Levy, S., Maclachlan, G., and Staehelin, L.A. (1997). Xyloglucan sidechains modulate binding to cellulose during in vitro binding assays as predicted by conformational dynamics simulations. Plant J **11,** 373-386.

Leyser, H.M., Pickett, F.B., Dharmasiri, S., and Estelle, M. (1996). Mutations in the AXR3 gene of Arabidopsis result in altered auxin response including ectopic expression from the SAUR-AC1 promoter. Plant J **10,** 403-413.

Leyser, H.M., Lincoln, C.A., Timpte, C., Lammer, D., Turner, J., and Estelle, M. (1993). Arabidopsis auxin-resistance gene AXR1 encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. Nature **364,** 161-164.

Lin, D., Nagawa, S., Chen, J., Cao, L., Chen, X., Xu, T., Li, H., Dhonukshe, P., Yamamuro, C., Friml, J., Scheres, B., Fu, Y., and Yang, Z. A ROP GTPase-dependent auxin signaling pathway regulates the subcellular distribution of PIN2 in Arabidopsis roots. Curr Biol **22,** 1319-1325.

Lin, D., Nagawa, S., Chen, J., Cao, L., Chen, X., Xu, T., Li, H., Dhonukshe, P., Yamamuro, C., Friml, J., Scheres, B., Fu, Y., and Yang, Z. (2012). A ROP GTPase-dependent auxin signaling pathway regulates the subcellular distribution of PIN2 in Arabidopsis roots. Curr Biol **22,** 1319-1325.

Lincoln, C., Britton, J.H., and Estelle, M. (1990). Growth and development of the axr1 mutants of Arabidopsis. Plant Cell **2,** 1071-1080.

Liu, F., Bakht, S., and Dean, C. (2012). Cotranscriptional role for Arabidopsis DICER-LIKE 4 in transcription termination. Science **335,** 1621-1623.

Ljung, K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. Development **140,** 943-950.

Llave, C., Kasschau, K.D., Rector, M.A., and Carrington, J.C. (2002). Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. Plant Cell **14,** 1605-1619.

Löbler, M., and Klämbt, D. (1985). Auxin-binding protein from coleoptile membranes of corn (*Zea mays* L.). I. Purification by immunological methods and characterization. J Biol Chem **260,** 9848-9853.

Lokerse, A.S., and Weijers, D. (2009). Auxin enters the matrix--assembly of response machineries for specific outputs. Curr Opin Plant Biol **12,** 520-526.

Long, J.A., Ohno, C., Smith, Z.R., and Meyerowitz, E.M. (2006). TOPLESS regulates apical embryonic fate in Arabidopsis. Science **312,** 1520-1523.

Luu, D.T., and Maurel, C. (2011). Aquaporin Trafficking in Plant Cells: An Emerging Membrane-Protein Model. Traffic.

Luu, D.T., Martiniere, A., Sorieul, M., Runions, J., and Maurel, C. (2011). Fluorescence recovery after photobleaching reveals high cycling dynamics of plasma membrane aquaporins in Arabidopsis roots under salt stress. Plant J **69,** 894-905.

Malamy, J.E., and Benfey, P.N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana. Development **124,** 33-44.

Marchant, A., Kargul, J., May, S.T., Muller, P., Delbarre, A., Perrot-Rechenmann, C., and Bennett, M.J. (1999). AUX1 regulates root gravitropism in Arabidopsis by facilitating auxin uptake within root apical tissues. Embo J **18,** 2066-2073.

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

Maris, A., Suslov, D., Fry, S.C., Verbelen, J.P., and Vissenberg, K. (2009). Enzymic characterization of two recombinant xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) proteins of Arabidopsis and their effect on root growth and cell wall extension. J Exp Bot **60,** 3959-3972.

McDougall, G.J., and Fry, S.C. (1989). Structure-activity relationships for xyloglucan oligosaccharides with antiauxin activity. Plant Physiol **89,** 883-887.

McGinnis, K.M., Thomas, S.G., Soule, J.D., Strader, L.C., Zale, J.M., Sun, T.P., and Steber, C.M. (2003). The Arabidopsis SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. Plant Cell **15,** 1120-1130.

Michniewicz, M., Zago, M.K., Abas, L., Weijers, D., Schweighofer, A., Meskiene, I., Heisler, M.G., Ohno, C., Zhang, J., Huang, F., Schwab, R., Weigel, D., Meyerowitz, E.M., Luschnig, C., Offringa, R., and Friml, J. (2007). Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. Cell **130,** 1044-1056.

Moller, B., and Weijers, D. (2009). Auxin control of embryo patterning. Cold Spring Harb Perspect Biol **1,** a001545.

Monroe-Augustus, M., Zolman, B.K., and Bartel, B. (2003). IBR5, a dual-specificity phosphatase-like protein modulating auxin and abscisic acid responsiveness in Arabidopsis. Plant Cell **15,** 2979-2991.

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

Mravec, J., Skupa, P., Bailly, A., Hoyerova, K., Krecek, P., Bielach, A., Petrasek, J., Zhang, J., Gaykova, V., Stierhof, Y.D., Dobrev, P.I., Schwarzerova, K., Rolcik, J., Seifertova, D., Luschnig, C., Benkova, E., Zazimalova, E., Geisler, M., and Friml, J. (2009). Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. Nature **459,** 1136-1140.

Muller, A., Guan, C.H., Galweiler, L., Tanzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E., and Palme, K. (1998). AtPIN2 defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control. EMBO Journal **17,** 6903-6911.

Nagawa, S., Xu, T., and Yang, Z. (2010). RHO GTPase in plants: Conservation and invention of regulators and effectors. Small GTPases **1,** 78-88.

Nagawa, S., Xu, T., Lin, D., Dhonukshe, P., Zhang, X., Friml, J., Scheres, B., Fu, Y., and Yang, Z. (2012). ROP GTPase-dependent actin microfilaments promote PIN1 polarization by localized inhibition of clathrin-dependent endocytosis. PLoS Biol **10,** e1001299.

Napier, R.M. (1997). Trafficking of the auxin-binding protein. Trends in Plant Science **2,** 251-255.

Napier, R.M., Venis, M.A., Bolton, M.A., Richardson, L.I., and Butcher, G.W. (1988). Preparation and characterization of monoclonal and polyclonal antibodies to maize membrane auxin-binding proteins. Planta **176,** 519-526.

Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O., and Jones, J.D. (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. Science **312,** 436-439.

Nemhauser, J.L., Hong, F., and Chory, J. (2006). Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. Cell **126,** 467-475.

Nick, P., Schafer, E., and Furuya, M. (1992). Auxin Redistribution During 1st Positive Phototropism in Corn Coleoptiles. Plant Physiology **99,** 1302-1308.

Noh, B., Murphy, A.S., and Spalding, E.P. (2001). Multidrug resistance-like genes of Arabidopsis required for auxin transport and auxin-mediated development. Plant Cell **13,** 2441-2454.

Oh, K., Ivanchenko, M.G., White, T.J., and Lomax, T.L. (2006). The diageotropica gene of tomato encodes a cyclophilin: a novel player in auxin signaling. Planta **224,** 133-144.

Okada, K., Ueda, J., Komaki, M.K., Bell, C.J., and Shimura, Y. (1991). Requirement of the Auxin Polar Transport System in Early Stages of Arabidopsis Floral Bud Formation. Plant Cell **3,** 677-684.

Okushima, Y., Mitina, I., Quach, H.L., and Theologis, A. (2005a). AUXIN RESPONSE FACTOR 2 (ARF2): a pleiotropic developmental regulator. Plant J **43,** 29-46.

Okushima, Y., Overvoorde, P.J., Arima, K., Alonso, J.M., Chan, A., Chang, C., Ecker, J.R., Hughes, B., Lui, A., Nguyen, D., Onodera, C., Quach, H., Smith, A., Yu, G., and Theologis, A. (2005b). Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in Arabidopsis thaliana: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. Plant Cell **17,** 444-463.

Osterlund, M.T., Hardtke, C.S., Wei, N., and Deng, X.W. (2000). Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. Nature **405,** 462-466.

Ostin, A., Kowalyczk, M., Bhalerao, R.P., and Sandberg, G. (1998). Metabolism of indole-3-acetic acid in Arabidopsis. Plant Physiol **118,** 285-296.

Ouyang, J., Shao, X., and Li, J. (2000). Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in Arabidopsis thaliana. Plant J **24,** 327-333.

Overvoorde, P.J., Okushima, Y., Alonso, J.M., Chan, A., Chang, C., Ecker, J.R., Hughes, B., Liu, A., Onodera, C., Quach, H., Smith, A., Yu, G., and Theologis, A. (2005). Functional genomic analysis of the AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID gene family members in Arabidopsis thaliana. Plant Cell **17,** 3282-3300.

Oyama, T., Shimura, Y., and Okada, K. (1997). The Arabidopsis HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. Genes Dev **11,** 2983-2995.

Paciorek, T., Zazimalova, E., Ruthardt, N., Petrasek, J., Stierhof, Y.-D., Kleine-Vehn, J., Morris, D.A., Emans, N., Jurgens, G., Geldner, N., and Friml, J. (2005). Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells **435,** 1251-1256.

Palin, R., and Geitmann, A. (2012). The role of pectin in plant morphogenesis. Biosystems **109,** 397-402.

Palme, K., Hesse, T., Campos, N., Garbers, C., Yanofsky, M.F., and Schell, J. (1992). Molecular analysis of an auxin binding protein gene located on chromosome 4 of Arabidopsis. Plant Cell **4,** 193-201.

Panigrahi, K.C., Panigrahy, M., Vervliet-Scheebaum, M., Lang, D., Reski, R., and Johri, M.M. (2009). Auxin-binding proteins without KDEL sequence in the moss Funaria hygrometrica. Plant Cell Rep **28,** 1747-1758.

Parent, J.S., Martinez de Alba, A.E., and Vaucheret, H. (2012). The origin and effect of small RNA signaling in plants. Front Plant Sci **3,** 179.

Park, Y.B., and Cosgrove, D.J. (2012a). A revised architecture of primary cell walls based on biomechanical changes induced by substrate-specific endoglucanases. Plant Physiol **158,** 1933-1943.

Park, Y.B., and Cosgrove, D.J. (2012b). Changes in cell wall biomechanical properties in the xyloglucan-deficient xxt1/xxt2 mutant of Arabidopsis. Plant Physiol **158,** 465-475.

Parry, G., and Estelle, M. (2006). Auxin receptors: a new role for F-box proteins. Curr Opin Cell Biol **18,** 152-156.

Parry, G., Calderon-Villalobos, L.I., Prigge, M., Peret, B., Dharmasiri, S., Itoh, H., Lechner, E., Gray, W.M., Bennett, M., and Estelle, M. (2009). Complex regulation of the TIR1/AFB family of auxin receptors. Proc Natl Acad Sci U S A **106,** 22540-22545.

Pauly, M., Albersheim, P., Darvill, A., and York, W.S. (1999). Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. Plant J **20,** 629-639.

Pauly, M., Qin, Q., Greene, H., Albersheim, P., Darvill, A., and York, W.S. (2001). Changes in the structure of xyloglucan during cell elongation. Planta **212,** 842-850.

Pelham, H.R. (1989). Control of protein exit from the endoplasmic reticulum. Annu Rev Cell Biol **5,** 1-23.

Pena, M.J., Ryden, P., Madson, M., Smith, A.C., and Carpita, N.C. (2004). The galactose residues of xyloglucan are essential to maintain mechanical strength of the primary cell walls in Arabidopsis during growth. Plant Physiol **134,** 443-451.

Peret, B., De Rybel, B., Casimiro, I., Benkova, E., Swarup, R., Laplaze, L., Beeckman, T., and Bennett, M.J. (2009). Arabidopsis lateral root development: an emerging story. Trends Plant Sci **14,** 399-408.

Peret, B., Swarup, K., Ferguson, A., Seth, M., Yang, Y., Dhondt, S., James, N., Casimiro, I., Perry, P., Syed, A., Yang, H., Reemmer, J., Venison, E., Howells, C., Perez-Amador, M.A., Yun, J., Alonso, J., Beemster, G.T., Laplaze, L., Murphy, A., Bennett, M.J., Nielsen, E., and Swarup, R. (2012). AUX/LAX genes encode a family of auxin influx transporters that perform distinct functions during Arabidopsis development. Plant Cell **24,** 2874-2885.

Perez-Torres, C.A., Lopez-Bucio, J., Cruz-Ramirez, A., Ibarra-Laclette, E., Dharmasiri, S., Estelle, M., and Herrera-Estrella, L. (2008). Phosphate availability alters lateral root development in Arabidopsis by modulating auxin sensitivity via a mechanism involving the TIR1 auxin receptor. Plant Cell **20,** 3258-3272.

Perrot-Rechenmann, C. (2010). Cellular responses to auxin: division versus expansion. Cold Spring Harb Perspect Biol **2,** a001446.

Petersson, S.V., Johansson, A.I., Kowalczyk, M., Makoveychuk, A., Wang, J.Y., Moritz, T., Grebe, M., Benfey, P.N., Sandberg, G., and Ljung, K. (2009). An auxin gradient and maximum in the Arabidopsis root apex shown by high-resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis. Plant Cell **21,** 1659-1668.

Petrasek, J., and Friml, J. (2009). Auxin transport routes in plant development. Development **136,** 2675-2688.

Prigge, M.J., Lavy, M., Ashton, N.W., and Estelle, M. (2010). Physcomitrella patens auxin-resistant mutants affect conserved elements of an auxin-signaling pathway. Curr Biol **20,** 1907-1912.

Provart, N., and Zhu, T. (2003). A Browser-based Functional Classification SuperViewer for Arabidopsis Genomics. *Currents in Computational Molecular Biology* **2003,** 271-272.

Pufky, J., Qiu, Y., Rao, M.V., Hurban, P., and Jones, A.M. (2003). The auxin-induced transcriptome for etiolated Arabidopsis seedlings using a structure/function approach. Funct Integr Genomics **3,** 135-143.

Rademacher, E.H., Moller, B., Lokerse, A.S., Llavata-Peris, C.I., van den Berg, W., and Weijers, D. (2011). A cellular expression map of the Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR gene family. Plant J **68,** 597-606.

Ramos, J.A., Zenser, N., Leyser, O., and Callis, J. (2001). Rapid degradation of auxin/indoleacetic acid proteins requires conserved amino acids of domain II and is proteasome dependent. Plant Cell **13,** 2349-2360.

Rayle, D.L., and Cleland, R.E. (1992a). The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. Plant Physiol **99,** 1271-1274.

Rayle, D.L., and Cleland, R.E. (1992b). The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. Plant Physiol **99,** 1271-1274.

Refregier, G., Pelletier, S., Jaillard, D., and Hofte, H. (2004). Interaction between wall deposition and cell elongation in dark-grown hypocotyl cells in Arabidopsis. Plant Physiol **135,** 959-968.

Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B., and Bartel, D.P. (2002). MicroRNAs in plants. Genes Dev **16,** 1616-1626.

Rensing, S.A., Lang, D., Zimmer, A.D., Terry, A., Salamov, A., Shapiro, H., Nishiyama, T., Perroud, P.F., Lindquist, E.A., Kamisugi, Y., Tanahashi, T., Sakakibara, K., Fujita, T., Oishi, K., Shin, I.T., Kuroki, Y., Toyoda, A., Suzuki, Y., Hashimoto, S., Yamaguchi, K., Sugano, S., Kohara, Y., Fujiyama, A., Anterola, A., Aoki, S., Ashton, N., Barbazuk, W.B., Barker, E., Bennetzen, J.L., Blankenship, R., Cho, S.H., Dutcher, S.K., Estelle, M., Fawcett, J.A., Gundlach, H., Hanada, K., Heyl, A., Hicks, K.A., Hughes, J., Lohr, M., Mayer, K., Melkozernov, A., Murata, T., Nelson, D.R., Pils, B., Prigge, M., Reiss, B., Renner, T., Rombauts, S., Rushton, P.J., Sanderfoot, A., Schween, G., Shiu, S.H., Stueber, K., Theodoulou, F.L., Tu, H., Van de Peer, Y., Verrier, P.J., Waters, E., Wood, A., Yang, L., Cove, D., Cuming, A.C., Hasebe, M., Lucas, S., Mishler, B.D., Reski, R., Grigoriev, I.V., Quatrano, R.S., and Boore, J.L. (2008). The Physcomitrella genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. Science **319,** 64-69.

Robert, S., Chary, S.N., Drakakaki, G., Li, S., Yang, Z., Raikhel, N.V., and Hicks, G.R. (2008). Endosidin1 defines a compartment involved in endocytosis of the brassinosteroid receptor BRI1 and the auxin transporters PIN2 and AUX1. Proc Natl Acad Sci U S A **105,** 8464-8469.

Robert, S., Kleine-Vehn, J., Barbez, E., Sauer, M., Paciorek, T., Baster, P., Vanneste, S., Zhang, J., Simon, S., Covanova, M., Hayashi, K., Dhonukshe, P., Yang, Z., Bednarek, S.Y., Jones, A.M., Luschnig, C., Aniento, F., Zazimalova, E., and Friml, J. (2010). ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in Arabidopsis. Cell **143,** 111-121.

Rolland-Lagan, A.G., and Prusinkiewicz, P. (2005). Reviewing models of auxin canalization in the context of leaf vein pattern formation in Arabidopsis. Plant J **44,** 854-865.

Rose, J.K., Braam, J., Fry, S.C., and Nishitani, K. (2002). The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. Plant Cell Physiol **43,** 1421-1435.

Rouse, D., Mackay, P., Stirnberg, P., Estelle, M., and Leyser, O. (1998). Changes in auxin response from mutations in an AUX/IAA gene. Science **279,** 1371-1373.

Royle, S.J. (2006). The cellular functions of clathrin. Cell Mol Life Sci **63,** 1823-1832.

Rück, A., Pälme, K., Venis, M.A., Napier, R.M., and Felle, R.H. (1993). Patch-Clamp Analysis Establishes a Role for an Auxin Binding Protein in the Auxin Stimulation of Plasma Membrane Current in Zea-Mays Protoplasts. Plant Journal **4,** 41-46.

Ruegger, M., Dewey, E., Gray, W.M., Hobbie, L., Turner, J., and Estelle, M. (1998). The TIR1 protein of Arabidopsis functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. Genes & Development **12,** 198-207.

Russinova, E., Borst, J.W., Kwaaitaal, M., Cano-Delgado, A., Yin, Y., Chory, J., and de Vries, S.C. (2004). Heterodimerization and endocytosis of Arabidopsis brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1). Plant Cell **16,** 3216-3229.

Ryden, P., Sugimoto-Shirasu, K., Smith, A.C., Findlay, K., Reiter, W.D., and McCann, M.C. (2003). Tensile properties of Arabidopsis cell walls depend on both a xyloglucan cross-linked microfibrillar network and rhamnogalacturonan II-borate complexes. Plant Physiol **132,** 1033-1040.

Sairanen, I., Novak, O., Pencik, A., Ikeda, Y., Jones, B., Sandberg, G., and Ljung, K. (2012). Soluble carbohydrates regulate auxin biosynthesis via PIF proteins in Arabidopsis. Plant Cell **24,** 4907-4916.

Sampedro, J., and Cosgrove, D.J. (2005). The expansin superfamily. Genome Biol **6,** 242.

Sanchez, M., Gianzo, C., Sampedro, J., Revilla, G., and Zarra, I. (2003). Changes in alpha-xylosidase during intact and auxin-induced growth of pine hypocotyls. Plant Cell Physiol **44,** 132-138.

Sasaki, K., Shimomura, K., Kamada, H., and Harada, H. (1994). IAA metabolism in embryogenic and non-embryogenic carrot cells. Plant and Cell Physiology **35,** 1159-1164.

Sauer, M., and Kleine-Vehn, J. AUXIN BINDING PROTEIN1: the outsider. Plant Cell **23,** 2033-2043.

Scheller, H.V., and Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. Annu Rev Plant Biol **61,** 263-289.

Shi, J.H., and Yang, Z.B. Is ABP1 an auxin receptor yet? Mol Plant **4,** 635-640.

Shimomura, S., Sotobayashi, T., Futai, M., and Fukui, T. (1986). Purification and properties of an auxin-binding protein from maize shoot membranes. J Biochem (Tokyo) **99,** 1513-1524.

Shimomura, Y. (2006). [Opportunity, environment, and team work as contributions to ophthalmologic research]. Nippon Ganka Gakkai Zasshi **110,** 930.

Shin, J., Kim, K., Kang, H., Zulfugarov, I.S., Bae, G., Lee, C.H., Lee, D., and Choi, G. (2009). Phytochromes promote seedling light responses by inhibiting four negatively-acting phytochrome-interacting factors. Proc Natl Acad Sci U S A **106,** 7660-7665.

Shin, R., Burch, A.Y., Huppert, K.A., Tiwari, S.B., Murphy, A.S., Guilfoyle, T.J., and Schachtman, D.P. (2007). The Arabidopsis transcription factor MYB77 modulates auxin signal transduction. Plant Cell **19,** 2440-2453.

Shishova, E., and Lindberg, S. (1999). Auxin-induced cytosol acidification in wheat leaf protoplasts depends on external concentration of Ca2+. Journal of Plant Physiology **155,** 190-196.

Smalle, J., and Vierstra, R.D. (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. Annu Rev Plant Biol **55,** 555-590.

Song, Y.H., Yoo, C.M., Hong, A.P., Kim, S.H., Jeong, H.J., Shin, S.Y., Kim, H.J., Yun, D.J., Lim, C.O., Bahk, J.D., Lee, S.Y., Nagao, R.T., Key, J.L., and Hong, J.C. (2008). DNA-binding study identifies C-box and hybrid C/G-box or C/A-box motifs as high-affinity binding sites for STF1 and LONG HYPOCOTYL5 proteins. Plant Physiol **146,** 1862-1877.

Staswick, P.E., Serban, B., Rowe, M., Tiryaki, I., Maldonado, M.T., Maldonado, M.C., and Suza, W. (2005). Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic Acid. Plant Cell **17,** 616-627.

Steffens, B., Feckler, C., Palme, K., Christian, M., Bottger, M., and Luthen, H. (2001). The auxin signal for protoplast swelling is perceived by extracellular ABP1. Plant J **27,** 591-599.

Stepanova, A.N., Yun, J., Likhacheva, A.V., and Alonso, J.M. (2007). Multilevel interactions between ethylene and auxin in Arabidopsis roots. Plant Cell **19,** 2169-2185.

Stepanova, A.N., Yun, J., Robles, L.M., Novak, O., He, W., Guo, H., Ljung, K., and Alonso, J.M. (2011). The Arabidopsis YUCCA1 flavin monooxygenase functions in the indole-3-pyruvic acid branch of auxin biosynthesis. Plant Cell **23,** 3961-3973.

Stepanova, A.N., Robertson-Hoyt, J., Yun, J., Benavente, L.M., Xie, D.Y., Dolezal, K., Schlereth, A., Jurgens, G., and Alonso, J.M. (2008). TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. Cell **133,** 177-191.

Strader, L.C., and Nemhauser, J.L. (2013). Auxin 2012: a rich mea ho'oulu. Development **140,** 1153-1157.

Strader, L.C., Monroe-Augustus, M., and Bartel, B. (2008). The IBR5 phosphatase promotes Arabidopsis auxin responses through a novel mechanism distinct from TIR1-mediated repressor degradation. BMC Plant Biol **8,** 41.

Swarup, K., Benkova, E., Swarup, R., Casimiro, I., Peret, B., Yang, Y., Parry, G., Nielsen, E., De Smet, I., Vanneste, S., Levesque, M.P., Carrier, D., James, N., Calvo, V., Ljung, K., Kramer, E., Roberts, R., Graham, N., Marillonnet, S., Patel, K., Jones, J.D., Taylor, C.G., Schachtman, D.P., May, S., Sandberg, G., Benfey, P., Friml, J., Kerr, I., Beeckman, T., Laplaze, L., and Bennett, M.J. (2008). The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. Nat Cell Biol **10,** 946-954.

Szemenyei, H., Hannon, M., and Long, J.A. (2008). TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during Arabidopsis embryogenesis. Science **319,** 1384-1386.

Takeda, T., Furuta, Y., Awano, T., Mizuno, K., Mitsuishi, Y., and Hayashi, T. (2002). Suppression and acceleration of cell elongation by integration of xyloglucans in pea stem segments. Proc Natl Acad Sci U S A **99,** 9055-9060.

Tamura, K., Shimada, T., Kondo, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2005). KATAMARI1/MURUS3 Is a novel golgi membrane protein that is required for endomembrane organization in Arabidopsis. Plant Cell **17,** 1764-1776.

Tan, X., Calderon-Villalobos, L.I., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C.V., Estelle, M., and Zheng, N. (2007). Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. Nature **446,** 640-645.

Terrile, M.C., Paris, R., Calderon-Villalobos, L.I., Iglesias, M.J., Lamattina, L., Estelle, M., and Casalongue, C.A. (2012). Nitric oxide influences auxin signaling through S-nitrosylation of the Arabidopsis TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 auxin receptor. Plant J **70,** 492-500.

Theologis, A., Huynh, T.V., and Davis, R.W. (1985). Rapid induction of specific mRNAs by auxin in pea epicotyl tissue. Journal of Molecular Biology **183,** 53-68.

Thiel, G., Blatt, M.R., Fricker, M.D., White, I.R., and Millner, P. (1993). Modulation of K+ channels in Vicia stomatal guard cells by peptide homologs to the auxin-binding protein C terminus. Proc Natl Acad Sci U S A **90,** 11493-11497.

Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A., and Browse, J. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. Nature **448,** 661-665.

Tian, C.E., Muto, H., Higuchi, K., Matamura, T., Tatematsu, K., Koshiba, T., and Yamamoto, K.T. (2004). Disruption and overexpression of auxin response factor 8 gene of Arabidopsis affect hypocotyl elongation and root growth habit, indicating its possible involvement in auxin homeostasis in light condition. Plant J **40,** 333-343.

Tian, H., Klambt, D., and Jones, A.M. (1995). Auxin-binding protein 1 does not bind auxin within the endoplasmic reticulum despite this being the predominant subcellular location for this hormone receptor. J Biol Chem **270,** 26962-26969.

Tillman, U., Viola, G., Kayser, B., Siemester, G., Hesse, T., Palme, K., Löbler, M., and Klämbt, D. (1989). cDNA clones of the auxin-binding protein from corn coleoptiles (*Zea mays* L.) : isolation and characterization by immunological methods. EMBO Journal **8,** 2463-2467.

Tiwari, S.B., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (2004). Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. Plant Cell **16,** 533-543.

Tromas, A., Paponov, I., and Perrot-Rechenmann, C. (2010a). AUXIN BINDING PROTEIN 1: functional and evolutionary aspects. Trends Plant Sci **15,** 436-446.

Tromas, A., Paque, S., Stierlé, V., Quettier A.L., Muller, P., Lechner, E., Genschik, P., and Perrot-Rechenmann, C. AUXIN BINDING PROTEIN 1 is a negative regulator of the SCFTIR1/AFB pathway.

Tromas, A., Braun, N., Muller, P., Khodus, T., Paponov, I.A., Palme, K., Ljung, K., Lee, J.Y., Benfey, P., Murray, J.A., Scheres, B., and Perrot-Rechenmann, C. (2009). The AUXIN BINDING PROTEIN 1 is required for differential auxin responses mediating root growth. PLoS One **4,** e6648.

Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. Plant Cell **9,** 1963-1971.

Vaillant, I., and Paszkowski, J. (2007). Role of histone and DNA methylation in gene regulation. Curr Opin Plant Biol **10,** 528-533.

Vandenbussche, F., Petrasek, J., Zadnikova, P., Hoyerova, K., Pesek, B., Raz, V., Swarup, R., Bennett, M., Zazimalova, E., Benkova, E., and Van Der Straeten, D. The auxin influx carriers AUX1 and LAX3 are involved in auxin-ethylene interactions during apical hook development in Arabidopsis thaliana seedlings. Development **137,** 597-606.

Vanzin, G.F., Madson, M., Carpita, N.C., Raikhel, N.V., Keegstra, K., and Reiter, W.D. (2002). The mur2 mutant of Arabidopsis thaliana lacks fucosylated xyloglucan because of a lesion in fucosyltransferase AtFUT1. Proc Natl Acad Sci U S A **99,** 3340-3345.

Varaud, E., Brioudes, F., Szecsi, J., Leroux, J., Brown, S., Perrot-Rechenmann, C., and Bendahmane, M. (2011). AUXIN RESPONSE FACTOR8 regulates Arabidopsis petal growth by interacting with the bHLH transcription factor BIGPETALp. Plant Cell **23,** 973-983.

Venis, M.A. (1995). Auxin binding protein 1 is a red herring? Oh no it isn't! (Opinion). Journal of Experimental Botany **46,** 463-465.

Venis, M.A., and Napier, R.M. (1990). Characterisation of auxin receptors. Symp Soc Exp Biol **44,** 55-65.

Venis, M.A., Napier, R.M., Barbier-Brygoo, H., Maurel, C., Perrot-Rechenmann, C., and Guern, J. (1992). Antibodies to a peptide from the maize auxin-binding protein have auxin agonist activity. Proc Natl Acad Sci U S A **89,** 7208-7212.

Vernoux, T., Brunoud, G., Farcot, E., Morin, V., Van den Daele, H., Legrand, J., Oliva, M., Das, P., Larrieu, A., Wells, D., Guedon, Y., Armitage, L., Picard, F., Guyomarc'h, S., Cellier, C., Parry, G., Koumproglou, R., Doonan, J.H., Estelle, M., Godin, C., Kepinski, S., Bennett, M., De Veylder, L., and Traas, J. (2011). The auxin signalling network translates dynamic input into robust patterning at the shoot apex. Mol Syst Biol **7,** 508-522.

Viaene, T., Delwiche, C.F., Rensing, S.A., and Friml, J. (2013). Origin and evolution of PIN auxin transporters in the green lineage. Trends Plant Sci **18,** 5-10.

Vierstra, R.D. (2009). The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. Nat Rev Mol Cell Biol **10,** 385-397.

Vissenberg, K., Oyama, M., Osato, Y., Yokoyama, R., Verbelen, J.P., and Nishitani, K. (2005). Differential expression of AtXTH17, AtXTH18, AtXTH19 and AtXTH20 genes in Arabidopsis roots. Physiological roles in specification in cell wall construction. Plant Cell Physiol **46,** 192-200.

Vriezen, W.H., Achard, P., Harberd, N.P., and Van Der Straeten, D. (2004). Ethylene-mediated enhancement of apical hook formation in etiolated Arabidopsis thaliana seedlings is gibberellin dependent. Plant J **37,** 505-516.

Wabnik, K., Kleine-Vehn, J., Govaerts, W., and Friml, J. (2011). Prototype cell-to-cell auxin transport mechanism by intracellular auxin compartmentalization. Trends Plant Sci **16,** 468-475.

Walsh, T.A., Neal, R., Merlo, A.O., Honma, M., Hicks, G.R., Wolff, K., Matsumura, W., and Davies, J.P. (2006). Mutations in an auxin receptor homolog AFB5 and in SGT1b confer resistance to synthetic picolinate auxins and not to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid or indole-3-acetic acid in Arabidopsis. Plant Physiol **142,** 542-552.

Wang, C., Yan, X., Chen, Q., Jiang, N., Fu, W., Ma, B., Liu, J., Li, C., Bednarek, S.Y., and Pan, J. (2013). Clathrin light chains regulate clathrin-mediated trafficking, auxin signaling, and development in Arabidopsis. Plant Cell **25,** 499-516.

Wang, H., Ma, L.G., Li, J.M., Zhao, H.Y., and Deng, X.W. (2001). Direct interaction of Arabidopsis cryptochromes with COP1 in light control development. Science **294,** 154-158.

Warwicker, J. (2001). Modelling of auxin-binding protein 1 suggests that its C-terminus and auxin could compete for a binding site that incorporates a metal ion and tryptophan residue 44. Planta **212,** 343-347.

Watahiki, M.K., and Yamamoto, K.T. (1997). The massugu1 mutation of Arabidopsis identified with failure of auxin- induced growth curvature of hypocotyl confers auxin insensitivity to hypocotyl and leaf. Plant Physiol **115,** 419-426.

Weijers, D., Benkova, E., Jager, K.E., Schlereth, A., Hamann, T., Kientz, M., Wilmoth, J.C., Reed, J.W., and Jurgens, G. (2005). Developmental specificity of auxin response by pairs of ARF and Aux/IAA transcriptional regulators. EMBO J **24,** 1874-1885.

Wierzbicki, A.T. (2012). The role of long non-coding RNA in transcriptional gene silencing. Curr Opin Plant Biol **15,** 517-522.

Wolf, S., Hematy, K., and Hofte, H. (2012). Growth control and cell wall signaling in plants. Annu Rev Plant Biol **63,** 381-407.

Woo, E.J., Marshall, J., Bauly, J., Chen, J.G., Venis, M., Napier, R.M., and Pickersgill, R.W. (2002a). Crystal structure of auxin-binding protein 1 in complex with auxin. EMBO J **21,** 2877-2885.

Woo, E.J., Marshall, J., Bauly, J., Chen, J.G., Venis, M., Napier, R.M., and Pickersgill, R.W. (2002b). Crystal structure of auxin-binding protein 1 in complex with auxin. Embo J **21,** 2877-2885.

Woodward, A.W., and Bartel, B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. Ann Bot (Lond) **95,** 707-735.

Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E., and Carrington, J.C. (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. PLoS Biol **2,** E104.

Xu, T., Nagawa, S., and Yang, Z. (2011). Uniform auxin triggers the Rho GTPase-dependent formation of interdigitation patterns in pavement cells. Small Gtpases **2,** 227-232.

Xu, T., Wen, M., Nagawa, S., Fu, Y., Chen, J.G., Wu, M.J., Perrot-Rechenmann, C., Friml, J., Jones, A.M., and Yang, Z. (2010). Cell surface- and rho GTPase-based auxin signaling controls cellular interdigitation in Arabidopsis. Cell **143,** 99-110.

Yang, Y., Hammes, U.Z., Taylor, C.G., Schachtman, D.P., and Nielsen, E. (2006). High-affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein. Curr Biol **16,** 1123-1127.

York, W.S., Darvill, A.G., and Albersheim, P. (1984). Inhibition of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid-stimulated elongation of pea stem segments by a xyloglucan oligosaccharide. Plant Physiol **75,** 295-297.

Yu, H., Moss, B., Jang, S.S., Prigge, M.J., Klavins, E., Nemhauser, J., and Estelle, M. Mutations in the TIR1 auxin receptor that increase affinity for Aux/IAA proteins result in auxin hypersensitivity. Plant Physiol.

Zablackis, E., York, W.S., Pauly, M., Hantus, S., Reiter, W.D., Chapple, C.C., Albersheim, P., and Darvill, A. (1996). Substitution of L-fucose by L-galactose in cell walls of Arabidopsis mur1. Science **272,** 1808-1810.

Zabotina, O.A. (2012). Xyloglucan and its biosynthesis. Front Plant Sci **3,** 134.

Zabotina, O.A., van de Ven, W.T., Freshour, G., Drakakaki, G., Cavalier, D., Mouille, G., Hahn, M.G., Keegstra, K., and Raikhel, N.V. (2008). Arabidopsis XXT5 gene encodes a putative alpha-1,6-xylosyltransferase that is involved in xyloglucan biosynthesis. Plant J **56,** 101-115.

Zazimalova, E., Murphy, A.S., Yang, H., Hoyerova, K., and Hosek, P. (2010). Auxin transporters--why so many? Cold Spring Harb Perspect Biol **2,** a001552.

Zemach, A., Kim, M.Y., Hsieh, P.H., Coleman-Derr, D., Eshed-Williams, L., Thao, K., Harmer, S.L., and Zilberman, D. (2013). The Arabidopsis Nucleosome Remodeler DDM1 Allows DNA Methyltransferases to Access H1-Containing Heterochromatin. Cell **153,** 193-205.

Zhang, H., He, H., Wang, X., Yang, X., Li, L., and Deng, X.W. Genome-wide mapping of the HY5-mediated gene networks in Arabidopsis that involve both transcriptional and post-transcriptional regulation. Plant J **65,** 346-358.

Zhao, Y., Christensen, S.K., Fankhauser, C., Cashman, J.R., Cohen, J.D., Weigel, D., and Chory, J. (2001). A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. Science **291,** 306-309.

Matériels et méthodes

Les Données utilisées dans les manuscrits d'article ((Tromas et al., 2013) et (Paque et al., 2013)) présentés dans cette thèse ne sont pas récapitulés dans cette partie.

Lignées utilisées

La totalité des lignées utilisées étaient dans un écotype Columbia hormis pour les lignées *tir1.1*, *afb2.1, afb3.1* avec ou sans ss12k car le mutant *afb2.1* est dans un fond Lansberg. La liste des mutants d'insertion est donnée en annexe. Les lignées utilisées seront présentées en annexe.

Culture

Les graines étaient stérilisés soit par vapeur de chlore (4 heures minium) soit à l'aide d éthanol selon le protocole suivant :

15 min dans solution éthanol 70%, SDS 0.05%
Rinçage à l'éthanol pur
Etalement sur papier buvard sous hotte jusqu'à évaporation de l'éthanol.

La culture des plantes s'est faire sur un milieu MS1/2 autoclavé. La culture des plantules à l'obscurité s'est faite dans un caisson de culture sans lumière. L'ouverture du caisson se faisant sous lumière verte. Pour les plantes ayant poussé à la lumière, la culture s'est faite en chambre de culture en lumière continue (intensité lumineuse de 100 $\mu E.m^{-2}.s^{-2}$)

Mesures

Photo prises par scanner ou appareil photo avec (étalon pour l'échelle). Mesures via Image J puis traitement des données par Excel.

STABILITÉ DES AUX/IAAS.

Les plantules ont été semées sur drin. Sur des plantules de 5 jours, un choc thermique de 3h à 37°C a permis l'expression du marqueur. La sortie du choc thermique constitue le t0. Pour les autres conditions, les drins ont été transferés sur des boites MS1/2 préalablement stocké à 4°C pendant 5 min afin d'arrêter la production du marqueur. Ensuite elles étaient à température ambiante le temps de la cinétique.

Les colorations GUS

Les colorations GUS Ont été faite dans 2mL de tampon GUS (50mM Na_2HPO_4, 50mM NaH_2PO_4,1mM EDTA, 0.1% SDS) 0.1 mM ferricyanide, 1 mM ferrocyanide) avec de la glucorinidase à 1mM (stock 40mM dilué dans DMF). Ensuite, les plantules ont été stocks à 37°C jusqu'à la coloration des tissus. Les photos ont ensuite été obtenus à l'aide d'une loupe binoculaire.

Fluorimétrie

Voir matériel et méthodes article Tromas et al., (2013) en annexe

PCR

Mix PCR utilisé :

20µL final

Kit eurobio (tampon 1X, 1,5 mM MgCl2, 2mM dNTPs, amorces 1µM, 0.18 unités de Taq, qsp eau distillée

Programme PCR :

3min 95°C (30sec à 95°C, 30sec à 55°C, 1min par kb à 72°C) x 30 cycles, 3 min à 72°C. migration sur gel d'agarose (Sigma) contenant du BET à 1µM puis utilisation d'imageur pour analyse de la migration.

Partie paroi

Voir matériel et méthodes du manuscrit d'article (Résultats partie I)

Partie suppresseur

Préparation de l'ADN pour séquençage

Matériel

Nombre de plantules

Pour représenter une lignée 15 plantules de 6 jours ayant poussés en jour continu ont été utiklisées

Pour la lignée parent ss12k, un seul lot de la lignée K9 Ler BC3F3 a été utilisée.

Concernant les lignées suppressives 36, 99 et 138, un nombre plus élevé de lignées recombinanates F3 était nécéssaires. Ainsi 45, 48 et 100 lignées (pour 36,99 et 138 respectivement) ont été prelevée, congeler dans de l'azote et ont constitué le matériel sur lequel l'extraction d'ADN a eu lieu.

Extraction ADN

Tampons utilisé :

Tampon d'extraction A :

0 mM TRIS-HC1 pH 9.5 ; 10 mM EDTA pH 8.0 ; 100 mM KC1 ; 500 mM sucrose ; 4 mM spermidine ; 1 mM spermine ; 01% βME (2-Mercaptoethanol); eau distillée.

Tampon d'extraction B :

[Stock] 0.5M Tris pH 7.5 ; 5M NaCl ; 0.5 M EDTA ; 1 % CTAB ; ; eau distillée

Tampon de lyse :

10% Triton X-100 in Nuclei extraction buffer (with 0.1% βME) ajouté extemporanément

Protocole:

- Broyez 1 gramme de feuilles de rosette en fine poudre dans un mortier avec un pilon et toujours avec de l'azote liquide.
- Transférez la poudre dans des tubes Falcon® 15 mL contenant 10 mL de tampon d'extraction A de noyau à 4°C
- Mélanger doucement puis transférer avec une pipette souple le contenu de tube dans un nouveau tube Falcon® 50mL équipé d'un papier filtre Miraxcloth ® (Calbiochem).
- Laisser filtrer par gravité puis centrifuger 10 min à 2000 rpm et à 4°C
- Ajouter 2 mL de tampon de lyse et inverser plusieurs fois les tubes
- Laisser 2 min dans la glace pour permettre la lyse. Répétez le mélange plusieurs fois pendant ce laps de temps
- Centrifugez 15 min à 2200g et à 4°C. On obtient alors un culot instable de vert clair à blanc.
- Jetez le surnageant avec prudence puis retournez el tube sur du papier absorbant pour finir l'absorption du surnageant en vérifiant que le culot reste en place
- Ajouter 500µL de tampon B et agiter bien le tube
- Incuber 30 min à) 60°C (remuez el culot en inversant le tube toutes les 10 minutes)
- Laisser au repos 5 min à température ambiante
- Transférer dans un tube eppendorf 1.5mL en transférant le contenu (pas de pipetage)
- Ajoutez 350 µL d'une mélange Chloroforme/ alcool iso amylique (24:1) et agiter délicatement pendant 2 min
- Centrifugez 10 min à 600 rpm et à température ambiante
- Transférez la partie supérieur (dans un tube propre contenant 450µL isopropanol à 4°C
- Agitez en inversant le tube plusieurs fois et centrifugez 6 min à 13000 rpm à température ambiante
- Jetez le supernageant puis lavez le culot à l'éthanol 75%
- Centrifugez 5 min à 13000 rpm à température ambiante
- Jetez le surnageant
- Faire séchez
- Ajouter l'eau DNAse free et ajoutez RNAse 10µg/mL^{-1}

Séquençage et alignement des données

L'obtention des pistes de lecture a été faite par la plateforme imagif
Ensuite, j'ai exécuté s le traitement de données à l'aide du logiciel de traitement de données de séquençage CLC genomics version 5.1
Les pistes de lecture ont été filtres selon la taille et la qualité de la séquence.
(taill attendue (74 ou 100 nt selon lignée, qualité séquences < 0.05, maximum 2 nucléotides ambigues par séquences).

Les séquences du génome de référence *Arabidopsis thaliana* écotype Columbia ont été téléchargées à partir de la base de données TAIR.

ftp://ftp.arabidopsis.org/home/tair/Sequences/whole_chromosomes/

Ensuite les pistes de lecture préalablement triées ont été alignées sur les chromosomes du génome de référence. Pour qu'une piste de lecture soit alignée sur le génome, elle devait avoir une similarité de séquence d'au moins 90% de similarité sur 90% de la séquence.
Les couvertures relatives obtenus ont étés :

lignée		**ss12k**	**36**	**99**	**138**
taille des séquences (en nucléotide)		100	74	100	74
nombre de séquences après tri		**55 379 020**	**60 484 487**	**63 127 067**	**91 299 076**
chromosome	I	40,51	29,51	42,23	37,57
	II	38,94	31,23	39,62	38,63
	III	48,39	33,36	50,43	45,31
	IV	52,32	29,77	49,44	44,13
	V	49,61	30,39	54,62	40,19

Le recensement des SNPs et des insertions/délétions avec une fréquence supérieur à 50% a été obtenu à l'aide de CLCgenomics (option SNP ou INDEL calling) et les graphes de répartition des mutations sur les chromosomes ont été obtenus via EXCEL.

Utilisation de marqueurs CAPS et SSLP

Les marqueurs utilisés ont été recensés sur le site www.arabidopsis.org. Le programme PCR utilisé est le même que celui présenté précédemment. La résolution du gel a ensuite été adapté selon les différences de polymorphisme entre les marqueurs Columbia et Lansberg. De l'agarose haute résolution (sigma aldrich ®) a été utilisé pour des gel avec une résolution supérieur à 2%.

ANNEXES

Annexe 1

Liste de primers

Annexe 2

Liste de gènes liés à l'expansion obtenue lors de l'analyse transcriptomique des plantes ss12k (Données supplémentaires Paque et al., - soumis)

Annexe 3

Manuscrit d'article Tromas et al., (2013) –en révision

Primers list

Name	AGI	Forward primers	Revers primers	From
AXY4	At1g70230	ACCGTCTCTAGCCCTGATCTCGTCT	CGCATGTCCAAGTCCAGACCTTCT	Gilles et al., (2011)
AXY8	At4g34260	TGATCTTGTGGATCCGTTGA	GTGCCGGAGCAAATATAGA	Günl et al., (2011)
bGAL1	At3g13750	GAATGGCAATCAACGCTGGTGAAC	GTGCTACAGTTACAGAACACCAGTTCTGC	Iglesias et al., (2006)
bGAL2	At3g52840	TGATACACCGAGAGGCAACGAACC	CAAGAGAGATTCCACTTGGATCACCACC	Iglesias et al., (2006)
bGAL6	At5g63800	CCTGCTGGACAACCTTCTCAATCTATAT	GAATTGAGATTGAGCTTGACTCGAACC	Iglesias et al., (2006)
bGAL8	At2g28470	AACAGAACCAGGCCGGTTC	GAAGCTTCAACAGCTAAGCTCTTGACGAC	Iglesias et al., (2006)
BXL4	At5g64570	TGAATGGTGGTCTGAAGCAC	TATAACCTGCGGGAAACTCG	
EXPA1	At1g69530	AAGGCTATGGAACCAACACG	GCCAGGAAGACACCATTTTC	
EXPA10	At1g26770	CCTTGCTCAGCCTGTTTTTC	GCTTGCCACACTGTTCTTGA	
EXPA14	At5g56320	CAATACCGGAGAGTGGCTTGCC	TTGTTAGATATAACTGTACGGCC	
EXPA20	At4g38210	AAAGTGAAGGGCCACACAAC	TTGCCGCCTTTGAGAGTAAC	
EXPA4	at2g39700	AAAGGATCACGGACTGGTTG	GCTTGACCAACCAAAACAGC	
EXPA5	at3g29030	ATAGAAGGGTTCGGTGCAAG	TCCTCGACCCTTTCATTGAG	
EXPAL1	At3g45970	GCGATTACGGCAACAAGAAC	GACTTGAGCAATGTCGATGG	
FXG1	At1g67830	ATGTTGCCTGAATCCGACAGC	TTAGCGAAGTAACCTGCTGTG	
MUR2	At2g03220	TGGAGGTTTAAAGCCTTGGA	TGTCAAAAGCACAAAAATTGACTT	
MUR3	At2g20370	CTTTGTGCCGTTCTATGCTG	ATGAGCCAATCGACCAACTC	
XTH17	At4g37800	GGGAAGCCGAGCATTGGGCA	ACCATGGGGAATTCGCGGAACA	
XTH18	At1g11545	AATGAGGCTTTACGCGAGTC	AGGAGCCTTTGACCAATCTG	
XTH19	At4g30290	TGACCCAACCGCTAACTTTC	CTTTGTTGGGAATGGGACTC	
XTH23	At4g25810	GCTGGAACTGTCACCGCTTAC	TCAAAGTCAATCTCGTCCCATGT	Lee et al., (2004)
XTH30	At1g32170	GCTCTTTACGCCACCATTTG	ATAGGATCAACGGAGCAACC	
XTH31	At3g44990	GGATGCATCGGACTGGGCCAC	GCCATCTGCTGCCGGCTCAA	
XTH32	At2g36870	CTCGGCTGCACCGCCTACTC	TCCTAACGCCAACATTCCGGC	
XTH33	At1g10550	CAATTCAGTAAGATCGCCATTG	TTTGACACCAACCCAGCTC	
XTH7	At4g37800	GATTCTGCCGGGACTGTCA	CGTCTCGTACCGAATCGGTATC	
XTH8	At1g11545	ATAACGACACCGGATGTGGATT	TTTAGCTTCATACTAAACCATCCGAAT	Lee et al., (2004)
XYL1	at1g68560	GGACATTAAGTAAGCCCTTGTGAGTTGCG	ATCCCTGAAGGAAAGCAGTGTCCAAGTG	

CELL WALL GENE (Paque et al.)				
XTHs	**short**	**long**	**class**	**Annotation**
At1g11545		-1,119	XTHs	XTH8__xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 8
At1g32170		-1,237	XTHs	XTH30_XTR4__xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 30
At1g65310		-2,992	XTHs	XTH17__xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 17
At2g36870		1,338	XTHs	XTH32__xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 32
At4g03210		1,111	XTHs	XTH9__xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 9
At4g30290		-1,937	XTHs	XTH19__xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 19
At5g57560		-1,209	XTHs	XTH22_TCH4_Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase family protein
At5g48070	-1,248		XTHs	XTH20__xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 20
At1g10550	-1,112	-1,092	XTHs	XTH33__xyloglucan:xyloglucosyl transferase 33
At3g44990	1,692	2,801	XTHs	XTH31_XTR8__xyloglucan endo-transglycosylase-related 8
At4g25810	-1,621	-1,918	XTHs	XTH23_XTR6__xyloglucan endotransglycosylase 6
At4g30280	-1,554	-2,753	XTHs	XTH18__xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 18
At4g37800	1,045	3,547	XTHs	XTH7__xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 7
subtilases	**short**	**long**	**class**	**Annotation**
At2g39850		1,428	subtilases	Subtilisin-like serine endopeptidase family protein
At4g21326		1,647	subtilases	ATSBT3.12_SBT3.12__subtilase 3.12
At5g51750		-1,447	subtilases	ATSBT1.3_SBT1.3__subtilase 1.3
At1g01900	2,336		subtilases	ATSBT1.1_SBTI1.1__subtilase family protein
At3g14067	1,251		subtilases	Subtilase family protein
At1g20160	-1,533	-2,064	Subtilases	ATSBT5.2__Subtilisin-like serine endopeptidase family protein
At3g14240	1,092	1,226	Subtilases	Subtilase family protein
peroxidases	**short**	**long**	**class**	**Annotation**
At3g01190		-1,171	peroxidases	Peroxidase superfamily protein
At3g21770		1,303	peroxidases	Peroxidase superfamily protein
At3g28200		-1,28	peroxidases	Peroxidase superfamily protein
At1g44970	-1,466		peroxidase	Peroxidase superfamily protein
At5g39580	-2,083		peroxidase	Peroxidase superfamily protein
At2g18980	-1,063	-2,564	peroxidases	Peroxidase superfamily protein
At3g49120	-1,235	-1,24	peroxidases	ATPCB_PERX34_PRXCB__peroxidase CB
At4g30170	-1,396	-1,099	peroxidases	Peroxidase family protein
At4g37530	-1,337	-1,6	peroxidases	Peroxidase superfamily protein
pectin related	**short**	**long**	**class**	**Annotation**
At1g02810		-1,662	Pectin related genes	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily
At1g11580		1,008	Pectin related genes	PMEPCRA__methylesterase PCR A
At1g14890		-1,456	Pectin related genes	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein
At1g67750		-1,982	Pectin related genes	Pectate lyase family protein
At1g80170		1,01	Pectin related genes	Pectin lyase-like superfamily protein
At4g23500		-1,593	Pectin related genes	Pectin lyase-like superfamily protein; Glycoside hydrolase, family 28
At5g07430		1,353	Pectin related genes	Pectin lyase-like superfamily protein
At5g23870		-1,243	Pectin related genes	Pectinacetylesterase family protein
At5g41870		1,327	Pectin related genes	Pectin lyase-like superfamily protein
At5g49215		1,81	Pectin related genes	Pectin lyase-like superfamily protein
At5g62350		1,111	Pectin related genes	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein
At3g59010	1,064		Pectin related gene	pectin methylesterase 61
At3g61490	-1,673		Pectin related genes	Pectin lyase-like superfamily protein
At2g43050	-3,946	-1,582	Pectin related genes	ATPMEPCRD__Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily
At2g45220	-1,02	-1,539	Pectin related gene	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily
At2g46930	2,408	1,295	Pectin related genes	Pectinacetylesterase family protein
At3g07010	1,093	1,042	Pectin related genes	Pectin lyase-like superfamily protein
At5g19730	1,746	1,237	Pectin related gene	Pectin lyase-like superfamily protein
Glycosyl	**short**	**long**	**class**	**Annotation**
At1g12240		-2,369	Glycosyl hydrolases	AT BETA FRUCT4_VAC-INV__Glycosyl hydrolases family 32 protein
At1g30080		2,787	Glycosyl hydrolases	Glycosyl hydrolase superfamily protein
At1g64390		-1,638	Glycosyl hydrolases	GH9C2__glycosyl hydrolase 9C2
At1g64760		1,057	Glycosyl hydrolases	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein
At1g68560		1,108	Glycosyl hydrolases	AXY3_TRG1_XYL1__alpha-xylosidase 1
At1g70710		-1,032	Glycosyl hydrolases	ATGH9B1_CEL1_GH9B1__glycosyl hydrolase 9B1
At2g28470		-1,909	Glycosyl hydrolases	BGAL8__beta-galactosidase 8
At3g10740		-1,255	Glycosyl hydrolases	ARAF_ARAF1_ASD1_ATASD1__alpha-L-arabinofuranosidase 1
At3g13750		-2,188	Glycosyl hydrolases	BGAL1_BGAL1__beta galactosidase 1
At3g52840		-1,721	Glycosyl hydrolases	BGAL2__beta-galactosidase 2
At4g17180		1,066	Glycosyl hydrolases	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein
At4g18340		-1,403	Glycosyl hydrolases	Glycosyl hydrolase superfamily protein
At4g19810		-1,373	Glycosyl hydrolases	Glycosyl hydrolase family protein with chitinase insertion domain
At5g08380		1,085	Glycosyl hydrolases	AGAL1_AtAGAL1__alpha-galactosidase 1
At5g13980		-1,002	Glycosyl hydrolases	Glycosyl hydrolase family 38 protein
At5g20950		-1,759	Glycosyl hydrolases	Glycosyl hydrolase family protein

At5g42100		1,001	Glycosyl hydrolases	ATBG_PPAP_BG_PPAP__beta-1,3-glucanase_putative
At5g42720		1,109	Glycosyl hydrolases	Glycosyl hydrolase family 17 protein
At1g78060	1,23		Glycosyl hydrolases	Glycosyl hydrolase family protein
At2g32990	-2,056		Glycosyl hydrolases	AtGH9B8_GH9B8__glycosyl hydrolase 9B8
At2g44450	-1,24		Glycosyl hydrolases	BGLU15__beta glucosidase 15
At4g16260	-1,464		Glycosyl hydrolases	Glycosyl hydrolase superfamily protein
At5g64570	-1,103		Glycosyl hydrolases	BXL4_XYL4__beta-D-xylosidase 4
At3g26720	-1,581	-1,465	Glycosyl hydrolases	Glycosyl hydrolase family 38 protein
At5g08370	-1,274	-1,381	Glycosyl hydrolases	AGAL2_AtAGAL2__alpha-galactosidase 2
At5g63800	-1,143	-1,237	Glycosyl hydrolases	BGAL6_MUM2__Glycosyl hydrolase family 35 protein
expansins	**short**	**long**	**class**	**Annotation**
At3g45970	-1,026	-1,087	expansins	ATHEXP BETA 2.1_EXLA1_EXPL1__expansin-like A1
At5g56320	-1,276	-2,037	expansins	ATHEXP ALPHA 1.5_EXP14_EXPA14__expansin A14
At2g37640	1,12		expansins	ATHEXP ALPHA 1.9_EXP3_endoglucanases superfamily protein
At1g26770		3,098	expansins	ATEXPA10_ATHEXP ALPHA 1.1_EXP10_EXPA10__expansin A10
At1g69530		2,4	expansins	ATEXPA1_ATHEXP ALPHA 1.2_EXP1_EXPA1__expansin A1
At2g39700		-3,561	expansins	ATHEXP ALPHA 1.6_EXPA4__expansin A4
At4g38210		2,936	expansins	ATHEXP ALPHA 1.23_EXP20_EXPA20__expansin A20
fascilins	**short**	**long**	**class**	**Annotation**
At4g31370		2,545	fascilins	fasciclin-like arabinogalactan-protein, putative (FLA5)
At5g03170		-1,842	fascilins	ATFLA11_FLA11__FASCICLIN-like arabinogalactan-protein 11
At5g44130		-1,554	fascilins	FLA13__FASCICLIN-like arabinogalactan protein 13 precursor
At2g04780	1,508		fascilins	FLA7__FASCICLIN-like arabinoogalactan 7
AGPs	**short**	**long**	**class**	**Annotation**
At5g11740	1,157		AGPs	AGP15_arabinogalactan protein 15
At2g14890		-1,412	AGPs	AGP9__arabinogalactan protein 9
At4g37450		1,257	AGPs	AGP18_arabinogalactan protein 18
At5g24105		1,203	AGPs	Encodes a putative arabinogalactan-protein (AGP41).
At5g53250		-1,101	AGPs	AGP22_arabinogalactan protein 22
miscellaneous	**short**	**long**	**class**	**Annotation**
At1g03220		-2,336	others	Eukaryotic aspartyl protease family protein
At1g03860		1,049	others	ATPHB2_PHB2__prohibitin 2
At1g05170		-1,002	others	Galactosyltransferase family protein
At1g08500		-1,118	others	ENODL18__early nodulin-like protein 18
At1g15390		1,521	others	ATDEF1_PDF1A__peptide deformylase 1A
At1g20510		1,177	others	OPCL1__OPC-8:0 CoA ligase1
At1g20850		-1,973	others	XCP2__xylem cysteine peptidase 2
At1g26250		-2,694	others	Proline-rich extensin-like family protein
At1g27450		1,142	others	APT1_adenine phosphoribosyl transferase 1
At1g28600		2,539	others	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
At1g41830		-1,885	others	SKS6__SKU5-similar 6
At1g53240		1,039	others	mMDH1__Lactate/malate dehydrogenase family protein
At1g57720		1,425	others	Translation elongation factor EF1B, gamma chain
At1g62440		1,298	others	LRX2__leucine-rich repeat/extensin 2
At1g63000		-1,331	others	NRS/ER_UER1__nucleotide-rhamnose synthase/epimerase-reductase
At1g72230		-2,038	others	Cupredoxin superfamily protein
At1g76160		-1,486	others	sks5__SKU5 similar 5
At1g76790		-1,103	others	IGMT5__O-methyltransferase family protein
At1g78860		2,107	others	D-mannose binding lectin protein with Apple-like carbohydrate-binding domain
At1g80240		-1,738	others	Protein of unknown function, DUF642
At2g02100		1,135	others	LCR69_PDF2.2__low-molecular-weight cysteine-rich 69
At2g15880		1,378	others	Leucine-rich repeat (LRR) family protein
At2g21140		-1,621	others	ATPRP2_PRP2__proline-rich protein 2
At2g32300		-1,406	others	UCC1__uclacyanin 1
At2g33340		1,326	others	MAC3B__MOS4-associated complex 3B
At2g36100		-1,277	others	CASP1__Uncharacterised protein family (UPF0497)
At2g38080		-2,504	others	IRX12_LAC4_LMCO4__Laccase/Diphenol oxidase family protein
At2g39730		1,429	others	RCA__rubisco activase
At2g43080		-1,803	others	AT-P4H-1__P4H isoform 1
At3g01940		1,099	others	Protein of unknown function (DUF 3339)
At3g06130		-1,418	others	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
At3g07770		1,052	others	AtHsp90-6_AtHsp90.6_Hsp89.1__HEAT SHOCK PROTEIN 89.1
At3g08840		1,139	others	D-alanine--D-alanine ligase family
At3g09630		1,059	others	Ribosomal protein L4/L1 family
At3g10340		-1,583	others	PAL4__phenylalanine ammonia-lyase 4
At3g12780		2,032	others	PGK1__phosphoglycerate kinase 1
At3g14920		-1,148	others	Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase A protein
At3g15400		1,579	others	ATA20__anther 20
At3g17390		1,044	others	MAT4_MTO3_SAMS3__S-adenosylmethionine synthetase family protein
At3g18660		-2,014	others	GUX1_PGSIP1__plant glycogenin-like starch initiation protein 1

At3g21240		-1,068	others	4CL2_4-coumarate:CoA ligase 2
At3g23820		1,107	others	GAE6__UDP-D-glucuronate 4-epimerase 6
At3g48930		1,331	others	EMB1080__Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein
At4g00300		-1,19	others	fringe-related protein
At4g16745		1,849	others	Exostosin family protein
At4g18480		1,585	others	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
At4g20830		-2,511	others	FAD-binding Berberine family protein
At4g25600		1,333	others	Oxoglutarate/iron-dependent oxygenase;oxygen,DOMAIN/s
At4g26940		-1,172	others	Galactosyltransferase family protein
At4g28360		1,288	others	Ribosomal protein L22p/L17e family protein
At4g31840		1,599	others	AtENODL15_ENODL15__early nodulin-like protein 15
At4g33910		-1,256	others	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
At4g34230		-2,454	others	ATCAD5_CAD-5_CAD5__cinnamyl alcohol dehydrogenase 5
At4g34670		1,118	others	Ribosomal protein S3Ae
At5g02490		1,082	others	AtHsp70-2_Hsp70-2__Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein
At5g03260		-1,449	others	LAC11__laccase 11
At5g03850		1,198	others	Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein
At5g06200		-1,087	others	CASP4__Uncharacterised protein family (UPF0497)
At5g07030		-1,463	others	Eukaryotic aspartyl protease family protein
At5g11420		1,097	others	Protein of unknown function, DUF642
At5g14430		1,436	others	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
At5g18860		-1,152	others	NSH3__inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase family protein
At5g18900		-1,243	others	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
At5g20630		-2,957	others	ATGER3_GER3_GLP3_GLP3A_GLP3B__germin 3
At5g38410		1,396	others	Ribulose bisphosphate carboxylase (small chain) family protein
At5g40970		1,674	others	Protein of unknown function (DUF 3339)
At5g41520		1,253	others	RNA binding Plectin/S10 domain-containing protein
At5g44380		-3,006	others	FAD-binding Berberine family protein
At5g44930		1,538	others	ARAD2__Exostosin family protein
At5g47550		1,421	others	Cystatin/monellin superfamily protein
At5g16190		1,06	others	CSLA11__cellulose synthase like A11
At5g56030		1,149	others	AtHsp90.2_ERD8_HSP81-2_HSP81.2_HSP90.2__heat shock protein 81-2
At5g60020		-1,958	others	ATLAC17_LAC17__laccase 17
At2g16060		-1,091	others	AHB1_ARATH GLB1_ATGLB1_GLB1_HB1_NSHB1__hemoglobin 1
At1g01300	1,77		others	Eukaryotic aspartyl protease family protein
At1g18140	-1,228		others	ATLAC1_LAC1__laccase 1
At1g34030	1,13		others	Ribosomal protein S13/S18 family
At1g43170	1,079		others	ARP1_emb2207_RP1_RPL3A__ribosomal protein 1
At1g48830	1,129		others	Ribosomal protein S7e family protein
At1g72680	-1,006		others	ATCAD1_CAD1__cinnamyl-alcohol dehydrogenase
At2g02990	-1,005		others	ATRNS1_RNS1__ribonuclease 1
At2g09990	1,103		others	Ribosomal protein S5 domain 2-like superfamily protein
At2g16570	1,399		others	ASE1_GLN phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase 1
At2g34790	-1,114		others	EDA28_MEE23__FAD-binding Berberine family protein
At2g43570	-1,254		others	CHI__chitinase, putative
At2g46710	-1,267		others	Rho GTPase activating protein with PAK-box/P21-Rho-binding domain
At3g02080	1,077		others	Ribosomal protein S19e family protein
At3g09220	-1,691		others	LAC7__laccase 7
At3g13920	1,035		others	EIF4A1_RH4_TIF4A1__eukaryotic translation initiation factor 4A1
At3g29810	-1,312		others	COBL2__COBRA-like protein 2 precursor
At3g49010	1,098		others	ATBBC1_BBC1_RSU2__breast basic conserved 1
At3g54420	-1,267		others	ATCHITIV_ATEP3_CHIV_EP3__homolog of carrot EP3-3 chitinase
At4g01700	-1,597		others	Chitinase family protein
At4g25900	-1,087		others	Galactose mutarotase-like superfamily protein
At4g38420	-1,987		others	sks9__SKU5 similar 9
At4g39640	-1,177		others	GGT1__gamma-glutamyl transpeptidase 1
At5g11200	1,009		others	DEAD/DEAH box RNA helicase family protein
At5g15200	1,096		others	Ribosomal protein S4
At5g34940	-1,02		others	AtGUS3_GUS3__glucuronidase 3
At5g51550	1,305		others	EXL3__EXORDIUM like 3
At5g59850	1,051		others	Ribosomal protein S8 family protein
At5g67470	-1,038		others	ATFH6_FH6__formin homolog 6
At1g07770	1,156	1,471	others	RPS15A__ribosomal protein S15A
At1g08210	1,452	2,084	others	Eukaryotic aspartyl protease family protein
At1g17860	-1,249	-1,203	others	Kunitz family trypsin and protease inhibitor protein
At1g20220	1,102	1,441	others	Alba DNA/RNA-binding protein
At1g58684	1,047	1,091	others	Ribosomal protein S5 family protein
At1g58983	1,032	1,106	others	Ribosomal protein S5 family protein
At1g59359	1,028	1,123	others	Ribosomal protein S5 family protein
At1g78850	-1,239	-1,146	others	D-mannose binding lectin protein with Apple-like carbohydrate-binding domain
At2g01210	1,042	1,499	others	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
At2g22920	-1,075	-1,561	others	SCPL12__serine carboxypeptidase-like 12
At2g37620	1,352	1,457	others	AAc1_ACT1__actin 1
At2g46740	-1,478	-2,527	others	D-arabinono-1,4-lactone oxidase family protein

At2g47650	1,033	1,788	others	UXS4__UDP-xylose synthase 4
At3g11550	-1,199	-1,696	others	CASP2__Uncharacterised protein family (UPF0497)
At3g11940	1,115	1,249	others	AML1_ATRPS5A_RPS5A__ribosomal protein 5A
At3g27280	1,558	1,767	others	ATPHB4_PHB4__prohibitin 4
At3g47370	1,201	1,123	others	Ribosomal protein S10p/S20e family protein
At3g62020	-1,272	-3,323	others	GLP10__germin-like protein 10
At4g00110	1,335	1,319	others	GAE3__UDP-D-glucuronate 4-epimerase 3
At4g02930	1,077	1,202	others	GTP binding Elongation factor Tu family protein
At4g20850	-1,364	-1,01	others	TPP2__tripeptidyl peptidase ii
At4g37910	1,381	1,128	others	mtHsc70-1__mitochondrial heat shock protein 70-1
At4g38770	1,557	1,153	others	ATPRP4_PRP4__proline-rich protein 4
At5g15290	-1,298	-1,581	others	CASP5__Uncharacterised protein family (UPF0497)
At5g20230	-1,23	-1,078	others	ATBCB_BCB_BCB_SAG14__blue-copper-binding protein
At5g52650	1,057	1,172	others	RNA binding Plectin/S10 domain-containing protein

Manuscrit d'article

Tromas et al., (2013) en révision

AUXIN BINDING PROTEIN 1 is a negative regulator of the SCF$^{TIR1/AFB}$ pathway

Alexandre Tromas[1,†], Sébastien Paque[1], Vérène Stierlé[1,#], Anne-Laure Quettier[1], Philippe Muller[1], Esther Lechner[2], Pascal Genschik[2], Catherine Perrot-Rechenmann[1]

[1] Institut des Sciences du Végétal (ISV), UPR2355 Centre National de la Recherche Scientifique, Saclay Plant Sciences, 1, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif sur Yvette Cedex France

[2] Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP), UPR2357 Centre National de la Recherche Scientifique, 12 Rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg Cedex France

Correspondence to: Catherine Perrot-Rechenmann[1].

e-mail: catherine.rechenmann@isv.cnrs-gif.fr

Present addresses:

[†] Southern Crop Protection and Food Research Centre, Agriculture and Agri-food Canada 1391 Sandford St, London, Ontario N5V 4T3 CANADA

[#] Université de Reims Champagne Ardenne, Laboratoire SiRMa, FRE3481 , Moulin de la Housse, BP 1039 - 51687 Reims Cedex 2, France

Abstract

Auxin is a major plant hormone that controls most aspects of plant growth and development. Auxin is perceived by two distinct classes of receptors: TRANSPORT INHIBTOR RESPONSE 1 (TIR1 and auxin related F-box, AFB) and AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID (AUX/IAA) co-receptors that control transcriptional responses to auxin [1] and the Auxin Binding Protein 1 (ABP1) that controls clathrin-dependent endocytosis and a wide variety of growth and developmental processes[2-5]. To date, the mode of action of ABP1 is still poorly understood and its functional interaction with TIR1/AFB-AUX/IAA co-receptors remains elusive. We combined genetic and biochemical approaches to gain insight into the integration of these two pathways. Here, we show that multiple *tir1,afb* null mutations are epistatic to ABP1 inactivation, thus placing ABP1 genetically upstream of TIR1/AFB proteins. We found that reducing the function of ABP1 leads to an enhanced degradation of AUX/IAA repressors via the $SCF^{TIR1/AFB}$ E3 ubiquitin ligase pathway. Most developmental defects reported for ABP1 loss of function result from transcriptional derepression. We established that inhibition of clathrin-dependent endocytosis is not sufficient *per se* to affect AUX/IAA stability suggesting that ABP1 controls AUX/IAA stability independently from its effect on endocytosis. Our results demonstrate that enhanced degradation of AUX/IAA repressors is deleterious for root growth and that regulation of their homeostasis requires ABP1-mediated negative regulation of the $SCF^{TIR1/AFB}$ signalling pathway. Control of protein turn-over is central for various plant hormone signalling pathways and combining positive and negative regulation of SCF ubiquitin-proteasome pathways might be a common mechanism conferring tight control of hormone-mediated responses.

Results

Within the last decade, molecular and genetic evidence established the importance of AUX/IAA repressor degradation for auxin-mediated transcriptional responses. AUX/IAAs and TIR1/AFBs F-box proteins behave as auxin co-receptors, their interaction promoting AUX/IAA polyubiquitination and degradation through the ubiquitin/26S proteasome system (UPS)[6]. Various developmental defects were reported for gain-of-function AUX/IAA mutants expressing stable AUX/IAA proteins.

Figure 1

Figure 1: Genetic relationship between TIR1/ AFBs and ABP1
Phenotypes of 4 day-old seedlings of *tir1-1,* double *tir1-1,afb2-1* and triple *tir1-1,afb2-1,afb3-1* mutants and SS12K9 into these mutant backgrounds mediating functional inactivation of ABP1; all induced by ethanol since germination. Scale bar represents 2mm.

Figure S1

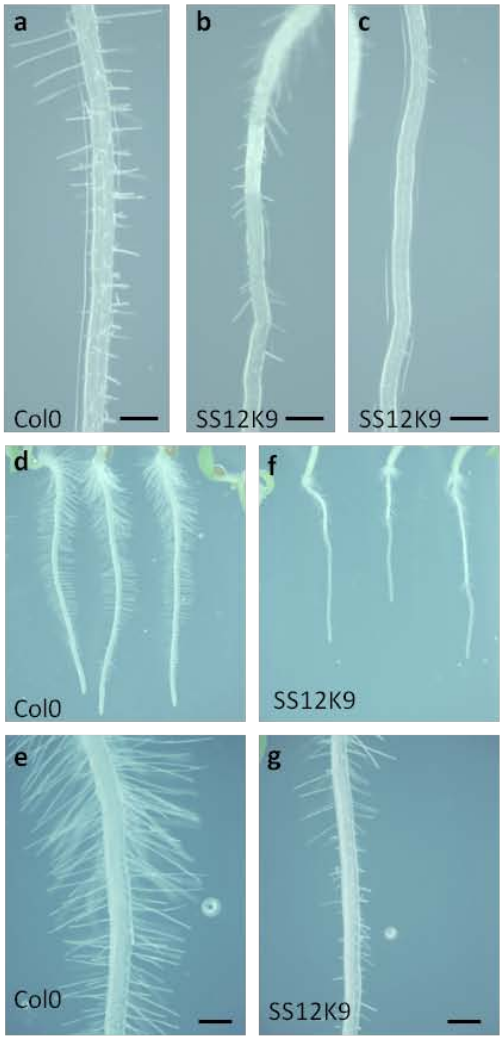


Figure S1: Root phenotype and auxin resistance resulting from ABP1 inactivation
Roots of ethanol induced wild type (**a**) and SS12K9 (**b-c**) grown on vertical plates. Bars represent 200µm. **d-g-** Primary roots and root hairs of ethanol induced wild-type (d and e) and SS12K9 (f and g) grown on vertical plates containing 500 nM IAA for 4 days. Bars represents 200µm.

Figure S2

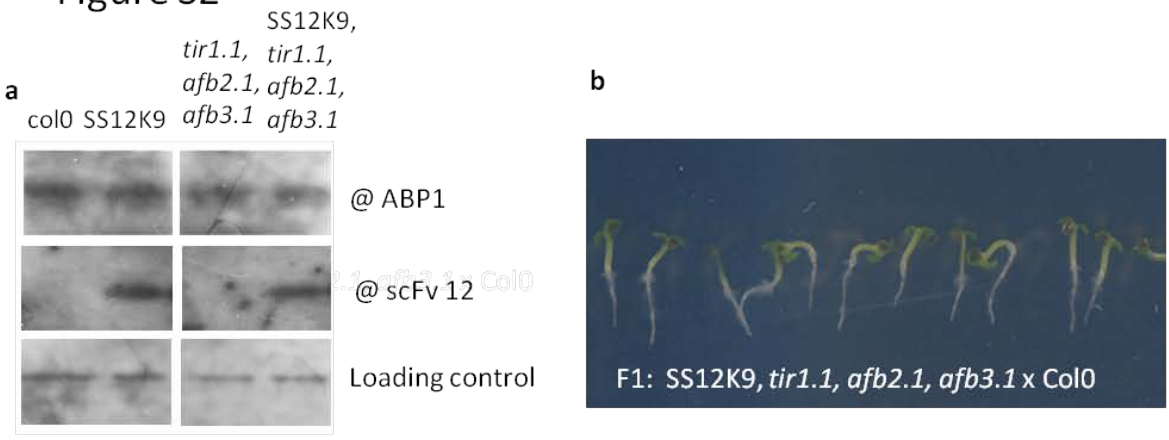


Figure S2: Functional inactivation of ABP1 is efficient in *tir1.1,afb2.1,afb3.1* mutant background
a- ABP1 and scFv12 recombinant antibodies were detected by western blot using mAb34 anti-ABP1monoclonal antibody and anti-E-Tag antibodies, respectively. **b-** phenotype of ethanol induced seedlings resulting from the backcross of homozygous plants for SS12K, *tir1.1,afb2.1,afb3.1* with wild-type Col0.

Surprisingly, little is known of the effects resulting from loss of function of AUX/IAA repressors, potentially because of significant redundancy within the gene family[7, 8]. Loss of function of up to 4 TIR1/AFB proteins leads to three types of phenotypes ranging from rootless seedlings to nearly normal ones[9]. Loss of function of ABP1 and post-embryonic functional inactivation of the protein were demonstrated to induce lethality[5, 10] and severe developmental defects[5, 11]. Primary roots of ABP1-inactivated plants are characterized by a dramatically reduced meristem, elongated and differentiated cells located close to the quiescent centre[11], development of erratic and short hairs (Supplementary Fig. S1) and resistance to IAA[11]. We previously reported that the transcriptional response to auxin is altered for a number of auxin response genes after functional inactivation of ABP1[11] thus suggesting that ABP1 and TIR1/AFB-AUX/IAA collectively contribute to mediate auxin responses sustaining plant growth and development.

TIR1/AFB are epistatic to ABP1

To gain insight into the understanding of the cross talk between ABP1 and TIR1/AFB pathways, we investigated genetic interactions between both pathways. We focused on the analysis of homozygous lines for ABP1 knockdown (SS12K9) in *tir1-1* single mutant, in the double mutant *tir1-1,afb2-1* and the triple *tir1-1,afb2-1,afb3-1* mutant. Inactivation of ABP1 in *tir1-1* leads to plants exhibiting typical ABP1 knockdown root phenotypes (Fig. 1). However, inactivation of ABP1 in the double *tir1-1,afb2-1* and triple *tir1-1,afb2-1,afb3-1* mutants leads to a striking result. Phenotypes associated with the inactivation of ABP1 completely vanished; conversely the typical long wavy primary root phenotype resulting from double and triple *tir/afb* mutations was observed (Fig. 1). We confirmed that the scFv12 antibody responsible for inactivation of ABP1 was properly induced and produced in response to ethanol induction in the mutant backgrounds (Supplementary Fig. S2). In addition, growth inhibition resulting from ABP1 inactivation was recovered in SS12K9, *tir1-1,afb2-1,afb3-1* plants backcrossed with Col0, (heterozygous for all mutations and for the scFv12 construct), demonstrating that the scFv12 was still fully efficient in these plants (Supplementary Fig. S2). These genetic analyses reveal that *TIR1/AFBs* are epistatic to *ABP1*.

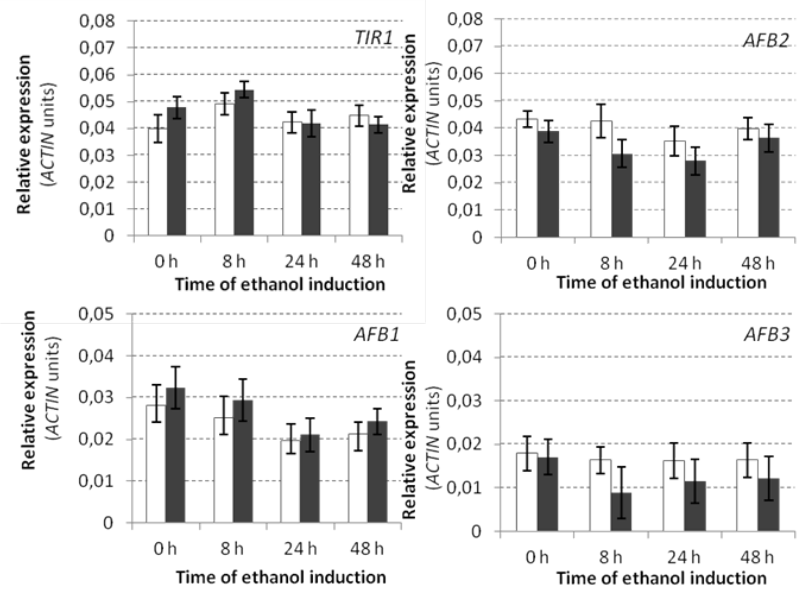


Figure S3: Inactivation of ABP1 does not affect expression of *TIR1* and *AFBs*
a- Quantitative RT-PCR analysis of *TIR1*, *AFB1*, *AFB2* et *AFB3* in wild-type (in white) and SS12K9 (in gray) after various times of ethanol induction. All data were normalized with respect to ACTIN2-8 and expressed in equivalent ACTIN units. **b**- Immunodetection of TIR-HA reporter protein in Col0 and SS12K9 backgrounds, with or without inactivation of ABP1. Red ponceau staining is included as a loading control.

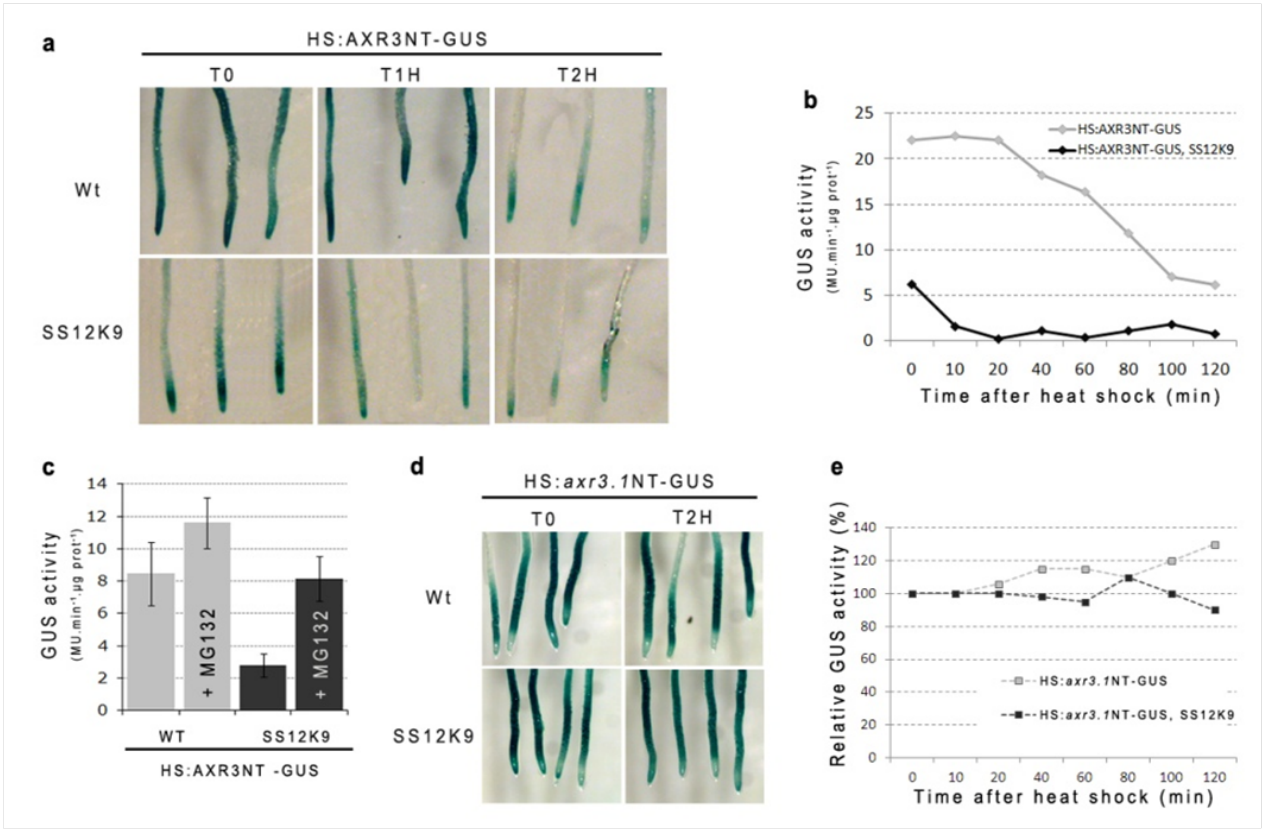


Figure 2: ABP1 pathway stabilizes AUX/IAA repressors
a- GUS staining in roots at various times after heat-shock of overnight ethanol-induced wild-type and SS12K9 seedlings expressing the *pHS:AXR3NT-GUS* construct. **b**- Quantification and kinetic analyses of GUS activity in root samples as in **a**. Activity is expressed in 4-methylumbelliferone (MU) per minute and µg protein. **c**- Quantification of GUS activity corresponding to expression of AXR3NT-GUS in overnight ethanol induced roots treated or not with MG132 proteasome inhibitor during heat-shock. **d**- GUS staining at various times after heat-shock in overnight ethanol-induced wild-type and SS12K9 roots expressing the *pHS:axr3.1NT-GUS* construct. **e**- Quantification and kinetic analyses of GUS activity in root samples as in **d**.

TIR1/AFB expression is not dependent on ABP1

To better understand the genetic relationship between ABP1 and TIR1/AFBs, we first investigated whether ABP1 affects TIR1 and AFB expression. We studied the accumulation of corresponding mRNAs in roots inactivated for various time for ABP1 (Supplementary Fig. S3). No difference was observed for *TIR1* and *AFB1* and only a very subtle decrease of *AFB2* and *AFB3* mRNA was observed over time. Using immunodetection of the TIR1-HA reporter[12], no significant change in TIR1 protein was observed in response to ABP1 inactivation, suggesting that ABP1 does not act through quantitative changes of TIR1 (Supplementary Fig.S3). We then investigated whether ABP1 directly affects the half-life of TIR1/AFB substrates.

ABP1 controls AUX/IAA stability

Next, we studied the half-life of the well described heat-shock (HS) inducible AXR3NT-GUS reporter that was initially used to demonstrate that AUX/IAAs are short-lived nuclear proteins[13], in the context of ABP1 inactivation. Two constructs were introgressed into the SS12K9 conditional ABP1 line[5]: the *pHS:AXR3NT-GUS* reporter and the same construct containing a point mutation within the degron of domain II *pHS:axr3.1NT-GUS* that impairs the interaction with TIR1[13]. In order to compare protein half-life from plant roots of similar development, 4 day-old seedlings of WT and SS12K9 reporter lines were grown in the absence of ethanol induction and were exposed overnight to ethanol vapour to induce inactivation of ABP1 in SS12K9 prior to a 3 hours heat-shock treatment on plates. Reporter abundance was estimated by GUS staining and GUS activity was quantified by fluorimetry on protein extracts of a large number of roots to average plant to plant differences (Fig. 2). In WT extracts, the protein accumulated during the HS was slowly degraded, with an EC50 between 60 and 80 min (Fig. 2b), in accord with previous reports[13, 14]. Immediately after HS, only one third of the AXR3NT-GUS protein quantified in WT was measured in roots inactivated for ABP1 and GUS activity dropped to baseline within 10min. The low level of protein reporter could result either from a decrease in biosynthesis or from increased degradation. Quantification of GUS activity in plants expressing *pHS:axr3.1NT-GUS* constructs revealed that neither the response to heat-shock nor the capacity of

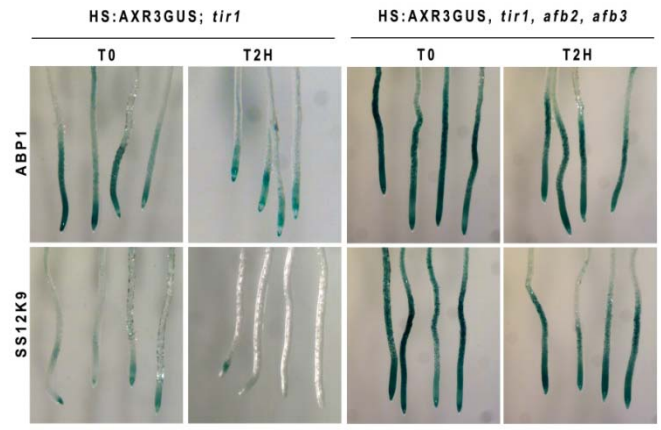


Figure 3: suppression of ABP1 knockdown phenotype correlates with stabilization of AUX/IAA

Four day-old seedlings of *tir1-1,* and triple *tir1-1,afb2-1,afb3-1* mutants with functional ABP1 or in SS12K9 , were ethanol induced overnight before heat-shock treatment. GUS staining detecting the accumulation of AXR3NT-GUS was performed at the end of the HS.

protein biosynthesis are affected in SS12K9 (Fig. 2d). Mutated axr3.1NT-GUS proteins exhibit an elevated stability over time in both WT and ABP1 inactivated backgrounds (Fig. 2d and e). In the absence of functional ABP1 the *axr3.1* single mutation in domain II is sufficient to avoid degradation, indicating that AUX/IAA enhanced degradation in SS12K9 relies on their interaction with TIR1/AFB F-box proteins as previously reported in WT background[13]. To verify that the low level of AXR3NT-GUS in SS12K9 resulted from an increased and proteasome-dependent degradation, HS induction was performed in the presence of the proteasome inhibitor MG132. In SS12K9, MG132 treatment restored the level of AXR3NT-GUS almost to that observed in WT in the absence of inhibitor (Fig. 2c), thus confirming that the observed differences came from an increased degradation of AXR3NT-GUS resulting from functional inactivation of ABP1. Interestingly, in WT, a slight increase in the amount of AXR3NT-GUS was also observed in the presence of MG132 during HS (Fig. 2c), suggesting that partial degradation of the reporter already takes place during heat-shock. The quantity of AXR3NT-GUS protein detected at the end of the HS results from an equilibrium between production and degradation. This equilibrium is severely shifted in favour of degradation when ABP1 is not functional, indicating that ABP1 behaves as a negative regulator of AUX/IAA degradation.

To address whether the suppression of ABP1 knockdown phenotypes by *tir1/afb* combined mutations was resulting from a restoration of AUX/IAA stability, we analysed AXR3NT-GUS reporter in SS12K9, *tir/afb* mutants (Fig.3). Gus staining confirmed that AXR3NT-GUS accumulates after inactivation of ABP1 in the mutant background indicating that suppression of the phenotype resulting from ABP1 inactivation by the *tir/afb* mutations is correlated with a restoration of endogenous AUX/IAA stability. These data reveal that primary root growth requires repression of auxin-mediated transcriptional responses and that ABP1 is required to maintain this repression via stabilisation of AUX/IAA repressors. In other words, the ABP1-mediated pathway counteracts with the TIR1/AFB-AUX/IAA pathway by increasing the stability of AUX/IAA repressors to control plant growth and development.

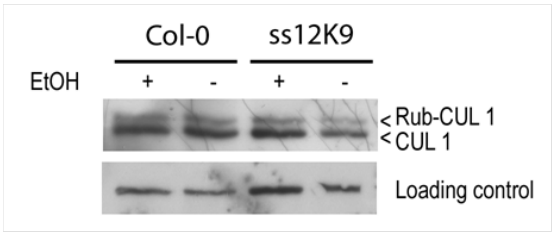


Figure S4: ABP1 does not affect the steaty state level of CULLIN1 modification.
Rubylated and non rubylated-CULLIN1 in overnight ethanol induced wild-type and SS12K9 root extracts were detected using anti-CULLIN1 antibodies.

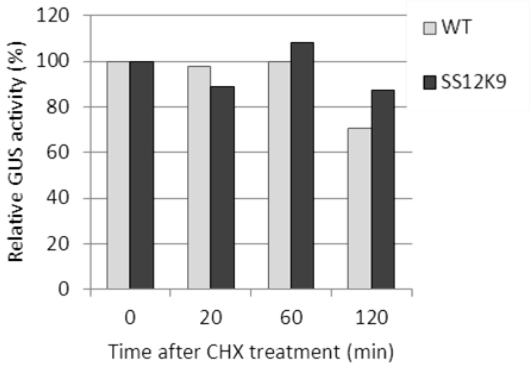


Figure S5: ABP1 inactivation does not affect JAZ1 half-life
GUS activity resulting from expression of the p35S:JAZ1-GUS reporter was measured in roots of overnight ethanol induced wild-type (in white) and SS12K9 (in grey) treated for various times with cycloheximide.

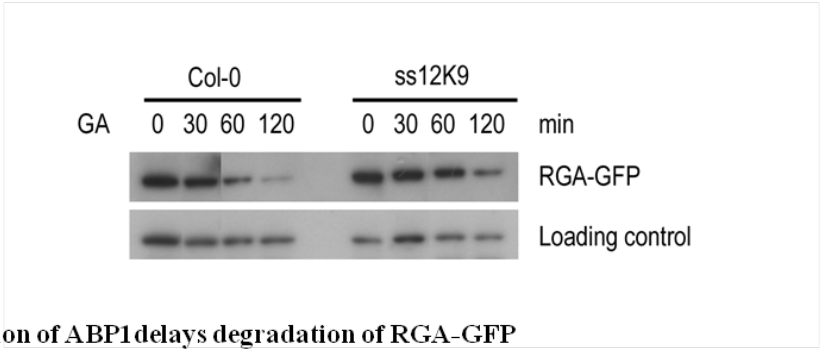


Figure S6: Inactivation of ABP1 delays degradation of RGA-GFP
Samples of overnight ethanol induced were harvested after treatment with 5µM GA3 for the indicated time. RGA-GFP was detected by western blot using anti-GFP antibodies.

ABP1 acts specifically on auxin-dependent targets

Regulation of protein turn-over through the UPS was shown to play critical roles in almost every aspect of plant growth and development including modulation of phytohormone signalling[15]. Considering the severe phenotypes resulting from ABP1 inactivation as well as the lethality of the null Arabidopsis mutant[10], we questioned whether the effect of ABP1 on protein stability resulted from a broad alteration of SCF-mediated protein degradation or was specific to $SCF^{TIR1/AFBs}$ E3 ubiquitin ligases targeting AUX/IAA repressors. We first investigated whether ABP1 affects one of the major mechanism modulating ubiquitin E3 ligases by analysing the effect of ABP1 inactivation on the steady-state level of modified SCF scaffold protein CULLIN1(CUL1) by the ubiquitin-like RUB (Related to Ubiquitin[16]). No significant change in the ratio of rubylated versus non-rubylated CUL1 was detected after inactivation of ABP1 (Supplementary Fig. S4), suggesting that ABP1 is not acting on this mechanism. We then investigated whether ABP1 inactivation affects the stability of other well-known UPS-dependent regulatory proteins starting with JAZ repressors of the jasmonate pathway. The *COI1* gene that triggers ubiquitination of JAZ is the closest gene to *TIR1* and *AFBs* within the LRR subfamily of F-box proteins[9, 17]. We analysed the effect of ABP1 inactivation on JAZ1-GUS protein half-life[18]. Inactivation of ABP1 has no significant impact on the turn-over of JAZ proteins (Supplementary Fig. S5), indicating that inactivation of ABP1 does not affect a central mechanism shared by distinct SCF complexes. Finally, we studied the degradation of the growth repressing DELLA proteins[19], using the *pRGA:RGA-GFP* reporter[20]. RGA-GFP protein is degraded in both genotypes in response to GA treatment; however, GA-induced RGA-GFP degradation is delayed in ABP1 inactivated roots (Supplementary Fig. S6). Interestingly, this effect is reminiscent of the delay in GA-induced RGA degradation caused by auxin depletion in roots[20]. On the basis of these results, we propose that ABP1 inactivation promotes rather specifically AUX/IAA repressors for degradation.

ABP1 affects AUX/IAA stability independently from its effect on endocytosis

Based on the current model of auxin-dependent transcriptional regulation, an increased degradation of Aux/IAA repressors might result either from an increase in auxin content promoting interaction of

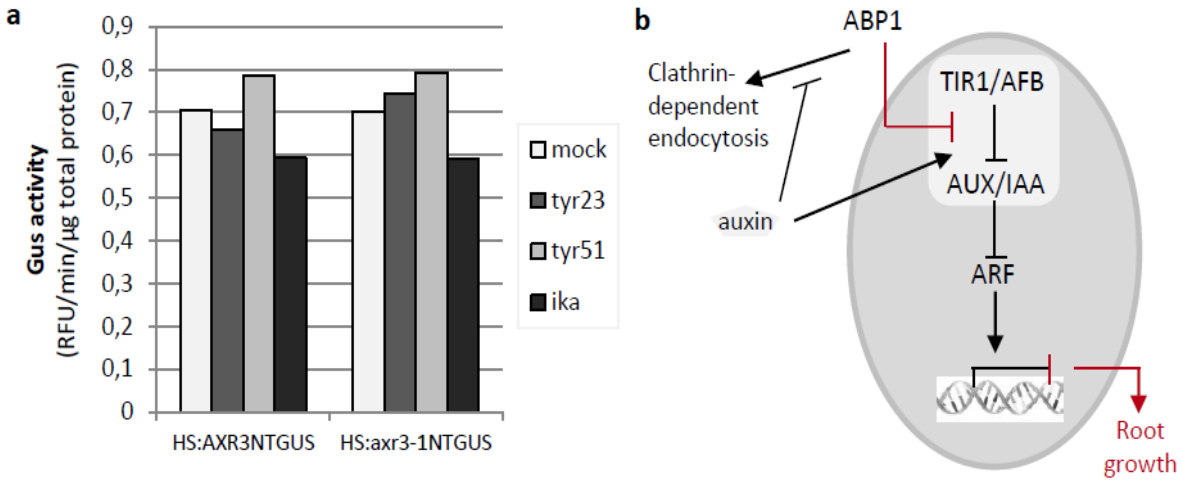


Figure 4: ABP1 acts on TIR1/AFB-AUX/IAA pathway independently from endocytosis regulation

a-Quantification of AXR3NTGUS production in root samples of wild-type plants treated with tyrphostin A23 (tyr23) or ikarugamycin (ika) clathrin-dependent endocytosis inhibitors. Controls were mock treated or treated with the inactive compound tyrphostin A51. Wild-type seedlings expressing pHS:AXR3NT-GUS were first treated with the compounds then heat-shock induced for 3 hours. Roots were collected immediately after HS for GUS measurement. **b**- Model for ABP1 action on TIR1/AFB-AUX/IAA pathway and root growth. ABP1 acts negatively on TIR1/AFB, promoting stabilization of AUX/IAA repressors and transcriptional repression. Repression of auxin responsive genes is critical for root growth, especially for cell division and maintenance of the apical meristem that were shown to be under the control of ABP1 (Tromas et al, 2009). Effect of ABP1 on TIR1/AFB-AUX/IAA pathway does not involve ABP1 control of clathrin dependent endocytosis.

TIR1/AFBs and AUX/IAAs co-receptors, or from a modulation of AUX/IAA repressor half-life through differential interaction with TIR1/AFBs independently of the presence of auxin[21]. Several lines of evidence support that the inactivation of ABP1 does not result in an increase in auxin content : (1) the root phenotype of ABP1 inactivated plants with elongated cells[11], reduced root hairs and few or no lateral roots is opposite to the root phenotype of plants with elevated auxin content or roots treated with exogenous auxin[22, 23] (Supplementary Fig S1), conversely it is similar to the phenotype of double *wei8-1tar* mutants that contain reduced auxin[24] (2) no alteration of free IAA was measured in roots, within up to two days following ABP1 inactivation in the immunomodulated SS12K9 line[11] whereas alterations of gene expression are observed within a few hours in similar conditions, (3) ABP1 inactivated plants exhibit a strong resistance to exogenous auxin with no inhibition of cell elongation and no strong induction of root hair elongation as observed in control roots (Supplementary Fig. S1). (4) ABP1 inactivation was shown to be required for clathrin-dependent protein internalization and to reduce PIN protein recycling at the plasma membrane[4, 25]. In parallel, ABP1 inactivation does not affect polar localisation of PIN auxin efflux proteins[4, 11] and efficient efflux of auxin was shown to be maintained in roots[11]. More functional PIN efflux carriers at the plasma membrane thus suggest an enhanced ability to transport auxin out of the cells. To address whether the effect of ABP1 on endocytosis is involved in changes of Aux/IAA stability potentially by impairing cellular distribution of auxin, we investigated whether disruption of clathrin-dependent endocytosis affects the stability of AUX/IAAs. Four day-old Col0 seedlings expressing either *pHS:AXR3NT-GUS* or *pHS:axr3.1NT-GUS* reporters were treated with ikarugamycin or tyrphostin A23[4, 26], two inhibitors of clathrin-dependent endocytosis, then heat-shock induced as previously described. Accumulation of mutated and non-mutated proteins was not significantly affected by any of the chemicals indicating that the inhibition of endocytosis is not sufficient to induce enhanced degradation of AUX/IAA (Fig. 4). Interestingly it suggests that even if the inhibition of endocytosis affects some subcellular auxin redistribution, it is unable to promote degradation of AUX/IAA. In consequence, it is highly unlikely that the effect of ABP1 on AUX/IAA stability occurs via the modulation of protein recycling and changes in auxin transport. Determining whether ABP1

downstream signalling components, as Rho-GTPases, are taking part of the signalling cascade negatively regulating the $SCF^{TIR1/AFB}$ pathway still have to be addressed.

Conclusion

Altogether these data suggest that ABP1 acts as a negative regulator of the $SCF^{TIR1/AFB}$ pathway. The enhanced degradation of AUX/IAA in the absence of functional ABP1 is likely to be independent from the presence of auxin, the $SCF^{TIR1/AFB}$ pathway being constitutively active in the absence of this negative regulator. An attractive hypothesis is that ABP1 would confer auxin conditionality to the interaction between TIR1/AFBs and AUX/IAA. Such conditionality might result from a change in subcellular or nuclei protein localisation of AUX/IAA and/or TIR1/AFB proteins[14, 27], from the presence or absence of another protein interacting with one of the component of the transcriptional regulatory module[28-31]or from post-translational modification affecting the relative affinity between TIR1/AFB and AUX/IAA[21, 32]. By demonstrating that ABP1 is involved in the control of AUX/IAA homeostasis, we reveal that the $SCF^{TIR1/AFB}$ pathway is far more complex than previously considered with a subtle and critical balance between stabilization and degradation of transcriptional repressors. Our work provides new basis for exploring positive and negative regulation of auxin signalling and their respective role in the cross-talk with other signalling pathways and coordinated regulation of developmental processes.

References

1. Calderon Villalobos, L. I. et al. A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. Nat Chem Biol 8, 477-85 (2012).
2. Tromas, A., Paponov, I. & Perrot-Rechenmann, C. AUXIN BINDING PROTEIN 1: Functional and evolutionary aspects. Trends Plant Sci 15, 436-446 (2010).
3. Sauer, M. & Kleine-Vehn, J. AUXIN BINDING PROTEIN1: The Outsider. Plant Cell 23, 2033-43 (2011).
4. Robert, S. et al. ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in Arabidopsis. Cell 143, 111-21 (2010).
5. Braun, N. et al. Conditional Repression of AUXIN BINDING PROTEIN1 Reveals That It Coordinates Cell Division and Cell Expansion during Postembryonic Shoot Development in Arabidopsis and Tobacco. Plant Cell 10, 2746-62. (2008).
6. Chapman, E. J. & Estelle, M. Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. Annu Rev Genet 43, 265-85 (2009).
7. Dello Ioio, R. et al. A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. Science 322, 1380-4 (2008).
8. Overvoorde, P. J. et al. Functional genomic analysis of the AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID gene family members in Arabidopsis thaliana. Plant Cell 17, 3282-300 (2005).
9. Dharmasiri, N. et al. Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. Dev Cell 9, 109-19 (2005).
10. Chen, J. G., Ullah, H., Young, J. C., Sussman, M. R. & Jones, A. M. ABP1 is required for organized cell elongation and division in Arabidopsis embryogenesis. Genes Dev 15, 902-11 (2001).
11. Tromas, A. et al. The AUXIN BINDING PROTEIN 1 is required for differential auxin responses mediating root growth. PLoS One 4, e6648 (2009).
12. Stuttmann, J. et al. COP9 signalosome- and 26S proteasome-dependent regulation of SCFTIR1 accumulation in Arabidopsis. J Biol Chem 284, 7920-30 (2009).
13. Gray, W. M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O. & Estelle, M. Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. Nature 414, 271-6. (2001).
14. Parry, G., Ward, S., Cernac, A., Dharmasiri, S. & Estelle, M. The Arabidopsis SUPPRESSOR OF AUXIN RESISTANCE proteins are nucleoporins with an important role in hormone signaling and development. Plant Cell 18, 1590-603 (2006).
15. Vierstra, R. D. The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. Nat Rev Mol Cell Biol 10, 385-97 (2009).
16. Dharmasiri, S., Dharmasiri, N., Hellmann, H. & Estelle, M. The RUB/Nedd8 conjugation pathway is required for early development in Arabidopsis. Embo J 22, 1762-70 (2003).

17. Parry, G. et al. Complex regulation of the TIR1/AFB family of auxin receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 22540-5 (2009).
18. Chini, A. et al. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. Nature 448, 666-671 (2007).
19. Wang, F. & Deng, X. W. Plant ubiquitin-proteasome pathway and its role in gibberellin signaling. Cell Res (2011).
20. Fu, X. & Harberd, N. P. Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. Nature 421, 740-3 (2003).
21. Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Jones, A. M. & Estelle, M. Auxin action in a cell-free system. Curr Biol 13, 1418-22 (2003).
22. Zhao, Y. et al. A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. Science 291, 306-9. (2001).
23. Boerjan, W. et al. Superroot, a recessive mutation in Arabidopsis, confers auxin overproduction. Plant Cell 7, 1405-19. (1995).
24. Stepanova, A. N. et al. TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. Cell 133, 177-91 (2008).
25. Chen, X. et al. ABP1 and ROP6 GTPase Signaling Regulate Clathrin-Mediated Endocytosis in Arabidopsis Roots. Curr Biol 22, 1326-32 (2012).
26. Nagawa, S. et al. ROP GTPase-dependent actin microfilaments promote PIN1 polarization by localized inhibition of clathrin-dependent endocytosis. PLoS Biol 10, e1001299 (2012).
27. Tao, L. Z., Cheung, A. Y., Nibau, C. & Wu, H. M. RAC GTPases in tobacco and Arabidopsis mediate auxin-induced formation of proteolytically active nuclear protein bodies that contain AUX/IAA proteins. Plant Cell 17, 2369-83 (2005).
28. Vernoux, T. et al. The auxin signalling network translates dynamic input into robust patterning at the shoot apex. Mol Syst Biol 7, 508-522 (2011).
29. Szemenyei, H., Hannon, M. & Long, J. A. TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during Arabidopsis embryogenesis. Science 319, 1384-6 (2008).
30. Shin, R. et al. The Arabidopsis transcription factor MYB77 modulates auxin signal transduction. Plant Cell 19, 2440-53 (2007).
31. Varaud, E. et al. AUXIN RESPONSE FACTOR8 regulates Arabidopsis petal growth by interacting with the bHLH transcription factor BIGPETALp. Plant Cell 23, 973-83 (2011).
32. Colon-Carmona, A., Chen, D. L., Yeh, K. C. & Abel, S. Aux/IAA proteins are phosphorylated by phytochrome in vitro. Plant Physiol 124, 1728-38. (2000).

Supplementary Information

Supplementary information accompanies this paper, material and methods are included.

Acknowledgements: We warmly thank M. Estelle, J. Browse, N. Harberd and L. Noel for providing mutants and/or reporter lines. This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR- 08-BLAN-0219 - CSD 7), the Centre National de la Recherche Scientifique (post-doc fellowship to V.S.) and the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur (grant to A. T. and S.P.). We thank Dolf Weijers and Stefan Kepinski for helpful discussion and review of initial draft, and Lawrence Hobbie and Eva Kondorosi for reading the manuscript and useful comments.

Author Contributions: A.T. developed and carried out the genetic approach, A.T., A.L.Q. , S.P. and V.S. performed protein turn-over analyses, S.P. studied clathrin-dependent endosytosis, P.M. performed qRT-PCR, E.L. studied CULLIN modification. C.P.R. conceived and supervised the study with input from A.T.. C.P.R. wrote the paper with input from A.T., S.P. and P.G.

Author information: Correspondence and requests for materials should be addressed to C. P.-R. (Email: catherine.rechenmann@isv.cnrs-gif.fr)

Materials and methods

Plant lines and growth conditions

All Arabidopsis genotypes used in this study were in the Columbia (Col0) ecotype except *afb2.1* and *afb3.1* that are in the Wassilewskija ecotype(Dharmasiri et al., 2005b). Seeds were germinated under sterile conditions on plates containing 1/2 Murashige and Skoog (MS) basal salt mixture, buffered at pH 5.7 with 2.5 mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid, and containing 0.9% vitroagar (Kalys, St Ismier, France). Plates were incubated in a vertical position at 22°C under constant lighting (99 µmol. m^{-2}. s^{-1} intensity). Ethanol induction of scFv12 expression conferring inactivation of ABP1 was performed as previously described(Braun et al., 2008a) for the indicated time. All reporter constructs and mutations were introgressed into the SS12K9 line by crosses and in each case, homozygous lines were selected before use.

Seedling treatments

For root growth inhibition assay, seedlings were grown on 1/2MS containing the indicated concentration of IAA for 4 days, in the presence of 5% ethanol vapors.
For JAZ degradation experiment, 4-day-old seedlings were exposed to 8% ethanol vapors overnight and treated with 200µM cycloheximide containing 0.1% ethanol. Addition of cycloheximide marks the beginning of the kinetic. Roots were harvested at the indicated times after treatments and stored in liquid nitrogen until protein extraction.
Treatments with gibberellic acid were performed by immerging overnight ethanol induced seedlings in 1/2 MS containing 5 µM GA3 for the indicated time.

Heat-shock induction and GUS activity assay

Four day-old seedlings were ethanol induced overnight before heat-shock was performed on plates for 3 hours at 37°C. Drug and mock treatments were applied to the seedlings before heat-shock: 10µM MG 132, 30µM tyrphostin A23, 30µM tyrphostin A51 or 5µM ikarugamycin in 1/2 MS. At the end of the heat-shock, plates were incubated 5 min at 4°C to stop the heat-shock, except time zero that was collected immediately. β-glucuronidase (GUS) assays were performed as described in(Malamy and Benfey, 1997), samples were stained overnight at 37°C. GUS-stained seedlings were observed without clearing with a MULTIZOOM AZ100 microscope (Nikon Corporation Instruments Company, Japan). Protein extraction was performed in GUS buffer (50 mM NaH_2PO_4 pH 7, 10 mM EDTA pH8.8, 0.1% Triton X-100, 0.1 % Laurylsarcosine and 0.2 mM AEBSF) without MUG and total proteins were quantified by Bradford assay. Fluorometric assays were performed by incubating 15 µg total protein in the presence of 2 mM MUG (4 methylumbelliferyl-β-D-glucuronic acid) for 2 h in a plate fluorometer (Infinite 200, TECAN) constantly reading fluorescence at 455 nm with an excitation wavelength set at

365 nm. Data were analyzed with Excel software (Microsoft), and data were normalized against total protein content.

Real-time RT-PCR analysis

Quantitative RT-PCR analysis was performed on root samples as previously reported(Tromas et al., 2009), using oligonucleotides reported in(Braun et al., 2008a), and specific primers for *TIR/AFB* were: TIR1-F: AGA TAA GGG ACT GCC CGT TT, TIR1-R: GAC CAG CCA CTG TTC GGT AT; AFB1-F: ACT GCG AGA ACT GAG GGT GT, AFB1-R: TCA CAC AGA GAC GGA AGC AC; AFB2-F: CGC AGC TGA GAT TCA TGG TA, AFB2-R: TTG CCT CCA CCG AGT AAA TC; AFB3-F: TCG CTG CCA CAT GTA AAG AG, AFB3-R: TGT GGC TCG AGA ATG CAT AG. At least two biological repeats were analyzed in duplicates.

Protein extraction and western bot analysis

Total proteins were extracted from roots of 4 day post-germination seedlings. Samples were grounded in liquid nitrogen and resuspended in preheated denaturing buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 3% SDS, 10% glycerol, 100 mM DTT). Samples were heated at 95°C for 5 min and spun at 5000 *g* for 20 min at RT to remove cell debris. Protein concentration was estimated by Amidoblack assay. For protein extraction after GA3 treatments, samples were grounded in liquid nitrogen and resuspended in protein extraction buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 75 mM NaCl, 15 mM $MgCl_2$, 2.5 mM EDTA, 0.1% Nodinet P-40, 1 mM DTT, 2 mM AEBSF, 0.5 mM NaF, 0.2 mM Na_3VO_4, 60 mM b-glycerophosphate, 2 mM MG132, 1 $\mu g.ml^{-1}$ leupeptine and aprotinin each). Samples were then centrifuged 30 min at 13,000 rpm at 4 °C. Supernatants were collected and total proteins were quantified by Bradford assay (Bradford Reagent, Sigma). For scFv12 and ABP1, extraction was performed as previously described(*5*).

Equal amounts of proteins (20 µg) were mixed with SDS reducing buffer. Protein sample were separated on 8 or 12% acrylamide (37.5:1) SDS-PAGE, then transferred onto PVDF membrane (Immobilon-P membrane PVDF 0.45 µm, Millipore). The membrane was blocked at least 2h at RT with 5% non fat dry milk in TBST (TBS 0.1% Tween 20) and treated 1 h with primary antibody: anti-CULLIN1(*27*), anti-GFP (BD Biosciences) , anti-HA (Roche), anti-E-tag and anti-ABP1 mAb34(*5*), in 5% non fat dry milk in TBST. For normalization, membranes were re-probed with anti-TSN primary antibody(*31*). Peroxidase activity of HRP-linked secondary antibodies was detected by enzyme linked chemiluminescence (Immobilon Western HRP substrate, Millipore). Protein expression was quantified by Image J software. All experiments were performed at least in triplicates

***Supplemental Bibliography*:**

30. J. E. Malamy, P. N. Benfey, *Development* **124**, 33 (1997).

31. N. F. Frei dit Frey *et al.*, *Plant Cell* **22**, 1575 (May, 2010).

Résumé

L'auxine est une hormone fondamentale dans le développement et la physiologie de la plante. L'obtention des plantes conditionnelles pour ABP1 a permis la mise en évidence de son importance dans la signalisation de l'auxine. Ainsi ABP1 agirait d'une part sur l'endocytose de vésicules à clathrine au niveau de la membrane plasmique et d'autre part sur la stabilité des Aux/IAAs. Ce dernier résultat suggère qu'une voie de signalisation en aval d'ABP1 permet de modifier l'homéostasie de la voie de régulation transcriptionnelle de l'auxine, la voie $SCF^{TIR/AFBs}$.

Mon travail de thèse a consisté à caractériser les plantes inactivées pour ABP1 lors de la croissance à l'obscurité dans la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Mon étude montre qu'ABP1 contrôle l'expansion cellulaire en jouant sur la plasticité pariétale. J'ai ainsi pu mettre en évidence une modification de la proportion de formes fucosylées des chaînes latérales des xyloglucanes, le principal hémicellulose de la paroi primaire chez *Arabidopsis*. Cette modification de la fucosylation des xyloglucanes requiert des changements d'expressions géniques médiés ce qui conforte l'existence d'une voie de signalisation reliant ABP1 à la voie $SCF^{TIR/AFBs}$.

En parallèle, j'ai mené une approche génétique de recherche de suppresseurs du phénotype lié à l'inactivation d'ABP1 à l'obscurité. Parmi les dix lignées validées, j'ai d'ores et déjà identifié le gène *DCL3* comme étant impliqué dans la suppression du phénotype ss12k et mis en évidence l'implication de la voie d'extinction de gènes par l'intermédiaire de petits ARNs non codant (voie RdDM) dans le contrôle de l'expansion cellulaire.

Abstract

Auxin is a key hormone concerning the control of plant physiology and the impact on plant development. Conditional plants for ABP1 allowed the post embryonic studies and have contributed to demonstrate the involvement of ABP1 in a broad range of cellular and developmental responses including the clathrin-dependent endocytosis and the regulation of Aux/IAAs homeostasis. These datas revealed that an ABP1-dependent pathway is acting on transcriptional regulation by modulating the $SCF^{TIR/AFBs}$ signaling pathway.

I took advantage of the phenotype of dark grown seedlings to study cell expansion in ABP1 loss of function background. ABP1 knockdown induced modifications of fucosylated form of xyloglucan side chains that are the main hemicellulose in *Arabidopsis* primary cell wall. All data converge to show that this effect results from alterations of expression of cell wall related genes via the modulation of the $SCF^{TIR/AFBs}$ pathway.

In parallel, I used a suppressor approach to discover new signaling components downstream of ABP1. Characterisation of one of the suppressor leads to the identification of a loss of function allele of DCL3. This data demonstrates the involvement of the RNA directed DNA methylation pathway downstream of ABP1.