



HAL
open science

Rôle des strigolactones dans le développement de l'architecture aérienne de la plante en interaction avec les autres hormones végétales

Yasmine Ligerot

► **To cite this version:**

Yasmine Ligerot. Rôle des strigolactones dans le développement de l'architecture aérienne de la plante en interaction avec les autres hormones végétales. Biologie végétale. Université Paris Saclay (COmUE), 2015. Français. NNT : 2015SACLS118 . tel-01655501

HAL Id: tel-01655501

<https://theses.hal.science/tel-01655501>

Submitted on 5 Dec 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.

NNT :2015SACLS118

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY,
préparée à l'Université Paris-Sud

ÉCOLE DOCTORALE N° 567
Sciences du Végétal : du Gène à l'Ecosystème

Spécialité de doctorat ([Biologie](#))

Par

Mlle Yasmine Roxane Ligerot

Rôle des Strigolactones dans le Développement de l'Architecture Aérienne de la Plante
en Interaction avec les autres Hormones Végétales

Thèse présentée et soutenue à Versailles , le 4 Décembre 2015 :

Composition du Jury :

Mme, Robert, Stéphanie	CR -- SLU (Suède)	Rapporteur
Mme, Rochange, Soïzic	MCF -- Université Toulouse III (UPS)	Rapporteur
Mme, Delarue, Marianne	PR -- Université Paris Saclay	Présidente du jury
M, Pouvreau, Jean-Bernard	MCF -- Université de Nantes	Examineur
M, Sakr, Soulaïman,	PR -- Agrocampus-ouest (Anger)	Examineur
Mme, Rameau, Catherine	DR -- IJPB-INRA (Versailles)	Directeur de thèse
Mme, Leduc, Nathalie	MCF – Université d'Angers	Invité



Sommaire

CHAPITRE n° 1 : INTRODUCTION	1
Partie n°I : <u>Les hormones dans le règne végétal</u>	7
I.A. Notion d'hormone chez les plantes	7
I.A.1 Définition d'une hormone	7
I.A.2 Les différentes hormones végétales chez les plantes et leurs rôles	9
I.A.3 Fonctionnement schématique d'une hormone, de sa biosynthèse à la transduction du signal	10
I.B. L'auxine et les gibbérellines : deux voies hormonales essentielles au contrôle de l'architecture aérienne de la plante.	12
I.B.1 L'auxine : une hormone clé dans la mise en place de l'architecture aérienne des plantes	12
I.B.1.a Métabolisme de l'auxine	12
<u>Biosynthèse</u>	12
- Voie de l'acide 3-indole pyruvique (IPyA)	13
- Voie du 3-indole acetamide (IAM)	13
- Voie de la tryptamine (TRA)	13
- Voie du 3-indole acetaldoxime (IAOx)	14
<u>Conjugaison et dégradation de l'auxine</u>	14
<u>Rétro-contrôle de l'auxine sur sa propre biosynthèse</u>	15
I.B.1.b Transport de l'auxine	16
I.B.1.c Signalisation de l'auxine	17
- Voie de signalisation transcriptionnelle de l'auxine via TIR1/AFBs	17
- Les facteurs de transcription impliqués dans la réponse à l'auxine : les ARFs	18
- Les répresseurs de la réponse à l'auxine : les Aux/IAAs	19
- Les récepteurs de l'auxine de la famille TIR1/AFBs	19
I.B.2 L'acide gibbérellique : hormone clé dans la régulation de la taille des plantes	21
I.B.1.a Métabolisme de l'acide gibbérellique	22
<u>Biosynthèse des GAs</u>	22
<u>Inactivation des GAs</u>	23
<u>Les GAs, un double rétro-contrôle négatif</u>	24
I.B.2.b Transport de l'acide gibbérellique	24
I.B.2.c Signalisation de l'acide gibbérellique	24
Partie n°II : <u>Les strigolactones, une hormone aux multiples rôles chez les plantes</u>	31
II.A. La ramification chez les plantes : de la théorie de la dominance apicale à la découverte du rôle des strigolactones	31
II.A.1 Processus de ramification chez les plantes	32
II.A.1.a Diversité d'architectures chez les plantes vasculaires	32
II.A.1.b Initiation du méristème axillaire	34

II.A.1.c Contrôle génétique de l'initiation du méristème axillaire	35
II.A.1.d La formation d'une branche résulte d'une levée de dormance et non d'une croissance continue du bourgeon	36
II.A.2 Rôle des hormones dans le processus de ramification	36
II.A.2.a Théorie de la dominance apicale : rôle de l'auxine et des cytokinines dans le processus de ramification	36
II.A.2.b Rôle du sucre dans la dominance apicale	39
II.A.3 Découverte de l'implication des strigolactones comme inhibiteurs de la ramification	40
II.A.3.a Etudes des mutants hyper-ramifiés	40
II.A.3.b Identification du signal d'inhibition de la ramification	42
II.A.4 Les strigolactones, hormones aux effets multiples sur la plante	45
II.A.4.a Strigolactones et développement des parties aériennes	45
II.A.4.b Strigolactones et système racinaire	46
II.A.4.c Strigolactones et nodulation, symbiose entre bactéries et légumineuses.	47
II.B. Les strigolactones agissent comme des signaux de reconnaissance entre différents organismes dans la rhizosphère	49
II.B.1 Les strigolactones stimulent la germination des graines de plantes parasites	49
II.B.1.a Cycle de vie des plantes parasites <i>Striga</i> et <i>Orobanche/Phelipanche</i>	49
II.B.1.b Impact économique des plantes parasites	51
II.B.1.c Rôle des strigolactones dans la germination des graines de plantes parasites	53
II.B.2 Les strigolactones facilitent la symbiose entre plante et champignons endomycorhiziens à arbuscules	53
II.B.2.a La relation symbiotique entre plante et champignons endomycorhiziens à arbuscules	53
II.B.2.b Rôle des strigolactones dans l'établissement des endomycorhizes à arbuscules.	54
Partie III : Biosynthèse et signalisation des strigolactones	59
III.A. Biosynthèse des strigolactones	59
III.A.1 Structure et diversité des strigolactones	59
III.A.2 Voie de biosynthèse des strigolactones	60
III.A.3 Régulation de la biosynthèse des strigolactones	62
III.A.3.a Régulation de la biosynthèse des strigolactones par l'auxine	62
III.A.3.b Contrôle de <i>RMS2</i> sur la biosynthèse des strigolactones	63
III.A.3.c Implication des facteurs de transcription <i>NSP1</i> et <i>NSP2</i>	64
III.A.3.d Influence de l'environnement sur la biosynthèse de SLs	64
III.A.4 Localisation de la biosynthèse et transport des strigolactones	65
III.B. Voie de Signalisation des strigolactones	66
III.B.1 <i>RMS3/D14</i> un récepteur à activité enzymatique	67
III.B.2 <i>RMS4/MAX2</i> une protéine à boîte F intégrant le signal strigolactone	68
III.B.3 Le signal strigolactone nécessite la dégradation de protéines	69
III.B.3.a Les protéines dégradées en présence de strigolactones : <i>D53</i> et les <i>SMXLs</i>	69
III.B.3.b Les protéines dégradées en présence de strigolactones : <i>SLR1</i>	70
III.B.3.c Les protéines dégradées en présence de strigolactones : <i>BES1</i>	71
III.C. Transduction du signal strigolactone dans le contrôle de la ramification	73

III.C.1 Hypothèse de la canalisation de l'auxine	73
III.C.1.a Transport d'auxine et canalisation: la théorie du « What the flux » (WTF)	73
III.C.1.b Le modèle de la canalisation dans le contrôle de la ramification	75
III.C.2 Modèle de régulation transcriptionnelle	77
III.C.2.a Les facteurs de transcription de la famille des TCP impliqués dans la ramification	77
III.C.2.b Le modèle transcriptionnel du contrôle de la ramification	78
III.D. Origine évolutive de la voie des strigolactones	80
III.D.1 Les strigolactones sont des molécules anciennes présentes chez les algues vertes	80
III.D.2 Rôle des strigolactones chez les plantes non vasculaires	81
III.E. Résumé du modèle actuel de contrôle de la ramification chez le pois	83
Partie n°IV : Article de revus “Strigolactone biosynthesis and signaling in plant development”	87
Partie n°V : Objectifs de la thèse	95
CHAPITRE n° 2 : Les strigolactones stimulent l'élongation des entre-nœuds chez le pois indépendamment des gibbérellines.	101
Partie n°I. Introduction	101
A. Le contrôle hormonal de la taille des entre-nœuds	101
B. Objectif : déterminer le rôle des strigolactones dans l'élongation des entre-nœuds	104
C. Résumé des résultats obtenus	105
- Les SLs régulent la taille des plantes via <i>RMS4</i>	105
- Les SLs stimulent l'élongation des entre-nœuds via la division cellulaire	106
- SLs et GAs agissent indépendamment dans le contrôle de l'élongation des entre-nœuds	106
Partie n°II : article accepté “Strigolactones stimulate internode elongation independently of gibberellins”	109
Partie n°III : Discussion	131
- Les mécanismes de contrôle de la taille des plantes par les SLs sont-ils conservés chez différentes espèces ?	132
- Quelles sont les potentielles cibles dégradées par la signalisation des SLs et impliquées dans le contrôle de la taille des plantes ?	133
CHAPITRE n° 3 : RMS2, un récepteur de l'auxine de la famille de TIR1/AFB	137
Partie n° I : Introduction	137
A. Caractéristiques du mutant <i>rms2</i>	138
A.1 Un mutant EMS identifié sur un crible de ramification : <i>rms2</i>	138

A.2 La caractérisation physiologique de <i>rms2</i> , met en évidence le rôle de <i>RMS2</i> comme signal de rétro-contrôle dans la voie strigolactone	139
B. Les hypothèses sur l'identité du signal <i>RMS2</i>, auxine ou autre signal ?	142
B.1 Hypothèse (1) : Le signal <i>RMS2</i> -dépendant est-il l'auxine	143
B. 2 Hypothèse (2) : Le signal <i>RMS2</i> -dépendant est indépendant de l'auxine ?	145
C. Objectifs	146
C.1 Identifier le signal <i>RMS2</i>	146
C. 2 Validation du signal <i>RMS2</i> = l'auxine	148
Partie n° II : Article en préparation : The pea branching <i>RMS2</i> gene encodes the <i>PsAFB4/5</i> auxin receptor	151
- Introduction	153
- Results	155
- Materials and methods	167
- Bibliography	172
- Supplemental Data	174
Partie n°III : Identification de nouveaux mutants <i>Psafb4/5</i> par une approche TILLING	177
A. Mise en place d'une approche TILLING sur le locus <i>PsAFB4/5</i>	179
B. Résultats : Etudes des mutants de TILLING <i>Psafb4/5</i>	182
B.1 Crible picloram sur les mutants de TILLING <i>Psafb4/5</i>	183
B.2 Le mutant de TILLING <i>rms2-3</i> est un allèle faible	185
C. Conclusion	188
Partie n°IV : Annexes	189
Annexe n°1 : Résultats complémentaires	189
- La mutation <i>afb5-5</i> induit une résistance au picloram mais pas la mutation <i>afb4-8</i> chez <i>Arabidopsis</i>	190
- Expressions des gènes de la famille TIR1/AFBs dans différents tissus de pois	191
- Localisation de l'expression des gènes de biosynthèse de l'auxine de la famille <i>TAR</i> chez le pois	192
- La mutation <i>dor3 (smx16)</i> restaure le phénotype de <i>rms3</i>	193
Annexe n°2 : Localisation de l'expression des gènes de la famille TIR1/AFBs dans différents tissus chez <i>Arabidopsis</i>	194
Annexe n°3 : Résultats préliminaires d'une étude de transcriptomique réalisé chez le pois	201
Partie n°V : Discussion	207
- Le signal de rétro-contrôle <i>RMS2</i> -dépendant est une auxine	207
Spécificités du clade AFB4/AFB5	207
- Le rétro-contrôle <i>RMS2</i> -dépendant semble conservé chez les plantes	209

- Modèle de la régulation de la biosynthèse d'IAA par les SLs : rôle des gènes <i>SMXL</i> et du FT BRC1 ?	210
- L'effet des SLs sur la synthèse d'IAA passe-t-il par la régulation du PAT ?	212
CHAPITRE n° 4 : Conclusion et Perspectives	215
I. L'utilisation de plusieurs espèces modèles, une étape essentielle dans l'étude de la voie strigolactones.	215
II. Le contrôle de la croissance des plantes est sous l'influence de multiples facteurs dont les strigolactones.	216
III. Auxine et strigolactones, une boucle de contrôle à l'échelle locale ?	217
IV. Les strigolactones, acteurs de la division cellulaire – Une molécule candidate dans l'élaboration de stratégies « anti-cancer »?	218
Liste des publications	221
Bibliographie	223

Liste des abréviations

°C = degré Celsius	MAX = MORE AXILLARY GROWTH
µg = microgramme	MEB = Microscope Electronique à Balayage
µL = microlitre	mM = milimolaire
2,4-D = acide 2,4-dichlorophenoxyacetic	MOC1 = MONOCULM1)
2ODD = 2-oxoglutarate-dependent deoxygenase	N = nœud
ABP1 = Auxin Binding Protein 1	NAA = acide 1-naphtaleneacetic
ADN = Acides Déoxyribo Nucléiques	nm = nanomètre
ADNc = ADN complémentaire	nM = nanomolaires
AFB = Auxin binding F-Box	oxIAA = acide 2-oxoindole-3acétique
ARF = Auxine Response Factor	P450 = Cytochrome P450 monooxygenase
ARN = Acides Ribo Nucléiques	Pb = paires de bases
ASK1 = Arabidopsis SKP1-like	PCR = Polymerase Chain Reaction
At = <i>Arabidopsis thaliana</i>	PID = PINOÏD
AuxRE = Auxin Responsive Element	PIF = Phytochrome Integrating Factor
BET = Bromure d'Ethidium	PIN = PIN-FORMED
BL = BLIND	PP2A = PROTEIN PHOSPHATASE 2A
BRC = BRANCHED	Ps = Pisum sativum
CCD = Carotenoid Cleavage Dioxygenase	Q-PCR = Quantitative PCR
CK = cytokinine	qsp = quantité suffisante pour
cm = centimètre	R = Reverse
CPS = <i>ent</i> -cophalyl diphosphate synthase	RGA = Repressor of the GA1-3 mutant
CYC = CYCLOIDEA	RMS= RAMOSUS
D = DWARF	RNase = ribonucléases
D6PK = D6 PROTEIN KINASE	RT = Reverse Transcription
DAD = DECREASED APICAL DOMINANCE	RT-PCR = Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction
Dnase = DéoxyriboNucléase	SCF = SKP1-CULLIN-F-BOX complex
dNTP = déoxyRiboNucléotides Triphosphate	SL = strigolactone
EF1= elongation factor 1	SLR1 = SLENDER RICE 1
EMS = EthylMethylSulfonate	SLY = SLEEPY
EN = entre-nœud	TAA1 = TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS
F = Forward	Taq = ADN polymérase de <i>Thermus aquaticus</i>
FT = facteur de transcription	TB1 = TEOSINTE BRANCHED
GA = gibbérellines	TBE = Tris Borate EDTA
GFP = Green Fluorescent Protein	TCP = TB1-CYC-PCF1
GGDP = géranyl géranyl diphosphate	TILLING = Targeting Induced Local Lesions in Genomes
GH3 = GRETCHEN HAGEN 3	TIR1 = Transport Inhibitor Response 1
GID1 = Gibberellin insensitive dwarf 1	Tpl = TOPLESS
GR24 = strigolactone synthétique	TPS = Terpene synthase
h = heure	U = unité
IAA = indole-3-acetic acid	UPS = Ubiquitine Protéasome System
KAO = <i>ent</i> -kaurenoic acid oxydase	UV = ultraviolet
KO = <i>ent</i> -kaurene oxydase	WT=Wild Type
KS = <i>ent</i> -kaurene synthase	YUC = YUCCA
LAS = LATERAL SUPPRESSOR	
MA = méristème axillaire	
MAC = méristème apical caulinaire	

Titre de la thèse :

Rôle des Strigolactones dans le Développement de l'Architecture Aérienne de la Plante en Interaction avec les autres Hormones Végétales

Ce projet de thèse a été réalisé à l'Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB) dans l'équipe « Contrôle de la ramification des plantes » sous la direction de Catherine Rameau. Le laboratoire travaille autour d'une thématique commune qui est la compréhension du rôle des **strigolactones** (SLs) comme composante de l'**architecture des plantes**. L'étude de mutants de synthèse et de réponse aux SLs chez deux plantes modèles, le pois (*Pisum sativum*) et la mousse (*Physcomitrella patens*), constitue le cœur principal du travail de notre laboratoire.

Le pois est un modèle végétal très utilisé depuis plus d'un siècle, notamment pour des approches **génétiques** ou **physiologiques**. En effet, ce modèle a surtout été rendu célèbre par **Gregor Mendel**, qui a utilisé le pois pour l'étude de l'**hérédité des caractères**. C'est en décortiquant la transmission de caractères facilement observables (longueur de la tige, couleur et disposition des fleurs, forme et couleur des graines, forme et couleur des gousses) suite à des croisements chez le pois que Mendel a fait émerger le concept de la transmission héréditaire des caractères. Le pois a aussi été un modèle précurseur dans les études physiologiques qui ont conduit à la **découvertes des hormones** chez les plantes (Voir Chap n°1, partie II.A.2).

La mousse *Physcomitrella patens*, est un modèle dont l'étude est plus récente. Elle appartient au taxon des Bryophytes, qui rassemble les descendants actuels des premières plantes ayant **colonisé le milieu terrestre**, il y a environ 450 millions d'années. Le **génome** de *Physcomitrella* est entièrement **séquencé** (Rensing et al., 2008), et le fort taux de recombinaison homologue chez cette espèce facilite grandement l'obtention de mutants par ciblage de gènes. L'étude de tels mutants permet de mieux comprendre le **rôle évolutif** des hormones et les mécanismes qui ont permis la **conquête du milieu terrestre** par les plantes.

Les strigolactones (SLs) représentent la dernière famille d'**hormones** végétales découverte chez les plantes. Ces dérivés de caroténoïdes étaient déjà connus pour être

impliqués dans des relations symbiotiques et parasitaires dans la rhizosphère, comme la germination des graines de plantes parasites de *Striga* ou d'*Orobanche* (Cook et al., 1966) et l'établissement de symbioses mycorhiziennes à arbuscules (Akiyama et al., 2005). Elles sont considérées comme des hormones depuis que leur rôle dans l'**inhibition de la ramification** a été mis en évidence (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008). Plus récemment, de nouvelles fonctions des SLs dans le développement des plantes ont été identifiées comme la régulation de l'architecture racinaire, la croissance secondaire des tiges ou la communication entre plantes chez la mousse *Physcomitrella patens*.

Des mutants impliqués dans les voies de biosynthèse et de réponse aux SLs ont été identifiés chez plusieurs espèces (*Arabidopsis*, pois, riz, pétunia), et tous présentent un **phénotype** hyper-ramifié et **nain**, chez le pois ils sont nommés *ramosus* (*rms*).

Mon premier **objectif** de thèse était de mieux comprendre le **rôle des strigolactones dans le contrôle de la taille des plantes** chez le pois.

Chez le pois l'élongation de l'entre-nœud est un processus développemental qui résulte de la **synergie** de deux phénomènes : la **division cellulaire** et l'**élongation cellulaire**. L'utilisation de multiples mutants a permis de mettre en évidence le **rôle de cinq hormones** dans ce phénomène : les gibbérellines (GAs) (Ingram et al ; 1984), l'auxine (McKay et al., 1994) et les brassinostéroïdes (Nomura et al., 1997) sont des régulateurs positifs de l'élongation de la tige chez le pois et d'autres espèces, tandis que l'éthylène (Ross and Reid., 1986) et l'acide abscissique (Ross et al., 2011) ont au contraire un rôle inhibiteur de l'élongation chez le pois. La régulation de la taille de la plante est donc un processus complexe faisant intervenir plusieurs acteurs.

Dans un premier temps nous avons testé l'effet des ramifications sur le contrôle de la hauteur de la plante, pour **découpler l'effet des mutations rms** sur la **taille** de celui des **ramifications**. Nous avons ensuite démontré le **rôle des SLs** sur la taille des plantes.

Ensuite nous avons analysé l'effet des SLs d'un point de vue cytologique pour mieux comprendre comment cette hormone agit sur le **contrôle de l'élongation des entre-nœuds**, et déterminer si les SLs agissent sur le nombre et/ou la longueur des cellules.

Le rôle des GAs sur l'élongation des tiges étant déjà décrit, il semblait important de tester une éventuelle **l'interaction entre SLs et GAs** dans le **processus d'élongation** des entre nœuds chez le pois.

Ces résultats constituent le **Chapitre n°2** sous forme d'une courte introduction en français et d'un article en anglais publié dans *Plant Physiology*[®] en octobre 2013.

L'autre objectif de ma thèse était de **valider le gène candidat** pour le gène *RMS2* impliqué dans un rétro-contrôle régulant la synthèse de SLs.

Un phénomène de rétro-contrôle sur la **transcription** des gènes de **biosynthèse des SLs** a été mis en évidence: les mutants déficients en SLs ont un niveau de transcrits des gènes de biosynthèse des SLs plus élevé que le type sauvage, et l'addition de SLs diminue ce niveau de transcrits (Foo et al., 2005). Chez le **mutant *rms2*** (hyper ramifié et nain), ce **rétro-contrôle** est **aboli**. Par contre, le gène affecté par la mutation *rms2* n'était pas connu.

Le gène *RMS2* est aussi impliqué dans un signal de rétro-contrôle (on a supposé qu'il s'agissait du même signal) régulant la teneur en cytokinines (CKs) dans la sève xylémienne.

Les résultats ont conduit à l'identification de *RMS2* comme récepteur de l'auxine et mettent en avant l'existence d'une **boucle SLs/auxine** permettant le contrôle de la ramification chez le pois.

Ces résultats constituent le **Chapitre n°3** de cette thèse. Une introduction en français présente les caractéristiques physiologiques du mutants *rms2* et les hypothèses quant à son rôle dans la voie SLs. Les résultats sont divisés en deux parties :

* La première partie présente une **approche TILLING** pour identifier de **nouveaux mutants *rms2*** (en français).

* La deuxième partie, sous forme d'article en préparation (en anglais), présente : (1) l'identification de ***RMS2* comme récepteur de l'auxine**, (2) une étude du **rôle des SLs** sur la régulation de la **biosynthèse de l'auxine** chez le pois.

Durant ma thèse je me suis donc intéressée au rôle des SLs en **interaction** avec deux autres **hormones** : (1) Les **SLs et les GAs** pour le contrôle de la taille des plantes et (2) les **SLs et l'auxine** dans le contrôle de la ramification.

Le **chapitre n°1** de cette thèse propose une introduction générale qui présente:

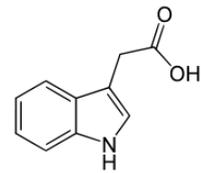
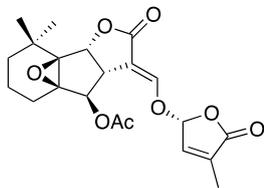
(**Partie I**) la notion d'hormone et les voies hormonales de l'auxine et des GAs

(**Partie II**) le processus de ramification et la découverte de l'implication des SLs dans ce processus

(**Partie III**) l'état actuel des connaissances sur la biosynthèse et la signalisation des SLs.

INDRODUCTION

Partie n°1 : Les hormones dans le règne végétal



Partie n°1 : Les hormones dans le règne végétal

I.A. Notion d'hormone chez les plantes

I.A.1 Définition d'une hormone

Le mot hormone est dérivé du grec et signifie littéralement « mettre en mouvement, diriger ». Sa création permet de donner une réalité linguistique à un concept, établi parallèlement par des scientifiques désignant l'existence de « substances » chimiques sécrétées par l'organisme, animal ou végétal, se déplaçant d'un organe à un autre pour coordonner son développement. C'est la découverte de la sécrétine, une hormone pancréatique, en 1902 (Bayliss et Starling) qui a conduit à la création du mot hormone en 1905 par Ernest Starling.

Au 19^{ème} siècle, des pionniers de l'étude des hormones chez les plantes, Julius Van Sachs et Charles Darwin montrent que des « substances » mobiles sont responsables de plusieurs processus de développement chez les plantes. Plusieurs dizaines d'années après les travaux initiés par Darwin sur les mouvements des plantes (« The power of movement in plants » F & C. Darwin), l'auxine devient la première hormone végétale identifiée (Kölg et al., 1934).

Depuis 1905, la définition d'une hormone évolue en fonction des avancées scientifiques. Si l'on s'intéresse au concept d'hormone chez les plantes à ce jour on peut établir la définition suivante : les hormones sont de petites molécules organiques synthétisées par la plante qui influencent des processus physiologiques de croissance, de développement ou de réponse aux stress, et qui agissent à de très faibles concentrations (Davies., 2004).

Chez les plantes les hormones peuvent être synthétisées dans tous les tissus et non dans des glandes dédiées comme chez les animaux. Elles influencent à la fois le développement et les réponses aux stress biotiques ou abiotiques. Leur concentration et leur transport sont régulés très finement par de nombreux facteurs y compris les changements de l'environnement.

Historiquement les hormones des plantes ont été décrites comme des substances mobiles, ayant une action endocrine ; la cellule sécrétrice de l'hormone appartient à un tissu

ou à un organe différent de la cellule sensible à son action. Il existe aussi chez les plantes des voies de transport des hormones, telles que la sève xylémienne, le phloème ou encore les voies aériennes pour les molécules volatiles comme l'éthylène. Cependant, des études récentes bien que ne réfutant pas l'importance de ce transport, tendent de plus en plus à montrer un effet local des hormones sur les cellules voisines appartenant à un même organe (action paracrine), voire sur la cellule sécrétrice elle-même (action autocrine).

Les hormones végétales ont été étudiées dans un premier temps pour leurs fonctions physiologiques. Ces vingt dernières années ont permis d'élucider, en partie, les mécanismes moléculaires de la biosynthèse, du métabolisme, du transport et de la réponse de plusieurs d'entre elles. L'utilisation de l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* et l'identification de mutants des voies de biosynthèse et de signalisation ont largement contribué à ces progrès. L'action d'une hormone n'est pas binaire, de type absence ou présence, comme le montrent les travaux menés par Thimann sur la croissance de différents organes en réponse à l'auxine. La croissance en réponse à l'application d'auxine exogène semble suivre une gaussienne, quel que soit l'organe observé (racines, tige ou bourgeons) : à faible concentration la croissance augmente, puis à partir d'une teneur seuil (différente d'un organe à l'autre), l'effet de l'auxine devient inhibiteur sur la croissance (Figure n°1.1).

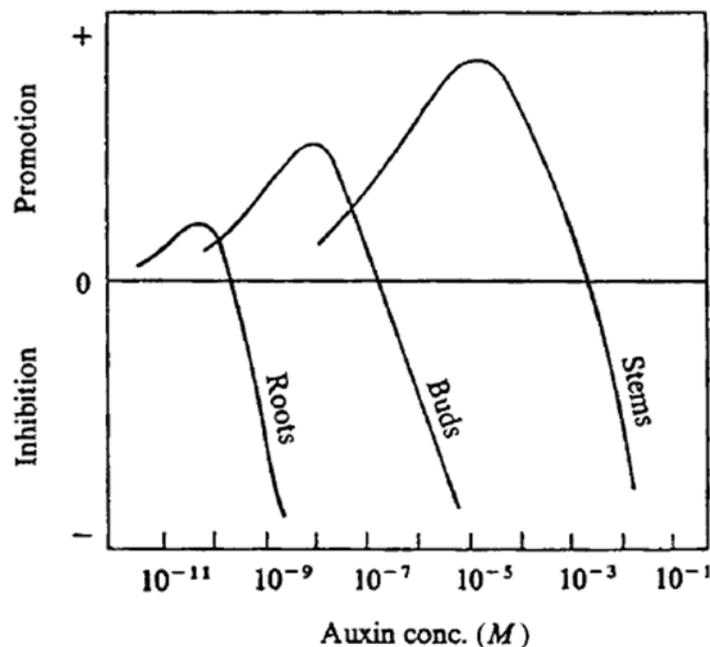


Figure n°1.1 : Etude de dose réponse à l'auxine.

L'apport d'auxine exogène induit une réponse différente sur la croissance d'un organe en fonction de sa concentration (Thimann., 1969).

Ainsi l'effet d'une hormone est dépendant d'une multitude de facteurs liés aux contextes cellulaires de la cellule percevant cette hormone. Un de ces facteurs est la présence éventuelle d'autres hormones.

I.A.2 Les différentes hormones végétales chez les plantes et leurs rôles

A ce jour neuf hormones ont été identifiées chez les plantes : l'auxine, les cytokinines (CKs), l'acide gibbérellique (GA), les brassinostéroïdes (BR), l'acide abscissique (ABA), l'éthylène, l'acide jasmonique (JA), l'acide salicylique (SA) et les strigolactones (SLs) dernière hormone découverte (Figure n°1.2).

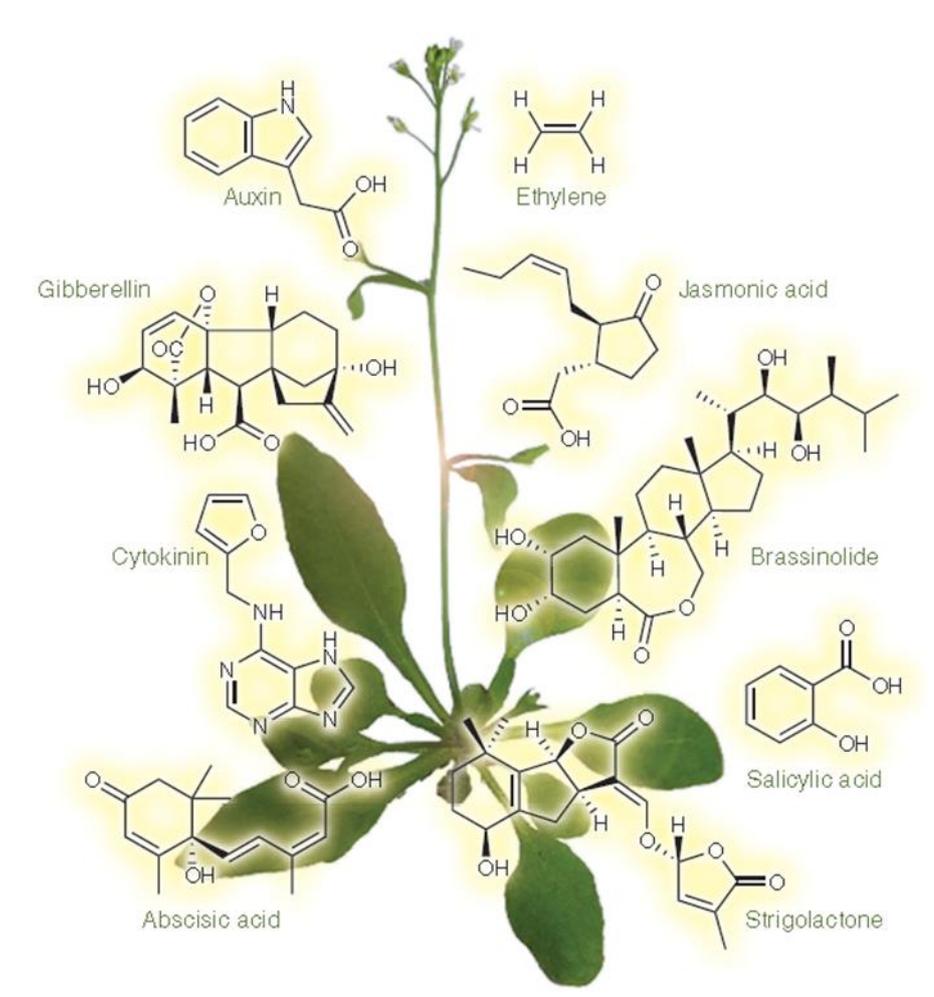


Figure n°1.2 : Structures chimiques des 9 hormones actuellement décrites.
(Santner et al., 2009)

L'auxine, les cytokinines, les gibbérellines, et l'acide abscissique ont majoritairement un rôle dans le développement de la plante, alors que l'éthylène, l'acide jasmonique et l'acide salicylique sont plutôt impliqués dans des processus de réponses à des stress et de défense (figure n°1.3). Les strigolactones sont impliquées dans des processus développementaux ainsi que dans la communication avec d'autres espèces. Les rôles des strigolactones seront développés à la Partie n°II de cette introduction.

Bien que les acteurs moléculaires soient différents, les hormones végétales ont un schéma commun de fonctionnement autour d'étapes clés qui conduisent *in fine* à une réponse hormonale.

Hormones	Principaux rôles
Auxine	Rhizogénèse, phototropisme, dominance apicale, organogénèse, cycle cellulaire
Cytokinines	Développement caulinaire stimulation de la division cellulaire, développement des bourgeons axillaires, développement des chloroplastes
Acide abscissique	Levée de dormance, réponse au stress hydrique, fermeture des stomates
Ethylène	Maturation du fruit, réponse de défense, induction de la sénescence, triple réponse : élongation des entre nœuds, germination, développement du fruit
Acide gibbérellique	Elongation de la tige, résistance aux pathogènes, inhibition de la germination, embryogénèse, développement du fruit, morphogénèse florale
Acide Salicylique	Résistance aux pathogènes, inhibition de la germination
Acide jasmonique	Développement des organes reproducteurs mâles chez Arabidopsis, sénescence, réponse de défense face aux insectes
Brassinostéroïdes	Différenciation des tissus vasculaires, division et élongation des cellules, épïnastie
Strigolactones	Inhibition du développement des bourgeons axillaires, interactions symbiotiques et parasitaires, croissance secondaire, développement de l'architecture racinaire, sénescence des feuilles

Figure n°1.3 : Principaux rôles des 9 hormones actuellement décrites.

I.A.3 Fonctionnement schématique d'une hormone, de sa biosynthèse à la transduction du signal

Le décryptage des voies de biosynthèse et de signalisation de plusieurs hormones végétales permet de mettre en évidence un schéma commun de fonctionnement des hormones (Figure n°1.4):

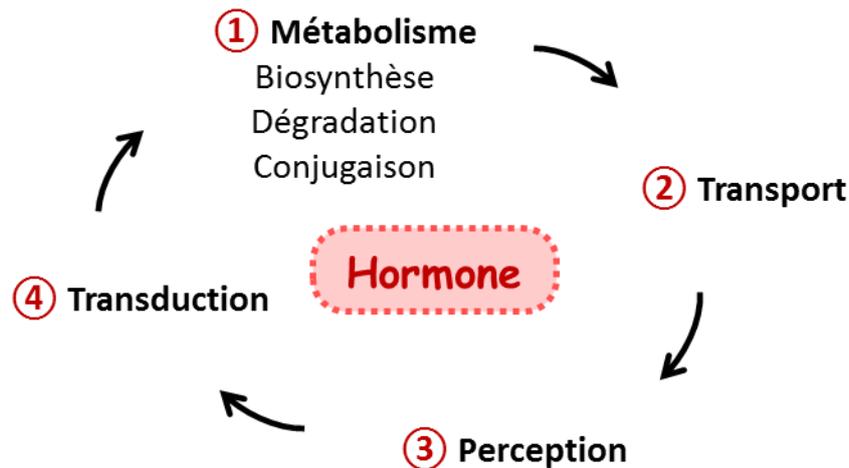


Figure n°1.4 : Fonctionnement d'une hormone, de la biosynthèse à la transduction du signal

- (1) Métabolisme de l'hormone : biosynthèse / dégradation / conjugaison / stockage
- (2) Transport de l'hormone : le transport peut être passif ou actif, il nécessite alors la présence de transporteurs permettant ainsi la mise en place de flux polarisés ou de pools d'hormones par exemple.
- (3) La perception de l'hormone : la perception d'une hormone nécessite la présence d'une protéine appelée récepteur qui a une affinité plus ou moins spécifique pour l'hormone.
- (4) Transduction du signal : La transduction du signal peut prendre différentes formes, et fait intervenir la dégradation de protéines cibles via le protéasome pour un grand nombre d'hormones. Les cytokinines par contre déclenchent une cascade de phosphorylation. La majorité des voies hormonales induisent une réponse transcriptionnelle via la régulation de l'expression de gènes de réponse à l'hormone.

I.B. L'auxine et les gibbérellines : deux voies hormonales essentielles au contrôle de l'architecture aérienne de la plante.

I.B.1 L'auxine : une hormone clé dans la mise en place de l'architecture aérienne des plantes

L'auxine est une hormone connue pour intervenir dans la plupart des processus du développement de la plante, dominance apicale, rhizogénèse, phototropisme... Des interactions multiples et complexes avec les autres hormones ont été démontrées. Un des objectifs de ma thèse a été de mettre en évidence une de ces interactions avec les SLs dans le contrôle de la ramification. Nous présenterons donc plus en détails les voies de biosynthèse et de signalisation de l'auxine dans la partie suivante.

I.B.1.a Métabolisme de l'auxine

Biosynthèse

Chez les plantes, l'auxine est majoritairement présente sous forme d'acide-3-indole acétique (IAA). Il existe cependant d'autres formes d'auxines naturelles ou synthétiques qui ont des actions similaires. Parmi les auxines synthétiques le NAA (acide 1-naphtaleneacetic) et le 2,4-D (acide 2,4-dichlorophenoxyacetic) sont celles majoritairement utilisées pour mimer l'action de l'auxine ; le picloram est une autre auxine de synthèse dont on reparlera au chapitre n°3 de cette thèse. L'utilisation de ces différentes auxines de synthèse permet d'explorer les spécificités des récepteurs de l'auxine.

Les voies de biosynthèse de l'IAA ont d'abord été étudiées chez les bactéries, puis chez les plantes pour lesquelles l'essentiel des avancées ont été réalisées par l'étude de mutants d'*Arabidopsis thaliana* (Ljung, 2013).

Il existe plusieurs voies de synthèse de l'IAA, qui ont toutes des précurseurs dérivés de la voie des Shikimates (Ljung, 2013). La voie majoritaire chez les plantes vasculaires est celle du L-Tryptophane (L-Trp), elle a été caractérisée chez le maïs (Krichbaumer et al., 2006), *Arabidopsis* (Mashigishi et al., 2011) ainsi que chez le pois (Quittenden et al., 2009). Les

gènes impliqués dans cette voie de biosynthèse de l'IAA dépendante du tryptophane ont été identifiés chez de nombreuses espèces.

Une autre voie de biosynthèse de l'IAA indépendante du tryptophane passe par l'indole-3-glycérol phosphate (IGP) qui est aussi un dérivé des Shikimates (Ouyang et al., 2000). Cependant, peu de gènes ou d'enzymes intervenant dans cette voie ont été identifiés faisant de la voie indépendante du tryptophane une voie dite alternative.

On dénombre quatre voies de biosynthèse de l'IAA à partir du L-tryptophane, ces voies ont été nommées d'après le premier métabolite après le L-tryptophane :

- **Voie de l'acide 3-indole pyruvique (IPyA)** : deux familles d'enzymes sont impliquées dans cette voie.

(1) La tryptophane amino-transférase TAA1 (TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF *ARABIDOPSIS*) et ses deux homologues TAR1 et TAR2 convertissent le L-Trp en IPyA (Stepanova et al., 2008 ; Tao et al., 2008 ; Yamada et al., 2009 ; Zou et al., 2011).

(2) les enzymes YUCCAs (YUC) synthétisent l'IAA à partir de l'IPyA (Mashigushi et al., 2011 ; Stepanova et al., 2011 ; Won et al., 2011). Il a d'abord été suggéré que les gènes *TAA/TAR* et *YUCCA* agissaient séparément, mais des approches génétiques et biochimiques établissent désormais qu'ils agissent bien dans une même voie de synthèse de l'IAA et que celle-ci est la voie majoritaire chez de nombreuses plantes (Zhao et al., 2012).

- **Voie du 3-indole acetamide (IAM)** : Cette voie est très étudiée chez les bactéries. L'IAM a été retrouvé chez plusieurs espèces végétales dont *Arabidopsis*, le maïs, le riz et le tabac. Cette voie fait intervenir une IAM hydrolase (AtAMI1, NtAMI1) qui convertit l'IAM en IAA et a été isolée chez *Arabidopsis* ainsi que chez le tabac (Pollman et al., 2006 ; Nemoto et al., 2009).

- **Voie de la tryptamine (TRA)** : La tryptamine est présente chez le pois et *Arabidopsis*, en très faible quantité comparée à l'IAA ou au L-Trp (Quittenden et al., 2009 ; Novák et al., 2012). Cette voie n'est pas encore bien caractérisée, une tryptophane decarboxylase (TDC) serait responsable de la conversion du L-Trp en TRA (Mano & Nemoto, 2012). Il semble que

la TRA soit un des précurseurs de la biosynthèse de l'IAA mais aussi de la biosynthèse de l'indole alkaloïde et de la sérotonine (Quittenden et al., 2009 ; Mano & Nemoto, 2012).

- **Voie du 3-indole acetaldoxime (IAOx)** : Les cytochrome P450 mono-oxygénases CYP79B2 et B3, identifiés uniquement chez les *Brassicaceae* catalysent la conversion du L-Trp en IAOx (Zhao et al., 2002 ; Sugawara et al., 2009). L'IAOX est un précurseur commun de l'IAA ainsi que des indoles glucosinolates (IG) et de la camalexin (CAM), (Hansen & Halkier, 2005 ; Normanly et al., 2010). La perturbation d'une de ces voies peut affecter la voie de biosynthèse de l'IAA : par exemple, les mutants *sur1* et *sur2*, affectés dans la conversion de l'IAOX en IG sont déficients en IG et accumulent l'IAA et ses métabolites (Barlier et al., 2000 ; Novák et al., 2012).

Récemment des inhibiteurs de la biosynthèse de l'auxine ont été identifiés : l'acide amino-oxyphénylpropionique (AOPP) (Soeno et al., 2010) ; la kynurenine (He et al., 2011) et la yucasin (Nishimura et al., 2014). L'AOPP et la kynurenine sont des inhibiteurs de la Trp aminotransférase, qui catalyse la première étape de la voie de l'IPyA.

Conjugaison et dégradation de l'auxine

Le taux d'auxine d'une plante est régulé par plusieurs facteurs, dont une part importante est la synthèse *de novo* d'IAA, mais il existe aussi des mécanismes de dégradation (irréversible) et de conjugaison (réversible) convertissant les molécules d'IAA en métabolites ou conjugués. Des gènes impliqués dans les mécanismes de conjugaison ont été identifiés chez *Arabidopsis*, dont la famille des gènes d'amido synthases *GH3* (GRETCHEN HAGEN 3) qui sont inductibles par l'auxine. L'IAA sous sa forme conjuguée peut être stocké dans les graines puis une fois reconverti en IAA redevenir actif lors des stades précoces du développement de la plantule (Woodward & Bartel, 2005 ; Ludwig-Miller et al., 2011). Les différents conjugués de l'auxine et les gènes impliqués dans ce phénomène restent toujours à identifier.

Parmi les produits de dégradation de l'IAA, l'acide 2-oxoindole-3-acétique (oxIAA) et l'oxIAA-glucose sont les deux métabolites majoritaires. Cependant les gènes impliqués dans le catabolisme de l'IAA restent à identifier (Östin et al., 1998 ; Kai et al., 2007 ; Novák et al., 2012).

Rétro-contrôle de l'auxine sur sa propre biosynthèse

De premières études menées sur *Arabidopsis* et sur le maïs, basées sur la perturbation du transport de l'auxine suggèrent un rétro contrôle de l'auxine sur sa propre synthèse (Ljung et al 2001 ; Morri et al., 2005). Des études plus récentes montrent qu'il existe chez *Arabidopsis* une régulation transcriptionnelle des gènes de la voie IPyA de biosynthèse de l'IAA, en réponse à des changements de concentration d'auxine active dans la plante (Suzuki et al., 2015). L'expression des gènes *TAR2*, *YUC1*, *YUC2*, *YUC4* et *YUC6* est inhibée en réponse à l'application exogène d'auxines synthétiques NAA ou 2,4-D (Figure n°1.5). Au contraire, les gènes *YUCCAs* sont surexprimés en réponse à la kynurenine (inhibiteur de la biosynthèse d'auxine), ce qui s'accompagne d'une réduction du niveau d'IAA dans la plante.

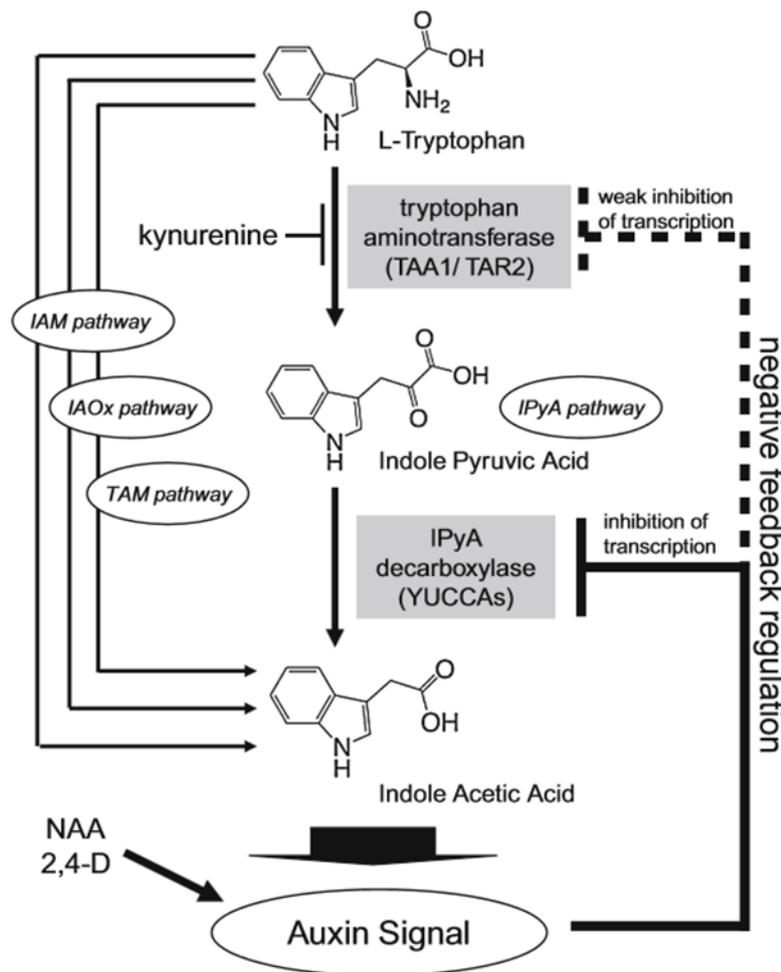


Figure n°1.5 : Les gènes de biosynthèse de l'auxine de la voie IPyA sont régulés transcriptionnellement en réponse à l'auxine chez *Arabidopsis* (Suzuki et al., 2015)

I.B.1.b Transport de l'auxine

Il existe deux types de transport de l'auxine :

(1) un transport rapide non polarisé qui permet d'acheminer l'auxine des sources (jeunes tissus aériens) vers les puits via les tissus vasculaires (phloème) (Marchant et al., 2002).

(2) un transport plus lent, actif de cellule à cellule et qui est polarisé. En effet, la molécule d'auxine, acide ($pK_a = 4,5$) sous forme protonée dans l'apoplaste (pH 5,5), peut traverser passivement la membrane plasmique. Cependant, des transporteurs d'influx existent. Ils appartiennent à la famille des protéines membranaires AUX/LAX (Auxin permease/Like AUX), qui comprend 4 membres chez *Arabidopsis* (AtAUX1 et AtLAX1 à 3) (Parry et al., 2001). Ces protéines agissent comme des symports transportant à la fois l'IAA et des protons (Kerr & Bennet, 2007).

Dans le cytoplasme (pH 7), l'IAA est sous forme dé-protonée et incapable de passer la membrane passivement sans l'action d'un transporteur d'export. Il existe de nombreux transporteurs d'efflux d'auxine appelés PIN (PIN-FORMED). Un réseau complexe d'interactions entre les différentes localisations des protéines PINs (PIN1, 2, 3, 4 & 7) semble être à l'origine du contrôle de la croissance racinaire (Blilou et al., 2005 ; Vieten et al., 2005). Au contraire, la croissance des organes aériens semble être contrôlée uniquement par la localisation de PIN1 (Okada et al., 1991 ; Gälweiler et al., 1998).

Les protéines PINs sont soit localisées à la membrane plasmique, soit internalisées dans des endosomes où elles pourront ensuite être ré-adressées à la membrane. Le transport des PINs est dynamique et un certain nombre de protéines sont connues pour réguler la localisation apicale ou basale des PINs (Adamowski & Friml., 2015). Les protéines PINs peuvent être internalisées via un processus d'endocytose dépendant des clathrines (Dhonukshe et al., 2007). La protéine GNOM est impliquée dans l'adressage des PINs à la partie basale de la cellule, alors que l'adressage à la partie apicale dépend d'autres facteurs (Doyle et al., 2015).

Un autre processus permet de réguler la polarité des PINs, il s'agit de la phosphorylation de ces protéines, contrôlée par trois familles de protéines kinases : PID (PINOÏD ; Bennett et al.,

1995 ; Frilm et al., 2004), PP2A (PROTEIN PHOSPHATASE 2A ; Garbers et al., 1996 ; Michniewicz et al., 2007) et D6PK (D6 PROTEIN KINASE ; Zourelidou et al., 2009 ; 2014). PID et PP2A agissent dans une boucle avec des rôles antagonistes : PID permet la phosphorylation de PIN (alors adressé à la membrane) alors que PP2A dé-phosphoryle PIN (alors internalisé dans la cellule). Plus récemment identifiée, la protéine D6PK semble phosphoryler PIN indépendamment de PID (Willige et al., 2013), et ainsi favoriser son adressage à la membrane plasmique.

Une fois présentes à la membrane, les protéines PINs semblent se regrouper en agglomérats fixes. Des études indiquent un rôle de la paroi cellulaire, via la cellulose, dans la maintenance de ces îlots de PINs, mais la relation entre paroi et protéines PINs reste encore incertaine (Adamowski & Friml., 2015).

Un autre mode de régulation des PINs est leur dégradation, dépendante de l'ubiquitination des protéines PINs et de leur adressage au protéasome (Kleine-Veine et al., 2008).

I.B.1.c Signalisation de l'auxine

L'action pléiotrope de l'auxine s'explique en partie par son mode de signalisation qui fait intervenir de nombreuses protéines. Deux types de signalisation auxinique ont été décrits : une voie de régulation transcriptionnelle via TIR1/AFBs (Transport Inhibitor Response 1 / Auxin binding F-Box) et une voie de régulation via ABP1 (Auxin Binding Protein 1), cette dernière ne sera pas décrite dans cette thèse.

- Voie de signalisation transcriptionnelle de l'auxine via TIR1/AFBs

L'auxine régule la transcription d'un grand nombre de gènes en induisant la dégradation de protéines de la famille des Aux/IAAs qui sont des répresseurs de facteurs de transcription de la famille des ARFs (Auxin Response Factor). Le mécanisme fait intervenir des récepteurs d'auxine de la famille TIR1/AFBs : ces protéines à boîte F font partie d'un complexe SCF^{TIR1/AFB}, le récepteur assurant une liaison avec la sous-unité ASK1 (*Arabidopsis* SKP1-like) du complexe SCF. En présence d'auxine le complexe SCF^{TIR1/AFB} recrute une protéine cible Aux/IAA qui est alors ubiquitinée puis adressée au protéasome 26S où elle est dégradée. La dégradation des Aux/IAAs par le système UPS (Ubiquitine Protéasome System) en présence d'auxine permet de lever la répression par les Aux/IAAs sur les facteurs de

transcription de type ARFs, ce qui permet la transcription de gènes dits de réponse à l'auxine (Figure n°1.6).

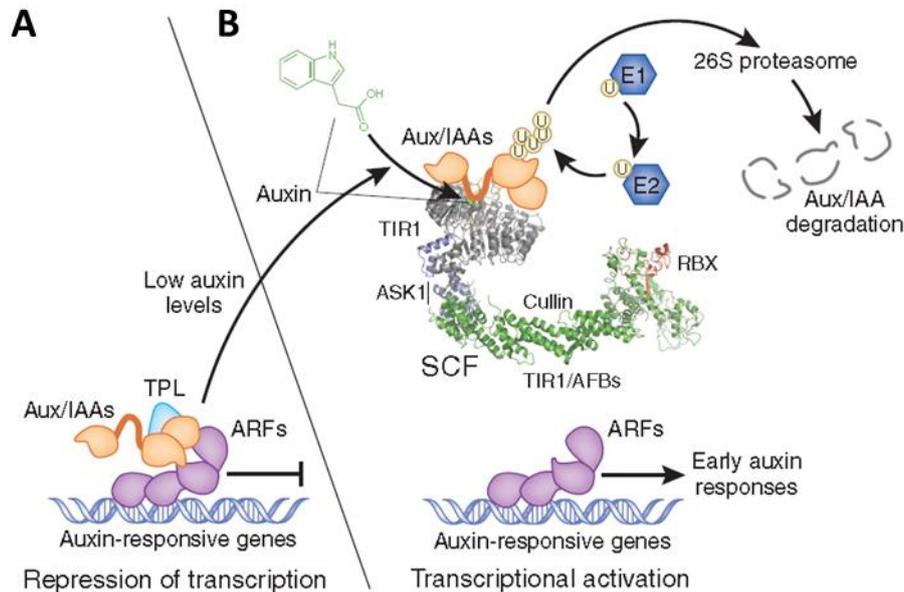


Figure n°1.6 : Signalisation auxinique chez *Arabidopsis*.

Le complexe SCF^{TIR1/AFBs} lie l'auxine et cible des protéines Aux/IAA qui sont dégradées via le protéasome.

[A] à faible concentration d'auxine, la transcription des gènes de réponse à l'auxine est inhibée par les Aux/IAAs. [B] Quand le niveau d'auxine cellulaire augmente, l'auxine se lie aux récepteurs TIR1/AFBs, augmentant son affinité pour les Aux/IAAs et entraînant l'ubiquitination puis la dégradation des Aux/IAAs via le protéasome, ce qui *in fine* permet la libération des facteurs de transcription ARFs et la transcription des gènes de réponse à l'auxine (Santner et al., 2009).

- Les facteurs de transcription impliqués dans la réponse à l'auxine : les ARFs

Les facteurs de transcription de type ARFs se caractérisent par leurs capacités à lier l'ADN au niveau de l'élément-cis de réponse à l'auxine AuxRE (Auxin Responsive Element) correspondant à la séquence TGTCTC, présente sur les promoteurs des gènes de réponse à l'auxine. Cette liaison entre l'ARF et l'AuxRE du gène de réponse à l'auxine induit soit une répression, soit une activation de la transcription du gène, selon la protéine ARF (Abel & Thelgis, 1996 ; Guifoyle & Hagen, 2007). La famille des ARFs comporte 23 membres chez *Arabidopsis*.

Cependant, les séquences promotrices de plusieurs gènes de réponse à l'auxine ne présentent pas d'éléments Aux/REs, ce qui laisse supposer l'existence putative d'autres séquences d'ADN pouvant être reconnues par les ARFs (Santner et al., 2009).

- Les répresseurs de la réponse à l'auxine : les Aux/IAAs

Les protéines Aux/IAAs possèdent quatre domaines conservés, nommés I, II, III et IV. Les domaines III et IV interviennent dans la formation de dimères entre Aux/IAA et ARF, alors que le domaine II permet la liaison au complexe SCF^{TIR1/AFB} via une séquence très conservée GWPPV/I appelée degron (Reed, 2001 ; Ramos et al., 2001 ; Kepinski & Leyser, 2004).

La famille des Aux/IAAs comporte 29 membres chez *Arabidopsis*. Le recrutement des ARFs par les Aux/IAAs nécessite la présence du co-répresseur TOPLESS (Tpl) qui se lie au domaine I des Aux/IAAs (Szemenyei et al., 2008).

L'auxine stimule également l'expression des gènes codant pour les Aux/IAAs, ce qui suggère que la réponse à l'auxine induit une boucle de rétro-contrôle négative (Mockaitis & Estelle, 2008). Ces gènes sont ainsi très souvent utilisés comme marqueurs de réponse à l'auxine.

- Les récepteurs de l'auxine de la famille TIR1/AFBs

Les récepteurs de l'auxine de la famille TIR1/AFBs sont des protéines à boîte F, on en dénombre six chez *Arabidopsis* : TIR1 et AFB 1 à 5. Ces six protéines sont capables de lier l'IAA et de former un complexe SCF^{TIR1/AFBs} en interagissant notamment avec ASK1 (*Arabidopsis* SKP1-like). La structure de la protéine TIR1 d'*Arabidopsis* a été déterminée en présence d'IAA et d'un peptide de 13 acides aminés correspondant au degron du domaine II de IAA7 (Aux/IAA). La protéine TIR1 comprend un domaine LRR (Leucine Rich Repeat), composé de 18 LRRs et d'une coiffe C-terminale, qui adopte une structure différente de celle des autres domaines LRRs (Kobe & Kajava, 2001). L'autre domaine de TIR1 nécessaire à la signalisation auxinique est le domaine à boîte F, permettant la liaison avec la sous unité ASK1 du complexe SCF (Figure n°1.7).

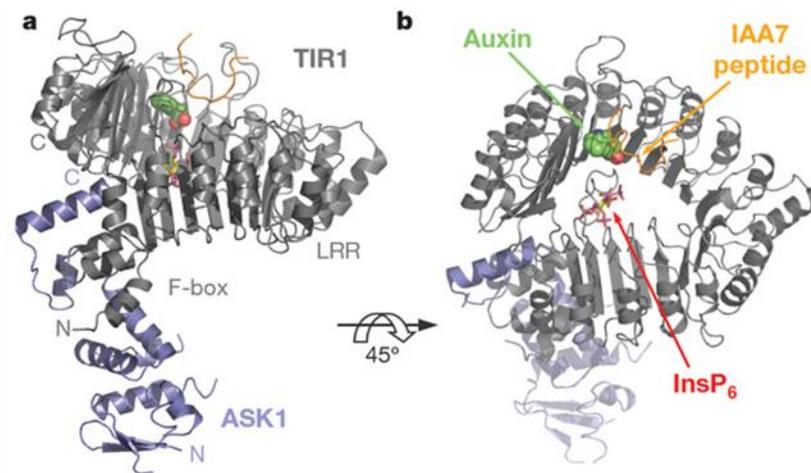


Figure n°1.7 : Structure cristalline du récepteur TIR1 d'*Arabidopsis*.

(Tan et al., 2007).

Le domaine LRR permet la formation d'un poche de liaison à l'auxine.

Le domaine à boîte F permet l'interaction avec la protéine ASK1 du complexe SCF.

Le repliement des différents domaines de TIR1 permet la formation d'une poche de liaison de l'auxine, comprenant 5 acides aminés essentiels: His78, Arg403, Ser438, Ser462 et Glu487. Un co-facteur, l'InsP6 (inositol 1,2,3,4,5,6- hexakisphosphate) présent dans la poche de liaison à l'auxine semble jouer un rôle dans la stabilisation du complexe (Tan et al., 2007). L'association entre le récepteur et l'Aux/IAA forme un co-récepteur, et les combinaisons TIR/AFB-Aux/IAA présentent des affinités de liaison à l'auxine différentes suivant l'Aux/IAA présent dans le complexe (Calderón Villalobos et al., 2012). Il a également été montré que les agonistes de l'auxine, le NAA, le 2,4-D et le picloram stabilisent différenciellement le complexe TIR1-Aux/IAA.

L'analyse phylogénétique de la famille *TIR1/AFBs* chez *Arabidopsis* montre deux clades (Figure n°1.8.A). D'un côté, *TIR1*, *AFB1*, *AFB2* et *AFB3* ont des rôles similaires et redondants, et le quadruple mutant pour ces gènes est insensible à l'auxine et présente des défauts sévères de développement (Figure n°1.8.B) (Dharmasiri et al., 2005). De l'autre côté, *AFB4* et *AFB5*, qui présentent une extension N-terminale de 44 acides aminés, ont une fonction inconnue. Le mutant *afb5* est spécifiquement résistant à l'auxine de synthèse picloram, et le complexe AFB5-Aux/IAA lie le picloram (Walsh et al., 2012 ; Calderón Villalobos et al., 2012).

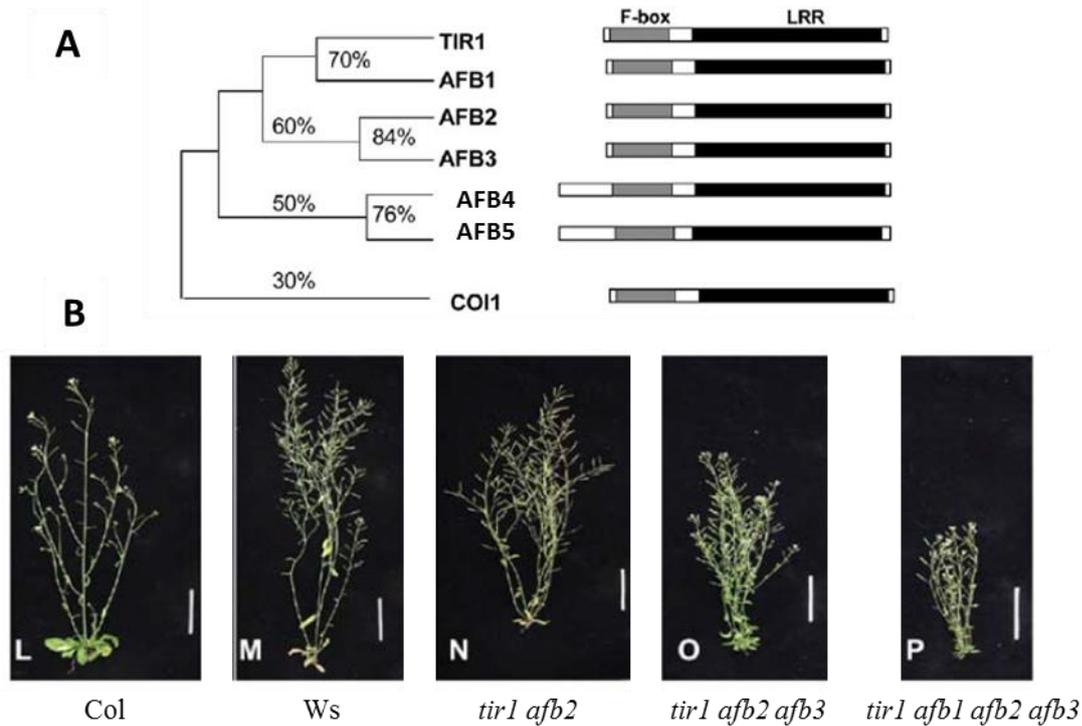


Figure n°1.8 : Les gènes *TIR1* et *AFB1* à *3* sont redondants pour la régulation de la croissance d'*Arabidopsis*.

[A] Arbre phylogénétique de la famille TIR1/AFBs. [B] Phénotype des mutants *tir1*, *afb1*, *afb2* et *afb3*. (Adapté de Dharmasiri et al., 2005.)

I.B.2 L'acide gibbérellique : hormone clé dans la régulation de la taille des plantes

Les gibbérellines sont des molécules définies par leur structure chimique (figure n°1.9.A). Plus d'une centaine de molécules de type acide gibbérellique (GAs) ont été identifiées chez 128 espèces différentes de plantes, de bactéries ou de champignons. Chez les plantes les GAs sont impliqués dans plusieurs processus développementaux comme la régulation de la taille des plantes, la germination de la graine, ou le développement du fruit.

Seules quelques formes de GAs sont bioactives (MacMillan, 2002), c'est principalement l'étude de mutants présentant des phénotypes nains, sensibles ou au contraire insensibles aux GAs qui a conduit à l'élucidation des voies de biosynthèse et de dégradation, ainsi que des mécanismes de signalisation des GAs (Figure n°1.9).

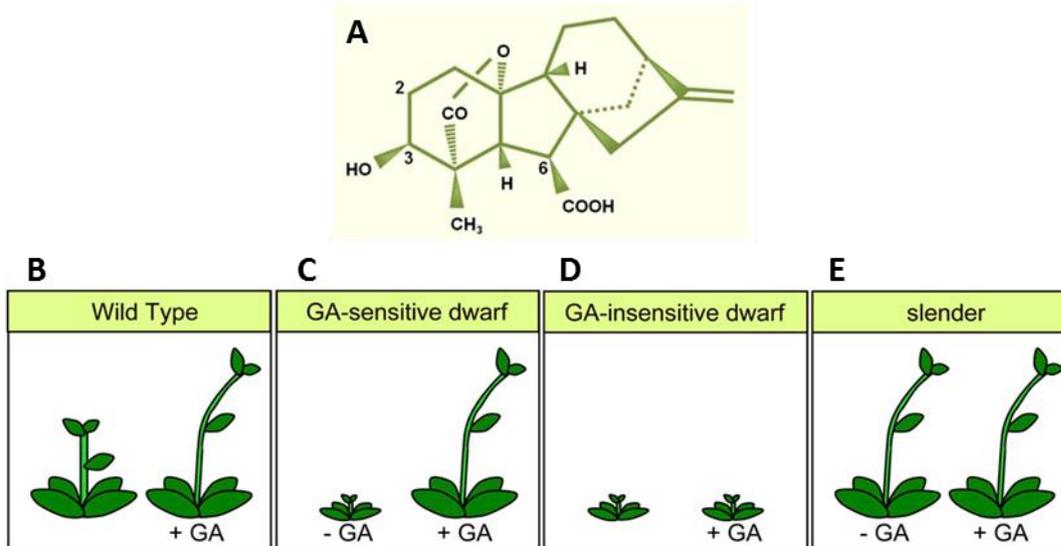


Figure n°1.9 : Phénotype des différents mutants GA.

[A] Structure de la GA_{47} , molécule bioactive, les groupes carboxyliques en (C6) et hydroxyle en (C3) sont essentiels pour la bio-activité de la molécule. [B] L'application de GA exogène sur une plante sauvage induit une augmentation de la taille de la plante. [C] Les mutants sensibles au GA sont des mutants de la biosynthèse des GAs, ils sont nains et répondent à une application exogène de GAs par une augmentation de la croissance. [D] Les mutants insensibles au GA, sont nains et ne répondent pas aux GA. [E] Le mutant *slender* de pois présente un phénotype similaire à celui d'un sauvage qui répond au GA, il est à l'origine de l'hypothèse selon laquelle les GAs sont des inhibiteurs d'inhibiteur de croissance (Brian et al., 1957; Potts et al., 1985) (Harberd et al., 2009).

I.B.1.a Métabolisme de l'acide gibbérellique

Biosynthèse des GAs

La forme GA_1 est la plus active pour l'élongation des entre-nœuds chez le pois et chez le maïs. Chez *Arabidopsis* et comme chez les *Cucurbitaceae*, GA_4 est la forme active majeure. Toutes les GAs connues sont synthétisées à partir du geranylgeranyl diphosphate (GGDP) qui est un précurseur en C_{20} commun pour la synthèse des diterpénoïdes. De nombreuses enzymes interviennent dans la voie de biosynthèse des GAs, que l'on peut classer en trois groupes : les terpènes synthases (TPSs), les cytochromes P450 monooxygénases (CYPs P450) et les 2-oxoglutarate-dépendent déoxygénases (2ODDs) (Yamaguchi, 2008).

Les deux premières étapes qui convertissent le GGDP en *ent*-kaurène via l'action de deux TPS, *ent*-cophalyl diphosphate synthase (CPS) et *ent*-kaurène synthase (KS), ces étapes se déroulent dans le plaste. Une série de plusieurs réactions via des P450 CYPs conduit *in*

fine à la molécule GA₁₂, molécule inactive qui est le précurseur commun des formes actives des GAs. Une série d'oxydations via des enzymes de type 2ODDs, la GA 20-oxidase (GA20ox) et la GA 3-oxidase (GA3ox), convertissent la GA₁₂ en GA₄, GA₁ et GA₃ actives (Figure n°1.10). La localisation subcellulaire des différentes GA oxydases n'est pas encore bien caractérisée, bien que certaines étapes soient connues pour être cytosoliques (Davière et Achard, 2015).

Chez le pois le passage de la GA₂₀ à la GA₁ qui est la forme la plus active est catalysée par la GA 3-oxydase ; le gène qui code cette enzyme est connu sous le nom de *LE* et fait partie des gènes identifiés par Mendel (Ingram et al., 1984).

Inactivation des GAs

Un des moyens de réguler la teneur en GAs actives dans la plante consiste à désactiver ces molécules en les transformant en GAs inactives de façon irréversible. La réaction de désactivation la plus connue est une 2β-hydroxylation catalysée par une enzyme de type 2ODDs, la GA 2-oxydase (GA2ox).

D'autres processus peuvent permettre la désactivation des GAs, l'époxydation, la méthylation ou la conjugaison.

L'étude du mutant nain de riz *eui* (*Elongated Uppermost Internode*), a permis de mettre en évidence un mécanisme général de désactivation des GAs. La protéine EUI est un cytochrome P450 qui par une réaction d'époxylation désactive plusieurs GAs dont GA₄, GA₉ et GA₁₂ (Zhu et al., 2006).

Chez *Arabidopsis*, les protéines GNAMT1 et GNAMT2 (gibberelin methyltransferase) catalysent la méthylation du carbone C-6 du groupe carboxyle des GAs, provoquant l'inactivation de l'hormone. Les gènes *GNAMT1* et *GNAMT2* sont exprimés préférentiellement durant le développement de la graine, et leur rôle semble restreint à ce développement (Varbanova et al., 2007).

Des conjugués éther et ester ont été identifiés pour les GAs. Les enzymes impliquées dans la formation de ces conjugués et leurs rôles (stockage, transport ou inactivation des GAs) sont encore peu connus. Des expériences *in vitro* montrent que la formation des conjugués de GAs peut être réversible (Schneider et al., 1992).

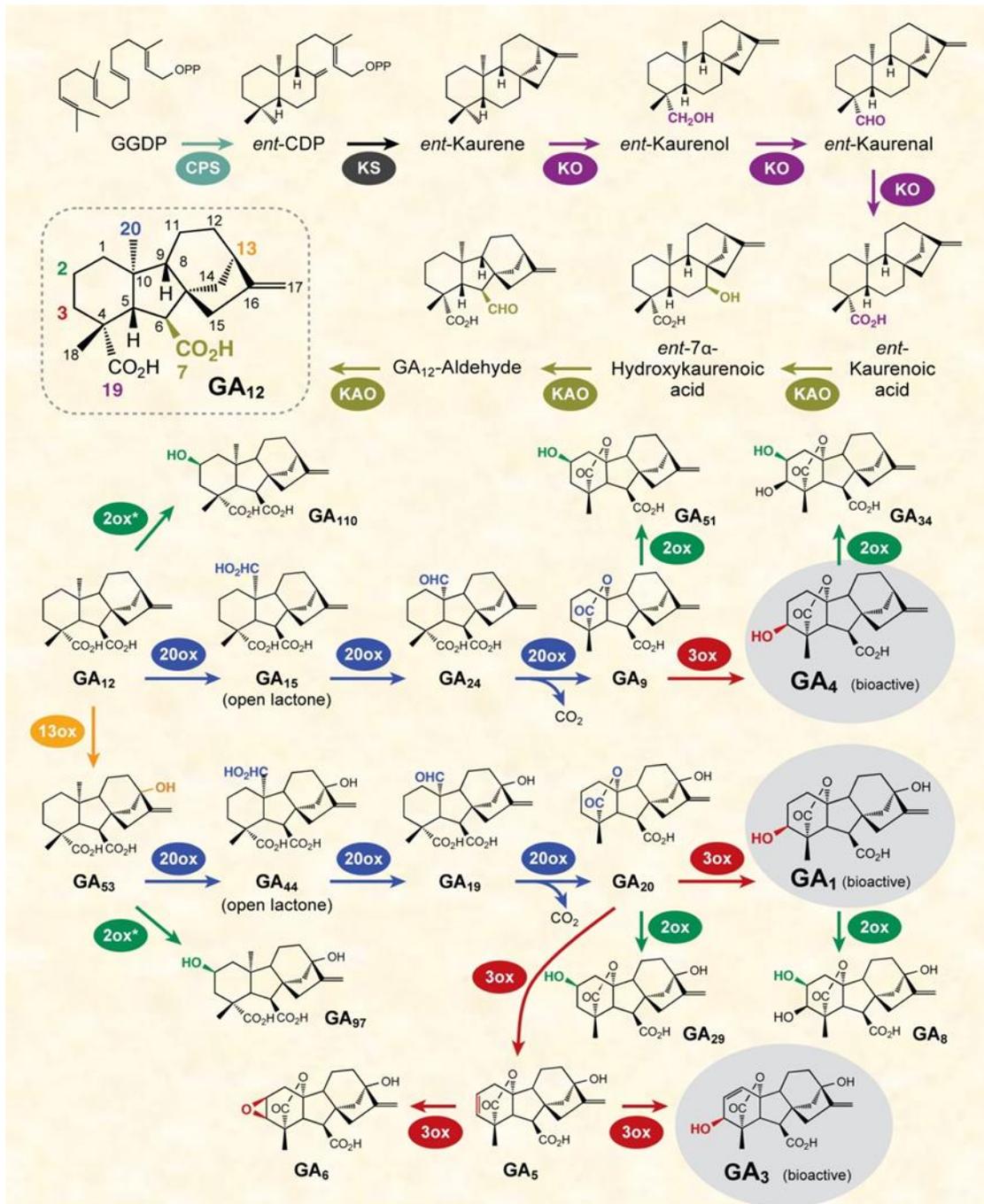


Figure n°1.10: Voie de biosynthèse des gibbérellines chez les plantes.

Les molécules de GAs bio-actives les plus fréquentes chez les plantes sont entourées en gris. Pour chaque réaction métabolique la modification induite est figurée en couleur. Abréviations : 2ox, GA 2-oxidase (Class I and II); 2ox*, GA 2-oxidase (Class III); 3ox, GA 3-oxidase; 13ox, GA 13-oxidase; 20ox, GA 20-oxidase; GGDP= géranylgéranyl diphosphate; ent-CDP= ent-copalyl diphosphate; CPS = ent-copalyl diphosphate synthase; KS = ent-kaurene synthase; KO= ent-kaurene oxidase; KAO = ent-kaurenoic acid oxidase. (Yamaguchi et al., 2008).

Les GAs, un double rétro-contrôle négatif

Les gibbérellines régulent leur propre homéostasie via la répression de l'expression des gènes de biosynthèse des GAs et des gènes codant les récepteurs des GAs (Griffiths et al., 2006).

I.B.2.b Transport de l'acide gibbérellique

Plusieurs éléments démontrent une capacité des GAs à se déplacer dans la plante aussi bien à longue distance (racine/tige) que de façon plus locale (entre tissus).

L'utilisation de molécules radio-marquées chez le pois a permis de montrer que les GAs se déplacent de façon non polaire (Kato, 1958 ; Clor, 1967). De plus il a été montré chez le pois et chez le maïs que le signal GA est transmissible par greffe (Proesting et al., 1992 ; Katsumi et al., 1983). Les GAs sont donc des hormones mobiles dont le transport ne semble pas être polarisé.

Cependant, des études menées sur des racines d'*Arabidopsis* montrent une accumulation de GAs dans les cellules de l'endoderme, au niveau de la zone d'élongation (Shani et al., 2013). L'accumulation de GAs dans une zone cellulaire bien spécifique peut laisser penser qu'il existe un transport actif et polarisé de cette hormone.

Très récemment des études couplant des approches biochimiques et des greffes chez *Arabidopsis*, montrent que le précurseur des GAs, GA₁₂ (inactif), se déplace via les tissus vasculaires sur de longues distances dans la plante (Regnault et al., 2015).

Malgré plusieurs éléments montrant un transport et/ou une accumulation des GAs dans certains tissus chez différentes espèces, à ce jour les mécanismes de transport des GAs ne sont pas encore élucidés.

I.B.2.c Signalisation de l'acide gibbérellique

En ce qui concerne la voie de signalisation des GAs, le récepteur GID1 (GA-insensitive dwarf rice 1), fait partie de la famille des α/β hydrolase, et semble avoir perdue sa fonction enzymatique. Il a été découvert suite à l'étude d'un mutant de riz nain et insensible aux GAs (Ueguchi-Tanaka et al., 2005). Le récepteur GID1 agit en module avec les protéines DELLAs,

de la famille des facteurs GRAS qui sont des répresseurs de la réponse aux GAs. La liaison d'une molécule de GA au récepteur GID1 entraîne un changement de conformation du récepteur qui peut alors recruter une protéine DELLA. C'est par l'intermédiaire d'un motif TVHYNP présent dans les protéines DELLAs, que GID1 se lie à ces protéines. Il y a alors formation d'un complexe GA/GID1/DELLA qui permet la reconnaissance des protéines DELLAs par le complexe SCF^{Sly1} (Figure n°1.11), où SLY1 est une protéine à boîte F. Les protéines DELLAs sont alors ubiquitinées et adressées au protéasome 26S où elles sont dégradées (Sasaki et al., 2003; Gomi et al., 2004). Ainsi, les protéines DELLAs s'accumulent en absence de GAs, et sont dégradées en présence de GAs.

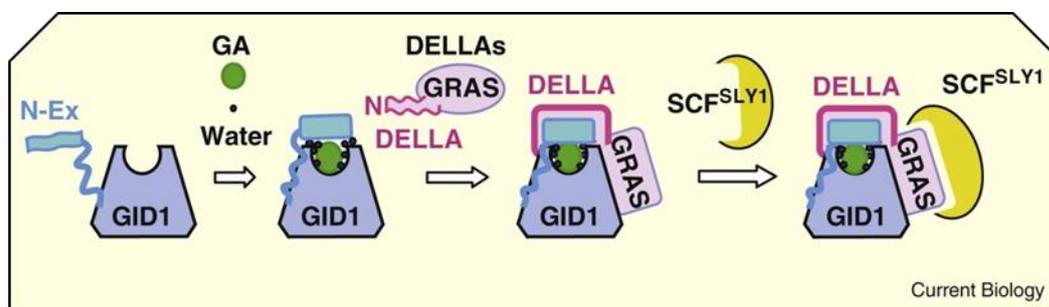


Figure n°1.11 : Signalisation des gibbérellines.

La liaison du récepteur GID1 avec une molécule de GA induit un changement conformationnel permettant le recrutement d'une protéine DELLA. La formation du complexe GID1/DELLA va déclencher la liaison entre le domaine GRAS de la protéine DELLA et un complexe SCF^{Sly1}, la protéine DELLA est alors ubiquitinée puis adressée au protéasome où elle est dégradée. (Sun, 2011).

On dénombre cinq protéines DELLAs chez *Arabidopsis* (dont REPRESSOR OF GA1-3, RGA) et seulement 2 chez le pois (LA et CRY-S). Il existe une lignée de pois chez laquelle les deux protéines DELLA sont inactives, le double mutant *la cry-s* (HL178). Ce mutant possède une taille plus grande que le type sauvage, les deux protéines étant mutées elles ne peuvent plus exercer leur rôle de répresseur sur leurs cibles habituelles. Ce mutant se comporte comme si les GAs étaient constitutivement actives (Weston et al., 2008).

En plus de leur dégradation via le protéasome en réponse aux GAs, d'autres mécanismes influencent l'activité ou la stabilité des protéines DELLAs.

Par exemple chez le riz le mutant *el1* (*early flowering1*), est hyper-sensible aux gibbérellines. Le gène *EL1* code une protéine kinase responsable de la phosphorylation de la protéine

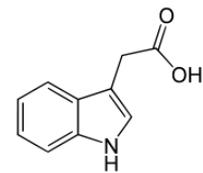
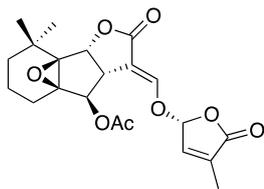
DELLA SLR1 (SLENDER RICE 1, protéine DELLA chez le riz), qui devient plus stable, et la réponse aux GAs est inhibée (Dai & Xue, 2010).

La réponse au stress peut induire une SUMOylation des protéines DELLAs, formant un complexe DELLA-SUMO (Small ubiquitin-like modifier) qui peut alors se lier au récepteur GID1 indépendamment des GAs. La séquestration du récepteur GID1 empêche la dégradation des protéines DELLAs ce qui provoque une accumulation de DELLAs, et inhibe la croissance indépendamment des GAs en cas de stress (Conti et al., 2014).

Plusieurs études récentes laissent suggérer que les protéines DELLAs sont des intégrateurs de plusieurs voies hormonales (Davière et Achard, 2015). Par exemple, en réponse à un stress biotique de type attaque d'herbivores, l'acide jasmonique va favoriser les défenses de la plante au dépend de la croissance de celle-ci en interférant avec les DELLAs. Les DELLAs interagissent aussi avec la voie de signalisation des SLs (Partie III.B.3.b).

INDRODUCTION

Partie n°II : Les strigolactones, une hormone aux multiples rôles chez les plantes



Partie n°II : Les strigolactones, une hormone aux multiples rôles chez les plantes

La mise en place de la ramification chez les plantes est un processus contrôlé à la fois par des facteurs génétiques et environnementaux.

Parmi les hormones impliquées dans la mise en place de l'architecture aérienne de la plante, dans le cadre de cette thèse je me suis intéressée plus particulièrement au rôle des strigolactones, hormone inhibant le développement des branches chez les plantes.

II.A. La ramification chez les plantes : de la théorie de la dominance apicale à la découverte du rôle des strigolactones

La croissance post-embryonnaire chez les plantes vasculaires se passe dans des régions spécialisées appelées méristèmes. La production de la partie apicale de la plante dérive du méristème apical caulinaire (MAC) qui est localisé à l'apex de la plante. Le MAC va produire des unités de bases répétitives, les phytomères constitués d'un entre-nœud, un nœud et une ou plusieurs feuilles qui vont se répéter le long de l'axe primaire. A l'aisselle des feuilles, sont initiés les méristèmes axillaires (MA), qui se développeront en bourgeons, puis (éventuellement) en branches permettant ainsi la complexification morphologique de la plante. L'architecture d'une plante mature résulte donc en grande partie du nombre et de l'activité des méristèmes axillaires.

Les organes produits à partir du MAC sont indéterminés ; le nombre, la forme et le rythme de production ne sont pas prédictibles. Les processus développementaux sont régulés conjointement par des facteurs génétiques et environnementaux qui permettent en théorie une multitude d'architectures possibles. Les plantes ont cette capacité de plasticité dans leur développement, elles adaptent leur morphologie aux conditions environnementales, ce qui les distingue des animaux (métazoaires).

Un des traits majeurs d'adaptation de l'architecture des plantes est la ramification.

Le processus de ramification peut se définir comme l'acquisition de nouvelles branches à l'aisselle des feuilles. Le degré de ramification d'une plante va alors découler de deux facteurs, d'une part la présence d'un méristème axillaire et d'autre part le contrôle de la levée de dormance des bourgeons axillaires.

II.A.1 Processus de ramification chez les plantes

II.A.1.a Diversité d'architectures chez les plantes vasculaires

L'architecture aérienne que l'on peut observer chez une plante vasculaire est très variable (figure n°I.12). Elle va dépendre d'un certain nombre de paramètres, nombre de nœuds, distance entre les nœuds, de l'activité du méristème axillaire (MA) ou encore des relations entre les différents méristèmes aériens. Ainsi au cours du développement le statut d'un MA change, il se développe en bourgeon qui ensuite reste dormant ou devient actif pour former une branche.

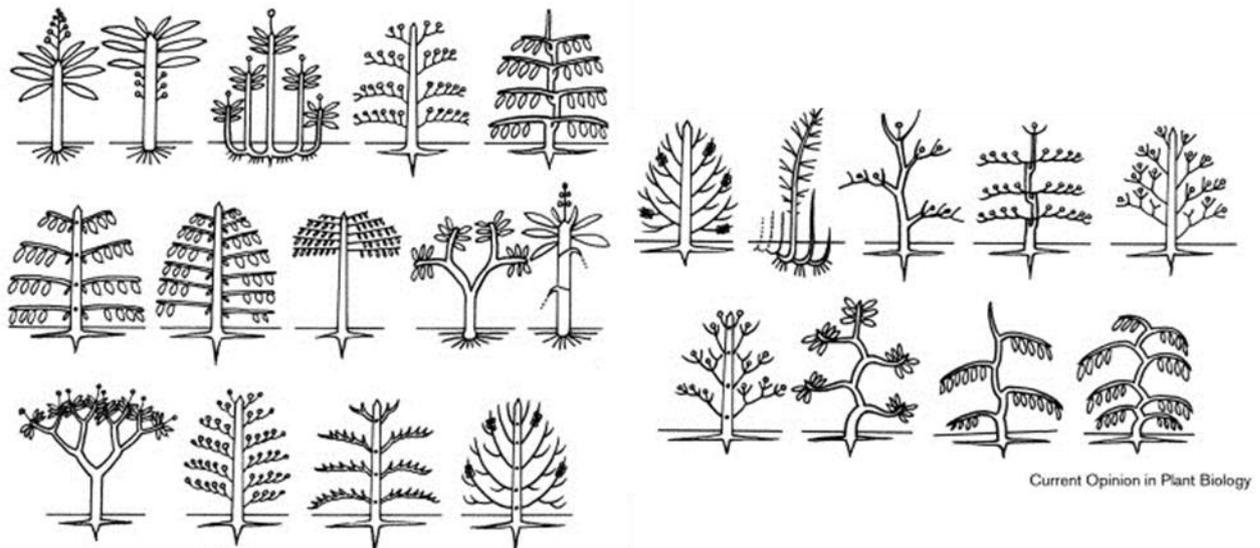


Figure n°I.12 :Modèles décrivant les différents types d'architectures chez les plantes vasculaires. (Sussex & Kerk., 2001)

Dans cette thèse l'étude de la ramification a été menée chez deux dicotylédones qui présentent des architectures différentes : *Pisum sativum* (pois) et *Arabidopsis thaliana*.

Le pois présente une organisation plutôt simple et une croissance indéterminée monopodiale (figure n°I.13). Le méristème apical caulinaire établit l'axe de croissance avec la tige qui s'étend en hauteur en formant des unités identiques (phytomères), constituées d'un nœud, d'un entre-nœud, de feuilles et d'un bourgeon à l'aisselle des feuilles. Chez le pois de type sauvage, les premiers entre-nœuds sont courts et les 2 premiers nœuds portent des stipules très peu développés qui sont sous forme d'écailles. Les bourgeons sont

dormants pendant la phase végétative à l'exception des bourgeons aux nœuds 1 et 2 qui peuvent se développer dans certains génotypes, notamment les lignées déficientes en GAs (*le1*). On observe une levée de la dormance des bourgeons aux nœuds situés sous le premier nœud floral au moment de la transition florale. C'est pourquoi nos expériences sur le pois se déroulent pendant la phase végétative pour ne pas interférer avec l'effet de l'initiation florale sur la ramification.

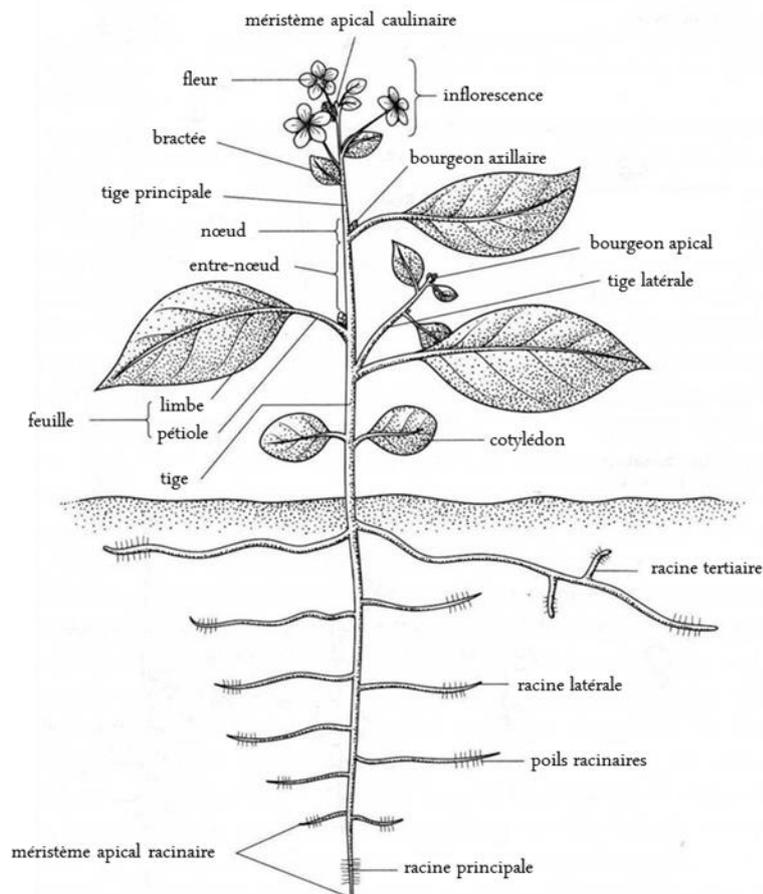


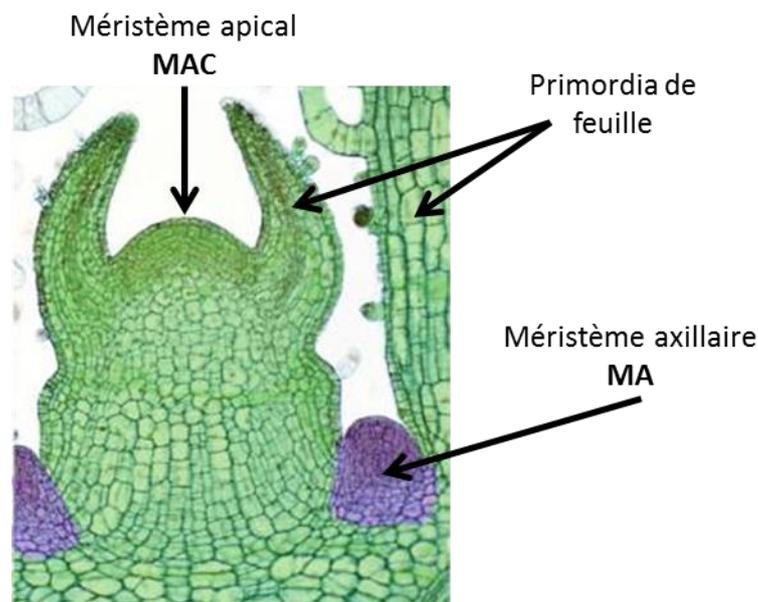
Figure n°1.13: Architecture d'une plante à croissance indéterminée monopodiale organisée selon l'axe de la tige. (Adapté d'après Leyser & Day., 2002)

Arabidopsis se développe avec des pulses de croissance, il y a d'abord formation d'une rosette constituée de feuilles, organisées selon un pattern de développement en spirale suivant un angle de 137.5° (nombre d'or) (Steeves & Sussex 1989). Puis la hampe florale se développe, organisée sous forme de phytomères composés d'un entre-nœud, d'un nœud avec une feuille dite caulinaire et d'un bourgeon. Il existe deux sortes de ramifications chez *Arabidopsis*, les branches issues de la rosette et celles qui se développent sur la hampe

florale. Chez le type sauvage Columbia (Col), les branches sont produites après la transition florale ce qui ne permet pas de distinguer l'effet de l'initiation florale des autres facteurs sur la ramification.

II.A.1.b Initiation du méristème axillaire

Les méristèmes axillaires (MA) sont formés au centre de la zone frontière qui sépare le méristème apical caulinaire (MAC) de la face adaxiale de la jeune feuille (figure n°1.14). L'initiation et le développement des méristèmes axillaires sont modulés par différents facteurs génétiques qui comme on le verra plus loin ne se « recouvrent » pas. Cependant l'origine ontogénétique de ces méristèmes reste en débat, et deux théories sont proposées (Sussex & Kerk., 2001).



Coleus shoot image by Judy Jernstedt, [BSA](#)

Figure n°1.14 : Image de microscopie, méristème apical de coléus
(Photo : Judy Jernstedt, BSA)

- La théorie de formation *de novo* du méristème : chez quelques espèces dont *Arabidopsis*, le méristème axillaire est formé après la formation des *primordia* foliaires, par un pool de cellules différenciées à l'aisselle de feuilles qui subissent une dédifférenciation et retrouvent un potentiel méristématique permettant la formation d'un bourgeon. C'est pourquoi lors

d'analyse de tissus on ne peut détecter de MA qu'après l'initiation des feuilles à l'état embryonnaire.

- La théorie de la « préformation » : chez la plupart des plantes, dont le pois, les cellules du méristème axillaire sont directement dérivées du méristème apical (Teichman & Muhr 2015).

II.A.1.c Contrôle génétique de l'initiation du méristème axillaire

L'étude de mutants présentant des défauts de formation des MA, chez différentes espèces modèles dont la tomate et *Arabidopsis*, a permis de mettre en évidence plusieurs gènes impliqués dans le processus d'initiation des MA. Cependant le modèle actuel ne permet pas d'établir si les régulateurs de la formation des MA sont conservés entre les différentes espèces (Teichman & Muhr 2015).

Un facteur de transcription (FT) de la famille GRAS, dont la mutation induit une absence de formation de méristème axillaire a été identifié, et semble conservé entre plusieurs espèces : LAS (LATERAL SUPPRESSOR) chez *Arabidopsis* (Greb et al., 2003) ; Ls chez la tomate (Schumacher et al., 1999) ; MOC1 (MONOCULM1) chez le riz (Li et al., 2003). Ce gène semble impliqué dans la détermination spatiale de la zone de formation du MA, puisqu'il est spécifiquement exprimé au niveau de la frontière du primordium foliaire, zone du futur MA.

Un autre FT intervient dans l'initiation du MA et semble avoir un rôle redondant avec ceux de la famille des LAS/Ls/MOC, il s'agit d'un facteur de type MYB : RAX (REGULATOR OF AXILLARY MERISTEMS) chez *Arabidopsis* (Keller et al., 2006) ; BL (BLIND) chez la tomate (Schmitz et al., 2002) ; C (POTATO LEAF) chez la pomme de terre (Busch et al., 2011). Ce FT intervient à la fois dans l'établissement du MA et dans le développement des marges foliaires.

II.A.1.d La formation d'une branche résulte d'une levée de dormance et non d'une croissance continue du bourgeon

Chez de nombreuses espèces, une fois initiés, les MA continuent leur développement en formant des bourgeons puis ces bourgeons arrêtent leur croissance et restent à l'état de bourgeons dormants. Leur développement en branche va dépendre du programme de développement de la plante et de facteurs environnementaux (Shimizu-Sato & Mori, 2001 ; Rameau et al., 2015).

Le passage de l'état dormant à l'état en développement des bourgeons axillaires a notamment été caractérisé chez le pois. Le deuxième nœud du pois comprend quatre bourgeons axillaires de tailles différentes, le plus développé est appelé le bourgeon principal. Après décapitation de la tige principale, les quatre bourgeons commencent à se développer, mais après 2 ou 3 jours on observe une dominance de la croissance du bourgeon principal.

II.A.2 Rôle des hormones dans le processus de ramification

II.A.2.a Théorie de la dominance apicale : rôle de l'auxine et des cytokinines dans le processus de ramification

Plusieurs hormones sont régulatrices du développement de la plante, et jusqu'en 2008, deux d'entre elles étaient connues pour jouer un rôle majeur dans le processus de ramification, mécanisme décrit dans la théorie de la dominance apicale : l'auxine et les cytokinines (figure n°1.15).

Cette théorie a été postulée suite à l'observation suivante : lorsqu'on décapite une tige, on observe une levée de dormance des bourgeons axillaires (Thimann & Skoog., 1933). Cette sortie de dormance des bourgeons est due à la suppression de l'apex qui entraîne une diminution du niveau d'auxine dans la plante. L'application exogène d'auxine suite à la décapitation permet de restaurer le phénotype non ramifié. L'auxine, première hormone découverte chez les plantes, agit donc comme un inhibiteur du développement des branches.

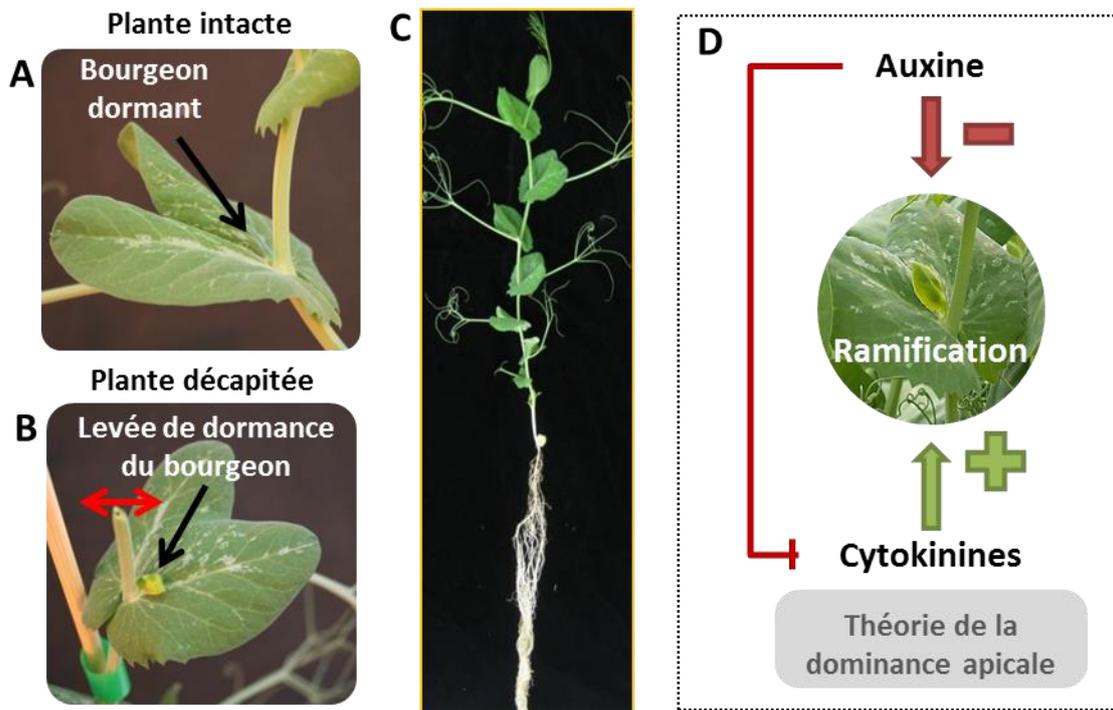


Figure n°1.15: Théorie de la dominance Apicale

[A] Bourgeon dormant de plante sauvage intacte . [B] Plante de type sauvage décapitée, début de croissance du bourgeon. [C] Pois sauvage, plante entière.

[D] Schéma illustrant la théorie de la dominance apicale. (Sachs and Thimann., 1967)

A l'inverse de l'auxine, les cytokinines, hormones produites dans les racines et transportées dans la tige via la sève xylémienne, stimulent la ramification. On peut induire la levée de dormance d'un bourgeon en lui appliquant directement des cytokinines (Cline., 1991). Il existe un niveau supplémentaire de régulation de ce modèle puisqu'il a été montré que la synthèse de cytokinines est directement affectée par l'auxine (Nordstrom et al., 2004), et que l'auxine induit l'expression d'une cytokinine oxydase (PsCKX2) qui inactive les cytokinines et diminuent ainsi le pool de cytokinines actives (Shimizu-Sato et al., 2009). L'auxine joue donc à la fois sur la diminution de la biosynthèse et l'augmentation de la dégradation des cytokinines. Ceci est en accord avec l'observation d'une augmentation du niveau des cytokinines dans le bourgeon axillaire après décapitation (Turnbull et al., 1997).

Cependant, des expériences de décapitation sur des tiges cotylédonaire de haricot avaient suggéré l'existence d'un autre signal provenant des racines et inhibant la ramification (Snow., 1937). Snow observait le développement de deux tiges cotylédonaire sur une plante dont la tige principale avait été décapitée. Lorsqu'il décapitait les deux tiges cotylédonaire, il observait une levée de dormance sur chaque tige cotylédonaire. En décapitant une seule des tiges cotylédonaire, il y avait inhibition du développement des bourgeons axillaires sur les deux tiges (Figure n°1.16). Cette expérience suggérait donc l'existence d'un signal contrôlé par la tige intacte qui inhibait la ramification dans la tige décapitée. L'auxine ayant un transport basipète, cet autre signal devait provenir des racines. Cette expérience proposait donc déjà l'idée d'un second messenger de l'auxine, transporté des racines vers les tiges.

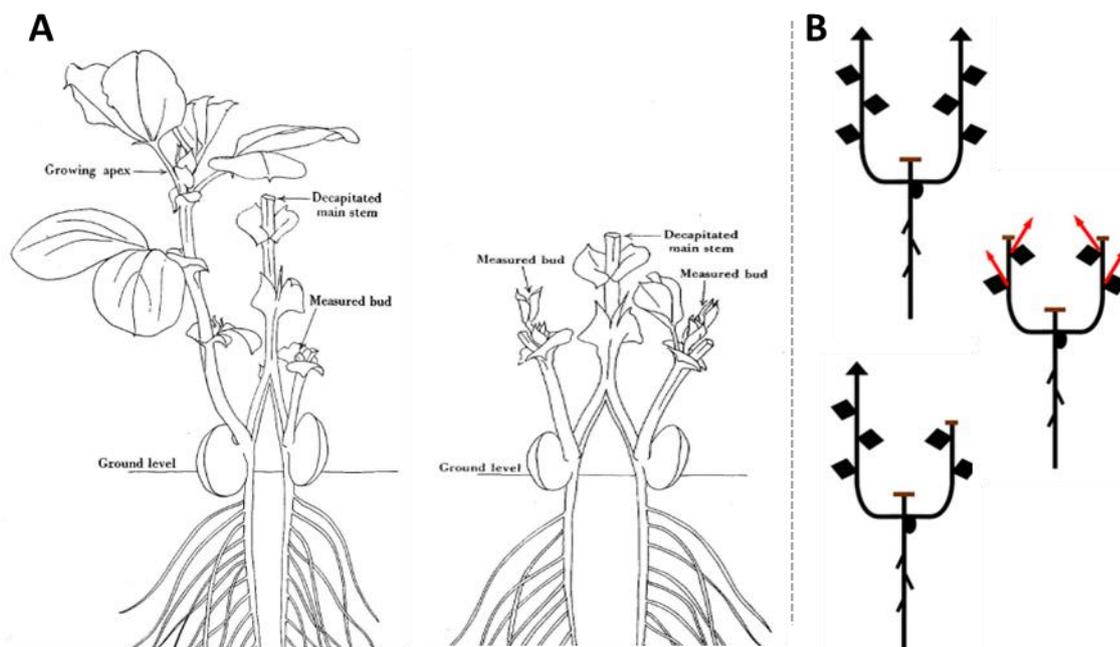


Figure n°1.16: Expériences de Snow.

[A] Dessin représentant une expérience de décapitation réalisée sur le haricot par Snow en 1937: Lorsque la tige principale est décapitée à la base, on observe la croissance des ramifications cotylédonaire.

Une fois la croissance des ramifications cotylédonaire amorcée, la décapitation d'une des ramifications cotylédonaire n'entraîne pas le démarrage des bourgeons axillaires. L'apex restant maintient la dominance apicale sur les deux ramifications cotylédonaire.

Si les deux ramifications cotylédonaire sont décapitées, il n'y a plus de dominance apicale car plus d'apex présent, on observe alors une levée de dormance des bourgeons axillaires sur chacune des ramifications cotylédonaire. (Snow, 1937)

[B] Schéma reprenant l'expérience de Snow. (Beveridge et al., 2009).

II.A.2.b Rôle du sucre dans la dominance apicale

Le rôle de l'auxine dans la dominance apicale a récemment été remis en question. En effet, des études réalisées chez le pois sur l'implication du sucre dans la régulation de la dominance apicale, suggèrent que celui-ci est le premier signal initiant la sortie de dormance du bourgeon (Mason et al., 2014). La plante de pois possède des entre-nœuds très longs ce qui permet de suivre la dynamique de la diminution d'IAA après décapitation. Il a ainsi été montré qu'après décapitation, la baisse du niveau d'IAA dans la tige intervient trop tard pour expliquer le démarrage des bourgeons axillaires situés à une certaine distance de l'apex (Morris et al., 2005). De plus même en appliquant de l'IAA sur l'apex décapité, on observe les premiers stades du démarrage du bourgeon axillaire. Cette étude suggérait qu'un signal indépendant de l'auxine intervenait et que l'auxine intervenait plutôt pour réguler les stades ultérieurs de la croissance du bourgeon axillaire (Morris et al., 2005).

Après décapitation, le sucrose s'accumule rapidement dans les bourgeons, une différence significative de sa concentration est observée 4 h après la décapitation de la plante (Mason et al., 2014). Le transport polarisé de l'auxine est beaucoup plus lent, chez le pois l'IAA se déplace environ à 1 cm^h. Ainsi dans la tige adjacente à un bourgeon axillaire, situé à 20 cm de l'apex, on observe une diminution du niveau d'IAA seulement 24 h après décapitation de la plante, alors que le bourgeon a déjà entamé sa sortie de dormance (Morris et al., 2005 ; Mason et al., 2014). De plus l'application exogène de sucrose entraîne une levée de dormance du bourgeon sur plante intacte et réprime l'expression du gène *PsBRC1*, codant pour un facteur de transcription responsable de l'inhibition de la ramification (Voir Partie n°III.C.2.a).

Les auteurs proposent donc un nouveau paradigme quant à la théorie de la dominance apicale (Mason et al., 2014):

- La demande en sucre de l'apex de la plante est un acteur majeur dans le maintien de la dominance apicale. Après décapitation, le sucre, signal rapide serait le premier facteur permettant la levée de dormance du bourgeon. L'auxine dont le transport est plus lent, interviendrait après dans la croissance du bourgeon, préalablement initiée par le sucre, notamment en régulant la synthèse de strigolactones et des cytokinines.

II.A.3 Découverte de l'implication des strigolactones comme inhibiteurs de la ramification

II.A.3.a Etudes des mutants hyper-ramifiés

C'est l'étude de mutants hyper-ramifiés chez plusieurs espèces (figure n°1.17) qui a conduit à l'identification de ce signal inhibiteur.

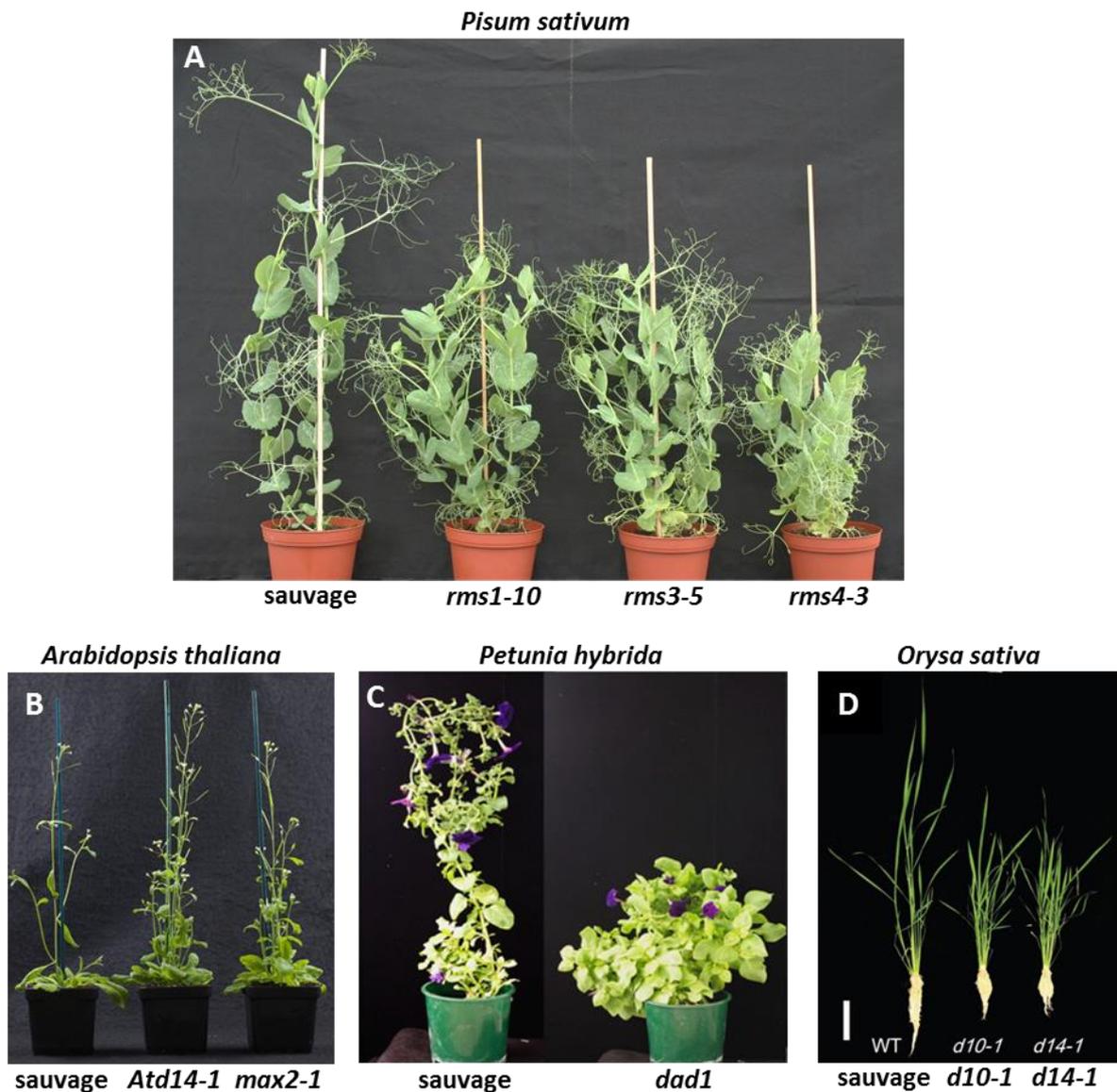


Figure n°1.17 : Photos de mutants hyper-ramifiés.

[A] mutants *ramosus* (*rms*) hyper-ramifiés de pois [B] mutants *max* (*More Axillary Growth*)

(Water et al., 2012) [C] mutants *dad* (*Decreased Apical Dominance*) (Simons et al., 2007)

[D] mutants *d* (*Dwarf*) (Arite et al., 2012).

Chez le pois, cinq mutants appelés *ramosus* (*rms1- rms5*) présentent un phénotype hyper-ramifié. Chez les mutants *rms1*, *rms2* et *rms5*, le développement des bourgeons axillaires est inhibé lorsqu'ils sont greffés sur un système racinaire de type sauvage (figure n°1.18) (Beveridge et al 1997a ; Morris et al., 2001). Ces expériences montrent l'existence d'un signal provenant des racines capable d'inhiber la ramification. Les mutants *rms1*, *rms2* et *rms5* peuvent être caractérisés comme des mutants impliqués dans la synthèse ou le transport de ce signal. Le greffon sauvage sur un porte greffe mutant *rms1* ou *rms4* conserve un phénotype sauvage, suggérant que le signal peut aussi être émis par la tige et suffire pour en inhiber les ramifications. Une autre expérience de greffe montre qu'il suffit d'introduire une courte portion d'épicotyle de type sauvage entre un greffon *rms1* et un porte-greffe *rms1* pour inhiber la ramification chez le mutant *rms1*, suggérant que le signal agit sûrement à de très faibles concentrations (Foo et al., 2001). En revanche les mutants *rms3* et *rms4* conservent un phénotype ramifié lorsqu'ils sont greffés sur un porte greffe de type sauvage (Beveridge et al., 1996), et peuvent être considérés comme des mutants de réponse au signal inhibiteur.

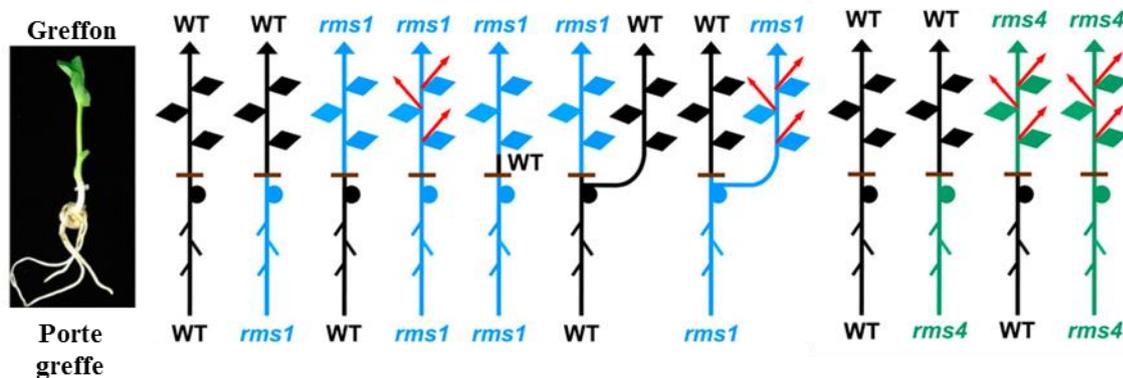


Figure n°1.18: Expériences de greffes sur les mutants *ramosus* de pois.

Les schémas représentent des expériences de greffes de la tige (= greffon) sur le système racinaire (= porte greffe) d'une autre plante. En noir le sauvage, en bleu le mutant *rms1* et en vert le mutant *rms4*. Les flèches rouges indiquent la présence de ramifications latérales. (Beveridge et al., 2009)

Parmi les mutants hyper-ramifiés de pois, le mutant *rms2* présente des teneurs élevées à la fois en auxine dans la tige et en cytokines dans la sève xylémienne (X-CKs) (Beveridge et al., 1997a). Une hypothèse alternative à celle d'un rôle dans la biosynthèse ou le transport du signal est posée pour *RMS2* : celui-ci serait impliqué dans un rétro-contrôle,

régulant la teneur en cytokinines dans la sève xylémienne et en signal inhibiteur régulé par *RMS1* (Beveridge., 2000). L'identification de ce signal de rétro-contrôle constitue l'un des axes de cette thèse, les détails concernant le signal *RMS2-dépendant* seront développés dans l'introduction du chapitre n°3, ainsi que dans l'introduction d'un article en préparation (Chapitre n°3.Partie n°I & Partie n°II).

Plusieurs expériences ont ensuite permis de caractériser le signal inhibiteur de la ramification :

- Ce signal diffère de l'auxine et des cytokinines, puisque les mutants *rms1* et *rms5* ne sont pas affectés dans le transport ou le niveau d'auxine et le niveau de cytokinines dans la sève xylémienne n'est pas élevé (Beveridge et al 1997a ; Morris et al., 2001).
- Le signal inhibiteur est acropète, il se déplace uniquement des racines vers la tige (Foo et al., 2001).
- La production du signal inhibiteur nécessite la présence à la fois de *RMS1* et *RMS5* dans une même cellule ou tissu (Morris et al., 2001).
- Ce signal baptisé SMS « Shoot Multiplication Signal » (Beveridge., 2006), semble conservé entre différentes espèces. Des similarités sont trouvées entre les mutants *rms* de pois, *max* (*MORE AXILLARY GROWTH*) d'*Arabidopsis*, *dad* (*DECREASED APICAL DOMINANCE*) de pétunia et *d* (*DWARF*) de riz (voir tableau récapitulatif des gènes impliqués dans la voie strigolactone, Figure n°I.30).
- Deux des gènes impliqués dans la voie de synthèse du signal inhibiteur, *RMS1/MAX4/D10/DAD1* et *RMS5/MAX3/D17/DAD3*, codent des enzymes capables de cliver des caroténoïdes, respectivement (CCD8 et CCD7, pour CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE) (Sorefan et al., 2003 ; Booker et al., 2004) suggérant que le signal SMS est un dérivé de caroténoïdes.

II.A.3.b Identification du signal d'inhibition de la ramification

C'est ce dernier élément, l'appartenance des gènes de synthèse du signal à la famille des CCD qui a mis sur la piste des strigolactones. En effet ces molécules sont connues depuis longtemps pour leur rôle dans la rhizosphère (Partie n°II.B.4). Les strigolactones sont des molécules synthétisées par les plantes majoritairement dans les racines (Koltai, 2011). En

2005, Matusova et al., montrent que les strigolactones sont des dérivés de caroténoïdes, cette classe de molécules devient alors le principal candidat comme signal inhibiteur de la ramification (Figure n°1.19).

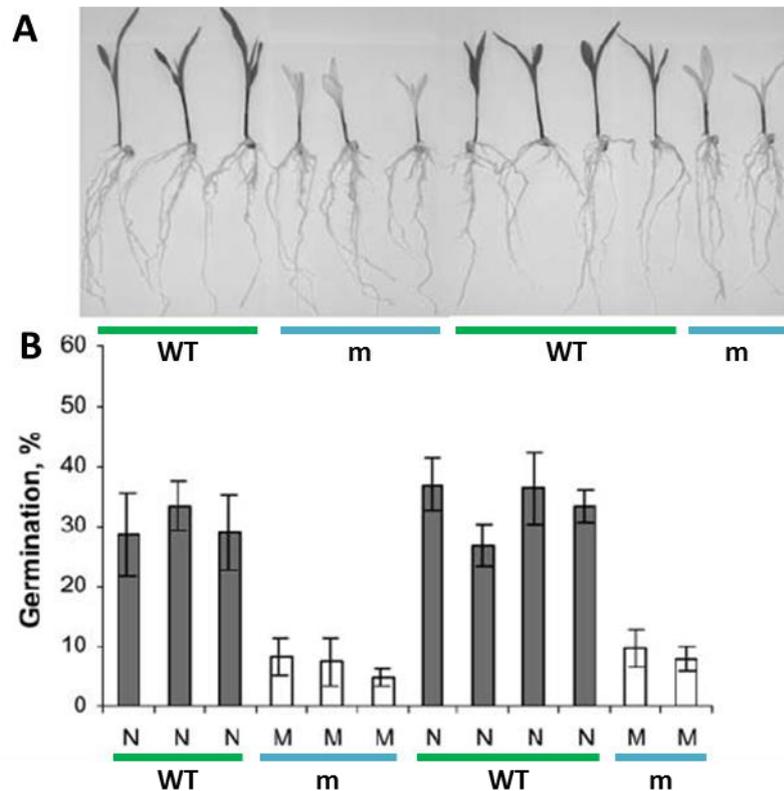


Figure n°1.19: Extrait de l'étude ayant permis de démontrer que les strigolactones sont des dérivés de caroténoïdes.

[A] Phénotype du mutant *y10* déficient en caroténoïdes (blanc, m) et du sauvage (gris). [B] Pourcentage de germination des graines de *Striga hermonthica* induit par les exsudats racinaires des plantules.

Les exsudats racinaires de plantes sauvages (WT) induisent la germination des graines de plantes parasites de type *Striga*, contrairement aux exsudats racinaires du mutant *y10*. Celui-ci est déficient en caroténoïdes, cela suggère que la substance présente dans les exsudats racinaires du WT et capable de faire germer les graines parasites, est une molécule dérivée des caroténoïdes (Adapté de Matusova et al., 2005)

Simultanément, deux études menées sur les mutants hyper-ramifiés de pois (*rms1* et *rms5*) (Gomez-Roldan et al., 2008) et de riz (*d10* et *d17*) (Umehara et al., 2008) montrent que ces mutants sont déficients en strigolactones, et qu'une application de strigolactone synthétique (GR24) est capable d'inhiber la ramification, chez les mutants de synthèse et pas chez les mutants de réponse (Figure n°1.20).

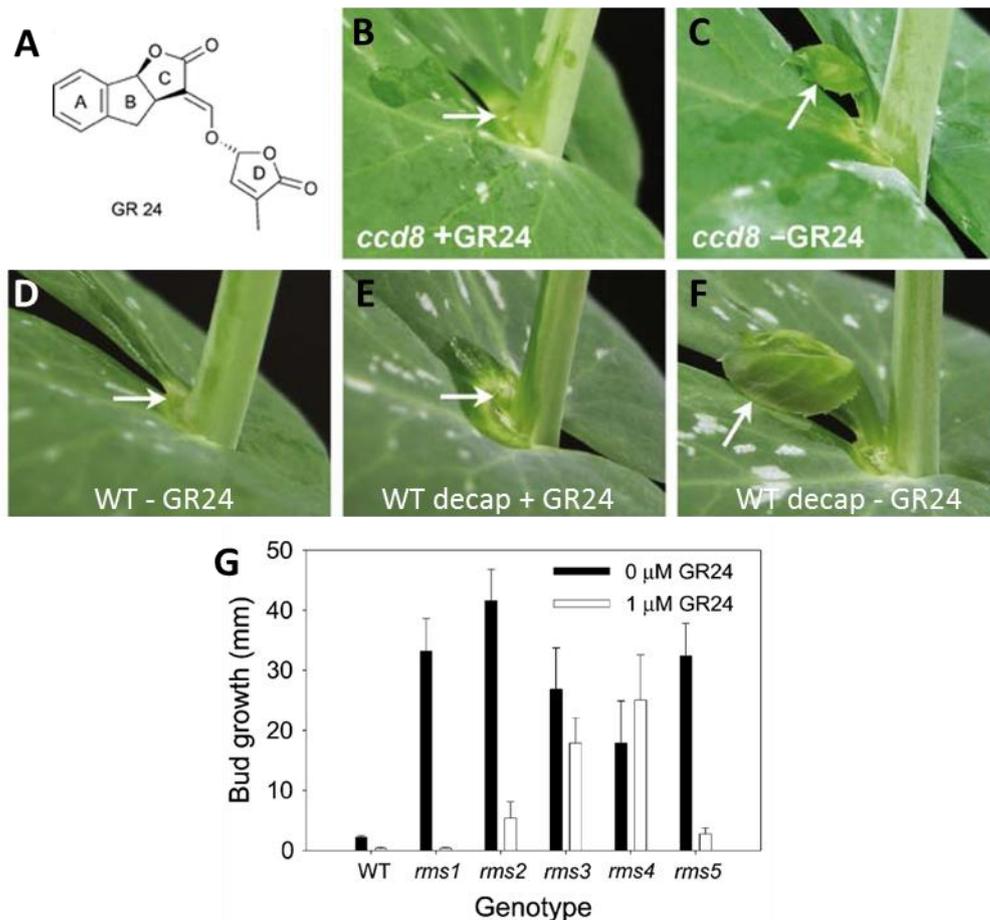


Figure n°1.20: Effet du GR24 sur le contrôle de la ramification chez le pois.

[A] Structure de la strigolactone synthétique GR24. **[B à F]** Les bourgeons au nœud 5 de plantes intacts ou décapitées sont traités avec une 5 μ L d'une solution avec du GR24 0 ou 1 μ M en application directe, les photos sont prises 5 jours après le traitement. **[B & C]** mutant *rms1* (*ccd8*) déficient en SLs, l'application de GR24 empêche la levée de dormance du bourgeon. **[E & F]** L'application de GR24 après décapitation inhibe la levée de dormance du bourgeon. **[G]** L'application de GR24 inhibe le développement du bourgeons chez les mutants de synthèse *rms1* et *rms5* ainsi que chez *rms2* mais pas chez les mutants de réponse *rms4* et *rms5*. (Dun et al., 2009)

Il sera ensuite démontré que les SLs inhibent la levée de dormance après décapitation, et sont capables d'inhiber la ramification chez les mutants de réponse à l'auxine (*axr1* et *tir1afb1afb2afb3*) de pois (Brewer et al., 2009). Le messager secondaire de l'auxine est alors identifié, il s'agit d'une classe de molécules, les SLs.

Si on définit une hormone comme une molécule synthétisée par la plante qui influence des processus développementaux ou de réponse au stress et qui agit à une très faible concentration (Davies, 2004 ; Partie n°I.A.1), alors les strigolactones qui sont des

molécules de faible poids moléculaire, synthétisées par les plantes, mobiles et agissant à de faibles concentrations sur le développement de la plante, constituent une nouvelle classe d'hormone végétale.

II.A.4 Les strigolactones, hormones aux effets multiples sur la plante

Depuis 2008 et la découverte du rôle des strigolactones dans le processus de ramification, les recherches sur les SLs se sont intensifiées, de nombreux groupes de recherche travaillant sur différentes espèces tentent de mieux comprendre les rôles et les mécanismes mis en jeu par le signal SL. Ainsi, l'implication des strigolactones a été démontrée pour de nombreux processus (Lopez-Obando et al., - accepté).

II.A.4.a Strigolactones et développement des parties aériennes

En plus de leur rôle comme répresseur de la ramification, les strigolactones sont impliquées dans d'autres processus aux niveaux des parties aériennes de la plante. Les strigolactones ont un rôle positif dans la croissance secondaire de la tige. En effet les mutants *max* présentent une diminution de la taille du cambium, et l'activité cambiale est stimulée par l'application de GR24 (Agusti et al., 2011).

Le mutant *max2*, mutant de réponse au SLs, présente un retard de sénescence des feuilles de la rosette chez *Arabidopsis* (Woo et al., 2001). La régulation positive des SLs sur la sénescence foliaire a été montrée chez plusieurs autres espèces dont le pétunia (Snowden et al., 2005) et le riz où l'effet des SLs sur la sénescence semble aussi être dépendant de la teneur en phosphate disponible (Yamada et al., 2014).

Les strigolactones sont aussi impliquées dans les mécanismes qui contrôlent la forme des feuilles avec un rôle positif sur la serration des feuilles, observé chez certains génotypes de *Medicago truncatula* (R108) (Laurelsergues et al., 2014) (figure n°I.21).

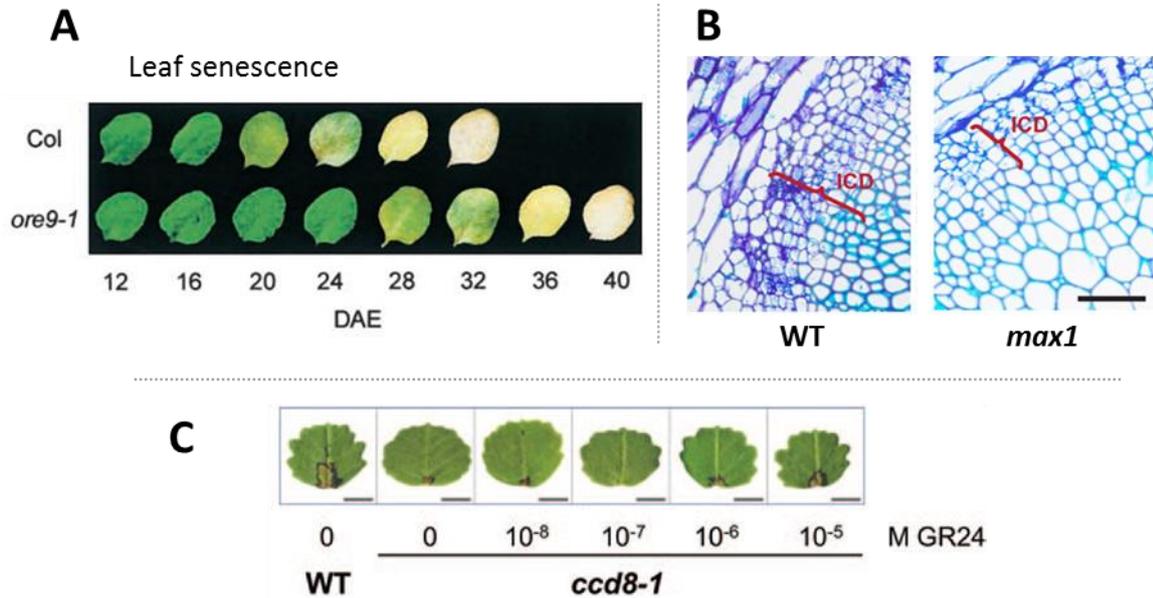


Figure n°1.21: Rôle des strigolactones dans le développement des parties aériennes.
[A] Le mutant *ore9-1* muté sur le gène *MAX2* (*RMS4*) (mutant de réponse aux SLs), montre des défauts de sénescence. (Woo et al., 2001). **[B]** Le mutant *max1* (biosynthèse des SLs) présente une diminution de la zone cambiale, les SLs stimulent l'activité cambiale (Agusti et al., 2001). **[C]** Chez *Medicago* on observe une diminution du nombre de serrations au niveau des feuilles du mutant *ccd8* qui peut être restauré par l'application de GR24 (Laurelsergues et al., 2014).

II.A.4.b Strigolactones et système racinaire

En tant qu'hormones, les SLs jouent également un rôle dans le développement et l'architecture du système racinaire. Les mutants *max* d'*Arabidopsis* présentent une racine principale plus courte et une plus forte densité de racines latérales que le type sauvage (Kalpulnik et al., 2011 ; Ruyter-Spira et al., 2011). Les SLs stimulent la formation des poils racinaires chez *Arabidopsis* et inhibent le développement de racines adventives aussi bien chez *Arabidopsis* que chez le pois (Kalpulnik et al., 2011 ; Rasmussen et al., 2012) (figure n°1.22).

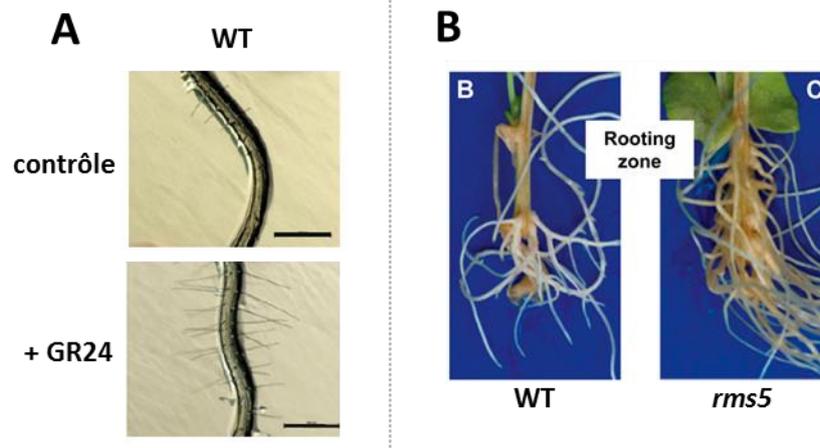


Figure n°1.22: Rôle des strigolactones dans le développement des parties racinaires.

[A] Les strigolactones stimulent la mise en place des poils racinaires. (Kapulnik et al., 2011). **[B]** Les strigolactones inhibent le développement des racines adventives (Rasmussen et al., 2012).

Cette régulation par les strigolactones semble dépendante des facteurs environnementaux comme la teneur en phosphate ou nitrate du sol/milieu de culture.

Le phosphate est un élément nutritif essentiel à la vie de la plante. Dans le sol il est majoritairement présent sous forme inorganique ce qui le rend inaccessible à l'assimilation par les plantes, c'est pourquoi il est souvent un des facteurs limitant de la croissance de la plante (Perret et al., 2011). Pour pallier ce manque d'accès au phosphate, les plantes mettent en place des symbioses avec des champignons endomycorhiziens à arbuscules du sol (Partie n°II.B.2; Smith & Smith., 2011).

Les plantes cultivées sur du milieu à faible teneur en phosphate présentent un meilleur taux de mycorhizations que celles cultivées avec des teneurs en phosphate standard (Nagahashi & Douds., 2004). De plus, il a été montré que la teneur en phosphate disponible dans le milieu influence fortement la teneur en strigolactones, et leur exsudation par la plante (Foo et al., 2012), via la régulation des gènes de biosynthèse des strigolactones (Breuillin et al., 2010 ; Sun et al., 2014) et de leur transport (Kretzschmar et al., 2012).

La plante répond aux différents facteurs de l'environnement via une signalisation hormonale permettant à la fois un changement de son architecture racinaire, et la mise en place de relations symbiotiques permettant une utilisation optimale des ressources.

II.A.4.c Strigolactones et nodulation, symbiose entre bactéries et légumineuses.

Le phénomène de nodulation résulte de la symbiose entre des plantes de la famille des légumineuses et des bactéries du sol de la famille rhizobia (genre *Rhizobium*). Les bactéries envahissent les racines des légumineuses, où elles forment des structures appelées nodules. Les nodules deviennent une zone d'échanges entre la bactérie qui fixe l'azote atmosphérique qui est transféré à la plante, et la plante qui lui fournit des carbohydrates (Markmann & Parniske., 2009). L'établissement de cette relation symbiotique entre les deux organismes nécessite la mise en place d'un dialogue chimique. Dans la rhizosphère les bactéries perçoivent des molécules de flavonoïdes sécrétées par la plante, et produisent à leur tour des facteurs Nod, perçus par la plante et permettant le déclenchement d'une cascade de signalisation qui conduit à la formation du nodule (Ferguson et al., 2010). Chez le pois, le mutant *rms1* (de biosynthèse des SLs) présente environ 40% de nodules en moins par rapport au sauvage. Des traitements au GR24 permettent d'augmenter le nombre de nodules à la fois chez le type sauvage et le mutant, attestant d'un rôle positif des strigolactones dans la mise en place de la nodulation chez le pois (Foo & Davies., 2011).

II.B. Les strigolactones agissent comme des signaux de reconnaissance entre différents organismes dans la rhizosphère

II.B.1 Les strigolactones stimulent la germination des graines de plantes parasites

II.B.1.a Cycle de vie des plantes parasites *Striga* et *Orobanche/Phelipanche*

Le parasitisme est un mode de vie concernant environ 1% des espèces d'angiospermes (Bouwmeester et al., 2007). Ces plantes dépendent soit partiellement (parasite facultatif) soit totalement (parasite obligatoire) d'une plante hôte pour l'accès à l'eau, aux minéraux ou encore au phosphate. En fonction du site d'attachement des plantes parasites on peut distinguer des parasites de la tige ou des racines.

Les plantes parasites peuvent aussi se caractériser par leur statut photosynthétique. En effet, on distingue les hémiparasites, qui possèdent des chloroplastes fonctionnels et sont capables d'effectuer la photosynthèse, des holoparasites, dépourvus de chlorophylle, donc incapables de produire une activité photosynthétique et totalement dépendants d'une plante hôte (Westwood et al 2010).

Les plantes parasites s'attachant aux racines de leur hôte passent une grande partie de leur cycle de vie sous terre ; une fois au contact de leur hôte, elles vont développer leurs tiges et fleurs à la surface. Les cycles de vie des parasites de racines, *Striga* (hémiparasite) et *Orobanche/Phelipanche* (holoparasites) partagent des similarités (Figure n°1.23). Toutes produisent un très grand nombre de graines (ne dépassant pas 300 µm) qui enfouies dans le sol restent viables jusqu'à 14 ans (Bebawi et al., 1984). Une fois germée, la radicule de la graine s'allonge puis au contact de la plante hôte développe un tissu spécifique, l'haustorium. Cet organe va s'accrocher à la racine et mettre en place une connexion, xylème-xylème chez *Striga* et à la fois avec le xylème et le phloème chez *Orobanche/Phelipanche*. Cette connexion permet l'acheminement d'eau et de nutriments de la plante hôte vers le parasite. Grâce à cet apport de nutriments la plante parasite va mettre en place son appareil végétatif aérien, produisant des fleurs puis des graines en très grand nombre. La diminution des ressources de la plante hôte affecte alors fortement sa croissance.

L'aspect le plus décisif du cycle de vie de *Striga* et *Orobanche/Phelipanche* est leur germination. En effet, après sa germination la plante parasite dispose de peu de temps pour trouver un hôte car la graine ne possède pas de réserves propres. Sa survie est donc intégralement liée à la présence d'une plante hôte à proximité, immédiatement après germination de la graine.

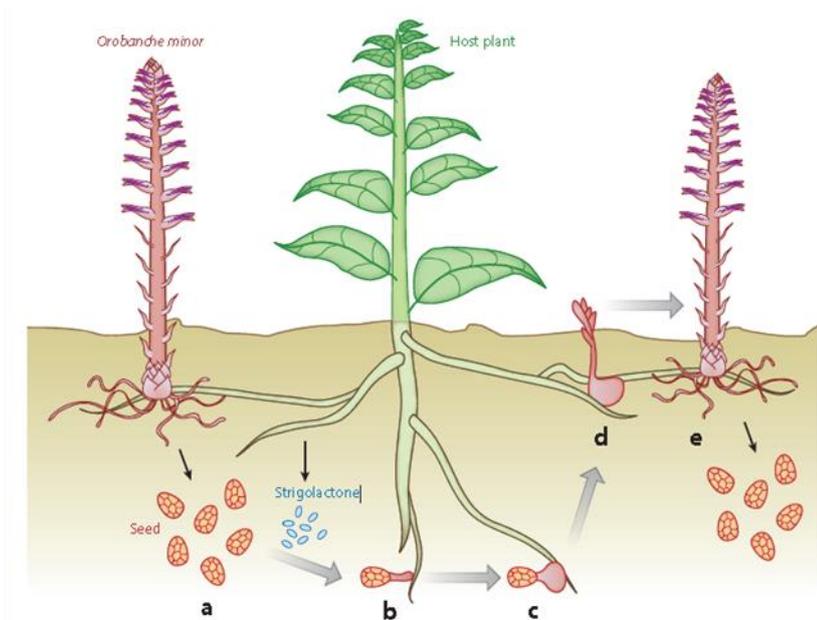


Figure n°1.23: Schéma du cycle de vie d'une plante parasite, *Orobanche minor*.

(a) La germination des graines est stimulée par les strigolactones. (b) Le parasite s'accroche à la racine de la plante hôte et forme un *haustorium*. (c-d) Pendant plusieurs semaines ou mois le parasite croît sous terre puis émerge au stade floral. (e) La plante parasite produit un grand nombre de graines qui restent viables de nombreuses années. (Xie et al., 2010).

II.B.1.b Impact économique des plantes parasites

Les plantes parasites *Striga* et *Orobanche/Phelipanche*, ont des aires de répartition assez larges, on retrouve majoritairement des *Striga* en Afrique et des *Orobanche/Phelipanche* en Europe et Afrique méditerranéennes ainsi qu'en Asie de l'Est. Si ces plantes sont esthétiquement attrayantes (figure n°1.24), elles présentent un inconvénient majeur, qui est d'affecter gravement le rendement des cultures de plantes d'intérêt agronomique. La lutte contre ces plantes parasites représente donc un enjeu sanitaire et économique important.

Parmi les *Orobanche/Phelipanche* 7 espèces causent le plus de dégâts, les plus virulentes étant *Orobanche crenata*, *Orobanche cumana*, *Orobanche ramosa* (= *Phelipanche ramosa*) et *Orobanche aegyptiaca* (= *Phelipanche aegyptiaca*). Elles infestent des légumineuses, comme la fève, le pois ou encore le pois chiche, et d'autres espèces comme la tomate ou la pomme de terre. En France se sont surtout les champs de colza qui commencent à être affectés par *Orobanche*, avec des dégâts plus au moins importants sur le rendement des cultures (Auger et al., 2012).

Parmi les *Striga*, *Striga hermonthica* et *Striga asiatica* sont les plus virulentes sur les céréales comme le sorgho, le millet, ou le riz, et entraînent une diminution des rendements de près de 50% (Parker., 2008).

Une étude de 1991 a montré que 16 millions d'hectares étaient considérés comme à risque d'attaques par *Orobanche* dans la région méditerranéenne et l'Asie de l'Est. A la même époque les *Striga* en Afrique affectaient 44 millions d'hectares pour une perte de revenus sur les cultures de maïs, millet et sorgho de 2.9 milliards de dollars (\$) par an.

Plus récemment des études montrent que la zone d'infestation par les *Striga* s'étend, atteignant 50 millions d'hectares (Ejeta et al., 2007), avec des pertes de 7 à 10 milliards de \$ par an, par les quelques 300 millions de fermiers concernés par ces attaques.

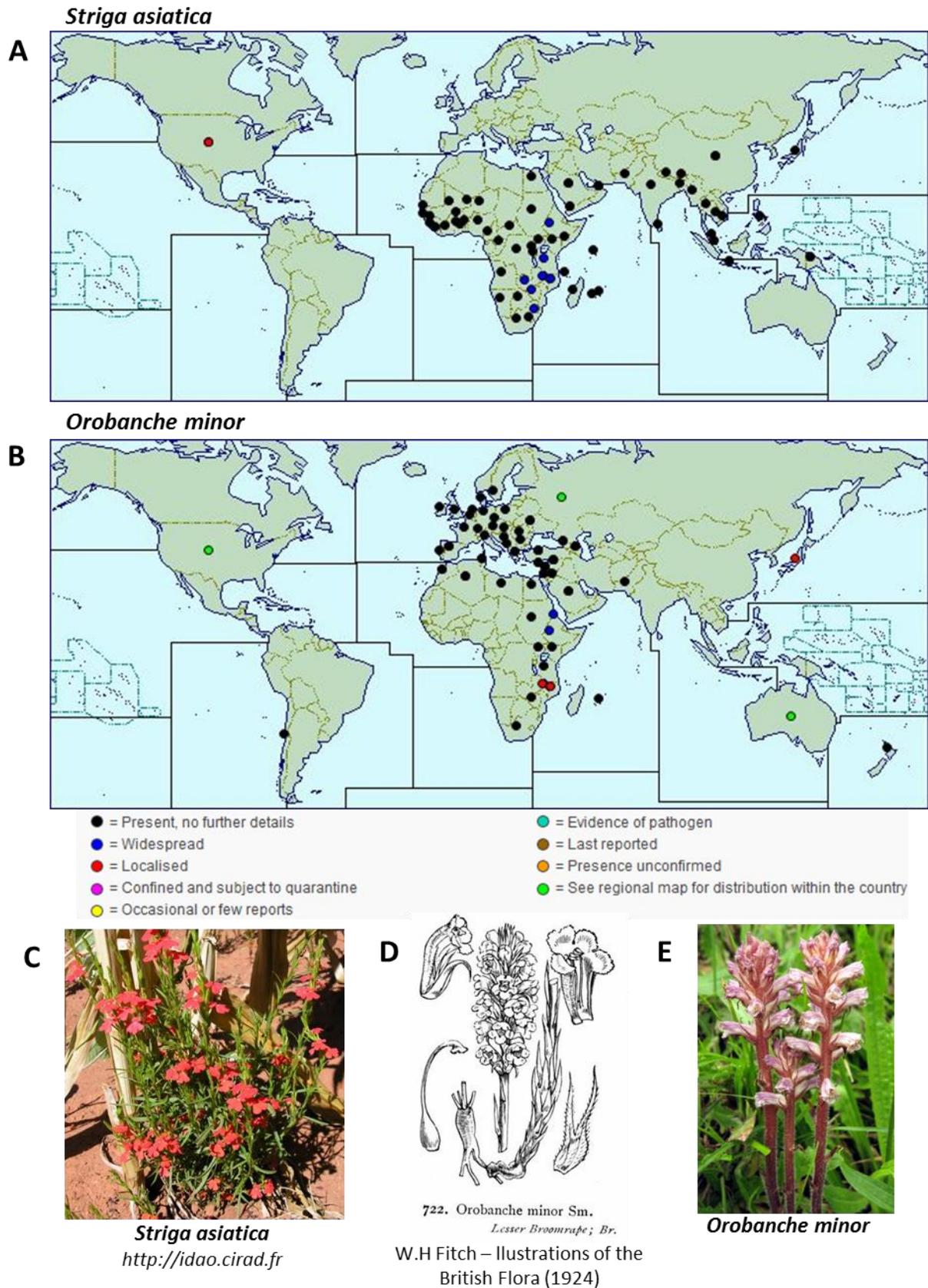


Figure n°1.24 :

Carte de répartition de *Striga asiatica* [A] et *Orobanche minor* [B], extrait du cabi (<http://www.cabi.org/isc/datasheet/51786>, dernier update 2015). [C-D-E] Photos et illustration de ces deux plantes parasites.

II.B.1.c Rôle des strigolactones dans la germination des graines de plantes parasites

Il est connu depuis longtemps que la germination des graines d'*Orobanche* est tributaire de stimulants produits par la plante hôte, répertoriés dès 1823 par Vaucher. En 1966, Cook identifie à partir des exsudats racinaires de coton (*Gossypium hirsutum*), plante non affectée par les plantes parasites, une molécule capable de faire germer *Striga hermonthica*, le strigol. Cette molécule est aussi trouvée dans les exsudats racinaires de plantes hôtes des *Striga* : maïs, sorgho et millet. D'autres stimulants sont ensuite isolés chez le haricot et le sorgho (sorgolactone et alectrol).

Ces molécules possédant une propriété commune, la capacité de faire germer des graines de *Striga* et une structure similaire incluant une fonction lactone, sont baptisées strigolactones par Butler.

Le premier stimulant de la germination des orobanches identifié, l'orobanchol, a été isolé à partir des exsudats racinaires de trèfle rouge (*Trifolium pratense*) un hôte d'*Orobanche minor*.

Les strigolactones sont donc des molécules synthétisées autant par des plantes non-hôtes que par des hôtes des *Striga* et *Orobanche*. (La structure des strigolactones ainsi que la diversité de cette classe de molécule sera décrite plus loin Partie n°III.A.1. Les strigolactones servent de signaux pour la localisation d'une plante hôte par la plante parasite, puisqu'au contact de strigolactones les graines de plantes parasites germent (Bouwmeester et al., 2003).

II.B.2 Les strigolactones facilitent la symbiose entre plante et champignons endomycorhiziens à arbuscules

II.B.2.a La relation symbiotique entre plante et champignons endomycorhiziens à arbuscules

Certaines plantes et champignons ont développé des relations de symbioses à bénéfiques réciproques appelées mycorhizes, littéralement du grec *mycès* (champignon) et *rhiza* (racine). Il existe deux types de mycorhizes : les ectomycorhizes, où les racines sont colonisées par des champignons (*Ascomycètes* et *Basidiomycètes*), mais leurs hyphes ne

pénètrent pas la racine ; et les endomycorhizes arbusculaires, où les hyphes des champignons appartenant à la famille des *Gloméromycètes* colonisent l'intérieur des racines (intra et extra cellulaire). Ces symbioses endomycorhiziennes à arbuscules se retrouvent dans plus de 80% des plantes terrestres, et leur origine évolutive est ancienne. Des données moléculaires et des études de fossiles laissent suggérer que c'est cette symbiose qui aurait facilité l'adaptation des premières plantes primitives à la vie sur terre, il y a environ 450 millions d'années. Plus de 400 millions d'années de coévolution entre les deux espèces font qu'elles possèdent aujourd'hui une interdépendance très élevée (Remy et al., 1994).

Les champignons endomycorhiziens à arbuscules (AM) sont des organismes biotrophes obligatoires, ils sont complètement dépendants d'une plante hôte qui leur apporte les éléments carbonés nécessaires à leur survie. La plante mycorhizée (hôte), n'est pas dépendante du champignon, mais elle bénéficie grâce à lui d'un accès plus important à l'eau et aux nutriments (phosphate notamment) présents dans le sol. En effet les champignons AM développent des réseaux d'hyphes, permettant ainsi à la plante d'augmenter la surface des zones explorées pour la recherche de nutriments. La symbiose AM a un autre avantage pour la plante, en permettant une meilleure résistance à certains stress (hydrique, salin, présence de métaux lourds) et une meilleure résistance aux pathogènes (Al-Karaki et al., 2004 ; Zhang et al., 2006).

II.B.2.b Rôle des strigolactones dans l'établissement des endomycorhizes à arbuscules.

Pour que la symbiose MA se mette en place il faut une coordination entre les deux organismes partenaires, grâce à un dialogue chimique. Depuis de nombreuses années l'existence d'un facteur de croissance appelé « branching factor » favorisant le développement de la ramification des hyphes de champignon et émanant de la plante hôte, avait été suggérée par de nombreuses études. Ce facteur de croissance est identifié par deux études indépendantes, il s'agit d'une molécule de strigolactone, le 5-déoxy-strigol (Akiyama et al., 2005). Les strigolactones exsudées par les plantes hôtes permettent de signaler au champignon la proximité d'une racine et stimulent la prolifération des hyphes, ce qui augmente les chances du champignon d'entrer en contact avec une racine de plante (figure n°1.25).

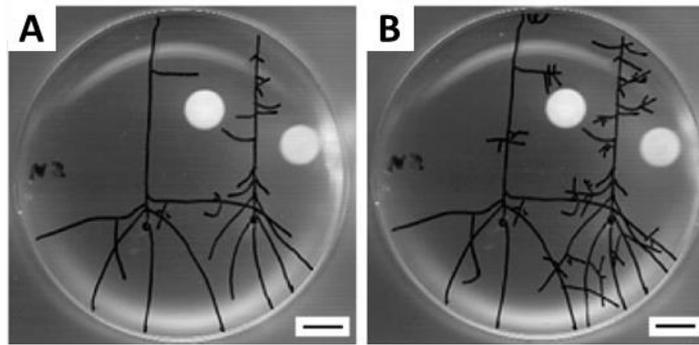


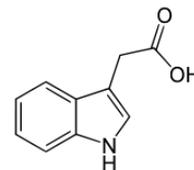
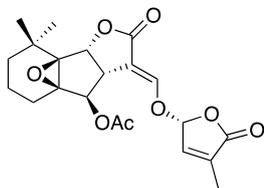
Figure n°1.25 : Les strigolactones activent la croissance des hyphes de champignons.
Hyphes de champignon *Gigaspora margarita* cultivés sur milieu après 24h de traitement [A] contrôle ou [B] avec une fraction d'éthyl acetate soluble. (Akiyama et al., 2005)

Les strigolactones peuvent aussi induire la germination des spores de quelques espèces de champignons (Besserer et al., 2006). Les champignons exsudent également des molécules appelées facteurs *Myc*, qui permettent à la plante de les reconnaître en tant que symbiontes (Parniske., 2008). Au contact de la racine, le champignon forme d'abord une structure d'attachement (appressorium) puis de pénétration des cellules végétales. Les hyphes progressent ensuite dans la racine jusqu'aux cellules du cortex racinaires où le champignon forme les arbuscules, structures permettant les échanges entre la plante et le champignon.

Des mutants déficients en strigolactones ont un nombre de mycorhizations moindre par rapport au sauvage, qui peut être restauré par une application de strigolactones exogènes (Gomez-Roldan et al., 2008 ; Foo et al., 2012 ; Kretzschmar et al., 2012). Des études complémentaires sur les mutants insensibles aux strigolactones, *rms4* chez le pois et *d3* chez le riz, montrent qu'ils présentent également une réduction de la colonisation de leurs racines par des mycorhizes (Foo et al., 2012 ; Yoshida et al., 2012). Le nombre d'arbuscules, et la croissance des hyphes de champignons sont réduits chez ces mutants, mais ils présentent des arbuscules normalement formés. Les mutants *rms4* et *d3*, bien que affectés dans la réponse aux SLs, présentent des teneurs en SLs dans les exsudats racinaires similaires à celles observées chez le sauvage. On peut donc proposer un rôle des strigolactones *in planta* via *PsRMS4/OsD3* dans la mise en place des mycorhizations.

INDRODUCTION

Partie n°III : Biosynthèse et signalisation des strigolactones



Partie III : Biosynthèse et signalisation des strigolactones

III.A. Biosynthèse des strigolactones

III.A.1 Structure et diversité des strigolactones

Les strigolactones sont des composés dérivés des caroténoïdes qui présentent une structure chimique composée d'un tricycle ABC, avec une fonction lactone sur le cycle C, relié par un pont éno-éther au cycle buténolique D qui comporte aussi une lactone (Figure n°I.26). Une vingtaine de strigolactones naturelles ont déjà été identifiées dans les exsudats racinaires de différentes plantes (Yoneyama et al, 2015), la plus récemment identifiée étant la molécule de medicaol présente chez *Medicago truncatula* (Tokunaga et al., 2015). Les plantes ne produisent pas une seule strigolactone mais un cocktail de 4 à 5 strigolactones par espèce, et on peut parler de signature chimique de strigolactones spécifique à l'espèce dans la rhizosphère (Humphrey et al., 2006). Par exemple chez le pois, on retrouve 5 strigolactones différentes : le didéhydro-orobanchol, l'orobanchol, l'orobanchyl acétate (aussi connue sous le nom d'alectrol), le 5-déoxystrigol et le fabacyl acétate. Si le 5-déoxystrigol est présent chez de nombreuses espèces de plantes, le fabacyl acétate semble spécifique du groupe des légumineuses (Yoneyama et al., 2008 ; Xie et al., 2009).

Les strigolactones peuvent être classées en deux groupes, les molécules de type strigol et celles de type orobanchol, en fonction de leur stéréochimie (Xie et al., 2010).

Les strigolactones sont des molécules qui interviennent à divers niveaux tant dans le développement de la plante qu'en tant que molécules de signalisation dans la rhizosphère (Partie n°II.B). Des études de structure /activité ont permis de mettre en évidence des spécificités d'activité des molécules de SLs corrélées à leurs structures chimiques (De Saint Germain et al., 2013). Ainsi l'activité de la molécule n'est pas toujours dépendante de l'intégralité de la structure des cycles ABC+D, et certaines parties seulement de la molécule peuvent suffire à induire une réponse soit chez la plante soit chez les symbiontes ou les plantes parasites (Figure n°I.26). Pour la germination des graines de plantes parasites, la partie carbonyle α,β -insaturée du cycle C reliée au cycle D via un pont éno-éther est nécessaire à l'activation de la germination (Zwanenbourg et al., 2013 ; Boyer et al., 2013). Pour l'inhibition de la ramification le cycle D est essentiel alors qu'une modification des

cycles ABC ne change pas l'activité de la molécule (Boyer et al., 2013). Pour l'activité de stimulation de la croissance des hyphes de champignons, l'intégralité des cycles ABC+D et du pont entre les cycles C et D semble nécessaire (Akiyama et al., 2010) (Figure n°I.26).

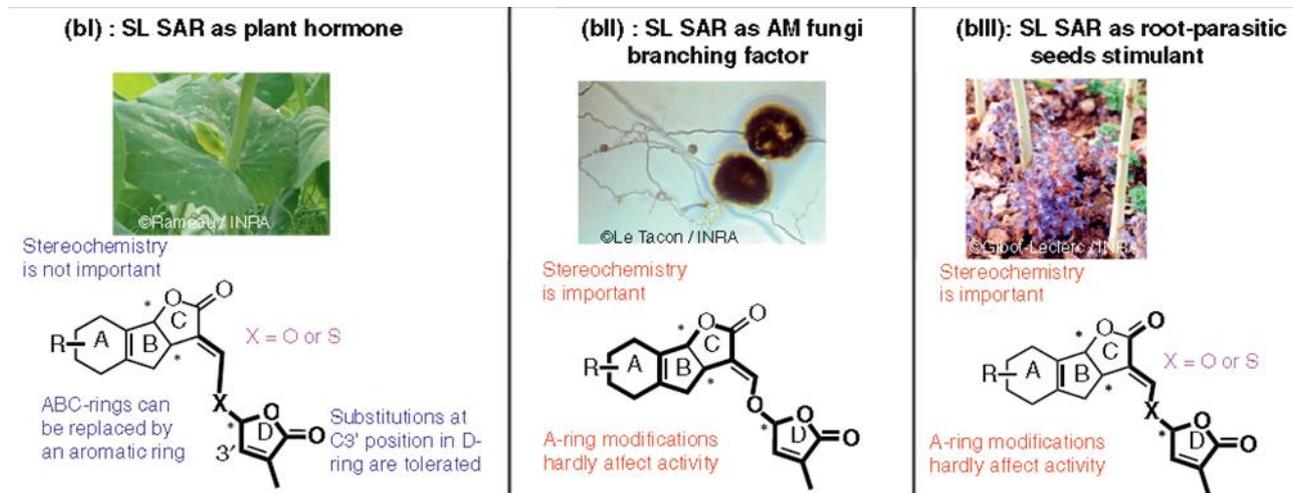


Figure n°I.26: L'activité de la molécule strigolactone dépend de sa structure.

En couleur noir « surligné » apparaissent les différentes parties de la molécule qui sont nécessaires à sa bio-activité. **[bI]** Pour l'inhibition de la ramification **[bII]** Pour l'élongation des hyphes de champignons **[bIII]**. Pour l'activité de germination des plantes parasites (De Saint Germain et al., 2013).

III.A.2 Voie de biosynthèse des strigolactones

Plusieurs étapes de la biosynthèse des strigolactones ont été élucidées ces dernières années cependant tous les détails des mécanismes en jeu ne sont pas encore connus. C'est l'étude des mutants hyperbranchés chez le pois (*ramosus (rms)*), *Arabidopsis (max)*, le riz (*d*) et le pétunia (*dad*) qui a conduit à la découverte des enzymes de la biosynthèse des strigolactones avant même l'identification de la molécule en tant qu'hormone.

Les strigolactones sont des dérivés du β -carotène (Booker et al., 2005 ; Matusova et al., 2005), pigment présent chez les plantes en grande quantité et qui est le précurseur de nombreuses molécules dont une autre hormone, l'acide abscissique (ABA) (Schwartz., 1997). Cependant les voies de biosynthèse de ces deux hormones sont indépendantes (Matusova et al., 2005). Les premières étapes connues de la formation des strigolactones se passent dans le plaste. Une enzyme de la famille des β -carotène isomérase, DWARF27 (D27) caractérisée chez le riz et *Arabidopsis* (Lin et al., 2009 ; Water et al., 2012) convertit les

trans- β -carotène en 9-*cis*- β -carotène (Alder et al., 2012). Puis le 9-*cis*- β -carotène est le substrat spécifique de l'enzyme CCD7 (Carotenoid Cleavage dioxygenase) qui le clive en 9-*cis*- β -apo-10'-caroténal (+ β -ionone) enfin l'action de l'enzyme CCD8 conduit à la formation de la carlactone (Alder et al., 2012) (figure n°1.27).

La carlactone est une molécule active, et peut induire la germination de graines de *Striga* (Alder et al., 2012). Chez *Arabidopsis*, l'application de carlactone synthétique permet de restaurer le phénotype de ramification chez les mutants déficients en strigolactones.

Une autre enzyme de la famille des cytochromes P450, codée par les gènes *MAX1* permet le passage de la carlactone à la SLs active.

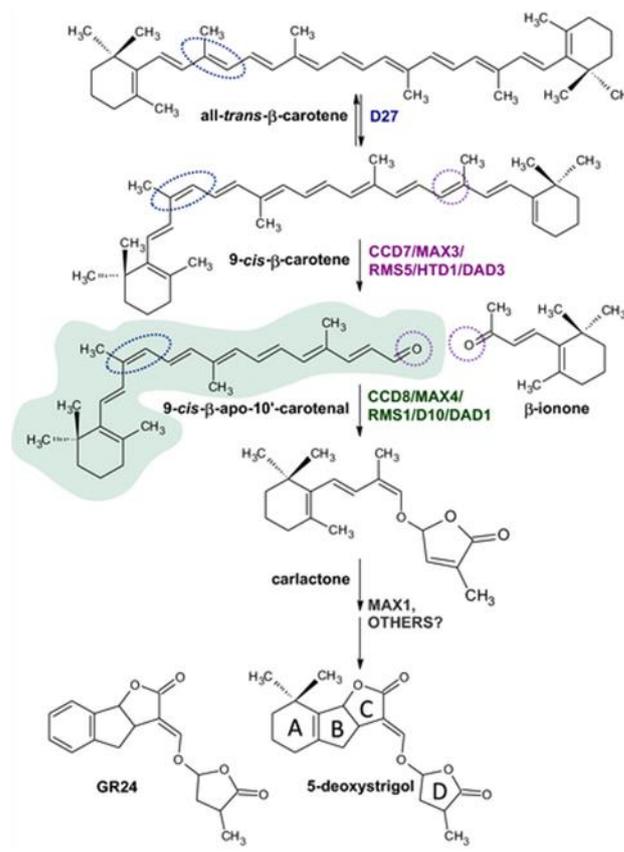


Figure n°1.27: Voie de biosynthèse des strigolactones.
(Waldie et al., 2014).

Ces quatre enzymes intervenant dans la biosynthèse des strigolactones ne semblent pas suffisantes pour produire des strigolactones actives. En effet l'expression transitoire des 4 protéines chez le tabac, ne permet pas le passage complet du β -carotène au 4-deoxyrobanchol (Zhang et al., 2014). D'autres enzymes intervenant dans la biosynthèse des strigolactones restent encore à découvrir.

III.A.3 Régulation de la biosynthèse des strigolactones

On peut observer chez la plupart des espèces (Pois, *Arabidopsis*, riz, *Physcomitrella patens*) un niveau de transcrits *CCD7* et *CCD8* élevé chez les mutants déficients en SLs ou chez les mutants de réponse aux SLs. Suggérant l'existence d'un rétro-contrôle, qui stimule l'expression des gènes de biosynthèse des SLs, dans des conditions d'absence ou de non réponse aux SLs.

III.A.3.a Régulation de la biosynthèse des strigolactones par l'auxine

Chez le pois les gènes de biosynthèse des strigolactones *RMS5* (*CCD7*) et *RMS1* (*CCD8*) sont exprimés dans les mêmes tissus, préférentiellement dans les racines et l'épicotyle (Foo et al., 2005 ; Johnson et al., 2006). Des expériences de décapitations montrent que le niveau de transcrits de ces deux gènes dans l'épicotyle est inhibé par une déplétion d'auxine dans la tige, la régulation du gène *RMS1* est plus forte que celle de *RMS5*, ce qui suggère que l'étape de biosynthèse catalysée par *RMS1* semble limitante (Johnson et al., 2006).

Cette régulation positive de l'auxine sur le niveau de transcrits de *CCD7* et *CCD8*, a été observée chez plusieurs espèces.

Chez *Arabidopsis*, il y a une régulation positive des gènes *CCD7/MAX3* et *CCD8/MAX4* par l'auxine. Cette régulation est dépendante d'*AXR1* (AUXIN RESISTANT1), protéine nécessaire à la signalisation auxinique via le complexe SCF^{TIR1} (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1). Le mutant de réponse à l'auxine *bodenlos* (*iaa12*) possède un phénotype hyper-ramifié qui peut être restauré par l'application exogène de GR24. Ce mutant présente des niveaux de transcrits *MAX3* et *MAX4* très faibles comparés au type sauvage (Hayward et al., 2009). Chez *Arabidopsis* il y a donc une régulation des gènes *MAX3* et *MAX4* dépendante d'*IAA12*, et le gène *AtD27* est soumis à ce même rétro-contrôle (Waters et al., 2012).

Chez le riz, le gène *CCD8/D10* est surexprimé chez les mutants *d10* et *d3*, et régulé positivement par l'auxine, mais ce n'est pas le cas de *CCD7/D17* qui a un niveau d'expression similaire au type sauvage chez ces mutants et dont l'expression n'est pas régulée par l'auxine (Arite et al., 2007).

Chez le pois, le rétro-contrôle semble être plus fort que chez les autres espèces. Diminuer les sources d'auxine via la décapitation ou altérer le transport d'auxine via le NPA (1-N-naphthylphthalamic), entraîne une très rapide diminution du niveau de transcrits de *CCD7/RMS5* et *CCD8/RMS1* dans l'épicotyle. Ce niveau de transcrits est restauré par l'application d'auxine exogène sur la plante décapitée (Foo et al., 2005 ; Jonhson et al., 2006). L'auxine joue donc également un rôle dans la régulation des gènes de biosynthèses des SLs chez le pois (Figure n°1.28).

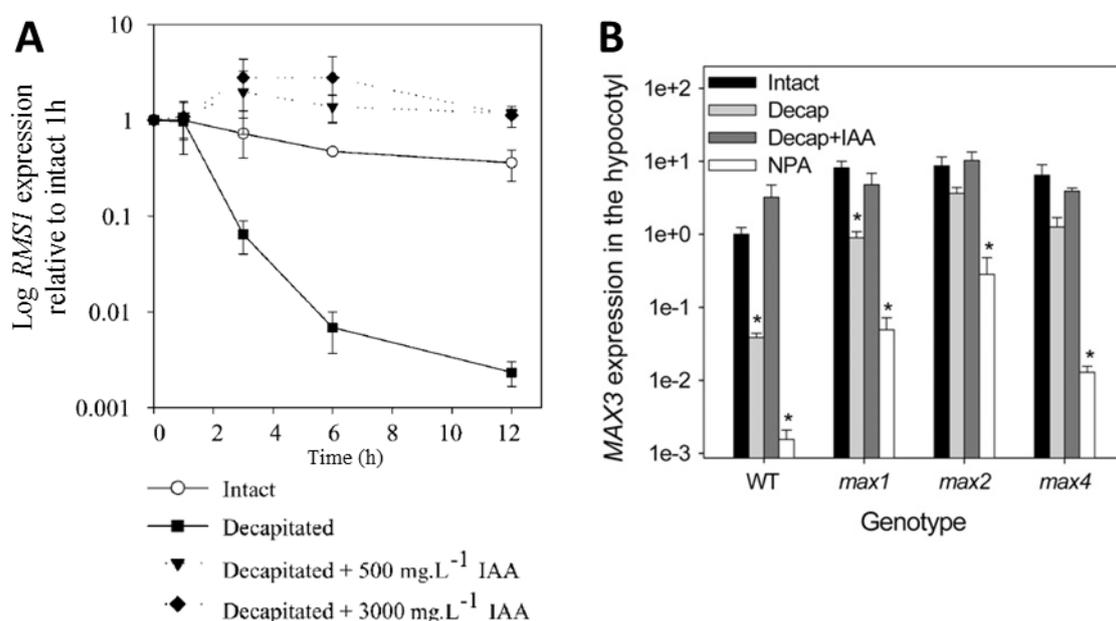


Figure n°1.28: L'expression des gènes de biosynthèse des SLs est régulée par l'auxine. [A] Expression de *RMS1* (*CCD8*) dans l'épicotyle en réponse à la décapitation chez le pois (Foo et al., 2005). [B] Expression de *MAX3* (*CCD7*) en réponse à la décapitation chez *Arabidopsis* (Hayward et al., 2009).

III.A.3.b Contrôle de *RMS2* sur la biosynthèse des strigolactones

Chez le pois, le mutant *rms2* possède un phénotype hyper ramifié et nain comme les autres mutants *rms*, mais des caractéristiques physiologiques différentes. En effet contrairement aux autres mutants *rms*, le mutant *rms2* présente des niveaux de transcrits des gènes *CCD7/RMS5* et *CCD8/RMS1* plus faibles (que chez le type sauvage) dans l'épicotyle (Beveridge et al., 1994 ; Beveridge et al., 1997).

Deux hypothèses ont été proposées quant à l'identité du signal *RMS2* :

(1) le signal *RMS2* est dépendant de l'auxine. En effet *RMS2* est décrit comme un signal mobile acropète, qui contrôle positivement la régulation de la transcription des gènes *CCD7/RMS5* et *CCD8/RMS1* de biosynthèse des SLs (Beveridge., 1997 ; Foo et al., 2005). Le rôle de *RMS2* semble donc similaire à celui de l'auxine dans la plante.

(2) le signal *RMS2* est indépendant de l'auxine. Pour ce qui concerne le niveau de transcrits *CCD8/RMS1*, le mutant *rms2* ne répond pas à la décapitation mais répond à une application exogène d'auxine. Il semble donc que l'auxine et le signal *RMS2* agissent indépendamment dans le contrôle de l'expression de *CCD8/RMS1* chez le pois (Foo et al., 2005).

L'étude de l'identification du signal *RMS2* constitue le chapitre n°3 de cette thèse.

III.A.3.c Implication des facteurs de transcription NSP1 et NSP2

Il a été montré chez le riz et chez *Medicago truncatula*, que la biosynthèse de strigolactones nécessite l'activité des facteurs de transcription NSP1 et NSP2 (NODULATION SIGNALING PATHWAY 1 & 2). Ces FTs appartiennent à la famille des facteurs de transcription de type GRAS, connus pour leurs rôles dans le développement, dans la signalisation du phytochrome A, ou encore dans la signalisation des gibbérellines (protéines DELLA) (Hirsch et al., 2009).

Les FTs NSP1 et NSP2 ont d'abord été décrits pour leurs rôles respectifs dans l'établissement des nodulations chez les légumineuses. Ces FTs sont capables de se fixer sur le promoteur du gène de biosynthèse des SLs, *D27*, et d'activer sa transcription (Liu et al., 2011). Chez le riz et *Medicago* les mutants *nsp1* et *nsp2* exsudent des quantités moindres de strigolactones, pourtant seuls les mutants de riz présentent un phénotype hyper-ramifié.

III.A.3.d Influence de l'environnement sur la biosynthèse de SLs

Plusieurs exemples convergent vers une importance de la régulation des gènes de biosynthèses des strigolactones en réponses à des stress abiotiques, comme la sécheresse, la salinité ou des carences en nutriments (phosphates ou nitrates).

Chez *Arabidopsis*, on observe une induction de l'expression des gènes *CCD7/MAX3* et *CCD8/MAX4* en réponse à un stress hydrique, une salinité élevée ou un traitement à l'acide abscissique (ABA) (Bu et al., 2014 ; Ha et al., 2014).

La biosynthèse et l'exsudation de SLs sont stimulées par la carence en phosphate, autant chez *Arabidopsis*, le trèfle rouge que chez des plantes cultivées comme la tomate, ou le sorgho (Yoneyama et al., 2007 ; Kohlen et al., 2010). Egalement chez le riz on observe une augmentation de l'expression des gènes de biosynthèses *CCD7/D17*, *CCD8/D10* et des cinq gènes *OsMAX1* en conditions de carence en phosphate. De manière similaire la biosynthèse des SLs est stimulée lors d'une carence en nitrate, même chez des espèces non légumineuses (Umehara et al., 2010).

En condition de carence en nutriments, les strigolactones sont donc présentes en teneur plus importante à la fois *in planta* et dans la rhizosphère, ce qui permet une régulation à la fois de l'architecture racinaire de la plante et stimule la mise en place de relations symbiotiques pour une meilleure acquisition/absorption des ressources.

III.A.4 Localisation de la biosynthèse et transport des strigolactones

Au niveau cellulaire, les premières étapes de la biosynthèse des SLs, catalysant le passage du *trans*- β -carotène à la carlactone sont réalisées dans les plastes. La formation des SLs actives à partir de carlactone est ensuite catalysée par le cytochrome P450 (*MAX1*). Cependant il n'est pas sûr que toutes les étapes conduisant *in fine* à la formation d'une strigolactone active aient lieu dans une même cellule.

En effet les différentes expériences de greffes montrent que les SLs sont des molécules mobiles, qui peuvent monter dans la tige mais non redescendre vers la racine, ce qui laisse suggérer une migration dans la sève xylémienne. Chez le pétunia, la protéine PDR1 (PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 1) de la famille des transporteurs ABC (ATP-BINDING CASSETTE), intervient dans l'exsudation des strigolactones par les racines. Le mutant *pdr1* et la lignée sur-exprimant PDR1 montrent tous deux une altération des niveaux de SLs exsudées par les racines comparés au sauvage (Kretschmar et al., 2012) .

Pour l'instant le rôle de PDR1, n'a pas encore été démontré *in planta*, mais la localisation de l'expression du gène *PDR1* au niveau des tissus vasculaires en fait un bon

candidat comme transporteur de SLs au sein même de la plante (Kohlen et al., 2011), des études récentes montrent qu'il aurait une localisation asymétrique (Sasse et al., 2015).

Les SLs sont des molécules peu stables, à ce jour elles n'ont jamais été quantifiées dans les parties aériennes de la plante, seulement dans les racines et les exsudats racinaires. Les expériences de greffes d'une tige WT sur un porte greffe sauvage, le phénotype non ramifié de la tige suggère qu'une synthèse locale de SLs au niveau de la tige suffit pour inhiber la ramification. De plus la greffe d'un bout d'épicotyle sauvage de pois entre un porte-greffe et un greffon *rms1/ccd8* (déficient en SLs), permet d'obtenir un tige non ramifié suggérant que les SL agissent à de très faibles concentration.

Le précurseur des SLs, la carlactone, a pu être détecté dans les parties aériennes chez *Arabidopsis* comme chez le riz (Seto et al., 2014). On peut donc imaginer l'existence d'un transport de ce précurseur des racines vers la tige, où il serait ensuite modifié en SLs actives. Malgré la connaissance du transporteur de SLs PDR1, beaucoup de questions sur le transport des SLs et la présence même de ces molécules dans les différentes parties de la plante restent à élucider.

III.B. Voie de Signalisation des strigolactones

Les voies de signalisation de plusieurs hormones végétales font intervenir une dégradation ciblée de protéines par le système d'ubiquitination et d'adressage au protéasome (UPS, Ubiquitination-Proteasome Système). L'UPS est partie intégrante des voies de signalisation de l'auxine, des gibbérellines et de l'acide jasmonique (Kelley & Estelle., 2012) (Partie n°I.B.1.c).

La caractérisation chez plusieurs espèces de mutants ramifiés et nains qui ne répondent pas aux strigolactones a permis d'identifier trois composants clés dans la transduction du signal strigolactone. Une α/β hydrolase D14/ AtD14/ RMS3/ DAD2, une protéine à boîte-F D3/ MAX2 / RMS4/ PhMAX2A et une protéine de la famille des CLp protéases D53/ SMXL.

L'élucidation du rôle de ces protéines montre que la dégradation de protéines par l'UPS constitue un composant essentiel de la voie de signalisation des strigolactones.

III.B.1 RMS3/D14 un récepteur à activité enzymatique

Le récepteur des strigolactones est une protéine de la famille des α/β hydrolases qui posséderait à la fois une fonction de récepteur et une activité enzymatique. Cette famille est aussi celle du récepteur des gibbérellines, GID1, qui lui a perdu sa fonction enzymatique (Ueguchi-Tanaka et al., 2007).

Le récepteur des strigolactones a d'abord été identifié chez le pétunia, le clonage du mutant *dad2* (insensible aux SLs) et la cristallisation de la protéine DAD2 a permis de mettre en évidence sa structure.

DAD2 est une α/β hydrolase, possédant une triade catalytique Ser-His-Asp (S-H-D) contenue dans une large cavité capable de recevoir et d'hydrolyser *in vitro* la strigolactone synthétique GR24 (Hamiaux et al 2012). Une mutation dans cette triade catalytique conduit à l'inactivation de la fonction enzymatique de DAD2 (*in vitro*) et empêche la restauration d'un phénotype sauvage lorsque cette protéine de DAD2 mutée est exprimée chez le mutant *dad2*.

Ces résultats ont été confirmés chez le riz et *Arabidopsis* par la caractérisation de l'activité et de la structure de D14 (riz) et AtD14 (*Arabidopsis*), protéines orthologues de DAD2. Des études *in vitro* montrent que les protéines D14, de riz et d'*Arabidopsis*, possèdent une triade catalytique capable d'hydrolyser le GR24 (Nakamura et al., 2013; Zhao et al., 2013). La triade catalytique constituée des trois résidus S-H-D est donc conservée entre les espèces.

Chez *Arabidopsis* comme chez le pétunia, une mutation dans la triade catalytique empêche la complémentarité du mutant *Atd14* par le récepteur muté, montrant ainsi sans équivoque l'importance de la triade catalytique.

Cependant le mécanisme de perception des strigolactones n'est pas totalement élucidé, l'importance de l'activité enzymatique du récepteur notamment reste encore discussion.

Une autre α/β hydrolase, KAI2 (KARRIKIN INSENSITIVE2) proche du clade de D14 a été identifiée comme récepteur des karrikines, composé issu des feux de forêt (Waters et al., 2012). Les deux signaux strigolactones et karrikines, bien qu'ayant deux récepteurs distincts semblent partager une partie de leur voie de signalisation. En effet la protéine à boîte-F MAX2 est impliquée dans les deux voies de signalisation (Nelson et al., 2011).

III.B.2 RMS4/MAX2 une protéine à boîte F intégrant le signal strigolactone

Le gène *MAX2 / D3 / RMS4 / PhMAX2A* code pour une protéine nucléaire de la famille des protéines à boîte-F. La famille des gènes de protéines à boîte F comprend plus de 700 membres chez *Arabidopsis* (Gagne et al., 2002) dont certains sont connus pour intervenir dans la perception d'hormones comme l'auxine (Dharmasiri et al., 2005 ; Kepinski & Leyser., 2005 ; Partie n°I.B.1.c) ou l'acide-jasmonique (Yan et al., 2009). La signalisation des hormones faisant intervenir les protéines à boîte-F fonctionne suivant le schéma suivant :

- la perception de l'hormone par le récepteur induit la formation d'un complexe SCF^{récepteur} (SKP1-CULLIN-COMPLEX),
- la formation de ce complexe SCF^{récepteur}, permet le recrutement de protéines cibles qui sont ubiquitinées.
- les protéines ubiquitinées sont adressées au protéasome 26S où elles sont dégradées via le système d'ubiquitination et d'adressage au protéasome (UPS, Ubiquitination-Proteasome Système).

Il a été montré chez *Arabidopsis* que MAX2 interagit *in vitro* avec les protéines ASK1 et Cullin1, permettant ainsi la formation d'un complexe SKP1-CULLIN-COMPLEX, SCF^{MAX2} (Stirnberg et al 2007). Ce premier élément suggère alors fortement l'implication de l'UPS dans la voie de signalisation des SLs. Ces résultats sont confirmés chez le riz, où D3 interagit avec OSK1, OSK5 ou OSK20 et OsCullin1 ; formant ainsi un complexe SCF^{D3} (Zhao et al 2014). Chez le pétunia et chez le riz, le récepteur DAD2 / D14 et la F-box PhMAX2A / D3 peuvent interagir *in vitro*, cette interaction est dépendante de la présence de GR24 dans le milieu (Hamiaux et al., 2012 ; Jiang et al 2013) ; cette interaction est confirmée en présence de GR24 *in vivo* entre D14 et D3 (Zhou et al., 2013). Ces résultats suggèrent que le changement de conformation de D14, induit par la perception et/ou l'hydrolyse des strigolactones, serait à l'origine de la formation du complexe SCF^{MAX2/D3} permettant l'ubiquitination d'une protéine cible (Nakamura et al., 2013).

III.B.3 Le signal strigolactone nécessite la dégradation de protéines

III.B.3.a Les protéines dégradées en présence de strigolactones : D53 et les SMXLs

Conjointement deux travaux menés sur le riz identifient la cible du complexe SCF^{MAX2/D3}, D53, une protéine dégradée via le protéasome suite à l'application de strigolactones (Jiang et al., 2013 ; Zhou et al., 2013).

Le mutant de riz *d53*, présente une mutation semi-dominante qui lui confère un phénotype nain et hyper-ramifié, qui n'est pas restauré par l'application de GR24, ce mutant est donc insensible aux SLs. Le gène *D53* code pour une protéine de la famille des Clp protéases, protéines possédant un double motif Clp-N contenant une boucle-P nucléoside triphosphate hydrolase. La réduction de l'expression de *D53* par des ARN interférents (ARNi) dans les mutants *d14* et *d3* peut partiellement restaurer un phénotype non ramifié, suggérant que D53 intervient en aval de D14 et D3. La protéine D53 est capable de se lier *in vitro* à D3 (interaction SL-indépendante) et à D14 (interaction SL-dépendante). De plus il a été montré que le GR24 induit la poly-ubiquitination et la dégradation de D53. Cette dégradation est abolie en présence de MG132 (inhibiteur du protéasome), et requiert la présence de protéines D14 et D3 fonctionnelles.

L'ensemble de ces résultats (Jiang et al., 2013 ; Zhou et al., 2013) suggèrent que la perception des SLs induit la formation d'un complexe entre D14, D3 et D53 qui déclenche l'ubiquitination de D53 par le complexe SCF^{D3} et entraîne sa dégradation via le protéasome. Etant donné que c'est l'accumulation de la protéine D53 qui semble être responsable du phénotype hyper-ramifié, on peut supposer que D53 est un répresseur de la voie de signalisation des strigolactones et active la ramification des plantes.

Chez *Arabidopsis*, le mutant *smax1* (*suppressor of more axillary growth2*), a été isolé en criblant des suppresseurs du phénotype de dormance des graines d'*Arabidopsis* chez *max2* (Stanga et al., 2013). SMAX1 appartient à la famille des Clp protéases, qui comportent 9 membres chez *Arabidopsis* (SMAX1 & SMXL1 à 8) homologues à D53. La protéine SMAX1 agit en aval de MAX2 pour contrôler divers processus développementaux (germination de la

graine et photo-morphogénèse) mais pas la croissance secondaire ni la ramification chez *Arabidopsis* (Figure n°1.29).

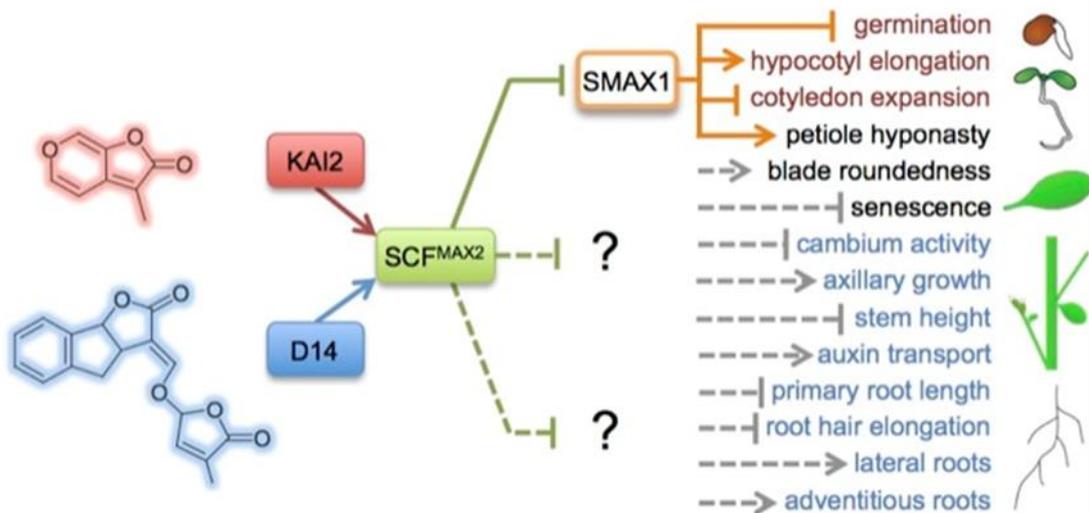


Figure n°1.29: L'hypothèse de MAX2 comme intégrateur commun des voies SLs et karrikines.
 La cible SMAX1 identifiée chez *Arabidopsis* est dégradée via le complexe SCF^{MAX2}. SMAX1 intervient dans le contrôle des stade précoce du développement d'*Arabidopsis*.
http://nelsonlab.genetics.uga.edu/research.html#sectionB_answer_1

Une des hypothèses proposées est que MAX2 formerait au moins deux complexes (Bennet & Leyser., 2014) :

- D14 /SCF^{MAX2} /D53 (SMXL), permettant la signalisation du signal SL ;
- KAI2 /SCF^{MAX2} /SMAX1, permettant la signalisation des karrikines et d'un putatif signal endogène « karrikine-like ».

III.B.3.b Les protéines dégradées en présence de strigolactones : SLR1

Des études *in vitro* et *in vivo* montrent que la protéine DELLA de riz SLR1 (SLENDER RICE 1) est capable d'interagir avec le récepteur D14 de manière dépendante des SLs (Nakamura et al., 2013). Les auteurs proposent un modèle dans lequel l'hydrolyse des SLs par D14 permettrait le recrutement de SLR1, qui est ensuite dégradé par le complexe SCF^{D3} ce qui induirait la transduction du signal SLs via SLR1. La protéine SLR1, qui fait partie de la signalisation GAs, semble avoir une affinité plus forte pour le récepteur des GAs GID1 que

pour celui des SLs D14. Les protéines DELLAs interviennent dans différentes voies hormonales, elles interagissent avec la voie des JAs (Hou et al., 2010) et celle des BRs (Yang et al., 2012). Les protéines DELLAs semblent donc intervenir aussi dans la voie des SLs.

Les processus biologiques mis en jeu par cette interaction SLs / DELLA sont encore inconnus. Cependant les deux hormones sont impliquées dans la régulation de mêmes processus comme le contrôle de la taille des plantes (discuté au chapitre n°1) ou encore la mise en place des symbioses AM (Yu et al., 2014). L'identification de protéines cibles de dégradation, comme les DELLAs, par les SLs est donc une piste prometteuse pour l'exploration des interactions hormonales entre GAs et SLs.

III.B.3.c Les protéines dégradées en présence de strigolactones : BES1

Le facteur de transcription BES1 (*bri1-EMS-supressor 1*) est un régulateur positif de la voie de signalisation des brassinostéroïdes, il agit en aval des FTs pour réguler l'expression des gènes de réponses aux BRs (Yin et al., 2002). La phosphorylation / déphosphorylation de BES1 est la voie majeure pour réguler son activité (Vert & Chory, 2006). Des études *in vitro* et *in vivo* montrent que la protéine BES1 d'*Arabidopsis* est capable de lier MAX2, et que le GR24 induit la dégradation de BES1. De plus, le mutant d'*Arabidopsis bes1* présente un phénotype hyper ramifié, et le mutant perte de fonction de BES1 induit une restauration du phénotype sauvage de *max2* (Wang et al., 2013). Ces résultats suggèrent que BES1 agit en aval de MAX2 pour inhiber la signalisation SLs et activer la ramification.

Fonction	Type de protéine	Pois (Ps)	Arabidopsis (At)	Riz (Os)	Pétunia (Ph)
Biosynthèse	Isomérase	<i>D27</i>	<i>D27</i>	<i>D27</i>	
	CCD7	<i>RMS5</i>	<i>MAX3</i>	<i>D17/HTD1</i>	<i>DAD3</i>
	CCD8	<i>RMS1</i>	<i>MAX4</i>	<i>D10</i>	<i>DAD1</i>
	Cytochrome P450	2 <i>MAX1</i>	<i>MAX1</i>	5 <i>MAX1</i>	<i>MAX1</i>
Récepteur des strigolactones	α/β -hydrolase	<i>RMS3</i>	<i>D14</i>	<i>D14</i>	<i>DAD2</i>
Récepteur des karrikinés		?	<i>KAI2</i>	<i>D14L</i>	
Signalisation Co-récepteur ?	Protéine à boîte F	<i>RMS4</i>	<i>MAX2</i>	<i>D3</i>	<i>MAX2α</i>
Cible du signal strigolactone	Clp-protéase (HSP101)	?	<i>SMXL2 à 8 ?</i>	<i>D53</i>	?
Cible du signal karrikine ?		?	<i>SMAX1</i>	?	?
Transduction du signal	Facteur de transcription TCP	<i>BRC1</i>	<i>BRC1/2</i>	<i>FC1</i>	?
Rétrocontrôle	Protéine à boîte F	<i>RMS2</i>	<i>AtAFB4/5</i>	?	?

Figure n°I.30 : Tableau récapitulatif des différents gènes impliqués dans le métabolisme et la signalisation des strigolactones

RMS = RAMOSUS ; *MAX* = MORE AXILLARY GROWTH ; *D* = DWARF ; *DAD* = DECREASE APICAL DOMINANCE ; *HTD* = HIGH TILLERING DWARF ; *L* = LIKE ; *KAI2* = KARRIKINE INSENSITIVE2 ; *SMAX* = SUPPRESSOR OF MAX ; *SMXL* = SMAX1-LIKE ; *TB1* = TEOSINTE BRANCHED1 ; *BRC1* = BRANCHED1 ; *FC1* = FINECULM1 ; *HSP* = HEAT SHOCK PROTEIN ; *TCP* = TB1-CYC-PCF1

III.C. Transduction du signal strigolactone dans le contrôle de la ramification

III.C.1 Hypothèse de la canalisation de l'auxine

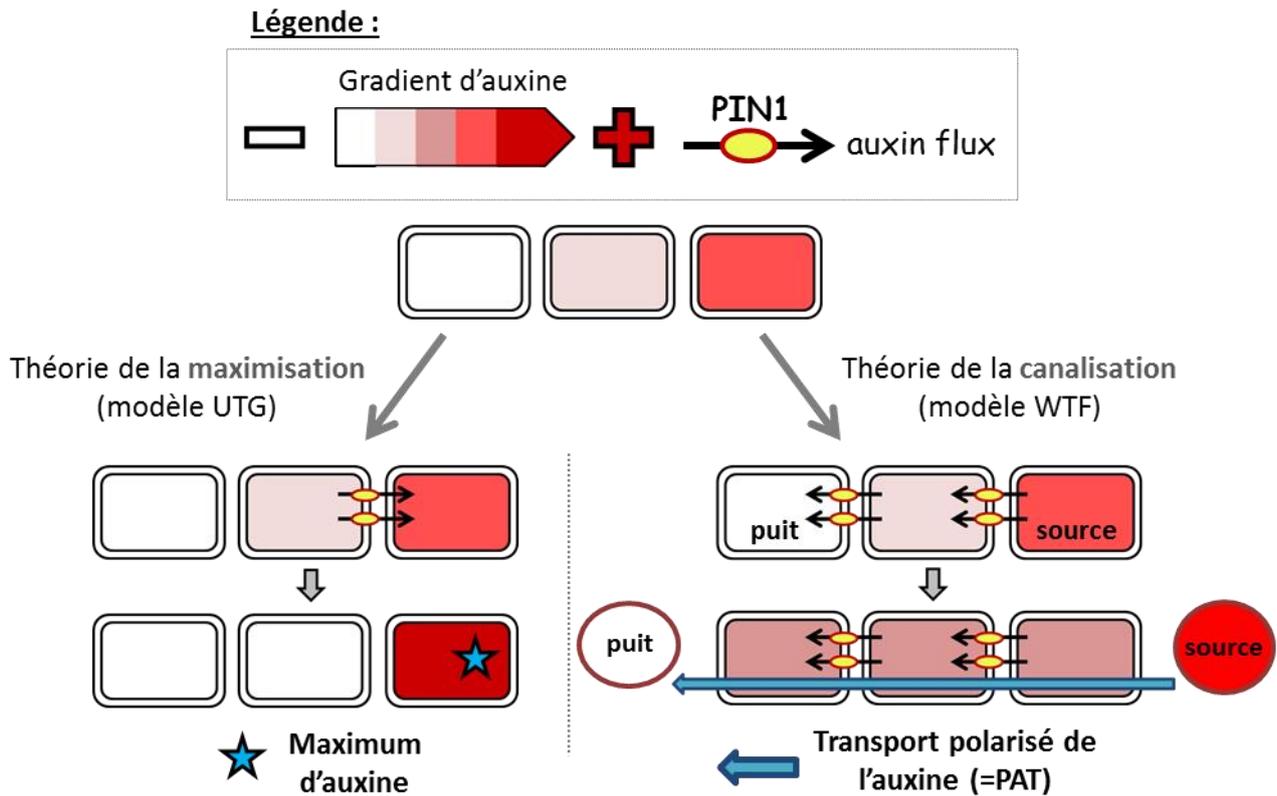
III.C.1.a Transport d'auxine et canalisation: la théorie du « What the flux » (WTF)

Dans les parties aériennes de la plante, l'apex constitue la source principale d'auxine. L'auxine est transportée de l'apex vers les racines via le PAT (« Polarised Auxin Transport »), ce transport basipète est dû à la localisation des transporteurs PIN1 sur la partie basale des cellules de la tige, permettant ainsi un flux d'auxine vers le bas.

Le transport polarisé de l'auxine est étudié dans le cas de plusieurs processus développementaux. Deux mécanismes distincts sont décrits :

- la maximisation de l'auxine, phénomène de formation d'un maximum d'auxine dans un pool de cellules qui permet soit l'émergence d'un nouvel organe (expl. Localisation de la position des primordia foliaires ; Reinhardt et al., 2003) , ou le contrôle de la forme d'un organe (expl. Formation de la marge des feuilles ; Bilsborough et al., 2011).
- la canalisation de l'auxine, phénomène de contrôle du flux d'auxine des cellules avec la plus forte concentration d'auxine (source) vers celles avec la plus faible (puits). Ce mécanisme intervient dans la formation de la vascularisation après l'initiation des primordia foliaires ainsi que dans le contrôle de la dormance des bourgeons (Sachs., 1968 ; 1981).

Deux modèles mathématiques ont été développés permettant ainsi la modélisation des flux auxiniques dans la plante, le modèle dit UTG («Up-The-Gradient ») utilisé pour la théorie de la maximisation et le modèle WTF («What The Flux ») pour celle de la canalisation (figure n°I.31).



Processus biologique décrit via la théorie de la maximisation :

- Formation des marges de feuilles
- Phyllotaxie : initiation des nouveaux primordia, voir illustration I1 ci-dessous

Processus biologique décrit via la théorie de la canalisation :

- Contrôle de la dormance des bourgeons axillaires
- Formation de la vascularisation après l'initiation des primordia (voir illustration P1, ci-dessous)

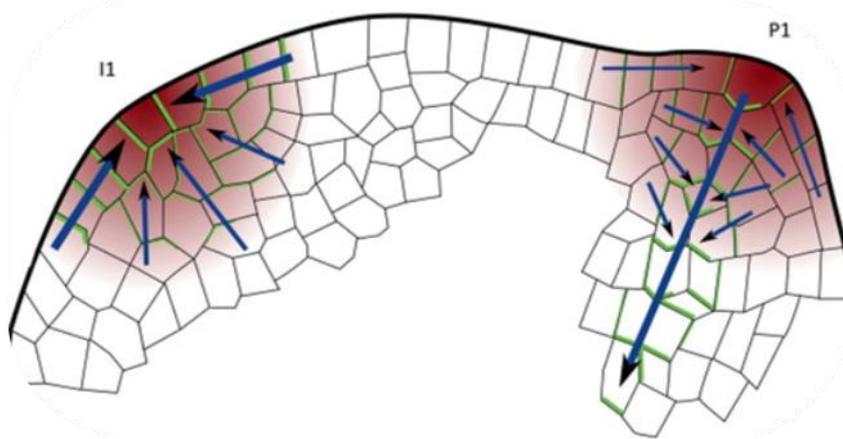


Figure n°I.31 : Théorie de la canalisation et de la maximisation.
(image issue de Bennett et al., 2014)

Ces deux mécanismes présupposent une réponse de la cellule à sa propre teneur en auxine et à celle de ces voisines, permettant d'orienter les transporteurs PIN1 à la membrane cellulaire ou non. L'issue de la « quantification » de l'auxine dans la cellule étant

différente selon le mécanisme, on peut penser que d'autres facteurs entrent en jeu dans la régulation de la localisation de PIN1 (Bennett et al., 2014). Il existe aussi une voie de transport de l'auxine apoplastique qu'il serait intéressant d'intégrer dans les deux modèles WTF et UTG, cependant les techniques actuelles ne permettent pas de quantifier ce transport, tout reste donc à faire dans l'exploration de ce transport.

Le localisation polaire des protéines PINs est régulée par des facteurs cellulaires spécifiques internes (Friml et al., 2004), des stimuli externes comme la lumière (Ding et al., 2011), des contraintes mécaniques (Heisler et al., 2010) ou encore par des hormones comme les cytokinines (Marhavy et al., 2011), les GAs, l'auxine ou les strigolactones (Crawford et al., 2010).

III.C.1.b Le modèle de la canalisation dans le contrôle de la ramification

Une des hypothèses sur le rôle des strigolactones dans l'inhibition de la ramification repose sur le concept de canalisation de l'auxine. Dans ce modèle, l'inhibition de la dormance des bourgeons passe par l'établissement d'un flux d'auxine entre le bourgeon dormant et le PAT de la tige principale (Li & Bangerth., 1999). C'est alors la capacité du bourgeon à exporter l'auxine qui détermine la transition de l'état dormant à actif.

Chez le pois, on observe une polarisation de PIN1 entre le bourgeon et le PAT de la tige principale après décapitation, permettant ainsi l'établissement d'un transport d'auxine du bourgeon vers le PAT (Balla et al., 2011). Chez *Arabidopsis*, les mutants *max* présentent une augmentation du transport de l'auxine ainsi qu'une accumulation de PIN1 à la membrane, conduisant à des teneurs générales en auxine plus élevées (Bennett et al., 2006). Des plantes traitées avec du GR24 présentent une déplétion du nombre de protéines PIN1 à la membrane ainsi qu'une diminution du transport de l'auxine chez le sauvage comme chez les mutants de biosynthèse des strigolactones, *max1* et *max4* (Figure n°1.32 ; Crawford et al., 2010). Ce processus régulé par les strigolactones est dépendant des clathrines et semble correspondre à une endocytose des PIN1. L'effet des strigolactones est rapide (détecté dès 10 min après application) dépendant de MAX2, mais indépendant de la synthèse de nouvelles protéines (Shinohara et al., 2013).

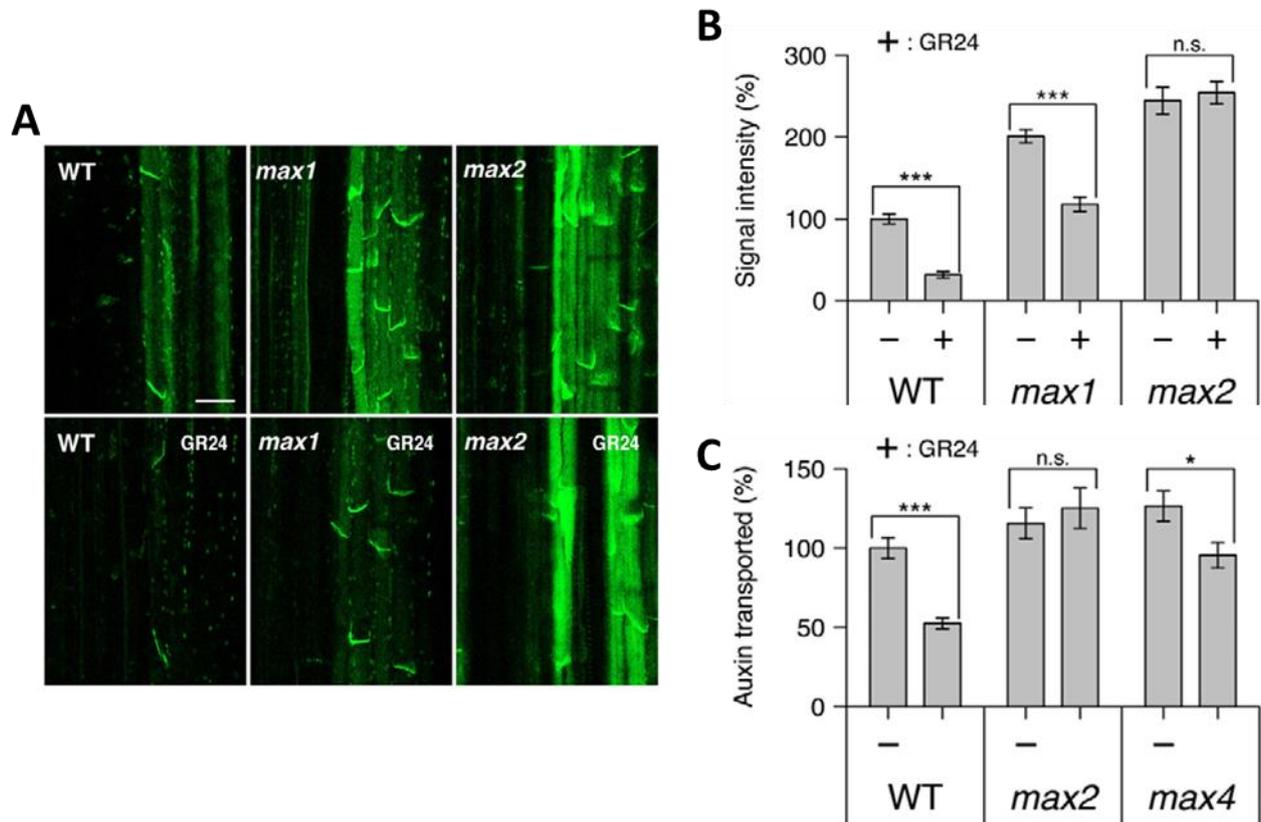


Figure n° I.32: Effet du GR24 sur l'accumulation des protéines PIN1

[A]. Localisation du transporteur PIN1 dans une section de la partie basale de la hampe chez le sauvage (WT) et les mutant *max1* et *max2*, incubés avec une solution contrôle ou de GR24 5 μ M pendant 6 h. Les cellules montrant la présence de la protéine fusion PIN1-GFP sont celles du parenchyme du xylème. **[B].** Quantification de la construction PIN1:GFP dans des cellules du xylème. **[C].** Quantification du transport de l'auxine (IAA radio marquée) après traitement avec une solution contrôle ou de GR24 10 μ M pendant 6 h. (Crawford et al., 2010)

L'une des hypothèses sur les mécanismes en jeu est qu'une protéine responsable de l'activation de l'endocytose de PIN1 est séquestrée dans le noyau par une protéine ciblée par les SLs pour sa dégradation via le complexe SCF^{MAX2} (Figure n°33 ; Waldie et al., 2014).

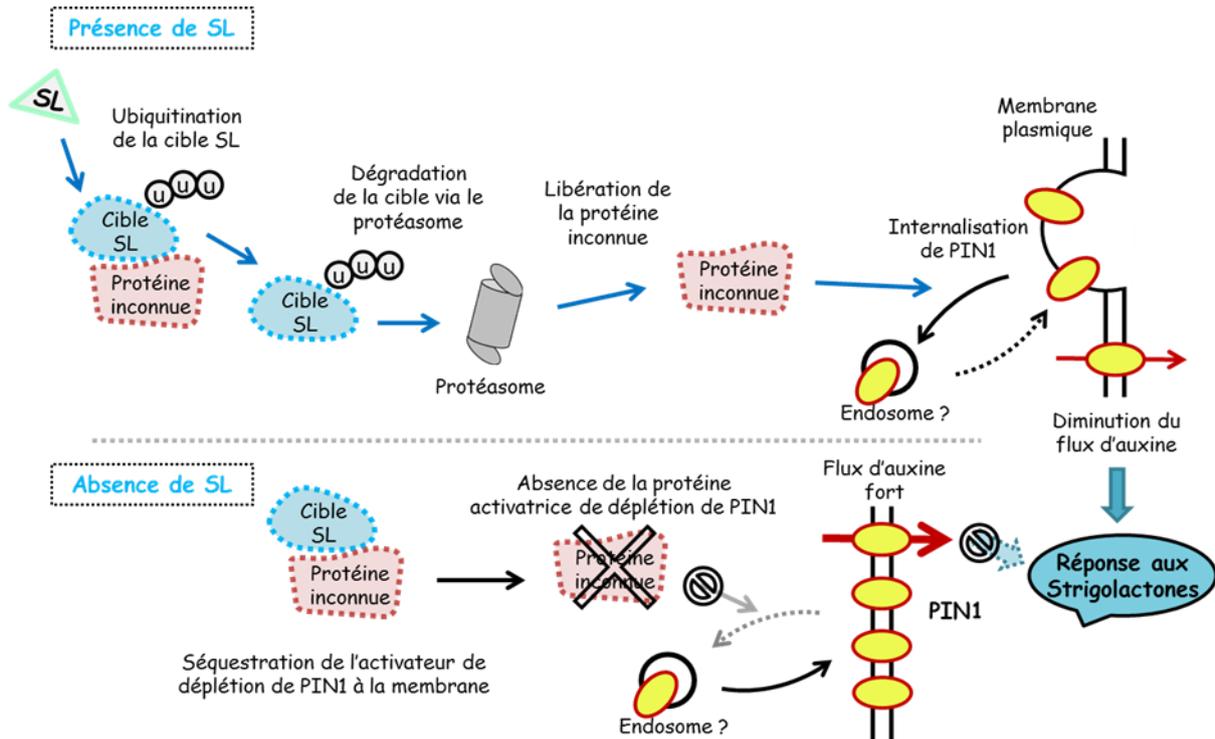


Figure n°1.33 : Hypothèse du contrôle de la réponse aux strigolactones via le modèle de la canalisation du transport de l'auxine (d'après une hypothèse de Waldie et al., 2014)

III.C.2 Modèle de régulation transcriptionnelle

III.C.2.a Les facteurs de transcription de la famille des TCP impliqués dans la ramification

Le facteur de transcription BRC1 (BRANCHED1) de la famille des TCP (TB1 CYCLOIDEA PCF) est connu pour jouer un rôle majeur dans l'établissement de l'architecture aérienne de la plante. Les mutants perte de fonction pour ce gène possèdent un phénotype hyper ramifié chez de nombreuses espèces comme : le maïs (*tb1*, *teosinte branched 1* ; Doebley et al., 1997), le riz (*fc1*, *fine culm 1* ; Takeda et al., 2003), *Arabidopsis* (*brc1* ; Aguilar-Martinez et al., 2007) ou le pois (*Psbrc1* ; Braun et al., 2012). Ce gène a été la cible d'une sélection artificielle par l'homme lors de la domestication du maïs à partir de son ancêtre présumé le téosinte (Doebley et al., 1997).

Le FT BRC1 est exprimé dans le bourgeon et son expression est corrélée avec l'inhibition de celui-ci (Lewis et al., 2008). De plus l'application de GR24 sur les mutants *brc1* d'*Arabidopsis* ne permet pas une restauration du phénotype sauvage (Brewer et al., 2009).

Chez le pois, l'expression de *PsBRC1* est positivement régulée par l'application de GR24, chez le sauvage comme chez les mutants de synthèse (*rms1* et *rms5*), mais pas chez les mutants de réponses aux SLs (Braun et al., 2012). De plus cette régulation se fait sans la nécessité de synthèse de nouvelles protéines, suggérant que *PsBRC1* est une cible directe des strigolactones, agissant comme inhibiteur de la ramification chez le pois (Dun et al., 2012).

Cependant, chez le riz, comme chez le maïs, les gènes *OsTB1* et *FC1* (homologue de *BRC1*) ne sont pas régulés transcriptionnellement par les strigolactones (Minakuchi et al., 2010 ; Guan et al., 2012). De plus chez le riz, un autre facteur de transcription, *OsMADS57*, un répresseur transcriptionnel qui diminue l'expression du gène codant le récepteur aux SLs D14 (Guo et al., 2013), interagit avec *OsTB1* qui inactive *OsMADS57*. Ici *OsTB1* semble agir comme activateur de la signalisation des SLs, il est donc possible que les modes d'action des SLs diffèrent entre monocotylédones et dicotylédones.

III.C.2.b Le modèle transcriptionnel du contrôle de la ramification

Des études d'interactions de protéines chez le riz montrent que D53 est capable d'interagir avec des protéines de la famille de TOPLESS ou des TPR connues pour être des corépresseurs de facteurs de transcription (Jiang et al., 2013). Ces résultats suggèrent l'existence d'autres facteurs de transcriptions encore non identifiés faisant partie de la voie de signalisation des strigolactones.

Le modèle transcriptionnel s'inspire du mode de signalisation observé chez d'autres hormones et suit la séquence modèle suivante (voir figure n°1.34):

- les SLs sont perçues par le récepteur D14/RMS3, le changement de configuration alors engendré permet le recrutement de la protéine à boîte MAX2/RMS4 ainsi que de la protéine cible D53, aboutissant *in fine* à la formation d'un complexe D14/MAX2/D53.
- D53 est ubiquitinée puis adressée au protéasome où elle est alors dégradée.
- l'absence de D53 permet l'expression des gènes de réponses aux strigolactones, dont *BRC1*, facteur de transcription causant l'inhibition du développement du bourgeon.

Les SLs interviennent donc dans la régulation d'un certain nombre de gènes intervenant dans différents processus développementaux.

A ce jour, peu de gènes de réponses aux SLs ont été identifiés par des études transcriptomiques menées chez *Arabidopsis*, et la majorité de ceux qui sont régulés par les SLs sont des gènes de réponses à l'auxine (Mashiguchi et al., 2009).

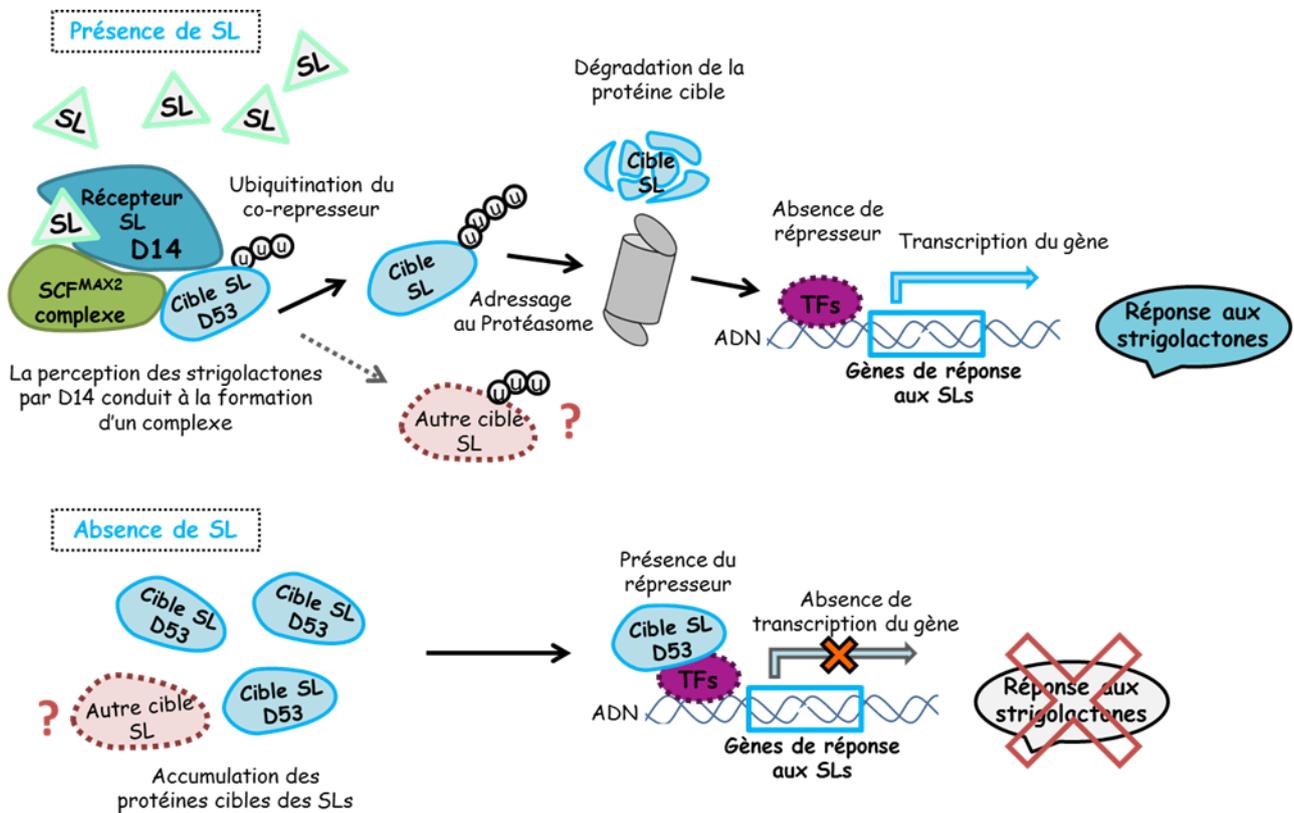


Figure n°I.34: Hypothèse du contrôle de la réponse aux strigolactones via le modèle transcriptionnel

III.D. Origine évolutive de la voie des strigolactones

Les gènes impliqués dans les voies de biosynthèses et de signalisation des strigolactones ont été identifiés chez plusieurs espèces d'angiospermes. Des études des teneurs en SLs ont montré que cette hormone est présente chez un grand nombre de plantes vasculaires, de bryophytes (plantes non vasculaires) ou encore chez certaines algues (Delaux et al., 2012). Les strigolactones semblent donc avoir une origine évolutive ancienne.

III.D.1 Les strigolactones sont des molécules anciennes présentes chez les algues vertes

Les strigolactones sont des molécules présentes chez les angiospermes mais aussi chez les bryophytes. L'étude des bryophytes et en particulier de la mousse *Physcomitrella patens*, est un moyen d'explorer les origines évolutives des SLs (et leur rôle évolutif). En effet les bryophytes actuelles sont les représentants d'un taxon qui a divergé de la lignée verte il y a environ 450 million d'années, les ancêtres des bryophytes étant hypothétiquement les premières plantes à avoir colonisé le milieu terrestre. Leur étude permet de mieux comprendre les mécanismes qui ont permis la conquête du milieu terrestre par les plantes (de Saint Germain et al., 2013).

Les SLs sont présentes chez les mousses, les hépatiques (liverwort) ainsi que chez les algues vertes de type charales (Delaux et al., 2012) il semblerait donc que l'apparition des SLs chez la lignée verte précède la conquête du milieu aérien par les plantes (Figure n°I.35). L'importance de la présence des strigolactones dans la colonisation du milieu terrestre reste une question ouverte. Une autre question reste la connaissance du rôle premier des strigolactones, hormonal ou autre ? Les strigolactones ont un rôle hormonal, sur l'élongation des rhizoïdes chez les charales, les mousses ainsi que chez les hépatiques. Comme les charales n'établissent pas de symbioses avec les champignons MA, il a donc été proposé que les SLs ont initialement joué un rôle hormonal dans l'élongation des rhizoïdes avant d'être recrutées comme molécule signal pour l'établissement d'interactions symbiotiques (Delaux et al., 2012).

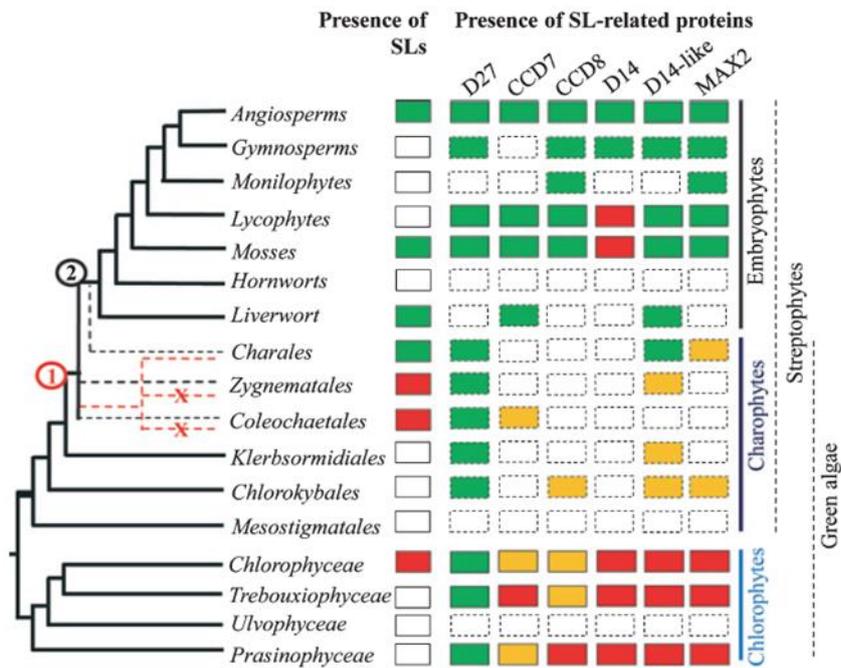


Figure n°1.35: Evolution des gènes impliqués dans le signal strigolactones chez la lignée verte. Arbre phylogénétiques de la lignée verte, les cases indiquent respectivement la présence (vert) ou l'absence (rouge) de SLs ou des protéines impliquées dans le signal SL. Les cases oranges indiquent la présence putative d'homologues chez ces espèces. (1) Et (2) indiquent les hypothèses d'apparition des SLs dans la lignée verte (Delaux et al., 2012).

III.D.2 Rôle des strigolactones chez les plantes non vasculaires

Des études réalisées sur le mutant *Ppccd8* chez *Physcomitrella patens*, montrent qu'il est affecté dans la communication entre mousses (Proust et al., 2011). En effet lorsque plusieurs plantes sauvages se développent dans un même espace, on observe que chacune réduit sa croissance en fonction de la présence de plantes voisines (Figure n°1.36 B.I). Ce n'est pas le cas du mutant *Ppccd8* lorsqu'il est entouré d'autres mutants *Ppccd8* ; cependant, *Ppccd8* est capable de réguler sa propre croissance lorsqu'il est à proximité de mousses sauvages. Le mutant *Ppccd8* est affecté dans sa teneur en SLs, mais capable de les percevoir. Les mousses ont un système de communication via l'exsudation de molécules de SLs dans le milieu qui permet de localiser la présence d'autres mousses à proximité. Les SLs ont aussi un rôle hormonal dans le développement de la mousse. Les SL inhibent l'élongation des *caulonema* via le contrôle de l'élongation cellulaire (Hoffmann et al., 2014), inhibent la ramification du gamétophore (Coudert et al., 2015) et activent l'élongation des rhizoïdes (Delaux et al., 2012)(Figure n°1.36).

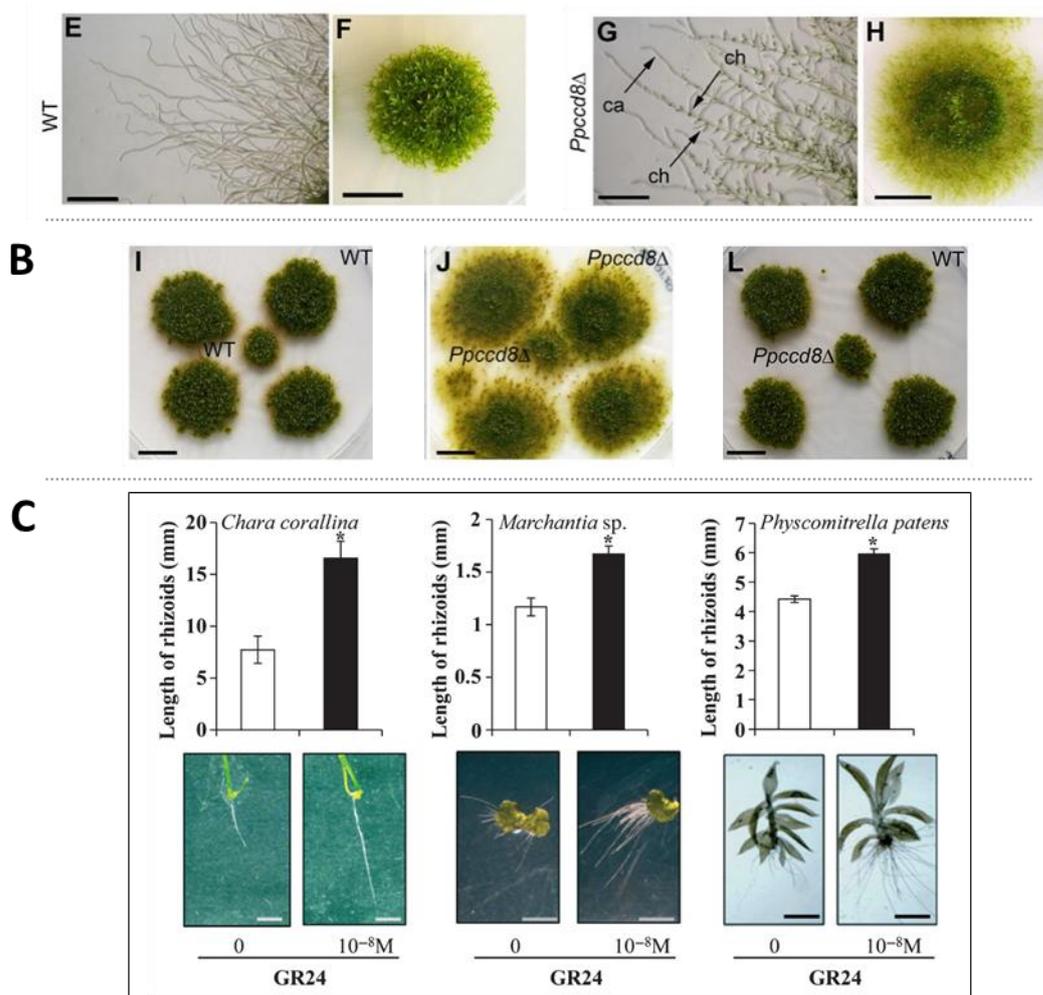


Figure n°1.36: Rôle des strigolactones chez les plantes non vasculaires.

[A] Photos de *Physcomitrella patens*, sauvage (E,F) et mutant *ccd8* (déficient en SLs) (G,H); périphérie d'une plante de 25 jours (E,G); plante de 45j (F,H). (Proust et al., 2011). [B] Photos de *Physcomitrella patens*, sauvage (WT) et mutant *ccd8*, [B.I] le WT entouré de WT, le développement de la plante est stoppé par ces voisins. [B.J] le mutant *ccd8* entouré de mutant *ccd8* a un développement qui ne tient pas compte de la présence de voisins [B.L] Le mutant *ccd8* entouré de WT stoppe sa croissance, il est capable de percevoir les SLs excrétées par le WT,, on observe une restauration du phénotype sauvage (Proust et al., 2011). [C] Effet d'un traitement GR24 sur la taille des rhizoïdes (Delaux et al., 2012).

III.E. Résumé du modèle actuel de contrôle de la ramification chez le pois

Les gènes impliqués dans la voie strigolactones sont assez bien conservés entre les différentes espèces (voir Figure n°1.30). Cependant, bien que des avancées majeures aient permis d'identifier ces dernières années de nombreux acteurs de la voie de signalisation des strigolactones, les mécanismes de transduction de ce signal sont encore à explorer notamment le rôle et les mécanismes d'actions des protéines SMXLs ciblées pour être dégradées dans la voie SLs.

Le rôle de l'auxine, dans le contrôle de la ramification fait toujours l'objet de débat :

(1) l'auxine est proposée comme signal permettant la régulation des **deux seconds messagers** : strigolactones et cytokinines qui régulent la dormance du bourgeon.

(2) c'est l'export d'auxine, grâce à la régulation de son **transport** par les strigolactones qui permet la transition du bourgeon de l'état dormant à l'état actif.

Ces **deux modèles** ne sont pas forcément antagonistes et peuvent agir en synergie dans le contrôle de la ramification. Cependant chez le pois, il semblerait que le rôle des strigolactones dans le contrôle de la ramification soit **indépendant du transport polarisé** de l'auxine. En effet les mutants *rms* ne semblent pas affectés dans le transport polarisé de l'auxine (Brewer et al., 2009). Des études montrent que l'application du GR24 (strigolactone synthétique) n'affecte pas le transport de l'auxine chez le pois (Brewer et al., 2009). De plus en condition de déplétion en auxine dans la tige, *in vitro* ou *in planta*, les strigolactones conservent leur pouvoir d'inhibition de la croissance des bourgeons (Brewer et al., 2015).

Le modèle actuel du **contrôle de la ramification** chez le pois, présenté -Figure n°1.37 suggère que l'auxine régule la synthèse de strigolactones et de cytokinines, et que le niveau de transcrits de *PsBRC1* dans le bourgeon axillaire est un **intégrateur de plusieurs signaux** (SL, CK, sucre, lumière...). Un signal de **rétro-contrôle** tige-racine *RMS2*-dépendant interviendrait dans le maintien de l'**homéostasie** du **système**.

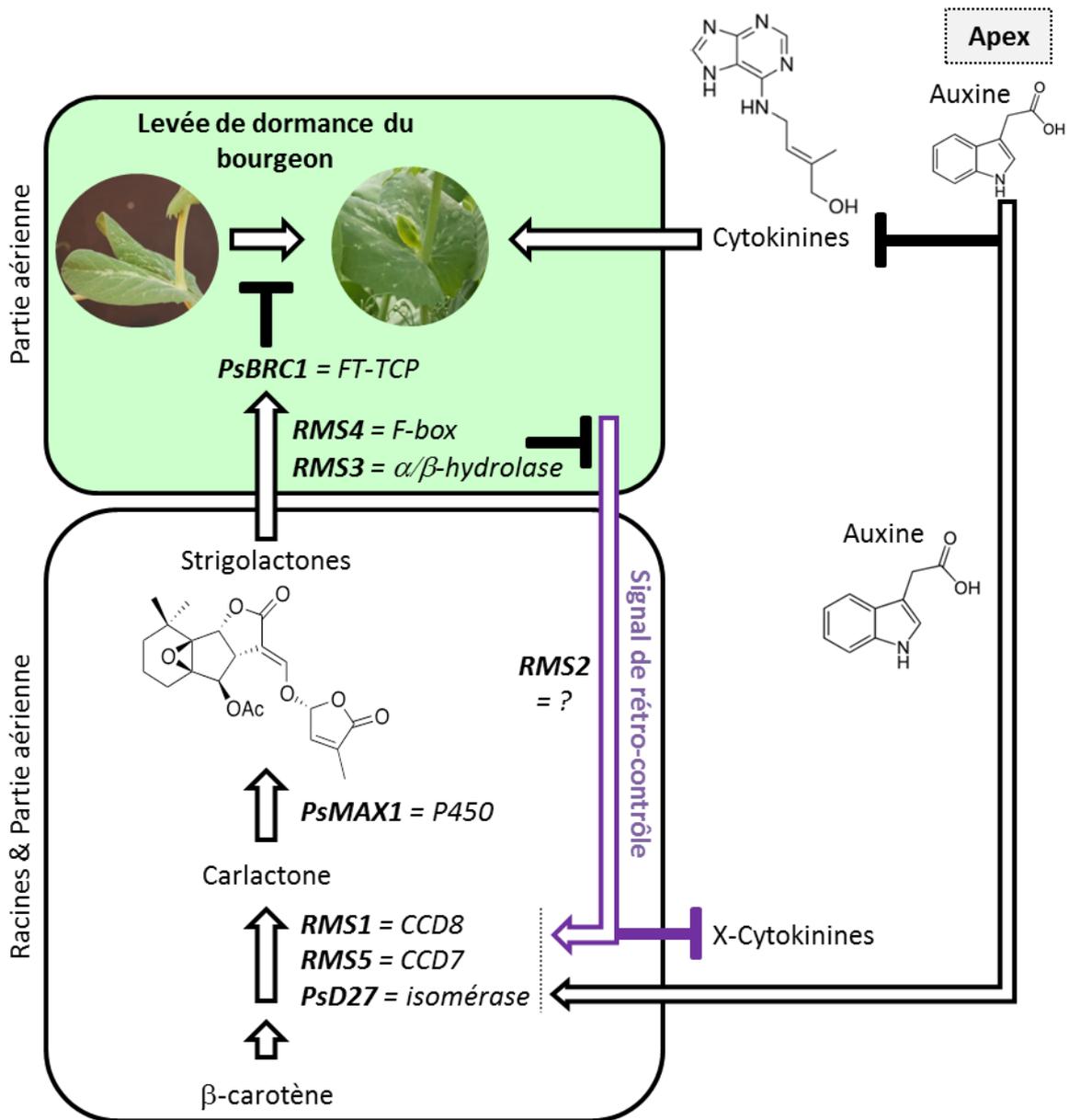


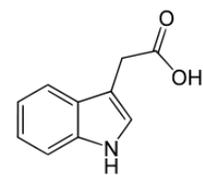
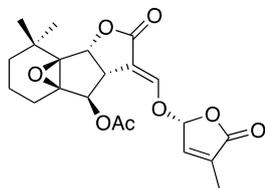
Figure n°I.37: Résumé du modèle du contrôle de la ramification chez le pois.

Chez le pois, la régulation du contrôle de la ramification par les strigolactones se fait via le facteur de transcription BRC1 qui maintient les bourgeons dormants.

CHAPITRE n°1

Partie n° IV : Article de revue

Strigolactone biosynthesis and signaling in plant development



DEVELOPMENT AT A GLANCE

Strigolactone biosynthesis and signaling in plant development

Mauricio Lopez-Obando¹, Yasmine Ligerot^{1,2}, Sandrine Bonhomme¹, François-Didier Boyer^{1,3} and Catherine Rameau^{1,*}

ABSTRACT

Strigolactones (SLs), first identified for their role in parasitic and symbiotic interactions in the rhizosphere, constitute the most recently discovered group of plant hormones. They are best known for their role in shoot branching but, more recently, roles for SLs in other aspects of plant development have emerged. In the last five years, insights into the SL biosynthetic pathway have also been revealed and several key components of the SL signaling pathway have been identified. Here, and in the accompanying poster, we summarize our current understanding of the SL pathway and discuss how this pathway regulates plant development.

¹Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA, AgroParisTech, CNRS, Université Paris-Saclay, RD10, 78026 Versailles Cedex, France. ²Université Paris Sud, Orsay Cedex F-91405, France. ³Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS UPR2301, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 1 av. de la Terrasse, F-91198 Gif-sur-Yvette, France.

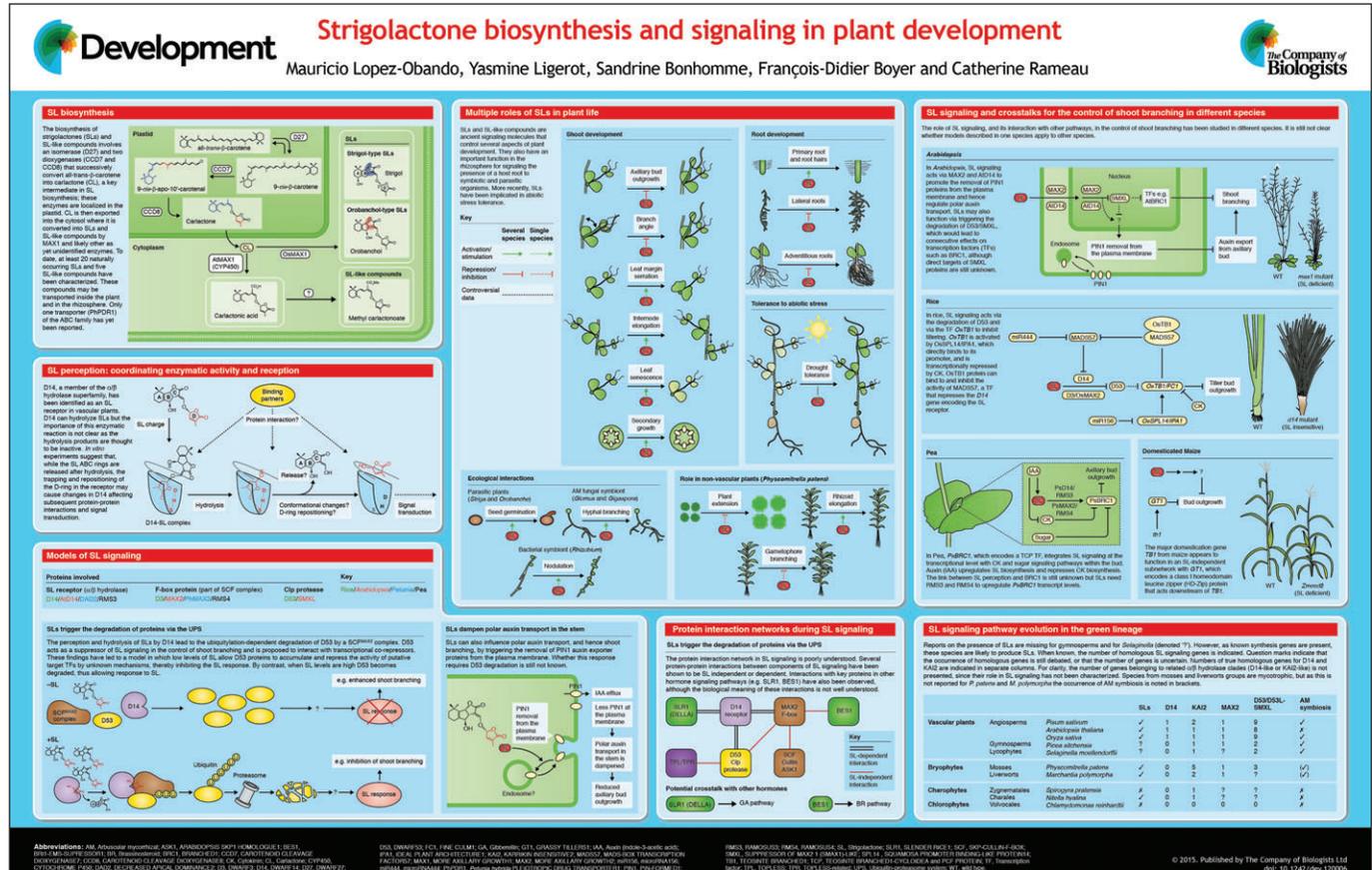
*Author for correspondence (catherine.rameau@versailles.inra.fr)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/3.0), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

KEY WORDS: Hormone signaling, Karrikins, Shoot branching, Strigolactone, Ubiquitin proteasome system

Introduction

Strigolactones (SLs) are evolutionarily ancient plant signaling molecules that play roles in diverse organisms [such as bryophytes, angiosperms and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi] and in several aspects of plant development. The name ‘strigolactone’ comes from the first identified role of these compounds as stimulants of seed germination in species of the parasitic weed *Striga* (Cook et al., 1966) and from their lactone ring-containing chemical structure. In 2008, SLs were shown to play a role in repressing shoot branching and hence were included in the list of plant hormones that modulate plant development. These early studies showed that SL-deficient mutants are highly branched and that application of the synthetic SL GR24 inhibits axillary bud outgrowth (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008). Since then, novel functions of SLs in plant development have continuously been identified (Brewer et al., 2013; Ruyter-Spira et al., 2013). Furthermore, parts of the SL biosynthesis pathway have recently been deciphered, with the



DEVELOPMENT

discovery of carlactone (CL) as a key intermediate for SL biosynthesis as well as of novel bioactive SL-like compounds (Abe et al., 2014; Al-Babili and Bouwmeester, 2015; Seto et al., 2014). Receptors for SLs, and some of their downstream effectors, have also been identified (Hamiaux et al., 2012; Xiong et al., 2014).

Here, we summarize our current understanding of the SL biosynthesis and signaling pathways, we describe the different functions of SLs during plant development, and we discuss the evolutionary origin of SL signaling. Models of SL signaling and crosstalk with other plant signaling pathways in the context of shoot branching are also presented.

Chemical structure and biosynthesis of natural SLs

The structural core of SLs is a tricyclic lactone (containing rings that are referred to as ABC), with different carbon A-ring sizes and substitution patterns on AB-rings. This core is connected via an enol ether bridge to an invariable α,β -unsaturated furanone moiety (termed the D-ring). To date, at least 20 naturally occurring SLs have been identified and characterized in root exudates of various land plants (Al-Babili and Bouwmeester, 2015; Tokunaga et al., 2015). They can be separated into two types – strigol and orobanchol – according to the stereochemistry of the B–C-ring junction, with both having a conserved *R*-configuration at the C-2' position. The bioactiphore responsible for the various SL bioactivities resides within the region that connects the D-ring to the core, which can differ according to SL type (Zwanenburg and Pospíšil, 2013).

Recent studies have provided some insights into the SL biosynthesis pathway. SLs are synthesized from the key precursor CL, which is derived from all-trans β -carotene via the action of an isomerase (D27) and two carotenoid cleavage dioxygenases (CCD7 and CCD8). These steps of the SL biosynthesis pathway take place in the plastid and the resulting CL is then exported into the cytoplasm. The subsequent steps involve CL oxidation, further ring closures and functionalizations involving members of the CYP711 family (MAX1) (Zhang et al., 2014), eventually giving rise to SLs and SL-like compounds. In *Arabidopsis*, the unique enzyme MAX1 is able to transform CL to carlactonoic acid, which is further transformed into the SL-like compound methyl carlactonoate (MeCLA) by an unknown enzyme (Abe et al., 2014). Other SL-like compounds, with a CL-type structure lacking the canonical ABC-rings (Kim et al., 2014; Ueno et al., 2014), have been discovered in different plants, highlighting the structural diversity of this class of compounds. Once synthesized, all of these compounds may be transported within the plant and in the rhizosphere. PhPDR1, a member of the ABC family, has been identified as a potential SL transporter (Kretzschmar et al., 2012; Sasse et al., 2015).

SL biosynthesis, which occurs mainly in roots but also in the stem, is tightly regulated (Al-Babili and Bouwmeester, 2015). Phosphate starvation, for example, strongly induces SL biosynthesis (López-Ráez et al., 2008). In addition, high levels of SL biosynthesis gene transcripts (in particular *CCD7* and *CCD8*) in SL-deficient and SL-insensitive mutants in several species indicate that there is feedback regulation of SL biosynthesis (Hayward et al., 2009; Proust et al., 2011).

SL perception: coordinating enzymatic activity and reception

Using genetic approaches, genes encoding SL receptors have been identified in several vascular land plants, including petunia (where the receptor is named DAD2), rice (D14) and *Arabidopsis* (AtD14) (Arite et al., 2009; Hamiaux et al., 2012; Waters et al., 2012). These proteins belong to a clade of the α/β -hydrolase enzyme superfamily that includes DWARF14 (D14) and GID1, which is a gibberellin

receptor that has lost its enzymatic activity. It was shown, using *in vitro* enzymatic studies, that D14 proteins can hydrolyze the synthetic SL GR24 into inactive ABC- and D-ring parts (Hamiaux et al., 2012; Seto and Yamaguchi, 2014; Xiong et al., 2014). Importantly, it was shown that the SL-like molecule MeCLA can also interact *in vitro* with the AtD14 SL receptor and be hydrolyzed, despite not having the canonical four-ring structure (Abe et al., 2014). The enzymatic activity of D14 proteins is mediated by a conserved catalytic triad, Ser-His-Asp (S-H-D), that has hydrolase activity. Additionally, the catalytic triad seems to be important for the biological response of D14 proteins since mutated proteins, at least those harboring mutations at the Ser residue, cannot complement the *d14* mutant branching phenotype, as shown in petunia (Hamiaux et al., 2012).

The mechanism of SL reception by D14 is still not well understood; in particular, it is unclear whether SL hydrolysis by the receptor is of importance as the hydrolysis products have been shown to be biologically inactive. However, it has been proposed that, following hydrolysis, the D-OH part of SLs forms a complex with D14 thereby allowing the recruitment of binding partners (de Saint Germain et al., 2013; Nakamura et al., 2013).

It should be noted that the D14 SL receptor clade is closely related to the KARRIKIN INSENSITIVE 2/HYPOSENSITIVE TO LIGHT (KAI2/HTL) clade. In *Arabidopsis*, KAI2 is able to perceive butenolide-containing rings, including the smoke-derived karrikin (KAR) compounds, which, similar to SLs, have a lactone D-ring (Guo et al., 2013b; Smith and Li, 2014; Waters et al., 2012). Interestingly, the SL and KAR pathways modulate plant development in distinct ways but both require the F-box protein MAX2 (D3) to mediate their responses (Nelson et al., 2011).

SL signaling: the role of UPS-dependent protein degradation

Most plant hormone signaling pathways involve the targeting of proteins for degradation through the ubiquitin-proteasome system (UPS) (Kelley and Estelle, 2012). There are strong arguments to suggest that the UPS is also involved in SL signaling (Bennett and Leyser, 2014). In particular, the F-box protein MAX2, which is part of a SKP1–CULLIN–F-BOX (SCF) ubiquitin ligase protein complex, appears to play a key role in mediating SL-triggered protein degradation (Stimberg et al., 2007; Zhao et al., 2014). Recently, the protein D53 was identified in rice and shown to be targeted for degradation after SL treatment; this degradation was not observed when the proteasome inhibitor MG132 was used (Jiang et al., 2013; Zhou et al., 2013). The rice *d53* semi-dominant mutant, which expresses a mutated protein that is resistant to degradation by SL treatment, is SL insensitive and shows high tillering/branching (Jiang et al., 2013; Zhou et al., 2013). Furthermore, it was shown that a reduction in *D53* expression in *d3* and *d14* mutant backgrounds can restore a non-branched wild-type phenotype (Jiang et al., 2013; Zhou et al., 2013). Together, these data indicate that D53 acts as a suppressor of SL signaling in the control of shoot branching (Jiang et al., 2013; Zhou et al., 2013).

This idea led to a model in which MAX2 interacts with D14 in an SL-dependent manner, and this leads to the ubiquitylation-dependent degradation of D53 by the SCF^{MAX2} complex. However, nothing is currently known about the subsequent effects of D53 degradation and how this protein acts to suppress SL signaling. D53 belongs to a small family of proteins [SMAX1-like (SMXL)] that show some homology with class I CIP ATPase enzymes (Stanga et al., 2013). The presence of potential ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression (EAR) motifs in D53 and its ability to interact with

topless-related (TPR) proteins, which are known transcriptional corepressors, suggest that a D53-TPR complex could repress the transcription of downstream targets (Bennett and Leyser, 2014; Jiang et al., 2013; Smith and Li, 2014), but this has not yet been demonstrated. Other proteins that are subject to SL-triggered degradation, or other transcription factors that lie directly downstream of D53/SMXL proteins, are still unknown (Smith and Li, 2014). BES1, a positive regulator in the brassinosteroid signaling pathway, can also be targeted for degradation via SCF^{MAX2}, although SL is not needed for a BES1-MAX2 interaction (Wang et al., 2013). An SL-dependent interaction between SLR1, a rice gibberellin signaling repressor (DELLA protein), and D14 has also been shown but the biological significance of this interaction is not yet understood (Nakamura et al., 2013).

Models for SL signaling in the control of shoot branching

SLs are best known for their role in repressing shoot branching, and two mechanisms have been proposed to explain this role. In rice and pea, SLs were shown to act via their effects on the TCP transcription factor OsTB1/PsBRC1 to repress axillary bud outgrowth (Braun et al., 2012; Minakuchi et al., 2010). This transcription factor acts as a key integrator of several other pathways, such as the cytokinin pathway and the recently proposed sucrose signaling pathway in pea (Mason et al., 2014; Rameau et al., 2015). Interestingly, the maize ortholog (*TBI*) of the gene encoding this transcription factor seems to act independently of SLs to repress shoot branching (Guan et al., 2012). In rice, other transcription factors, such as MADS57 and IPA1/OsSPL14, that are involved in shoot branching have also been connected to key components of the SL signaling pathway, but whether these various transcription factors mediate SL signaling, and if or how they lie downstream of the D14-D3-D53 axis, are still not clear (Guo et al., 2013a; Lu et al., 2013).

Because SL-deficient mutants are more branched than *brc1* mutants (Braun et al., 2012; Minakuchi et al., 2010), there is very likely a BRC1-independent effect of SLs on shoot branching. Indeed, in *Arabidopsis* a non-transcriptional mechanism relies on SLs triggering the rapid removal of the auxin efflux carrier PIN-FORMED 1 (PIN1) from the plasma membrane of stem xylem parenchyma cells (Shinohara et al., 2013). This effect of SLs would increase competition between buds to export auxin into the main auxin stream, based on an auxin transport canalization-dependent mechanism (Shinohara et al., 2013; Waldie et al., 2014).

Whether both of these mechanisms regulate shoot branching or act at different stages of bud outgrowth is still debated. Moreover, whether these downstream targets of SL signaling are dependent on the UPS-mediated degradation of D53 remains to be clarified.

Key developmental roles for SL signaling

SLs control numerous other aspects of plant development. Pea, *Arabidopsis*, rice and petunia mutants with defects in SL biosynthesis or SL responses were first identified based on their increased shoot branching phenotypes and their dwarfism (Beveridge et al., 1996; Ishikawa et al., 2005; Napoli, 1996; Stirnberg et al., 2002). Less obvious phenotypes, such as reduced secondary growth, delay in leaf senescence or modified root architecture, were later identified (Brewer et al., 2013; Ueda and Kusaba, 2015; Yamada et al., 2014). SLs can also modulate tolerance to abiotic stresses (drought) (Ha et al., 2014). Direct or indirect roles for SLs in biotic stress-related responses have been suggested to act via crosstalk with other hormones (Al-Babili and Bouwmeester, 2015; Brewer et al., 2013; Stes et al., 2015). Thus, like other plant hormones, SLs can modulate multiple aspects of

plant growth and development, either independently or via interactions with other hormonal and environmental pathways. The observed diversity of D53-like/SMXL proteins may contribute to the multiple processes controlled by SLs in plant development.

The origin and evolution of SL signaling

Studies have shown that species of the fresh water algae *Nitella* (Charales) are able to synthesize SLs (Delaux et al., 2012), suggesting that the SL pathway originated prior to the diversification of land plants (embryophytes). Since Charales do not establish symbiosis with AM fungi, it has been proposed that SLs first played a hormonal role during rhizoid elongation and were later recruited for symbiotic interactions (Delaux et al., 2012). In the moss *Physcomitrella patens*, SLs regulate protonema filament extension (Proust et al., 2011) as well as leafy shoot branching (Coudert et al., 2015). Furthermore, although SLs are detected in basal plants (Delaux et al., 2012), the KAI2/HTL clade appeared before the D14 clade, suggesting that D14 proteins might have been later selected as SL receptors during land plant evolution for novel developmental processes. Intriguingly, a high number of *KAI2/HTL* genes are present in the *P. patens* genome compared with angiosperms but also with *Selaginella* and *Marchantia* (Delaux et al., 2012). A similar *KAI2/HTL* gene expansion is found in parasitic plants (Conn et al., 2015; Tsuchiya et al., 2015). Interestingly, in these species, it was suggested that some of these KAI2/HTL homologs could be SL receptors (Conn et al., 2015). It should be noted that, despite SLs being detected in basal plants, the SL signaling pathway is poorly described in these plants. Recently, it was shown that KAI2/HTL homologs of *Selaginella* and *Marchantia* do not complement *Arabidopsis d14* mutant phenotypes, nor some phenotypes of *Arabidopsis kai2* (Waters et al., 2015). This leaves open the question of SL receptor identity in basal plants.

Perspectives

Despite significant progress, many key questions regarding SL biosynthesis, perception and signaling remain to be answered. The enzymatic activity of the SL receptor has been conserved during evolution, indicating that it plays an essential function, but this function is puzzling as the hydrolysis products (the ABC and D-OH parts) are known to be inactive. Is this enzymatic function of the SL receptor essential for SL reception and signaling? Does it play an important role in SL homeostasis? Furthermore, if SL perception truly involves an SL degradation process, are there other mechanisms of SL inactivation? The link between SL perception and downstream responses is also unclear. Although some downstream transcription factors have been identified, it is often noted that very few genes are transcriptionally regulated after SL application, at least over a short time frame, compared with other plant hormones (Smith and Li, 2014; Waldie et al., 2014), suggesting that non-transcriptional mechanisms might also be important in mediating the response to SL. Further investigation into both transcriptional and non-transcriptional responses and their importance will be key.

Understanding the molecular events acting downstream of D53/SMXL proteins will also be essential. In particular, it is unknown whether other post-translational modifications, such as phosphorylation and/or glycosylation, are required for the regulation of these downstream targets (Chen et al., 2014). The protein-protein interaction network in SL signaling also appears to be quite complex, and further understanding of these interactions might help to explain the observed crosstalk between the SL pathway and other plant signaling pathways. There is no doubt that the coming years will bring answers to the key questions in this exciting field.

Acknowledgements

We thank Alexandre de Saint Germain and Rajeev Kumar for comments on the manuscript. The IJPB benefits from the support of the Labex Saclay Plant Sciences-SPS [ANR-10-LABX-0040-SPS].

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Funding

We thank the Agence Nationale de la Recherche [contract ANR-12-BSV6-004-01] and the Stream COST Action FA1206 for financial support.

Development at a Glance

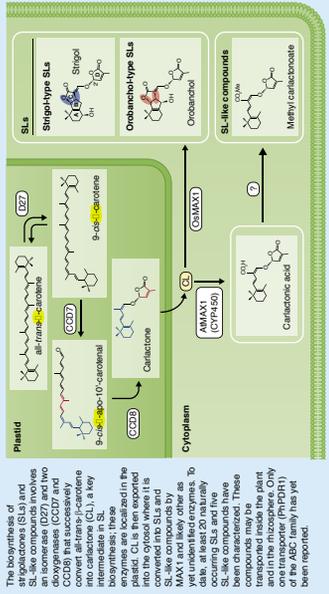
A high-resolution version of the poster is available for downloading in the online version of this article at <http://dev.biologists.org/content/142/21/3615/F1.poster.jpg>

References

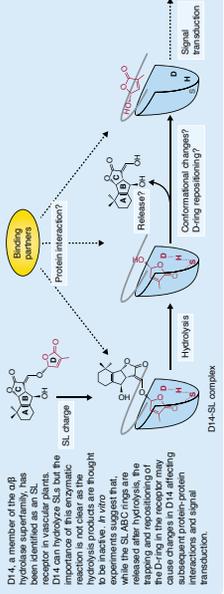
- Abe, S., Sado, A., Tanaka, K., Kisugi, T., Asami, K., Ota, S., Kim, H. I., Yoneyama, K., Xie, X., Ohnishi, T. et al. (2014). Carlactone is converted to carlactonic acid by MAX1 in Arabidopsis and its methyl ester can directly interact with AtD14 in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 18084-18089.
- Al-Babili, S. and Bouwmeester, H. J. (2015). Strigolactones, a novel carotenoid-derived plant hormone. *Annu. Rev. Plant Biol.* **66**, 161-186.
- Arite, T., Umehara, M., Ishikawa, S., Hanada, A., Maekawa, M., Yamaguchi, S. and Kyoizuka, J. (2009). d14, a strigolactone-insensitive mutant of rice, shows an accelerated outgrowth of tillers. *Plant Cell Physiol.* **50**, 1416-1424.
- Bennett, T. and Leyser, O. (2014). Strigolactone signalling: standing on the shoulders of DWARFs. *Curr. Opin. Plant Biol.* **22**, 7-13.
- Beveridge, C. A., Ross, J. J. and Murfet, I. C. (1996). Branching in pea - action of genes Rms3 and Rms4. *Plant Physiol.* **110**, 859-865.
- Braun, N., de Saint Germain, A., Pillot, J.-P., Boutet-Mercery, S., Dalmais, M., Antoniadis, I., Li, X., Maia-Grondard, A., Le Signor, C., Bouteiller, N. et al. (2012). The pea TCP transcription factor PsBRC1 acts downstream of Strigolactones to control shoot branching. *Plant Physiol.* **158**, 225-238.
- Brewer, P. B., Koltai, H. and Beveridge, C. A. (2013). Diverse roles of strigolactones in plant development. *Mol. Plant* **6**, 18-28.
- Chen, F., Jiang, L., Zheng, J., Huang, R., Wang, H., Hong, Z. and Huang, Y. (2014). Identification of differentially expressed proteins and phosphorylated proteins in rice seedlings in response to strigolactone treatment. *PLoS ONE* **9**, e93947.
- Conn, C. E., Bythell-Douglas, R., Neumann, D., Yoshida, S., Whittington, B., Westwood, J. H., Shirasu, K., Bond, C. S., Dyer, K. A. and Nelson, D. C. (2015). Convergent evolution of strigolactone perception enabled host detection in parasitic plants. *Science* **349**, 540-543.
- Cook, C. E., Whichard, L. P., Turner, B., Wall, M. E. and Egle, G. H. (1966). Germination of witchweed (*Striga lutea* Lour): isolation and properties of a potent stimulant. *Science* **154**, 1189-1190.
- Coudert, Y., Palubicki, W., Ljung, K., Novak, O., Leyser, O. and Harrison, C. J. (2015). Three ancient hormonal cues co-ordinate shoot branching in a moss. *eLife* **4**, e06808.
- de Saint Germain, A., Bonhomme, S., Boyer, F.-D. and Rameau, C. (2013). Novel insights into strigolactone distribution and signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **16**, 583-589.
- Delaux, P.-M., Xie, X., Timme, R. E., Puech-Pages, V., Dunand, C., Lecompte, E., Delwiche, C. F., Yoneyama, K., Bécard, G. and Séjalon-Delmas, N. (2012). Origin of strigolactones in the green lineage. *New Phytol.* **195**, 857-871.
- Gomez-Roldan, V., Feras, S., Brewer, P. B., Puech-Pagès, V., Dun, E. A., Pillot, J.-P., Letisse, F., Matusova, R., Danoun, S., Portais, J.-C. et al. (2008). Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**, 189-194.
- Guan, J. C., Koch, K. E., Suzuki, M., Wu, S., Latshaw, S., Petrucci, T., Goulet, C., Klee, H. J. and McCarty, D. R. (2012). Diverse roles of strigolactone signaling in maize architecture and the uncoupling of a branching-specific subnetwork. *Plant Physiol.* **160**, 1303-1317.
- Guo, S., Xu, Y., Liu, H., Mao, Z., Zhang, C., Ma, Y., Zhang, Q., Meng, Z. and Chong, K. (2013a). The interaction between OsMADS57 and OsTB1 modulates rice tillering via DWARF14. *Nat. Commun.* **4**, 1566.
- Guo, Y., Zheng, Z., La Clair, J. J., Chory, J. and Noel, J. P. (2013b). Smoke-derived karrikin perception by the alpha/beta-hydrolase KAI2 from Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 8284-8289.
- Ha, C. V., Leyva-Gonzalez, M. A., Osakabe, Y., Tran, U. T., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Tanaka, M., Seki, M., Yamaguchi, S., Dong, N. V. et al. (2014). Positive regulatory role of strigolactone in plant responses to drought and salt stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 851-856.
- Hamiaux, C., Drummond, R. S. M., Janssen, B. J., Ledger, S. E., Cooney, J. M., Newcomb, R. D. and Snowden, K. C. (2012). DAD2 is an alpha/beta hydrolase likely to be involved in the perception of the plant branching hormone, strigolactone. *Curr. Biol.* **22**, 2032-2036.
- Hayward, A., Stirnberg, P., Beveridge, C. and Leyser, O. (2009). Interactions between auxin and strigolactone in shoot branching control. *Plant Physiol.* **151**, 400-412.
- Ishikawa, S., Maekawa, M., Arite, T., Onishi, K., Takamura, I. and Kyoizuka, J. (2005). Suppression of tiller bud activity in tillering dwarf mutants of rice. *Plant Cell Physiol.* **46**, 79-86.
- Jiang, L., Liu, X., Xiong, G., Liu, H., Chen, F., Wang, L., Meng, X., Liu, G., Yu, H., Yuan, Y. et al. (2013). DWARF53 acts as a repressor of strigolactone signalling in rice. *Nature* **504**, 401-405.
- Kelley, D. R. and Estelle, M. (2012). Ubiquitin-mediated control of plant hormone signaling. *Plant Physiol.* **160**, 47-55.
- Kim, H. I., Kisugi, T., Khetkam, P., Xie, X., Yoneyama, K., Uchida, K., Yokota, T., Nomura, T., McElean, C. S. P. and Yoneyama, K. (2014). Avenaol, a germination stimulant for root parasitic plants from *Avena strigosa*. *Phytochemistry* **103**, 85-88.
- Kretzschmar, T., Kohlen, W., Sasse, J., Borghi, L., Schlegel, M., Bachelier, J. B., Reinhardt, D., Bours, R., Bouwmeester, H. J. and Martinoia, E. (2012). A petunia ABC protein controls strigolactone-dependent symbiotic signalling and branching. *Nature* **483**, 341-344.
- López-Ráez, J. A., Charnikhova, T., Gómez-Roldán, V., Matusova, R., Kohlen, W., De Vos, R., Verstappen, F., Puech-Pages, V., Bécard, G., Mulder, P. et al. (2008). Tomato strigolactones are derived from carotenoids and their biosynthesis is promoted by phosphate starvation. *New Phytol.* **178**, 863-874.
- Lu, Z., Yu, H., Xiong, G., Wang, J., Jiao, Y., Liu, G., Jing, Y., Meng, X., Hu, X., Qian, Q. et al. (2013). Genome-wide binding analysis of the transcription activator IDEAL PLANT ARCHITECTURE1 reveals a complex network regulating rice plant architecture. *Plant Cell* **25**, 3743-3759.
- Mason, M. G., Ross, J. J., Babst, B. A., Wienclaw, B. N. and Beveridge, C. A. (2014). Sugar demand, not auxin, is the initial regulator of apical dominance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 6092-6097.
- Minakuchi, K., Kameoka, H., Yasuno, N., Umehara, M., Luo, L., Kobayashi, K., Hanada, A., Ueno, K., Asami, T., Yamaguchi, S. et al. (2010). FINE CULM1 (FC1) works downstream of strigolactones to inhibit the outgrowth of axillary buds in rice. *Plant Cell Physiol.* **51**, 1127-1135.
- Nakamura, H., Xue, Y.-L., Miyakawa, T., Hou, F., Qin, H.-M., Fukui, K., Shi, X., Ito, E., Ito, S., Park, S.-H. et al. (2013). Molecular mechanism of strigolactone perception by DWARF14. *Nat. Commun.* **4**, 2613.
- Napoli, C. (1996). Highly branched phenotype of the petunia dad1-1 mutant is reversed by grafting. *Plant Physiol.* **111**, 27-37.
- Nelson, D. C., Scaffidi, A., Dun, E. A., Waters, M. T., Flematti, G. R., Dixon, K. W., Beveridge, C. A., Ghisalberti, E. L. and Smith, S. M. (2011). F-box protein MAX2 has dual roles in karrikin and strigolactone signaling in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 8897-8902.
- Proust, H., Hoffmann, B., Xie, X., Yoneyama, K., Schaefer, D. G., Yoneyama, K., Nogue, F. and Rameau, C. (2011). Strigolactones regulate protonema branching and act as a quorum sensing-like signal in the moss *Physcomitrella patens*. *Development* **138**, 1531-1539.
- Rameau, C., Bertheloot, J., Leduc, N., Andrieu, B., Foucher, F. and Sakr, S. (2015). Multiple pathways regulate shoot branching. *Front. Plant Sci.* **5**, 741.
- Ruyter-Spira, C., Al-Babili, S., van der Krol, S. and Bouwmeester, H. (2013). The biology of strigolactones. *Trends Plant Sci.* **18**, 72-83.
- Sasse, J., Simon, S., Gübeli, C., Liu, G.-W., Cheng, X., Friml, J., Bouwmeester, H., Martinoia, E. and Borghi, L. (2015). Asymmetric localizations of the ABC transporter PaPDR1 trace paths of directional strigolactone transport. *Curr. Biol.* **25**, 647-655.
- Seto, Y. and Yamaguchi, S. (2014). Strigolactone biosynthesis and perception. *Curr. Opin. Plant Biol.* **21**, 1-6.
- Seto, Y., Sado, A., Asami, K., Hanada, A., Umehara, M., Akiyama, K. and Yamaguchi, S. (2014). Carlactone is an endogenous biosynthetic precursor for strigolactones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 1640-1645.
- Shinohara, N., Taylor, C. and Leyser, O. (2013). Strigolactone can promote or inhibit shoot branching by triggering rapid depletion of the auxin efflux protein PIN1 from the plasma membrane. *PLoS Biol.* **11**, e1001474.
- Smith, S. M. and Li, J. (2014). Signalling and responses to strigolactones and karrikins. *Curr. Opin. Plant Biol.* **21**, 23-29.
- Stanga, J. P., Smith, S. M., Briggs, W. R. and Nelson, D. C. (2013). SUPPRESSOR OF MORE AXILLARY GROWTH2 1 controls seed germination and seedling development in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **163**, 318-330.
- Stes, E., Depuydt, S., De Keyser, A., Matthys, C., Audenaert, K., Yoneyama, K., Werbrouck, S., Goormachtig, S. and Vereecke, D. (2015). Strigolactones as an auxiliary hormonal defence mechanism against leafy gall syndrome in Arabidopsis thaliana. *J. Exp. Bot.* **66**, 5123-5134.
- Stirnberg, P., van de Sande, K. and Leyser, H. M. O. (2002). MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in Arabidopsis. *Development* **129**, 1131-1141.
- Stirnberg, P., Furner, I. and Ottoline Leyser, H. M. (2007). MAX2 participates in an SCF complex which acts locally at the node to suppress shoot branching. *Plant J.* **50**, 80-94.
- Tokunaga, T., Hayashi, H. and Akiyama, K. (2015). Medicaol, a strigolactone identified as a putative didehydro-orobanchol isomer, from *Medicago truncatula*. *Phytochemistry* **111**, 91-97.

- Tsuchiya, Y., Yoshimura, M., Sato, Y., Kuwata, K., Toh, S., Holbrook-Smith, D., Zhang, H., McCourt, P., Itami, K., Kinoshita, T. et al. (2015). Probing strigolactone receptors in *Striga hermonthica* with fluorescence. *Science* **349**, 864-868.
- Ueda, H. and Kusaba, M. (2015). Strigolactone regulates leaf senescence in concert with ethylene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **169**, 138-147.
- Ueno, K., Furumoto, T., Umeda, S., Mizutani, M., Takikawa, H., Batchvarova, R. and Sugimoto, Y. (2014). Heliolactone, a non-sesquiterpene lactone germination stimulant for root parasitic weeds from sunflower. *Phytochemistry* **108**, 122-128.
- Umehara, M., Hanada, A., Yoshida, S., Akiyama, K., Arite, T., Takeda-Kamiya, N., Magome, H., Kamiya, Y., Shirasu, K., Yoneyama, K. et al. (2008). Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* **455**, 195-200.
- Waldie, T., McCulloch, H. and Leyser, O. (2014). Strigolactones and the control of plant development: lessons from shoot branching. *Plant J.* **79**, 607-622.
- Wang, Y., Sun, S., Zhu, W., Jia, K., Yang, H. and Wang, X. (2013). Strigolactone/MAX2-induced degradation of brassinosteroid transcriptional effector BES1 regulates shoot branching. *Dev. Cell* **27**, 681-688.
- Waters, M. T., Nelson, D. C., Scaffidi, A., Flematti, G. R., Sun, Y. K., Dixon, K. W. and Smith, S. M. (2012). Specialisation within the DWARF14 protein family confers distinct responses to karrikins and strigolactones in *Arabidopsis*. *Development* **139**, 1285-1295.
- Waters, M. T., Scaffidi, A., Moulin, S. L. Y., Sun, Y. K., Flematti, G. R. and Smith, S. M. (2015). A *Selaginella moellendorffii* ortholog of KARRIKIN INSENSITIVE2 functions in *Arabidopsis* development but cannot mediate responses to karrikins or strigolactones. *Plant Cell* **27**, 1925-1944.
- Xiong, G., Wang, Y. and Li, J. (2014). Action of strigolactones in plants. *Enzymes* **35**, 57-84.
- Yamada, Y., Furusawa, S., Nagasaka, S., Shimomura, K., Yamaguchi, S. and Umehara, M. (2014). Strigolactone signaling regulates rice leaf senescence in response to a phosphate deficiency. *Planta* **240**, 399-408.
- Zhang, Y., van Dijk, A. D. J., Scaffidi, A., Flematti, G. R., Hofmann, M., Charnikhova, T., Verstappen, F., Hepworth, J., van der Krol, S., Leyser, O. et al. (2014). Rice cytochrome P450 MAX1 homologs catalyze distinct steps in strigolactone biosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 1028-1033.
- Zhao, J., Wang, T., Wang, M., Liu, Y., Yuan, S., Gao, Y., Yin, L., Sun, W., Peng, L., Zhang, W. et al. (2014). DWARF3 participates in an SCF complex and associates with DWARF14 to suppress rice shoot branching. *Plant Cell Physiol.* **55**, 1096-1109.
- Zhou, F., Lin, Q., Zhu, L., Ren, Y., Zhou, K., Shabek, N., Wu, F., Mao, H., Dong, W., Gan, L. et al. (2013). D14-SCFD3-dependent degradation of D53 regulates strigolactone signalling. *Nature* **504**, 406-410.
- Zwanenburg, B. and Pospíšil, T. (2013). Structure and activity of strigolactones: new plant hormones with a rich future. *Mol. Plant* **6**, 38-62.

SL biosynthesis



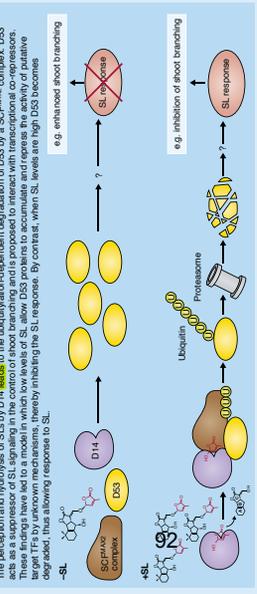
SL perception: coordinating enzymatic activity and reception



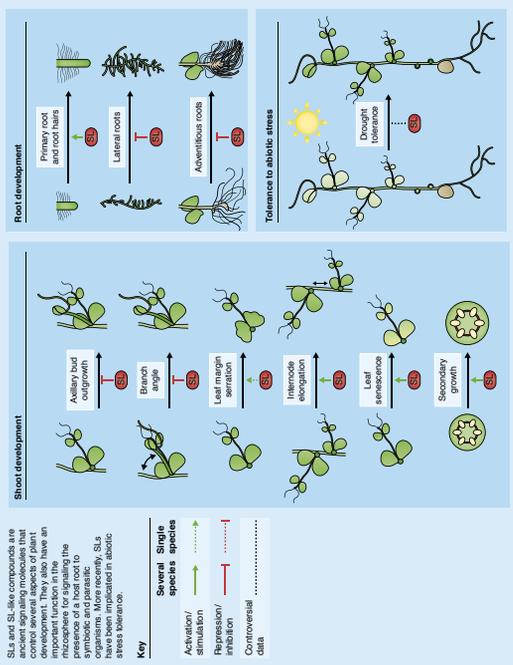
Models of SL signaling



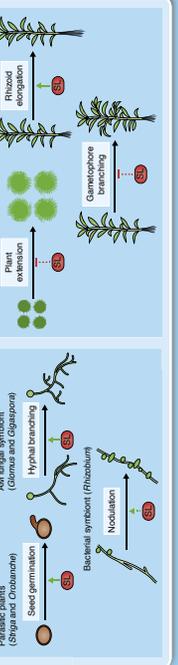
SLs trigger the degradation of proteins via the UPS



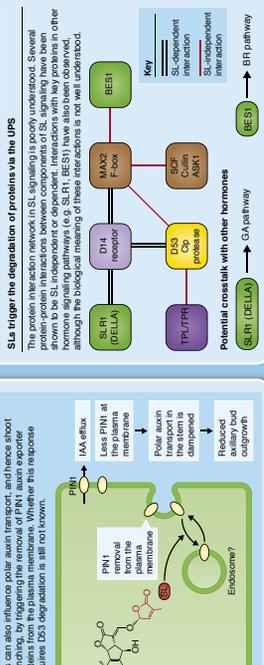
Multiple roles of SLs in plant life



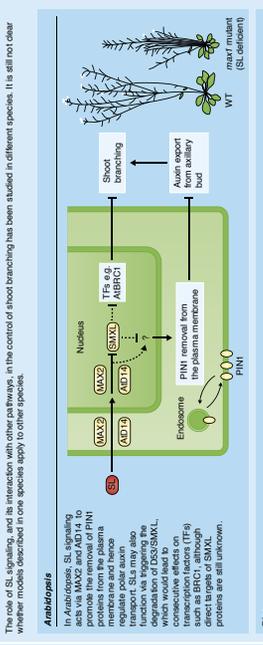
Role in non-vascular plants (Physcomitrella patens)



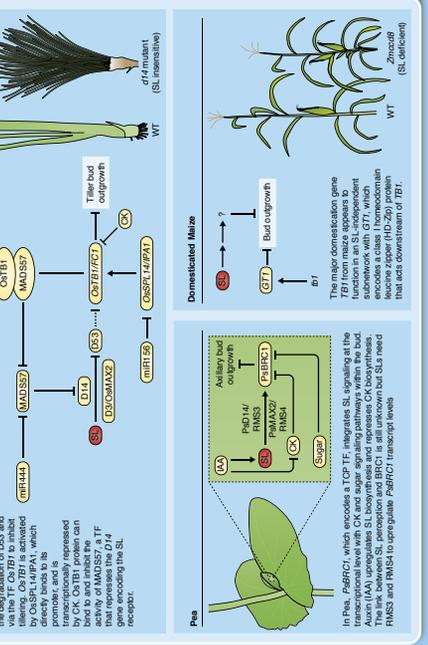
Protein interaction networks during SL signaling



SL signaling and cross-talks for the control of shoot branching in different species



Domesticated Maize



SL signaling pathway evolution in the green lineage

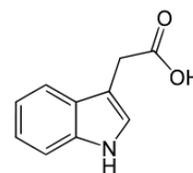
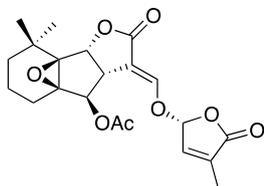
Reports on the presence of SLs are missing for gymnosperms and for *Selaginella* (denoted ?). However, as known synthesis genes are present, the occurrence of separate genes is still debated, or that the number of genes is uncertain. Numbers of true homologous genes for D14 and KAI2 are indicated in separate columns. For clarity, the number of genes belonging to related D14-like or KAI2-like is not indicated. In this table, the SL signaling pathway is not shown in green. SLs are present in all green lineages, but SLs are not supported for *F. pallens* and *A. polytrichum* (the occurrence of AM synthase is noted in brackets).

Vascular plants	Aglossperms	Gymnosperms	Lycophytes	Mosses	Liverworts	Charales	Volvocales
<i>Paumotu</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Arabidopsis thaliana</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Physcomitrella patens</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Selaginella moleculare</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Marchantia polymorpha</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Zygnema</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Styrraria graminea</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Mitella hyalina</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Abbreviations: AM, Arabinoside; AR, Arabidopsis Root; ARB, Arabidopsis Root Branching; ARB1, Arabidopsis Root Branching 1; ARB2, Arabidopsis Root Branching 2; ARB3, Arabidopsis Root Branching 3; ARB4, Arabidopsis Root Branching 4; ARB5, Arabidopsis Root Branching 5; ARB6, Arabidopsis Root Branching 6; ARB7, Arabidopsis Root Branching 7; ARB8, Arabidopsis Root Branching 8; ARB9, Arabidopsis Root Branching 9; ARB10, Arabidopsis Root Branching 10; ARB11, Arabidopsis Root Branching 11; ARB12, Arabidopsis Root Branching 12; ARB13, Arabidopsis Root Branching 13; ARB14, Arabidopsis Root Branching 14; ARB15, Arabidopsis Root Branching 15; ARB16, Arabidopsis Root Branching 16; ARB17, Arabidopsis Root Branching 17; ARB18, Arabidopsis Root Branching 18; ARB19, Arabidopsis Root Branching 19; ARB20, Arabidopsis Root Branching 20; ARB21, Arabidopsis Root Branching 21; ARB22, Arabidopsis Root Branching 22; ARB23, Arabidopsis Root Branching 23; ARB24, Arabidopsis Root Branching 24; ARB25, Arabidopsis Root Branching 25; ARB26, Arabidopsis Root Branching 26; ARB27, Arabidopsis Root Branching 27; ARB28, Arabidopsis Root Branching 28; ARB29, Arabidopsis Root Branching 29; ARB30, Arabidopsis Root Branching 30; ARB31, Arabidopsis Root Branching 31; ARB32, Arabidopsis Root Branching 32; ARB33, Arabidopsis Root Branching 33; ARB34, Arabidopsis Root Branching 34; ARB35, Arabidopsis Root Branching 35; ARB36, Arabidopsis Root Branching 36; ARB37, Arabidopsis Root Branching 37; ARB38, Arabidopsis Root Branching 38; ARB39, Arabidopsis Root Branching 39; ARB40, Arabidopsis Root Branching 40; ARB41, Arabidopsis Root Branching 41; ARB42, Arabidopsis Root Branching 42; ARB43, Arabidopsis Root Branching 43; ARB44, Arabidopsis Root Branching 44; ARB45, Arabidopsis Root Branching 45; ARB46, Arabidopsis Root Branching 46; ARB47, Arabidopsis Root Branching 47; ARB48, Arabidopsis Root Branching 48; ARB49, Arabidopsis Root Branching 49; ARB50, Arabidopsis Root Branching 50; ARB51, Arabidopsis Root Branching 51; ARB52, Arabidopsis Root Branching 52; ARB53, Arabidopsis Root Branching 53; ARB54, Arabidopsis Root Branching 54; ARB55, Arabidopsis Root Branching 55; ARB56, Arabidopsis Root Branching 56; ARB57, Arabidopsis Root Branching 57; ARB58, Arabidopsis Root Branching 58; ARB59, Arabidopsis Root Branching 59; ARB60, Arabidopsis Root Branching 60; ARB61, Arabidopsis Root Branching 61; ARB62, Arabidopsis Root Branching 62; ARB63, Arabidopsis Root Branching 63; ARB64, Arabidopsis Root Branching 64; ARB65, Arabidopsis Root Branching 65; ARB66, Arabidopsis Root Branching 66; ARB67, Arabidopsis Root Branching 67; ARB68, Arabidopsis Root Branching 68; ARB69, Arabidopsis Root Branching 69; ARB70, Arabidopsis Root Branching 70; ARB71, Arabidopsis Root Branching 71; ARB72, Arabidopsis Root Branching 72; ARB73, Arabidopsis Root Branching 73; ARB74, Arabidopsis Root Branching 74; ARB75, Arabidopsis Root Branching 75; ARB76, Arabidopsis Root Branching 76; ARB77, Arabidopsis Root Branching 77; ARB78, Arabidopsis Root Branching 78; ARB79, Arabidopsis Root Branching 79; ARB80, Arabidopsis Root Branching 80; ARB81, Arabidopsis Root Branching 81; ARB82, Arabidopsis Root Branching 82; ARB83, Arabidopsis Root Branching 83; ARB84, Arabidopsis Root Branching 84; ARB85, Arabidopsis Root Branching 85; ARB86, Arabidopsis Root Branching 86; ARB87, Arabidopsis Root Branching 87; ARB88, Arabidopsis Root Branching 88; ARB89, Arabidopsis Root Branching 89; ARB90, Arabidopsis Root Branching 90; ARB91, Arabidopsis Root Branching 91; ARB92, Arabidopsis Root Branching 92; ARB93, Arabidopsis Root Branching 93; ARB94, Arabidopsis Root Branching 94; ARB95, Arabidopsis Root Branching 95; ARB96, Arabidopsis Root Branching 96; ARB97, Arabidopsis Root Branching 97; ARB98, Arabidopsis Root Branching 98; ARB99, Arabidopsis Root Branching 99; ARB100, Arabidopsis Root Branching 100; ARB101, Arabidopsis Root Branching 101; ARB102, Arabidopsis Root Branching 102; ARB103, Arabidopsis Root Branching 103; ARB104, Arabidopsis Root Branching 104; ARB105, Arabidopsis Root Branching 105; ARB106, Arabidopsis Root Branching 106; ARB107, Arabidopsis Root Branching 107; ARB108, Arabidopsis Root Branching 108; ARB109, Arabidopsis Root Branching 109; ARB110, Arabidopsis Root Branching 110; ARB111, Arabidopsis Root Branching 111; ARB112, Arabidopsis Root Branching 112; ARB113, Arabidopsis Root Branching 113; ARB114, Arabidopsis Root Branching 114; ARB115, Arabidopsis Root Branching 115; ARB116, Arabidopsis Root Branching 116; ARB117, Arabidopsis Root Branching 117; ARB118, Arabidopsis Root Branching 118; ARB119, Arabidopsis Root Branching 119; ARB120, Arabidopsis Root Branching 120; ARB121, Arabidopsis Root Branching 121; ARB122, Arabidopsis Root Branching 122; ARB123, Arabidopsis Root Branching 123; ARB124, Arabidopsis Root Branching 124; ARB125, Arabidopsis Root Branching 125; ARB126, Arabidopsis Root Branching 126; ARB127, Arabidopsis Root Branching 127; ARB128, Arabidopsis Root Branching 128; ARB129, Arabidopsis Root Branching 129; ARB130, Arabidopsis Root Branching 130; ARB131, Arabidopsis Root Branching 131; ARB132, Arabidopsis Root Branching 132; ARB133, Arabidopsis Root Branching 133; ARB134, Arabidopsis Root Branching 134; ARB135, Arabidopsis Root Branching 135; ARB136, Arabidopsis Root Branching 136; ARB137, Arabidopsis Root Branching 137; ARB138, Arabidopsis Root Branching 138; ARB139, Arabidopsis Root Branching 139; ARB140, Arabidopsis Root Branching 140; ARB141, Arabidopsis Root Branching 141; ARB142, Arabidopsis Root Branching 142; ARB143, Arabidopsis Root Branching 143; ARB144, Arabidopsis Root Branching 144; ARB145, Arabidopsis Root Branching 145; ARB146, Arabidopsis Root Branching 146; ARB147, Arabidopsis Root Branching 147; ARB148, Arabidopsis Root Branching 148; ARB149, Arabidopsis Root Branching 149; ARB150, Arabidopsis Root Branching 150; ARB151, Arabidopsis Root Branching 151; ARB152, Arabidopsis Root Branching 152; ARB153, Arabidopsis Root Branching 153; ARB154, Arabidopsis Root Branching 154; ARB155, Arabidopsis Root Branching 155; ARB156, Arabidopsis Root Branching 156; ARB157, Arabidopsis Root Branching 157; ARB158, Arabidopsis Root Branching 158; ARB159, Arabidopsis Root Branching 159; ARB160, Arabidopsis Root Branching 160; ARB161, Arabidopsis Root Branching 161; ARB162, Arabidopsis Root Branching 162; ARB163, Arabidopsis Root Branching 163; ARB164, Arabidopsis Root Branching 164; ARB165, Arabidopsis Root Branching 165; ARB166, Arabidopsis Root Branching 166; ARB167, Arabidopsis Root Branching 167; ARB168, Arabidopsis Root Branching 168; ARB169, Arabidopsis Root Branching 169; ARB170, Arabidopsis Root Branching 170; ARB171, Arabidopsis Root Branching 171; ARB172, Arabidopsis Root Branching 172; ARB173, Arabidopsis Root Branching 173; ARB174, Arabidopsis Root Branching 174; ARB175, Arabidopsis Root Branching 175; ARB176, Arabidopsis Root Branching 176; ARB177, Arabidopsis Root Branching 177; ARB178, Arabidopsis Root Branching 178; ARB179, Arabidopsis Root Branching 179; ARB180, Arabidopsis Root Branching 180; ARB181, Arabidopsis Root Branching 181; ARB182, Arabidopsis Root Branching 182; ARB183, Arabidopsis Root Branching 183; ARB184, Arabidopsis Root Branching 184; ARB185, Arabidopsis Root Branching 185; ARB186, Arabidopsis Root Branching 186; ARB187, Arabidopsis Root Branching 187; ARB188, Arabidopsis Root Branching 188; ARB189, Arabidopsis Root Branching 189; ARB190, Arabidopsis Root Branching 190; ARB191, Arabidopsis Root Branching 191; ARB192, Arabidopsis Root Branching 192; ARB193, Arabidopsis Root Branching 193; ARB194, Arabidopsis Root Branching 194; ARB195, Arabidopsis Root Branching 195; ARB196, Arabidopsis Root Branching 196; ARB197, Arabidopsis Root Branching 197; ARB198, Arabidopsis Root Branching 198; ARB199, Arabidopsis Root Branching 199; ARB200, Arabidopsis Root Branching 200; ARB201, Arabidopsis Root Branching 201; ARB202, Arabidopsis Root Branching 202; ARB203, Arabidopsis Root Branching 203; ARB204, Arabidopsis Root Branching 204; ARB205, Arabidopsis Root Branching 205; ARB206, Arabidopsis Root Branching 206; ARB207, Arabidopsis Root Branching 207; ARB208, Arabidopsis Root Branching 208; ARB209, Arabidopsis Root Branching 209; ARB210, Arabidopsis Root Branching 210; ARB211, Arabidopsis Root Branching 211; ARB212, Arabidopsis Root Branching 212; ARB213, Arabidopsis Root Branching 213; ARB214, Arabidopsis Root Branching 214; ARB215, Arabidopsis Root Branching 215; ARB216, Arabidopsis Root Branching 216; ARB217, Arabidopsis Root Branching 217; ARB218, Arabidopsis Root Branching 218; ARB219, Arabidopsis Root Branching 219; ARB220, Arabidopsis Root Branching 220; ARB221, Arabidopsis Root Branching 221; ARB222, Arabidopsis Root Branching 222; ARB223, Arabidopsis Root Branching 223; ARB224, Arabidopsis Root Branching 224; ARB225, Arabidopsis Root Branching 225; ARB226, Arabidopsis Root Branching 226; ARB227, Arabidopsis Root Branching 227; ARB228, Arabidopsis Root Branching 228; ARB229, Arabidopsis Root Branching 229; ARB230, Arabidopsis Root Branching 230; ARB231, Arabidopsis Root Branching 231; ARB232, Arabidopsis Root Branching 232; ARB233, Arabidopsis Root Branching 233; ARB234, Arabidopsis Root Branching 234; ARB235, Arabidopsis Root Branching 235; ARB236, Arabidopsis Root Branching 236; ARB237, Arabidopsis Root Branching 237; ARB238, Arabidopsis Root Branching 238; ARB239, Arabidopsis Root Branching 239; ARB240, Arabidopsis Root Branching 240; ARB241, Arabidopsis Root Branching 241; ARB242, Arabidopsis Root Branching 242; ARB243, Arabidopsis Root Branching 243; ARB244, Arabidopsis Root Branching 244; ARB245, Arabidopsis Root Branching 245; ARB246, Arabidopsis Root Branching 246; ARB247, Arabidopsis Root Branching 247; ARB248, Arabidopsis Root Branching 248; ARB249, Arabidopsis Root Branching 249; ARB250, Arabidopsis Root Branching 250; ARB251, Arabidopsis Root Branching 251; ARB252, Arabidopsis Root Branching 252; ARB253, Arabidopsis Root Branching 253; ARB254, Arabidopsis Root Branching 254; ARB255, Arabidopsis Root Branching 255; ARB256, Arabidopsis Root Branching 256; ARB257, Arabidopsis Root Branching 257; ARB258, Arabidopsis Root Branching 258; ARB259, Arabidopsis Root Branching 259; ARB260, Arabidopsis Root Branching 260; ARB261, Arabidopsis Root Branching 261; ARB262, Arabidopsis Root Branching 262; ARB263, Arabidopsis Root Branching 263; ARB264, Arabidopsis Root Branching 264; ARB265, Arabidopsis Root Branching 265; ARB266, Arabidopsis Root Branching 266; ARB267, Arabidopsis Root Branching 267; ARB268, Arabidopsis Root Branching 268; ARB269, Arabidopsis Root Branching 269; ARB270, Arabidopsis Root Branching 270; ARB271, Arabidopsis Root Branching 271; ARB272, Arabidopsis Root Branching 272; ARB273, Arabidopsis Root Branching 273; ARB274, Arabidopsis Root Branching 274; ARB275, Arabidopsis Root Branching 275; ARB276, Arabidopsis Root Branching 276; ARB277, Arabidopsis Root Branching 277; ARB278, Arabidopsis Root Branching 278; ARB279, Arabidopsis Root Branching 279; ARB280, Arabidopsis Root Branching 280; ARB281, Arabidopsis Root Branching 281; ARB282, Arabidopsis Root Branching 282; ARB283, Arabidopsis Root Branching 283; ARB284, Arabidopsis Root Branching 284; ARB285, Arabidopsis Root Branching 285; ARB286, Arabidopsis Root Branching 286; ARB287, Arabidopsis Root Branching 287; ARB288, Arabidopsis Root Branching 288; ARB289, Arabidopsis Root Branching 289; ARB290, Arabidopsis Root Branching 290; ARB291, Arabidopsis Root Branching 291; ARB292, Arabidopsis Root Branching 292; ARB293, Arabidopsis Root Branching 293; ARB294, Arabidopsis Root Branching 294; ARB295, Arabidopsis Root Branching 295; ARB296, Arabidopsis Root Branching 296; ARB297, Arabidopsis Root Branching 297; ARB298, Arabidopsis Root Branching 298; ARB299, Arabidopsis Root Branching 299; ARB300, Arabidopsis Root Branching 300; ARB301, Arabidopsis Root Branching 301; ARB302, Arabidopsis Root Branching 302; ARB303, Arabidopsis Root Branching 303; ARB304, Arabidopsis Root Branching 304; ARB305, Arabidopsis Root Branching 305; ARB306, Arabidopsis Root Branching 306; ARB307, Arabidopsis Root Branching 307; ARB308, Arabidopsis Root Branching 308; ARB309, Arabidopsis Root Branching 309; ARB310, Arabidopsis Root Branching 310; ARB311, Arabidopsis Root Branching 311; ARB312, Arabidopsis Root Branching 312; ARB313, Arabidopsis Root Branching 313; ARB314, Arabidopsis Root Branching 314; ARB315, Arabidopsis Root Branching 315; ARB316, Arabidopsis Root Branching 316; ARB317, Arabidopsis Root Branching 317; ARB318, Arabidopsis Root Branching 318; ARB319, Arabidopsis Root Branching 319; ARB320, Arabidopsis Root Branching 320; ARB321, Arabidopsis Root Branching 321; ARB322, Arabidopsis Root Branching 322; ARB323, Arabidopsis Root Branching 323; ARB324, Arabidopsis Root Branching 324; ARB325, Arabidopsis Root Branching 325; ARB326, Arabidopsis Root Branching 326; ARB327, Arabidopsis Root Branching 327; ARB328, Arabidopsis Root Branching 328; ARB329, Arabidopsis Root Branching 329; ARB330, Arabidopsis Root Branching 330; ARB331, Arabidopsis Root Branching 331; ARB332, Arabidopsis Root Branching 332; ARB333, Arabidopsis Root Branching 333; ARB334, Arabidopsis Root Branching 334; ARB335, Arabidopsis Root Branching 335; ARB336, Arabidopsis Root Branching 336; ARB337, Arabidopsis Root Branching 337; ARB338, Arabidopsis Root Branching 338; ARB339, Arabidopsis Root Branching 339; ARB340, Arabidopsis Root Branching 340; ARB341, Arabidopsis Root Branching 341; ARB342, Arabidopsis Root Branching 342; ARB343, Arabidopsis Root Branching 343; ARB344, Arabidopsis Root Branching 344; ARB345, Arabidopsis Root Branching 345; ARB346, Arabidopsis Root Branching 346; ARB347, Arabidopsis Root Branching 347; ARB348, Arabidopsis Root Branching 348; ARB349, Arabidopsis Root Branching 349; ARB350, Arabidopsis Root Branching 350; ARB351, Arabidopsis Root Branching 351; ARB352, Arabidopsis Root Branching 352; ARB353, Arabidopsis Root Branching 353; ARB354, Arabidopsis Root Branching 354; ARB355, Arabidopsis Root Branching 355; ARB356, Arabidopsis Root Branching 356; ARB357, Arabidopsis Root Branching 357; ARB358, Arabidopsis Root Branching 358; ARB359, Arabidopsis Root Branching 359; ARB360, Arabidopsis Root Branching 360; ARB361, Arabidopsis Root Branching 361; ARB362, Arabidopsis Root Branching 362; ARB363, Arabidopsis Root Branching 363; ARB364, Arabidopsis Root Branching 364; ARB365, Arabidopsis Root Branching 365; ARB366, Arabidopsis Root Branching 366; ARB367, Arabidopsis Root Branching 367; ARB368, Arabidopsis Root Branching 368; ARB369, Arabidopsis Root Branching 369; ARB370, Arabidopsis Root Branching 370; ARB371, Arabidopsis Root Branching 371; ARB372, Arabidopsis Root Branching 372; ARB373, Arabidopsis Root Branching 373; ARB374, Arabidopsis Root Branching 374; ARB375, Arabidopsis Root Branching 375; ARB376, Arabidopsis Root Branching 376; ARB377, Arabidopsis Root Branching 377; ARB378, Arabidopsis Root Branching 378; ARB379, Arabidopsis Root Branching 379; ARB380, Arabidopsis Root Branching 380; ARB381, Arabidopsis Root Branching 381; ARB382, Arabidopsis Root Branching 382; ARB383, Arabidopsis Root Branching 383; ARB384, Arabidopsis Root Branching 384; ARB385, Arabidopsis Root Branching 385; ARB386, Arabidopsis Root Branching 386; ARB387, Arabidopsis Root Branching 387; ARB388, Arabidopsis Root Branching 388; ARB389, Arabidopsis Root Branching 389; ARB390, Arabidopsis Root Branching 390; ARB391, Arabidopsis Root Branching 391; ARB392, Arabidopsis Root Branching 392; ARB393, Arabidopsis Root Branching 393; ARB394, Arabidopsis Root Branching 394; ARB395, Arabidopsis Root Branching 395; ARB396, Arabidopsis Root Branching 396; ARB397, Arabidopsis Root Branching 397; ARB398, Arabidopsis Root Branching 398; ARB399, Arabidopsis Root Branching 399; ARB400, Arabidopsis Root Branching 400; ARB401, Arabidopsis Root Branching 401; ARB402, Arabidopsis Root Branching 402; ARB403, Arabidopsis Root Branching 403; ARB404, Arabidopsis Root Branching 404; ARB405, Arabidopsis Root Branching 405; ARB406, Arabidopsis Root Branching 406; ARB407, Arabidopsis Root Branching 407; ARB408, Arabidopsis Root Branching 408; ARB409, Arabidopsis Root Branching 409; ARB410, Arabidopsis Root Branching 410; ARB411, Arabidopsis Root Branching 411; ARB412, Arabidopsis Root Branching 412; ARB413, Arabidopsis Root Branching 413; ARB414, Arabidopsis Root Branching 414; ARB415, Arabidopsis Root Branching 415; ARB416, Arabidopsis Root Branching 416; ARB417, Arabidopsis Root Branching 417; ARB418, Arabidopsis Root Branching 418; ARB419, Arabidopsis Root Branching 419; ARB420, Arabidopsis Root Branching 420; ARB421, Arabidopsis Root Branching 421; ARB422, Arabidopsis Root Branching 422; ARB423, Arabidopsis Root Branching 423; ARB424, Arabidopsis Root Branching 424; ARB425, Arabidopsis Root Branching 425; ARB426, Arabidopsis Root Branching 426; ARB427, Arabidopsis Root Branching 427; ARB428, Arabidopsis Root Branching 428; ARB429, Arabidopsis Root Branching 429; ARB430, Arabidopsis Root Branching 430; ARB431, Arabidopsis Root Branching 431; ARB432, Arabidopsis Root Branching 432; ARB433, Arabidopsis Root Branching 433; ARB434, Arabidopsis Root Branching 434; ARB435, Arabidopsis Root Branching 435; ARB436, Arabidopsis Root Branching 436; ARB437, Arabidopsis Root Branching 437; ARB438, Arabidopsis Root Branching 438; ARB439, Arabidopsis Root Branching 439; ARB440, Arabidopsis Root Branching 440; ARB441, Arabidopsis Root Branching 441; ARB442, Arabidopsis Root Branching 442; ARB443, Arabidopsis Root Branching 443; ARB444, Arabidopsis Root Branching 444; ARB445, Arabidopsis Root Branching 445; ARB446, Arabidopsis Root Branching 446; ARB447, Arabidopsis Root Branching 447; ARB448, Arabidopsis Root Branching 448; ARB449, Arabidopsis Root Branching 449; ARB450, Arabidopsis Root Branching 450; ARB451, Arabidopsis Root Branching 451; ARB452, Arabidopsis Root Branching 452; ARB453, Arabidopsis Root Branching 453; ARB454, Arabidopsis Root Branching 454; ARB455, Arabidopsis Root Branching 455; ARB456, Arabidopsis Root Branching 456; ARB457, Arabidopsis Root Branching 457; ARB458, Arabidopsis Root Branching 458; ARB459, Arabidopsis Root Branching 459; ARB460, Arabidopsis Root Branching 460; ARB461, Arabidopsis Root Branching 461; ARB462, Arabidopsis Root Branching 462; ARB463, Arabidopsis Root Branching 463; ARB464, Arabidopsis Root Branching 464; ARB465, Arabidopsis Root Branching 465; ARB466, Arabidopsis Root Branching 466; ARB467, Arabidopsis Root Branching 467; ARB468, Arabidopsis Root Branching 468; ARB469, Arabidopsis Root Branching 469; ARB470, Arabidopsis Root Branching 470; ARB471, Arabidopsis Root Branching 471; ARB472, Arabidopsis Root Branching 472; ARB473, Arabidopsis Root Branching 473; ARB474, Arabidopsis Root Branching 474; ARB475, Arabidopsis Root Branching 475; ARB476, Arabidopsis Root Branching 476; ARB477, Arabidopsis Root Branching 477; ARB478, Arabidopsis Root Branching 478; ARB479, Arabidopsis Root Branching 479; ARB480, Arabidopsis Root Branching 480; ARB481, Arabidopsis Root Branching 481; ARB482, Arabidopsis Root Branching 482; ARB483, Arabidopsis Root Branching 483; ARB484, Arabidopsis Root Branching 484; ARB485, Arabidopsis Root Branching 485; ARB486, Arabidopsis Root Branching 486; ARB487, Arabidopsis Root Branching 487; ARB488, Arabidopsis Root Branching 488; ARB489, Arabidopsis Root Branching 489; ARB490, Arabidopsis Root Branching 490; ARB491, Arabidopsis Root Branching 491; ARB492, Arabidopsis Root Branching 492; ARB493, Arabidopsis Root Branching 493; ARB494, Arabidopsis Root Branching 494; ARB495, Arabidopsis Root Branching 495; ARB496, Arabidopsis Root Branching 496; ARB497, Arabidopsis Root Branching 497; ARB498, Arabidopsis Root Branching 498; ARB499, Arabidopsis Root Branching 499; ARB500, Arabidopsis Root Branching 500; ARB501, Arabidopsis Root Branching 501; ARB502, Arabidopsis Root Branching 502; ARB503, Arabidopsis Root Branching 503; ARB504, Arabidopsis Root Branching 504; ARB505, Arabidopsis Root Branching 505; ARB506, Arabidopsis Root Branching 506; ARB507, Arabidopsis Root Branching 507; ARB508, Arabidopsis Root Branching 508; ARB509, Arabidopsis Root Branching 509; ARB510, Arabidopsis Root Branching 510; ARB511, Arabidopsis Root Branching 511; ARB512, Arabidopsis Root Branching 512; ARB513, Arabidopsis Root Branching 513; ARB514, Arabidopsis Root Branching 514; ARB515, Arabidopsis Root Branching 515; ARB516, Arabidopsis Root Branching 516; ARB517, Arabidopsis Root Branching 517; ARB518, Arabidopsis Root Branching 518; ARB519, Arabidopsis Root Branching 519; ARB520, Arabidopsis Root Branching 520; ARB521, Arabidopsis Root Branching 521; ARB522, Arabidopsis Root Branching 522; ARB523, Arabidopsis Root Branching 523; ARB524, Arabidopsis Root Branching 524; ARB525, Arabidopsis Root Branching 525; ARB526, Arabidopsis Root Branching 526; ARB527, Arabidopsis Root Branching 527; ARB528, Arabidopsis Root Branching 528; ARB529, Arabidopsis Root Branching 529; ARB530, Arabidopsis Root Branching 530; ARB531, Arabidopsis Root Branching 531; ARB532, Arabidopsis Root Branching 532; ARB533, Arabidopsis Root Branching 533; ARB534, Arabidopsis Root Branching 534; ARB535, Arabidopsis Root Branching 535; ARB536, Arabidopsis Root Branching 536; ARB537, Arabidopsis Root Branching 537; ARB538, Arabidopsis Root Branching 538; ARB539, Arabidopsis Root Branching 539; ARB540, Arabidopsis Root Branching 540; ARB541, Arabidopsis Root Branching 541; ARB542, Arabidopsis Root Branching 542; ARB543, Arabidopsis Root Branching 543; ARB544, Arabidopsis Root Branching

CHAPITRE n°1

Partie n° V : Objectifs de la thèse



Objectifs de la thèse

L'objectif de mon projet de thèse est de mieux comprendre le **mode d'action** des **strigolactones** en interaction avec les autres **hormones** dans le contrôle de l'**architecture** aérienne du pois. Le contrôle de la **taille des plantes** et le processus de **ramification** sont des phénomènes complexes, sous l'influence de nombreux facteurs notamment de différentes hormones qui interagissent pour intégrer ces facteurs et permettent une bonne homéostasie du système.

Mon projet s'articule autour des questions biologiques et des hypothèses suivantes :

(1) Les **mutants** de pois *rms* en plus de leur phénotype hyper-ramifié présentent un phénotype de **nanisme**. Au début de ma thèse, ce phénotype n'avait pas été relié directement aux mutations affectant soit la biosynthèse soit la perception des SLs ouvrant la question suivante : **Comment peut-on expliquer cette réduction de la taille des plantes chez les mutants *rms* ?**

Nous avons testé plusieurs **hypothèses** pour **élucider le rôle des SLs** dans le processus de l'élongation des entre-nœuds chez le pois.

* Hypothèse 1 : le développement des ramifications chez les mutants *rms* se fait au dépend de l'allocation des ressources pour l'élongation de la tige ?

* Hypothèse 2 : la réduction des entre-nœuds chez les mutants *rms* est due à un manque de présence ou de réponse aux SLs endogènes ?

* Hypothèse 3 : les SLs régulent la taille des entre-nœuds via la réduction du nombre et / ou de la taille des cellules de la tige ?

* Hypothèse 4 : les SLs agissent sur la régulation de la taille des plantes en interagissant avec la voie des GAs ? via la dégradation des protéines DELLA ?

Nous avons mis en place des **approches génétique, physiologique et cytologique** pour répondre à ces différentes questions. Les résultats sont proposés sous forme d'article au Chapitre n°2.

(2.a) Le modèle actuel du **contrôle de la ramification** chez le pois, présenté -Figure n°1.37 suggère l'existence d'un signal de **rétro-contrôle** tige-racine **RMS2**-dépendant intervenant dans le maintien de l'**homéostasie** du **système**. Deux hypothèses concernant l'identité du signal **RMS2**-dépendant avaient déjà été proposées : (a) le signal **RMS2**-dépendant est l'auxine ? (b) le signal **RMS2**-dépendant est indépendant de l'auxine ? Juste avant mon arrivée en thèse, un **candidat** pour le **gène affecté par la mutation rms2** a été identifié. Il s'agit d'un **homologue** des **récepteurs de l'auxine** de la famille **TIR1/AFBs**, **PsAFB4/5**. Ce résultat va en faveur de la deuxième hypothèse quant à l'identité du signal **RMS2** comme étant l'auxine.

(2.b) L'identification du signal de rétro-contrôle **RMS2**-dépendant comme étant l'auxine, ouvre des questions quant à l'**émission** de ce **signal via la signalisation des SLs**. L'interaction SLs / Auxine a fait l'objet de nombreuses études révélant (a) un rôle de l'auxine dans la régulation de la biosynthèse des SLs. (b) un rôle des SLs dans le transport polarisé de l'auxine chez *Arabidopsis*.

Chez le pois, comme chez d'autres espèces (*Arabidopsis*, riz, pétunia) les **mutations** des gènes **de biosynthèse ou de réponse aux SLs** entraînent une **augmentation** de la **concentration d'auxine** dans la tige. Cependant au commencement de ce projet le rôle des SLs dans la régulation de la teneur en auxine de la plante n'avait pas encore été caractérisé, ouvrant la question suivante : **Comment les SLs régulent la teneur en auxine dans la tige des plantes ?**

Nous avons testé plusieurs **hypothèses** pour **valider l'identification** du signal de rétro-contrôle **RMS2**-dépendant comme étant l'auxine et répondre aux questions suivantes :

- * **Question 1** : la protéine **RMS2** de pois en tant que membre de la famille **TIR1/AFBs** est-elle capable de percevoir l'auxine ? de former un complexe **SCF^{RMS2}** ?
- * **Question 2** : le récepteur **RMS2** présente-t-il les mêmes spécificités que ses homologues **AFB4** et **AFB5** chez *Arabidopsis* ?
- * **Question 3** : les mutants de pois **rms2** et d'*Arabidopsis* **afb4** et **afb5** présentent-ils des similarités de phénotypes ?

Nous avons aussi testé plusieurs **hypothèses** pour **élucider le rôle des SLs** dans le contrôle de la teneur en auxine dans la tige chez le pois.

* Hypothèse 1 : l'augmentation de la teneur en auxine dans la tige des mutants *rms* est due à un manque de présence ou de réponse aux SLs endogènes ?

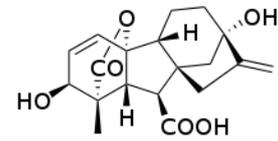
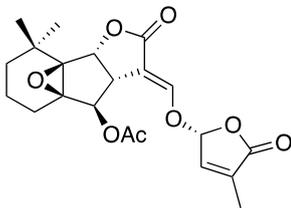
* Hypothèse 2 : les SLs agissent sur la teneur en auxine dans la tige des plantes en régulant l'expression des gènes de biosynthèse de l'auxine ?

Nous avons mis en place des **approches génétique, biochimique, physiologique et transcriptomique** pour répondre à ces différentes questions. Les résultats font l'objet d'un article en préparation et de résultats complémentaires présentés au Chapitre n°3.

CHAPITRE n° 2

Les strigolactones stimulent l'élongation des entre-nœuds chez le pois indépendamment des gibbérellines.

Partie n°1. Introduction



CHAPITRE n° 2 : Les strigolactones stimulent l'élongation des entre-nœuds chez le pois indépendamment des gibbérellines.

Partie n°I. Introduction

La taille des plantes est un des aspects majeurs de leur architecture aérienne, la régulation du processus de croissance de la tige fait intervenir plusieurs hormones. L'utilisation de multiples mutants a permis de mettre en évidence le rôle de cinq hormones dans ce phénomène : les gibbérellines (GAs) (Ingram et al ; 1984), l'auxine (McKay et al., 1994) et les brassinostéroïdes (Nomura et al., 1997) sont des régulateurs positifs de l'élongation de la tige chez le pois et d'autres espèces, tandis que l'éthylène (Ross and Reid., 1986) et l'acide abscissique (Ross et al., 2011) ont au contraire un rôle inhibiteur de l'élongation chez le pois.

Chez le pois l'élongation de l'entre-nœud est un processus développemental qui résulte de la synergie de deux phénomènes : la division cellulaire et l'élongation cellulaire.

En plus de cette régulation hormonale, d'autres facteurs interviennent. Par exemple, la lumière est un répresseur majeur de l'élongation cellulaire, des mutations dans le récepteur à la lumière (phytochrome) induisent un phénotype d'hypocotyle long chez *Arabidopsis* (Shin et al., 2009). La régulation de la taille de la plante est un processus complexe faisant intervenir plusieurs acteurs.

A. Le contrôle hormonal de la taille des entre-nœuds

Une des hormones clé dans le contrôle de la taille des plantes sont les GAs. C'est l'observation d'une élongation anormale chez une plantule de riz infectée par le champignon *Gibberella fujikuroi* qui a permis de mettre en évidence le rôle des GAs en tant qu'hormone régulatrice de la taille des plantes (Takashi et al., 1955). La taille des plantes étant un caractère agronomique important, des stratégies de réduction des plantes ont été mises en place dans le but d'optimiser les rendements. Lors de la « révolution verte », des mutants de plantes cultivées affectés dans la biosynthèse ou la signalisation des GAs ont été utilisés,

chez le riz ou le blé par exemple, de manière à générer des lignées naines ou semi-naines. Chez le pois la plupart des cultivars nains sont des mutants pour le gène *LE* qui code pour une GA 3-oxidase (Lester et al., 1997 ; Martin et al., 1997) contrôlant la taille des entrenœuds (Figure n°II.1). Le caractère de taille de la plante de pois, contrôlé par l'allèle mutant *le-1* est un des caractères héréditaires étudiés par Mendel.

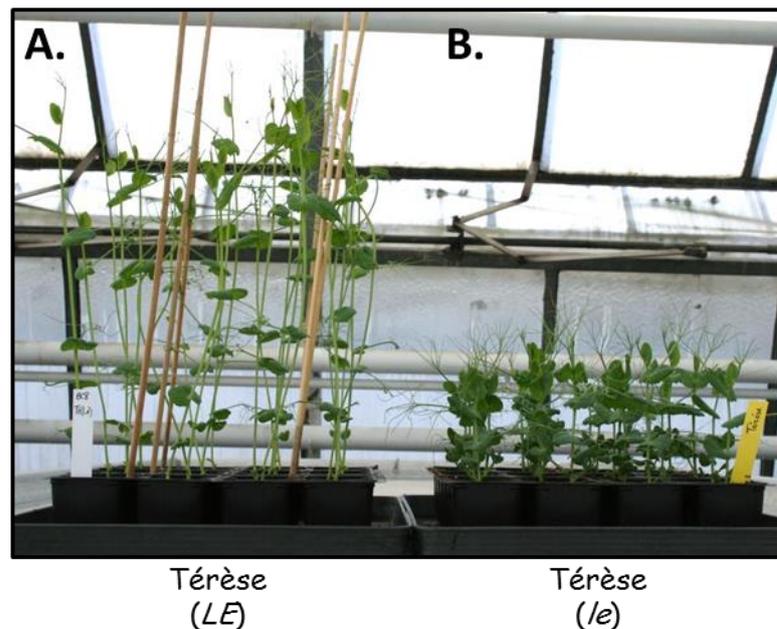


Figure n° II.1 : Influence du gène *LE* sur la taille des plantes

[A]. Cultivar Térésè avec l'allèle sauvage *LE*. **[B].** Cultivar Térésè avec l'allèle mutant *le*, c'est le cultivar avec l'allèle *le* qui est utilisé comme référence WT.

Le mutant *le* présente une déficience en GA₁ active, la concentration de GA₁ dans la tige et environ 10 fois inférieure à celle présente chez le sauvage (Yaexley et al., 2000).

Chez *Arabidopsis*, la croissance de l'hypocotyle résulte uniquement du processus d'élongation cellulaire et non de division cellulaire (Gendreau et al., 1997). Chez le pois l'élongation de l'entre-nœud est un processus développemental qui résulte de la synergie de deux phénomènes : la division et l'élongation cellulaire.

Les GAs jouent un rôle à la fois dans le contrôle de l'élongation et de la division cellulaire. Alors que l'auxine et les brassinostéroïdes agissent surtout sur l'élongation cellulaire (Tao et al., 2008 ; Tong et al., 2014).

Dans le phénomène de régulation de la taille des plantes, l'élongation des cellules est dépendante de la présence de protéines DELLA, répresseurs de la réponse aux GAs. Les

protéines DELLA sont rapidement dégradées en réponse à un traitement GA (Silverstone et al., 2001). On en dénombre cinq chez *Arabidopsis* et seulement deux chez le pois : LA et CRY (Weston et al., 2008).

Ce sont les GAs qui apparaissent comme régulateur majoritaire de la réponse, l'auxine et les BRs ayant un rôle en amont dans la régulation même du niveau de GAs dans la tige en plus de leurs actions respectives sur le contrôle de la longueur des entre-nœuds. En effet, l'auxine joue un rôle important dans la régulation du métabolisme des GAs, elle permet l'augmentation des niveaux en GAs actives par deux mécanismes (Figure n°II.2). D'une part l'auxine stimule l'expression de la GA3OXIDASE (biosynthèse de GA₁ active= LE) et d'autre part elle réprime l'expression de la GA2OXIDASE responsable du passage de la GA₂₀ à la GA₂₉, et de GA₁ à GA₈. L'auxine favorise donc la production de GA₂₀ et de GA₁ chez le pois (Ross et al ; 2000). Plus récemment, il a été montré que les GAs jouent sur le transport d'auxine via les transporteurs d'efflux PIN. Chez *Arabidopsis* des plantes déficientes en gibbérellines ont une réduction de la quantité de PIN à la membrane plasmique (Willige et al., 2011).

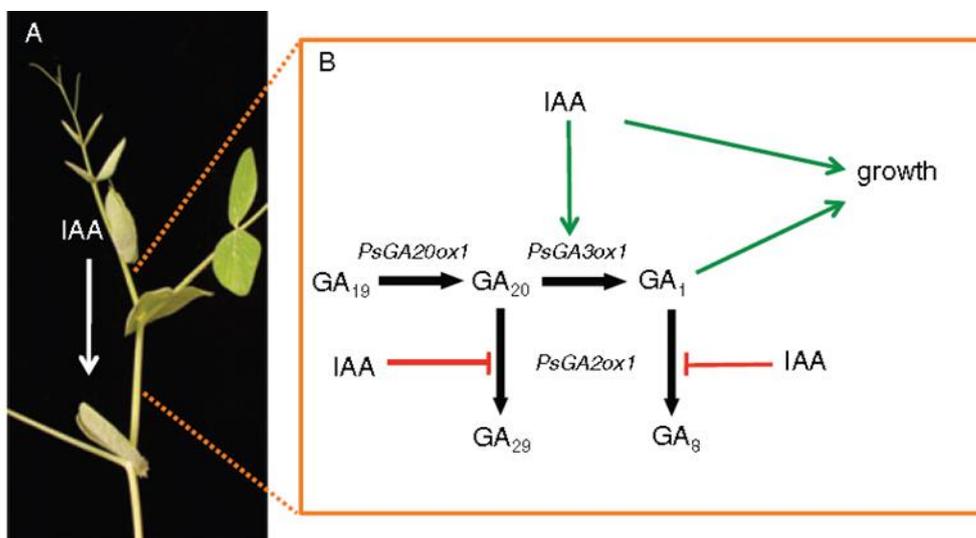


Figure n° II.2 : IAA et GA régulent la taille des plantes.

[A]. Photo de la partie apicale d'une plante de pois, les deux entre-nœuds sous l'apex sont encore en élévation. [B]. Modèle du contrôle de l'auxine sur la biosynthèse de gibbérellines. (Ross et al., 2011)

Similairement, les BRs induisent une accumulation de GAs via la régulation de l'expression des gènes de biosynthèse des GAs (Tong et al., 2014).

B. Objectif : déterminer le rôle des strigolactones dans l'élongation des entre-nœuds :

Depuis la découverte du rôle des SLs dans l'inhibition de la ramification de nombreux autres rôles ont été attribués à cette hormone (voir page 45). On peut se demander si le nanisme observé chez les mutants SLs de pois (figure n°II.3) et observé plus ou moins chez d'autres espèces (*Arabidopsis*, riz, pétunia, tomate et *Lotus japonicus*) est dû au manque ou à une non réponse aux SLs ? Ce nanisme est particulièrement marqué chez le riz où ces mutants ont été appelés *dwarf*.

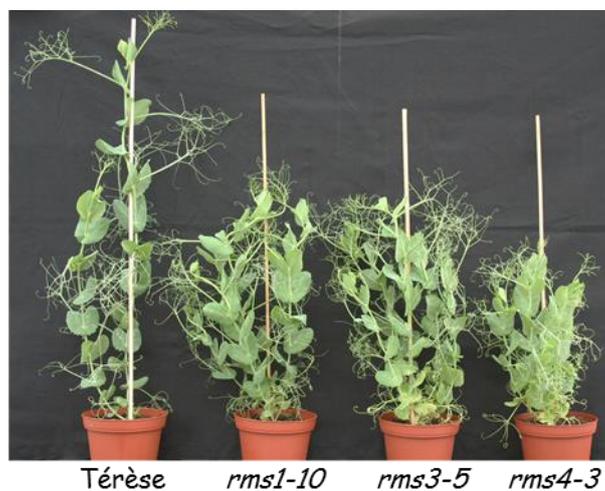


Figure n°II.3 : Photos de mutants rms de pois.

Le mutant de biosynthèse des SLs *rms1* (*Pscdd8*), ainsi que les mutants de réponse *rms3* (récepteur SLs, *Psd14*) et *rms4* (*Psmx2*) présentent un phénotype nain et hyper branché.

Chez le riz, le mutant nain *htd1/d17* (*ccd7*) déficient en SLs présente une restauration de sa taille suite à l'ébourgeonnement des thalles (Zou et al., 2006). Il y a chez ce mutant un développement des thalles au dépend de la taille générale de la plante, ainsi le développement d'organes supplémentaires (branches) se fait au détriment de l'allocation des ressources pour l'élongation de la tige. Ces études suggèrent un rôle indirect des strigolactones sur le contrôle de la taille des plantes, le phénotype des mutants *d* serait majoritairement dû leurs fortes ramifications.

L'objectif de ce chapitre est de mieux comprendre le rôle des strigolactones dans l'élongation des entre-nœuds chez le pois (figure n II.4). Dans un premier temps, en réalisant

une expérience similaire à celle sur le riz, j'ai testé si les mutants de pois *rms* sont nains du fait de leur forte ramification.

Dans un deuxième temps, via des approches physiologiques et cytologiques, je me suis intéressée à l'origine du nanisme chez les mutants SLs déficients et insensibles au SLs de pois de manière à déterminer le rôle des SLs dans ce processus et d'élucider si les SLs jouent un rôle dans le contrôle de la division et/ou de l'élongation cellulaire.

Enfin, via des approches génétiques et moléculaires, je me suis intéressée à l'interaction entre les SLs et les GAs dans le contrôle de la taille des plantes.

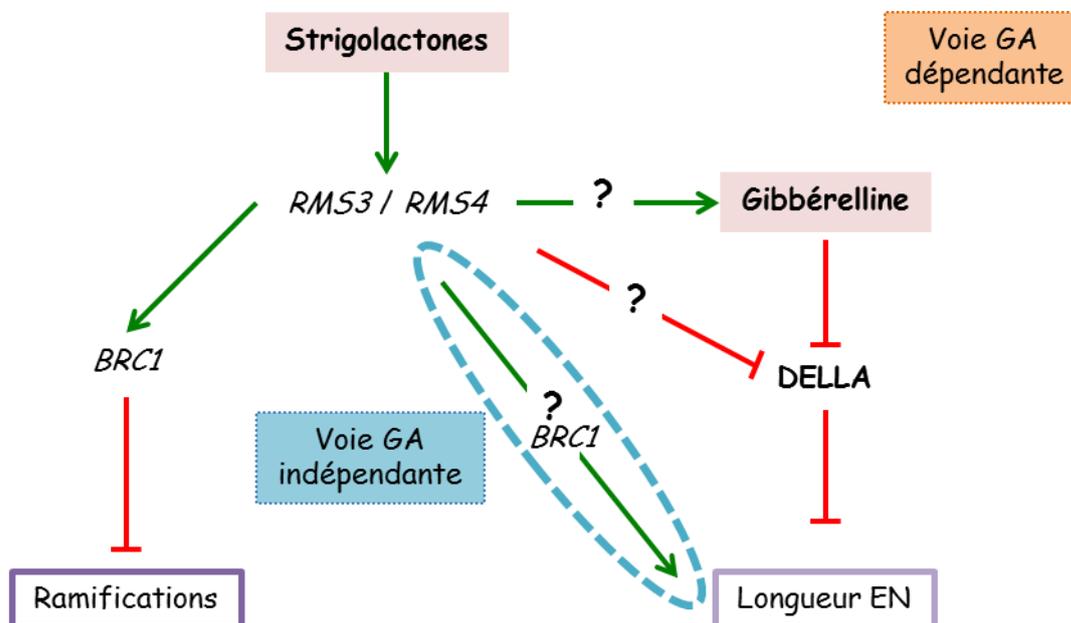


Figure n°II.4 : Modèle du contrôle de la taille des entre-nœuds chez le pois.
 Les points d'interrogations représentent les différentes questions abordées dans ce chapitre.
 EN = entre-nœud.

C. Résumé des résultats obtenus :

Les SLs régulent la taille des plantes via *RMS4*

Les résultats obtenus nous montrent que la présence des ramifications n'impact pas la taille de la plante contrairement à ce qui se passe chez le riz. En effet les mutants *rms* ébourgeonnés restent nains. D'autre part la taille du mutant de biosynthèse de

strigolactones *rms1* peut être partiellement restaurée par un traitement hydroponique avec la strigolactone synthétique GR24, contrairement aux mutants de réponse *rms3* et *rms4* qui restent nains même en présence de l'hormone. Ces résultats montrent que la taille des plantes est régulée par les SLs par les mêmes voies de biosynthèse et de signalisation que pour le contrôle de la ramification. Cependant cette voie ne semble pas passer par le facteur de transcription PsBRC1, qui assure la transduction du signal strigolactone dans le bourgeon axillaire.

Les SLs stimulent l'élongation des entre-nœuds via la division cellulaire

Nos études cytologiques de l'effet de la mutation *rms1* montrent que les SLs régulent positivement la division cellulaire et ne semble pas avoir de rôle dans l'élongation cellulaire. On peut noter que cet effet positif des SLs sur la division cellulaire dans la tige est opposé à l'effet de répression du démarrage des bourgeons axillaires lors du contrôle de la ramification. Cette hormone pourrait donc avoir des effets antagonistes sur un même mécanisme cellulaire suivant sa localisation dans les tissus de la plante. L'effet des SLs serait donc dépendant d'autres facteurs présents dans la cellule, tels que d'autres hormones qui vont moduler son action en fonction du contexte cellulaire ou tissulaire.

SLs et GAs agissent indépendamment dans le contrôle de l'élongation des entre-nœuds

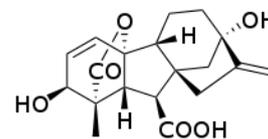
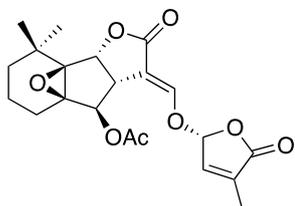
On a d'abord procédé par une approche génétique utilisant des doubles mutants, affectés à la fois dans la synthèse de SLs (*rms1*) et dans la synthèse de GAs (*le*) ou dans la perception des GAs (*la cry-s*) pour comprendre le lien entre GAs et SLs. En parallèle, nous avons utilisé le modèle *Arabidopsis* pour étudier l'action des strigolactones sur une des protéines DELLA (RGA) d'*Arabidopsis* avec une lignée GFP-RGA. Toujours pour répondre à la question du lien entre SL et GA, nous avons mesuré chez des mutants *rms* l'effet de l'application de GAs sur la taille de l'entre-nœud. Ainsi que la teneur en GA chez les différents mutants *rms*.

Globalement nos résultats suggèrent que les SLs et les GAs contrôlent la hauteur de la plante indépendamment. Ainsi quel que soit le contexte, déficient ou non en gibbérellines, muté pour les DELLA ou non, on observe un effet sur la taille des plantes contrôlé par le facteur strigolactone.

CHAPITRE n° 2

Partie n°II : Article accepté

Strigolactones Stimulate Internode Elongation Independently of Gibberellins.



Strigolactones Stimulate Internode Elongation Independently of Gibberellins^{1[C][W]}

Alexandre de Saint Germain², Yasmine Ligerot², Elizabeth A. Dun, Jean-Paul Pillot, John J. Ross, Christine A. Beveridge, and Catherine Rameau*

Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA UMR1318, INRA-AgroParisTech, F-78000 Versailles, France (A.d.S.G., Y.L., J.-P.P., C.R.); University of Queensland, School of Biological Sciences, St. Lucia, Queensland 4072 Australia (E.A.D., C.A.B.); and School of Plant Science, University of Tasmania, Sandy Bay, Tasmania 7005 Australia (J.J.R.)

Strigolactone (SL) mutants in diverse species show reduced stature in addition to their extensive branching. Here, we show that this dwarfism in pea (*Pisum sativum*) is not attributable to the strong branching of the mutants. The continuous supply of the synthetic SL GR24 via the root system using hydroponics can restore internode length of the SL-deficient *rms1* mutant but not of the SL-response *rms4* mutant, indicating that SLs stimulate internode elongation via *RMS4*. Cytological analysis of internode epidermal cells indicates that SLs control cell number but not cell length, suggesting that SL may affect stem elongation by stimulating cell division. Consequently, SLs can repress (in axillary buds) or promote (in the stem) cell division in a tissue-dependent manner. Because gibberellins (GAs) increase internode length by affecting both cell division and cell length, we tested if SLs stimulate internode elongation by affecting GA metabolism or signaling. Genetic analyses using SL-deficient and GA-deficient or *DELLA*-deficient double mutants, together with molecular and physiological approaches, suggest that SLs act independently from GAs to stimulate internode elongation.

In plants, a single hormone can regulate multiple and diverse aspects of plant growth and development (Vogler and Kuhlemeier, 2003; Davies, 2010). Consequently, most developmental processes such as secondary growth, lateral root development, or hypocotyl elongation are influenced by multiple hormones that interact and integrate environmental factors to optimize plant growth and reproduction (Davies, 2010). Important questions in plant biology relate to how these different plant hormones interact to regulate particular processes and the relative roles of each plant hormone according to environmental conditions, developmental stages, and tissues (Nemhauser et al., 2006; Kuppusamy et al., 2009).

Plant height is a major target in plant breeding for improving seed yield, biomass, and standing ability. Most plant hormones have been shown to affect this trait, with auxin (Cleland, 2010), GA (Ingram et al., 1986; Hedden, 2003), and brassinosteroid (BR; Clouse

and Sasse, 1998; Jager et al., 2007) promoting internode elongation and with abscisic acid, ethylene (Ross and Reid, 1986), and jasmonic acid (Heinrich et al., 2013) having an inhibitory effect (Davies, 2010; Ross et al., 2011). GA is one of the key determinants of plant height, as suggested by the different strategies designed to reduce plant height in several crops. Genetically manipulating GA biosynthesis (e.g. rice [*Oryza sativa*] gene *Semi dwarf1*) or GA signaling pathways (e.g. wheat [*Triticum aestivum*] *Reduced height*) to generate dwarf and semidwarf high-yield varieties in rice and wheat was particularly successful during the "Green Revolution" (Peng et al., 1999; Sasaki et al., 2002; Hedden, 2003; Salamini, 2003). In pea (*Pisum sativum*), the stem length gene *LE*, encoding a GA 3-oxidase (*PsGA3ox1*; Lester et al., 1997; Martin et al., 1997), controls internode length and is involved in plant height variation. The *le-1* allele is found in most dwarf pea cultivars and generates one of the seven traits studied by Mendel (Ellis et al., 2011; Reid and Ross, 2011). Genetic studies have convincingly demonstrated that BR is also a major endogenous regulator of internode elongation (Clouse and Sasse, 1998; Ross et al., 2011). Based on several lines of evidence, including the rapid growth response during gravitropism and phototropism, auxin is also a major factor controlling internode elongation (Cleland, 2010).

Different signals may affect separate components of a given process or have distinct modes of action. In contrast to hypocotyl elongation, in which only cell elongation is concerned (Gendreau et al., 1997), internode elongation is the result of both cell division and cell elongation, and hormones have different effects on

¹ This work was supported by the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie (to A.d.S.G. and Y.L.), and by the Australian Research Council (to E.A.D. and C.A.B.).

² These authors contributed equally to the article.

* Address correspondence to catherine.rameau@versailles.inra.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.plantphysiol.org) is: Catherine Rameau (catherine.rameau@versailles.inra.fr).

^[C] Some figures in this article are displayed in color online but in black and white in the print edition.

^[W] The online version of this article contains Web-only data.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.113.220541

these two mechanisms. Whereas GA affects both cell division and cell elongation, auxin and BR mostly control cell elongation. Molecular mechanisms involved in interactions among hormone signaling pathways are being deciphered, and different classes of cross regulation of a given process by multiple hormones can be described (Kuppusamy et al., 2009). One of the most common schemes of cross regulation is the modulation of the metabolism of one hormone by another. For instance, an important mechanism by which auxin stimulates internode elongation is the increase of bioactive GA levels (Ross et al., 2000, 2003). Additionally, elevated levels of jasmonic acid, a stress-related hormone, can inhibit internode elongation by repressing transcript levels of GA biosynthesis genes (Heinrich et al., 2013). Genetic studies combined with physiology (hormone-level quantifications, hormone response) are very powerful to identify cross talk or cross regulation (Kuppusamy et al., 2009) of a given process by multiple hormones. For the control of internode elongation, pea, with its simple architecture, has been intensively used for such analyses (Ross et al., 2011). In pea stems, auxin increases transcript levels of the *LE* gene (*PsGA3ox1*) and down-regulates transcript levels of the *SLENDER* (*SLN*) GA catabolism gene (encoding a GA deactivation 2-oxidase [*PsGA2ox1*]; Lester et al., 1999), leading to increased levels of GA₁, the main bioactive GA in pea (Lester et al., 1999; O'Neill and Ross, 2002; Ross et al., 2011). This ability of auxin to promote or maintain levels of bioactive GA in pea stems is also observed in other tissues (roots, pod) and in other species, such as *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*; Frigerio et al., 2006), barley (*Hordeum vulgare*; Wolbang et al., 2004), and tobacco (*Nicotiana tabacum*; Wolbang and Ross, 2001), with some changes in the specific GA metabolism gene that is regulated (Reid et al., 2011).

The growth repressor DELLA proteins are major players in GA signaling and are rapidly degraded in response to GA treatment (Silverstone et al., 2001; Jiang and Fu, 2007). In *Arabidopsis*, it was shown that genes encoding the GA biosynthetic enzymes GA3ox1 and GA20ox2 are direct DELLA targets, indicating the involvement of DELLA proteins in the feedback regulation of GA biosynthesis by GA treatment (Zentella et al., 2007). Whereas five DELLA genes are present in *Arabidopsis* (*GIBBERELLIN INSENSITIVE*, *REPRESSOR OF ga1-3* [*RGA*], *RGA-LIKE1* [*RGL1*], *RGL2*, and *RGL3*; Olszewski et al., 2002), the pea genome contains only two DELLA genes, *LA* and *CRY* (Weston et al., 2008). In pea, it was shown that auxin regulation of GA metabolism genes was DELLA independent, as indole-3-acetic acid (IAA) regulation of GA genes was also observed in the slender *la cry-s* line, a DELLA-deficient background (O'Neill et al., 2010; Ross et al., 2011).

In 2008, the role of strigolactones (SLs) in the control of shoot branching was demonstrated (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008). SL-deficient and SL-response mutants identified in pea (*ramosus* [*rms*]), rice (*dwarf* [*d*]), *Arabidopsis* (*more axillary growth* [*max*]) and

petunia (*Petunia hybrida*; *decreased apical dominance* [*dad*]) display increased shoot branching (Ongaro and Leyser, 2008; Beveridge et al., 2009; McSteen, 2009). SLs are carotenoid-derived compounds that were already known for their roles in symbiotic and parasitic interactions in the rhizosphere (Akiyama et al., 2005; López-Ráez et al., 2009). Mutant-based approaches have identified several genes of the SL biosynthesis and signaling pathways (Beveridge and Kyozuka, 2010). The chloroplastic initial steps of the SL biosynthesis pathway involve D27 (Lin et al., 2009), a β -carotene isomerase, modifying all-trans- β -carotene into 9-cis- β -carotene (Alder et al., 2012) and two carotenoid cleavage dioxygenases, CCD7 (RMS5/D17/MAX3/DAD3; Booker et al., 2004; Johnson et al., 2006; Zou et al., 2006; Drummond et al., 2009) and CCD8 (RMS1/D10/MAX4/DAD1; Sorefan et al., 2003; Snowden et al., 2005; Arite et al., 2007), to produce the SL intermediate carlactone (Alder et al., 2012). Another putative SL biosynthesis enzyme has been identified, the cytochrome P450 MAX1 (Booker et al., 2005), acting very likely after carlactone formation; however, its biochemical function is not known yet.

Similar to the GA signaling pathway, the SL signaling pathway involves an F-box protein (RMS4/D3/MAX2; Stirnberg et al., 2002, 2007; Ishikawa et al., 2005; Johnson et al., 2006) and an α/β -fold hydrolase (D14/DAD2; Arite et al., 2009; Gao et al., 2009; Liu et al., 2009; Waters et al., 2012). In contrast to the GA receptor GIBBERELLIN-INSENSITIVE DWARF1, which has lost the enzymatic activity of the members of the α/β -fold hydrolase superfamily, DAD2 retains hydrolytic activity, leading to products without SL-like activity (Hamiaux et al., 2012). Direct binding of the synthetic SL, GR24, with the *petunia* DAD2 or the rice D14 protein (Hamiaux et al., 2012; Kagiya et al., 2013) pinpoints the DAD2/D14 α/β -fold hydrolase as the best candidate for the SL receptor. In *Arabidopsis* and pea, the SL response involves the TCP (for TB1, CYCLOIDEA, and PCF domain) transcription factor BRANCHED1 (BRC1/*PsBRC1*; Aguilar-Martinez et al., 2007; Braun et al., 2012), homologous to the maize (*Zea mays*) TEOSINTE BRANCHED1 (TB1; Hubbard et al., 2002; Doebley et al., 2006). Branching of pea or *Arabidopsis* *brc1* mutant plants is not repressed by treatment with the synthetic SL, GR24 (Brewer et al., 2009; Braun et al., 2012); therefore, these mutants are considered as SL-response mutants.

Since the discovery that SLs represent a novel class of plant hormones, several functions of SLs other than the control of branching have been identified through the examination of SL-deficient and SL-response mutants and by examining the effects of treatments with the synthetic SL GR24. Developmental processes such as lateral root formation, adventitious root formation, root hair elongation, and interfascicular cambium development have been shown to be regulated by SL (Agusti et al., 2011; Kapulnik et al., 2011; Ruyter-Spira et al., 2011; Rasmussen et al., 2012). The use of SL and auxin signaling mutants suggests that SLs act

de Saint Germain et al.

predominantly downstream of auxin to stimulate secondary growth (Agusti et al., 2011), whereas for lateral root formation, SLs would modulate auxin levels and/or signaling and ethylene synthesis for root hair elongation (Koltai, 2011). Whether SLs act directly or in coordination with other hormones to regulate these processes will need further investigation. Consequently, it appears that, as for other plant hormones, SLs are involved in many aspects of plant development.

Another phenotype of the SL-deficient and SL-response mutants observed in various species (pea, *Arabidopsis*, rice, petunia, tomato [*Solanum lycopersicum*], and *Lotus japonicus*) is their shorter stature in comparison with the wild type (Beveridge et al., 1996; Napoli, 1996; Stirnberg et al., 2002; Ishikawa et al., 2005; Zou et al., 2006; Kohlen et al., 2012; Liu et al., 2013). Previously, it was shown in rice that this reduced plant height was in part a consequence of the increased branching, as manual removal of tillers in the rice *htd1/d17* SL-deficient mutant led to an increase in overall plant height (Zou et al., 2006). However, the overall plant height was not completely restored to that of comparative wild-type plants, and this incomplete restoration could have been due to the diversion of energy from the main stem to the tillers prior to their removal or to their SL deficiency. Umehara et al. (2008) have shown that SLs supplied in the hydroponics medium can substantially restore the height of SL-deficient rice mutants. Here, we used the pea model to investigate the role of SL in the regulation of internode elongation. We set out to investigate the origin of the dwarfism of SL-deficient and SL-response mutants in pea, to confirm the role of SL on internode elongation, and to analyze whether SL controls cell elongation and/or cell division. A possible interaction with GA was tested by evaluating two types of putative SL action: the effect of SLs on levels of the main bioactive GA in pea, GA₁, and their possible influence on GA signaling, in particular on DELLA proteins. Overall, our results indicate that SL and GA act independently to stimulate internode elongation in pea.

RESULTS

Reduced Internode Length of Pea SL Mutants Is Not Caused by Their Increased Shoot Branching

To investigate whether the reduced height of the pea SL-related mutants is due to their high branching, we determined the impact of manual bud removal on internode lengths of wild-type, *rms1*, *rms4*, and *Psbrcl* plants. As reported previously, on a tall background, the *rms1* SL-deficient and *rms4* SL-insensitive mutants exhibited not only a high-branching phenotype but also a relative dwarf phenotype (Beveridge et al., 1996, 1997b). Internode length of the *rms1-10* SL-deficient mutant and the *rms4-3* SL-response mutant was reduced to 70% and 63%, respectively, of the dwarf wild-type line cv Tèrese (Fig. 1). In contrast, *Psbrcl*, which is

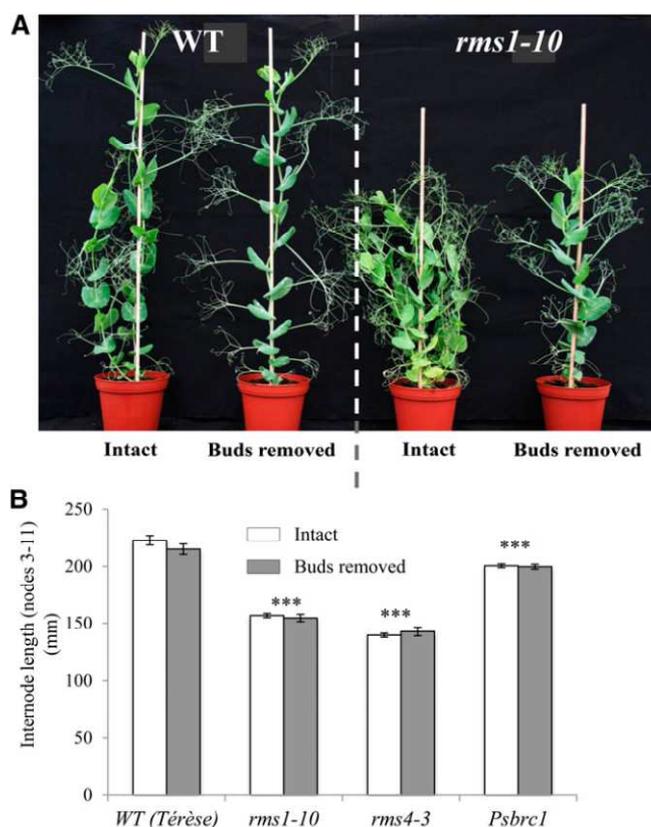


Figure 1. Reduced height of the *rms* SL mutants is not caused by their strong shoot branching. A, Phenotypes of wild-type (WT; cv Tèrese) and *rms1-10* plants, intact or with axillary buds removed. B, Internode lengths between node 3 and node 11 were measured when plants were 30 d old. Axillary buds were manually removed every 2 or 3 d. Data are means \pm SE ($n = 7-8$). Asterisks denote significant differences from the wild type ($***P < 0.001$, Student's *t* test). [See online article for color version of this figure.]

also unable to respond to SL, showed a significant reduction in internode length but was far less affected than *rms1* and *rms4* (90% of the wild type; Braun et al., 2012; Fig. 1B). For all genotypes, bud removal had no significant impact on internode length (Fig. 1). Similarly, further examination of the effect of shoot branching on stem elongation revealed that bud outgrowth inhibited by exogenous treatment of the synthetic SL GR24 directly to all axillary buds of SL-deficient *rms1-1* mutant plants (Dun et al., 2013) did not lead to a significant increase in plant height (Fig. 2). Our results suggest that SLs may affect internode elongation independently of their function in bud outgrowth inhibition and that the reduced stature of the SL-related mutants is not simply a consequence of their increased branching phenotype. Manual removal of axillary buds along the stem, however, did induce a significant increase in stem diameter and leaf size in all genotypes tested, indicating that this response is SL independent and is possibly due to reallocation of resources (Supplemental Fig. S1).

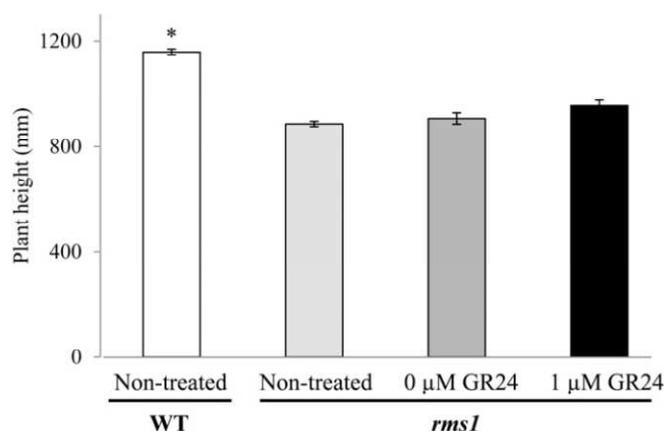


Figure 2. Inhibiting bud growth by directly treating buds with GR24 does not restore reduced *rms1* plant height. Axillary buds of wild-type (WT) or *rms1-1* plants (cv Parvus) were either left untreated (non-treated) or treated with 0 or 1 μM GR24 when the leaf was first open and retreated the following day. Bud lengths (Dun et al., 2013) and plant height were measured when the plants were 35 d old. Data are means ± SE ($n = 14-16$). The asterisk denotes a significant difference from the *rms1* 0 μM GR24-treated plant (* $P < 0.05$, Student's t test).

SL Promotes Internode Elongation in *rms1* But Not in *rms4* When Supplied to the Roots

To confirm that SL promotes internode elongation, GR24 (3 μM) was continuously supplied to the roots of wild-type, *rms1*, and *rms4* plants via hydroponics. After 16 d of GR24 treatment, total branch length was significantly reduced for *rms1* but not for the wild type or *rms4* (Fig. 3A). Generally, the strong basal branching at nodes 1 and 2 of dwarf pea lines (including the wild-type cv Tère se) is not inhibited by GR24 treatment using hydroponics (Boyer et al., 2012; Supplemental Fig. S1). The wild-type line displays branching only at these nodes, whereas *rms1* and *rms4* produce branches at basal and upper nodes. Upper branches in this dwarf background are inhibited by GR24 treatment in the SL-deficient *rms1* mutant but not in the *rms4* SL-response mutant. GR24 treatment caused a significant increase in internode length for the *rms1* SL-deficient mutant but not for the *rms4* SL-response mutant (Fig. 3B). No significant effect of GR24 on internode length was observed for the wild type (Fig. 3B).

To determine if SL can function similarly to GAs in promoting main stem internode elongation in pea, we compared the response of *rms1* SL-deficient mutant plants with treatment of the shoot tip with or without GR24 or GA₃. GA₃ applied to the shoot tip caused significant increases in length of all internodes except the first two nodes that were already elongated at the time of treatment. In contrast, GR24 at a dose more than 10 times greater than what is effective at axillary bud inhibition (10 μM) had no significant effect whatever the node and even on internodes that were newly forming in the shoot tip at the time of treatment (Fig. 4). These data suggest that, unlike GA,

GR24 may not function in the shoot tip to regulate internode elongation.

Mutations Affecting SL (*rms1*) and GA (*le*) Levels Have Additive Effects on Branching and Internode Elongation

The *LE* gene (*PsGA3ox1*) encodes a GA 3-oxidase that is able to convert GA₂₀ to the bioactive GA₁ (Lester et al., 1997; Martin et al., 1997). The enzyme encoded by the *le-1* allele shows reduced activity, resulting in a 10- to 20-fold reduction of GA₁ levels in elongating internodes of dwarf *le-1* mutant plants compared with tall *LE* plants (Ross et al., 1992). We have previously shown that the *rms1* mutation reduces plant height in different genetic backgrounds (Figs. 1 and 2; Beveridge et al., 1997b). Notably, a similar reduction is also observed in the *rms1-10* line, obtained from the dwarf wild-type line cv Tère se, which contains the *le-1* mutation affecting GA₁ levels.

To compare the effects of SL and GA on internode elongation and to investigate if GA or SL impact on each other's response, we used a series of four lines deficient in GA₁ and/or SLs (*le* or *LE* and *rms1* or

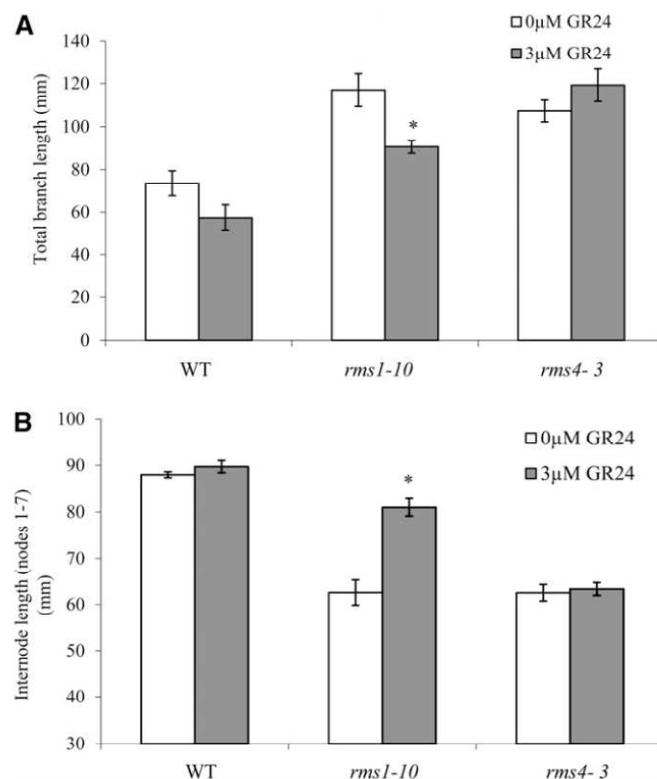


Figure 3. SL supplied via hydroponics increases the internode length of *rms1* SL-deficient mutant plants but not of *rms4* SL-response mutant plants. Six-day-old wild-type (WT), *rms1-10*, and *rms4-3* plants (cv Tère se) were supplied with 0 or 3 μM GR24 via hydroponics for 16 d, after which the sum of all lateral buds and branches at nodes 1 to 5 (A) and the internode length between nodes 1 and 7 (B) were measured. Data are means ± SE ($n = 7-8$). Asterisks denote significant effects of GR24-treated versus control-treated plants (* $P < 0.05$, Student's t test).

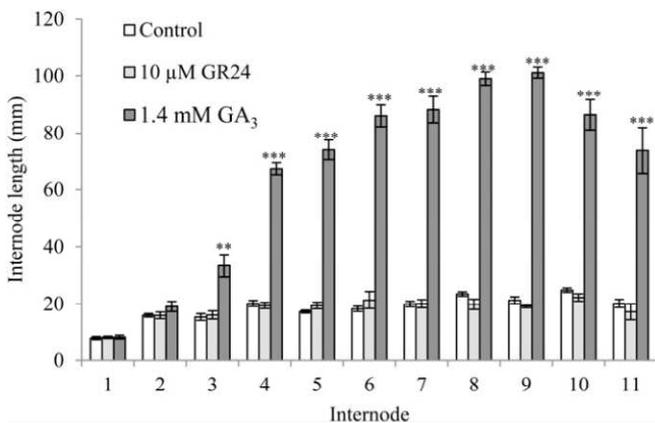


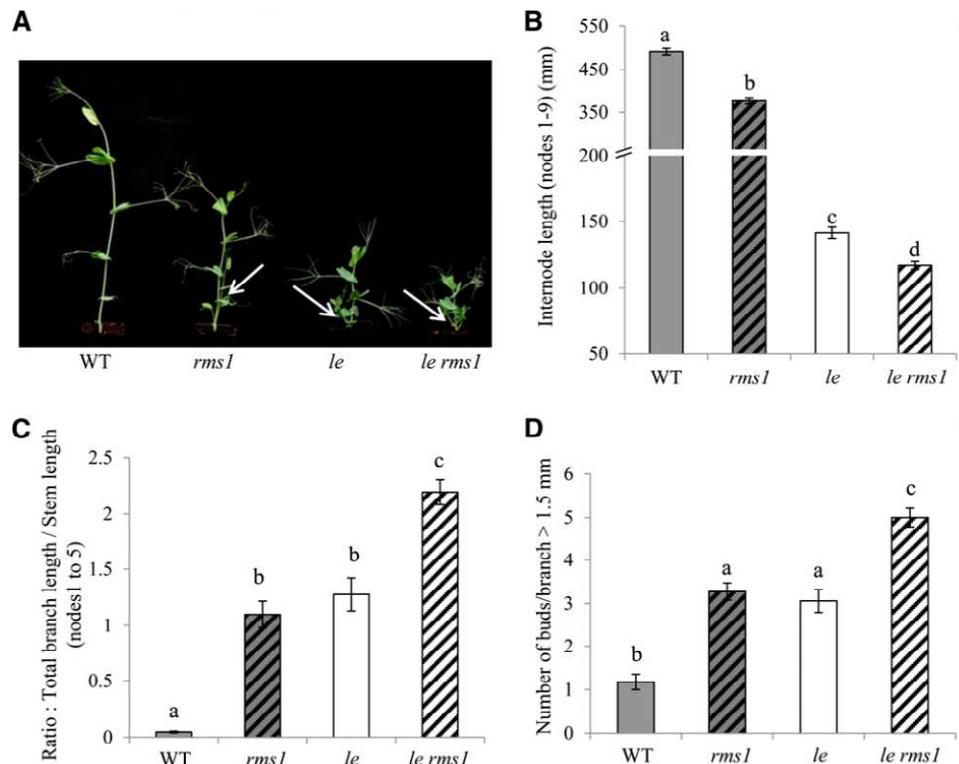
Figure 4. SL treatment to the shoot tip does not affect the growth of the main stem. The main shoot apex of 7-d-old *rms1-11* plants (cv Tère \grave{e}) with 2.5 expanded leaves was treated on two consecutive days with 0 or 10 μ M GR24 or 1.4 mM GA₃. Internode lengths were measured 23 d after treatment. Data are means \pm SE ($n = 7-10$). Asterisks denote significant differences from the control (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, Student's t test).

RMS1) in the cv Tère \grave{e} background (Fig. 5A). Branching and internode lengths of 15-d-old plants were measured. A deficiency in GA₁ levels caused by the *le-1* allele gave rise to a 71% decrease in internode length in an *RMS1* background and 69% in an *rms1* background. The *rms1* mutation led to a significant reduction in internode length: 23% in an *LE* background

and 17% in an *le-1* background (Fig. 5, A and B). Clearly, the effect of SLs on internode elongation is not as strong as the effect of GA. However, SL does significantly stimulate internode elongation irrespective of the level of GA, and vice versa. Importantly, *le-1 rms1* double mutant plants are shorter in stature than single *le-1* and *rms1* mutants, suggesting that phenotypes are additive and that SL and GA control internode elongation independently (Fig. 5, A and B).

The effect of GA on branching is suggested by the common use of the *le-1* allele in pea crops to reduce internode length and increase basal branching. In rice, reducing endogenous GA levels by overexpression of GA2ox resulted in reduced stem elongation and increased tillering (Lo et al., 2008). We often quantify branching by measuring branch length; such a measure is strongly dependent on internode length. As such, here, we quantified branching of the four lines by the ratio of total branch length to main stem length (from nodes 1 to 5). Using this ratio as a measure of branching, the double *le-1 rms1* mutant was more branched than single *le-1* and *rms1* mutants (Fig. 5C). We also estimated branching by the number of buds or branches with a size greater than 1.5 mm (Fig. 5D). Using this estimation, the double *le-1 rms1* mutant also displayed more branch/bud outgrowth than single *le-1* and *rms1* mutants. These additive results in double mutant plants indicate that *le-1* and *rms1* mutations independently induce branching and, hence, that SL and GA control branching independently.

Figure 5. The effect of the *rms1-10* and *le* mutations on both internode length and branching is additive. A, Fifteen-day-old wild-type (WT), *rms1*, *le*, and *le rms1* plants. White arrows indicate the basal branching. B, Internode length between nodes 1 and 9. Data are means \pm SE ($n = 18$). Values with different lowercase letters are significantly different from one another (ANOVA, $P < 0.01$). C, Ratio of total branch length to total stem length ($n = 18$). Values with different lowercase letters are significantly different from one another (ANOVA, $P < 0.001$). D, Number of buds or branches from nodes 1 to 5 with a length greater than 1.5 mm ($n = 18$). Values with different lowercase letters are significantly different from one another (ANOVA, $P < 0.001$). [See online article for color version of this figure.]



SLs Stimulate Stem Growth by Increasing Cell Number But Not Cell Length

To investigate whether SLs increase cell number and/or cell length to control the height of the plant, and to compare the effect of SLs with GA, we quantified epidermal cell size at a given elongated internode (internode 4) of 25-d-old wild-type, *le-1*, *rms1*, and *le-1 rms1* plants using scanning electronic microscopy (Fig. 6A). The number of cells was estimated for each plant by the ratio of internode length to cell length. Irrespective of the *LE* genotype, *rms1* significantly affected cell number but not cell length (Fig. 6, B and C). Consistent with what is known for GA, cell length and number were both strongly decreased in GA-deficient *le-1* plants in comparison with *LE* plants (Fig. 6, A, B, and D; Reid, 1983). These results indicate that SLs affect cell division rather than cell elongation to stimulate internode elongation. Both *le-1* and *rms1* mutations caused a significant increase in cell width (Supplemental Fig. S2).

GA₁ Content Is Not Correlated with the Dwarf Phenotype of the *rms* Mutants

To investigate in more detail a possible interaction between SL and GA in the control of internode elongation, we determined whether SL affects the levels of GA₁, the main bioactive GA in pea. GA₁ levels were

quantified from elongating internodes of the tall line cv Torsdag (*LE*) and the corresponding SL mutant lines *rms1* and *rms4*. There was a small, although statistically significant ($P < 0.05$), reduction in GA₁ content in the SL-response mutant *rms4* compared with the wild type (Fig. 7). This reduction is unlikely to be physiologically significant, given the log/linear relationship between GA content and elongation in this species (Ross et al., 2011). GA₁ levels in *rms1* internodes were not significantly different from those of the wild type. To investigate further whether SLs are involved in the regulation of GA, transcript levels of genes involved in GA biosynthesis (*PsGA20ox1* and *PsGA3ox1* [*LE*]) and catabolism (*PsGA2ox1* [*SLN*] and *PsGA2ox2*) were analyzed in expanding stem tissue 24 h after GR24 treatment (3 μ M) via the root system. Transcript levels of the *RMS5/PsCCD7* SL biosynthesis gene, known to be feedback down-regulated by SL in epicotyl, were analyzed as a positive control for GR24 treatment in the epicotyl (Supplemental Fig. S3). As expected, *RMS5* was highly expressed in the *rms1* and *rms4* mutant epicotyls in comparison with the wild type, and the GR24 treatment caused a strong down-regulation of *RMS5* transcript level in the *rms1* SL-deficient mutant, while there was no effect of GR24 on *RMS5* expression in the epicotyl of the *rms4* SL-response mutant (Supplemental Fig. S3). Transcript levels of the four genes controlling GA levels were not significantly affected by SL treatment in expanding stem tissue of any genotype (Supplemental Figs. S4

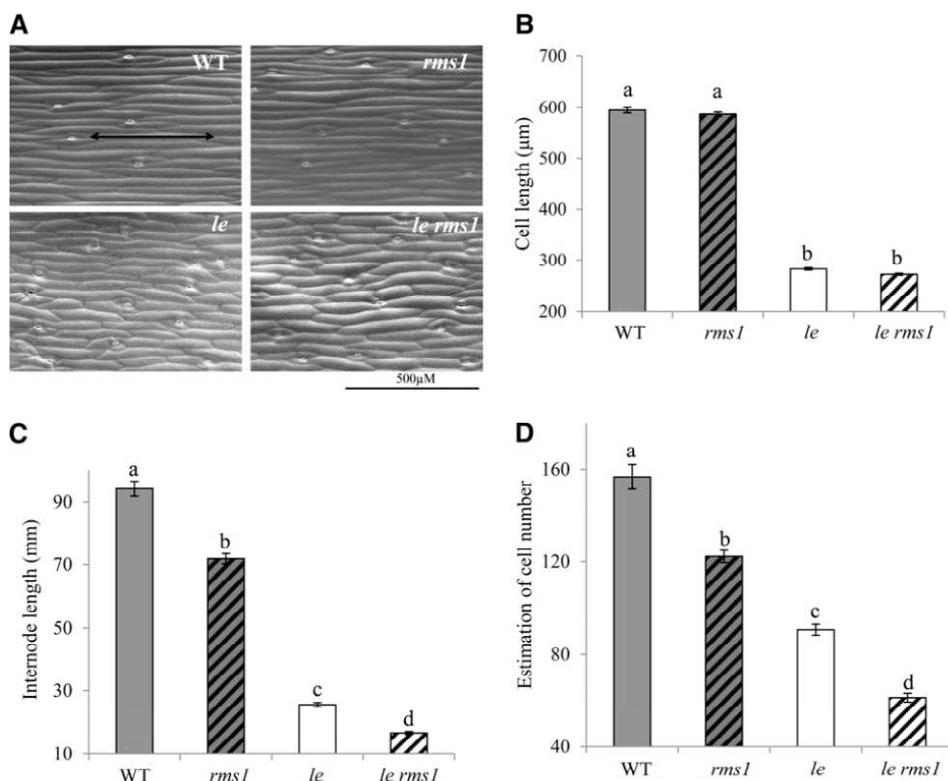


Figure 6. SLs regulate internode elongation by affecting cell number. A, Epidermal cells of internode 4 of the wild type (WT; top left), *rms1* (top right), *le* (bottom left), and *le rms1* (bottom right) in scanning electronic microscopy. B, Epidermal cell length (μ m) in internode 4 of the wild type, *rms1*, *le*, and *le rms1*. Data are means \pm se ($n = 7-8$ plants with about 100 cells per plant). Values with different lowercase letters are significantly different from one another (ANOVA, $P < 0.05$). C, Internode 4 length (mm) of the wild type, *rms1*, *le*, and *le rms1*. Values with different lowercase letters are significantly different from one another (ANOVA, $P < 0.01$). D, Estimation of cell number in internode 4 of the wild type, *rms1*, *le*, and *le rms1*. Values with different lowercase letters are significantly different from one another (ANOVA, $P < 0.001$).

de Saint Germain et al.

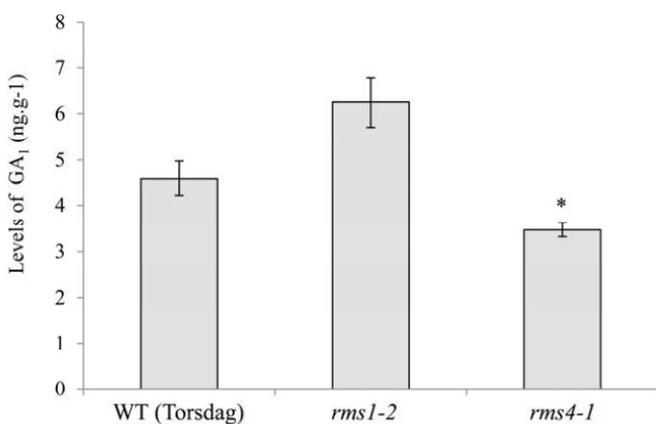


Figure 7. GA₁ levels in expanding stem tissue of wild-type (WT; Torsdag), *rms1-2*, and *rms4-1* 15-d-old plants. Data are means \pm SE ($n = 3$). The asterisk denotes a significant difference from wild-type plants (* $P < 0.05$, Student's t test).

and S5). These results support the hypothesis that the SL and GA pathways do not interact in the control of internode elongation. However, significant increases in expression of the GA biosynthesis gene *PsGA3ox1* and the GA deactivation genes *PsGA2ox1* and *PsGA2ox2* were observed in the SL mutants relative to the wild type (Supplemental Figs. S4B and S5). Accordingly, a slight decrease in *PsGA3ox1* transcript levels (although not significant) was observed after GR24 treatment in *rms1* but not in *rms4*. Elevated transcript levels of the two GA deactivation genes in the *rms4* SL-response mutant might explain the reduced levels of GA₁ in this mutant (Fig. 7; Supplemental Fig. S5).

Hence, the dwarf phenotype of both *rms* SL mutants cannot be explained by low levels of GA₁ in expanding tissue. This strengthens the previous genetic data (Fig. 5) that the action of SL on internode elongation is independent of GA biosynthesis.

SLs Regulate Internode Elongation in a DELLA-Deficient Background

To determine if the reduction of internode length due to SL deficiency requires functional DELLA proteins, we compared the internode length of SL-deficient and nondeficient lines in a background with no functional DELLA proteins (*la cry-s*; O'Neill et al., 2010). The double mutant *la cry-s* shows a slender phenotype with very long internodes, particularly the basal internodes. If SL and DELLA proteins act in the same pathway to control internode elongation, the dwarf phenotype caused by the *rms* mutations should not be observed in a genetic background where DELLA proteins are nonfunctional.

A strong variation in internode length between *RMS1* F3 families and *rms1* F3 families was observed, despite all these families being fixed for *la cry-s* and

le-1 (as both lines, cv T r se and HL178, contain the *le-1* allele). *RMS1* families had globally longer internodes (mean \pm SE = 53.1 \pm 1.59 mm) than the *rms1* families (mean \pm SE = 45.4 \pm 1.12 mm; Student's t test, $P < 0.01$; Fig. 8). In each of the three F3 families segregating for *RMS1/rms1*, a strong and significant effect of the *rms1* mutation was observed on internode length (Student's t test, $P < 0.01$ for family 6 and $P < 0.001$ for families 7 and 8; Fig. 8). These results indicate that functional DELLA proteins are not needed for SL to regulate internode elongation.

DELLA Proteins Are Not Degraded by SL in the Root Tip of Arabidopsis

Because pea is not amenable to transformation, we used the Arabidopsis transgenic line carrying the RGA promoter::GFP-RGA fusion (Silverstone et al., 2001) to test if SL application affects the levels of the DELLA protein. RGA is one of the five DELLA proteins present in Arabidopsis. Mutations at the *RGA* locus suppress the dwarf phenotype of the GA-deficient *ga1-3* mutant (Silverstone et al., 1997). The GFP-RGA fusion protein, localized to the nucleus in transgenic Arabidopsis seedlings, is rapidly degraded by GA treatment (Silverstone et al., 2001). The Arabidopsis *max* SL mutants have also been described to have reduced stature (Stirnberg et al., 2002; Booker et al., 2004), so we surmised that any effect of SL on DELLA proteins would also be conserved between pea and Arabidopsis.

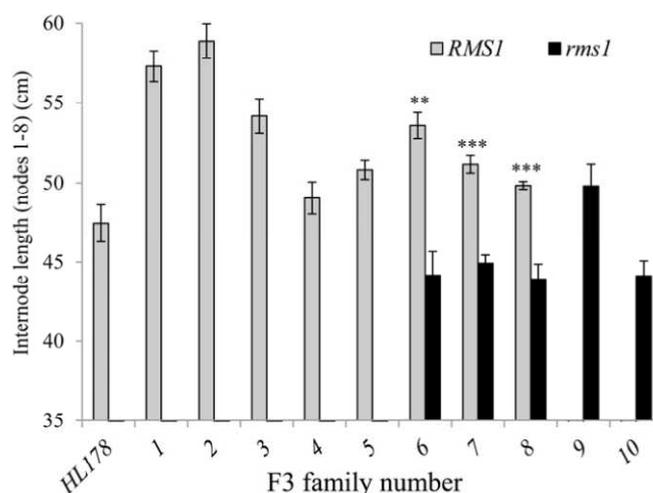


Figure 8. SLs control internode elongation in a *della* background. Internode length between nodes 1 and 8 were measured in the *della* line HL178 (*la cry-s*) and in F3 *della* families fixed for *la cry-s* and fixed for *RMS1* (1–5) or *rms1* (9 and 10) or segregating for *RMS1/rms1* (6–8). For families 6 to 8, the gray bars correspond to a mixture of *RMS1/RMS1* and *RMS1/rms1* plants ($n = 11$ –28 except for *rms1* F3 6–8, for which $n = 6$ –8). Asterisks denote significant differences from corresponding *rms1* plants (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, Student's t test).

The *pRGA::GFP-RGA* line was used to follow the levels and the localization of the GFP-RGA fusion protein after GR24 treatment in root tips of Arabidopsis seedlings. Root tips of transgenic plants expressing *pRGA::GFP-RGA* were treated with water or GA₃ (100 μM) as negative and positive controls, respectively, or with GR24 (10 μM) and observed 1 and 2.5 h after treatment using confocal microscopy (Fig. 9). GFP signal in the nuclei decreased slightly after 2.5 h in water but was maintained in the nuclei, while the GA₃ treatment induced a strong decrease of GFP fluorescence in the nuclei. No degradation of GFP-RGA in the nuclei was observed 1 or 2.5 h after the GR24 treatment (Fig. 9) or after 4 h (data not shown). These results are in accordance with the results shown above and altogether suggest that SLs do not interact with the GA signaling pathway.

Dose Response of GA Application on the Wild Type, *rms1*, and *rms4*

To test if the SL-related mutants are affected in GA response, a dose-response experiment was performed where GA₃ was applied to expanding stipules at node 3 of 8-d-old plants and the length of internode 4 was measured 8 d after application. Both mutants responded to the application of GA₃, and 2.5 μg of GA₃ restored the internode length of the mutants to the wild-type control. However, GA application did not remove the

difference in internode elongation between the mutants and the wild type (Fig. 10).

DISCUSSION

SLs Stimulate Stem Growth Independently from Its Effect on Branching

Pea grafting experiments have demonstrated that the reduced plant height observed in *rms1* SL-deficient plants is partly restored by wild-type rootstocks (Beveridge et al., 1997b). This could be a consequence of the majority of branching in the *rms1* shoot being inhibited by the wild-type rootstock or due to a supply of SL from the wild-type rootstock to the SL-deficient shoot. More recently, Umehara et al. (2008) demonstrated that the decreased plant height of *d10* SL-deficient mutant rice plants was restored to that of the wild type when grown with GR24 in the hydroponic medium, indicating a possible role for SL in the main stem, but again this was associated with reduced branching.

Here, we show that depleted SL levels are more directly responsible for the reduced height of the pea *rms1* SL-deficient mutant. Indeed, inhibiting the outgrowth of the buds along the *rms1* mutant stem by applying the synthetic SL, GR24, specifically to the axillary buds led to only a minimal and insignificant increase in plant height, as was also observed when all buds along the stem were manually removed (Figs.

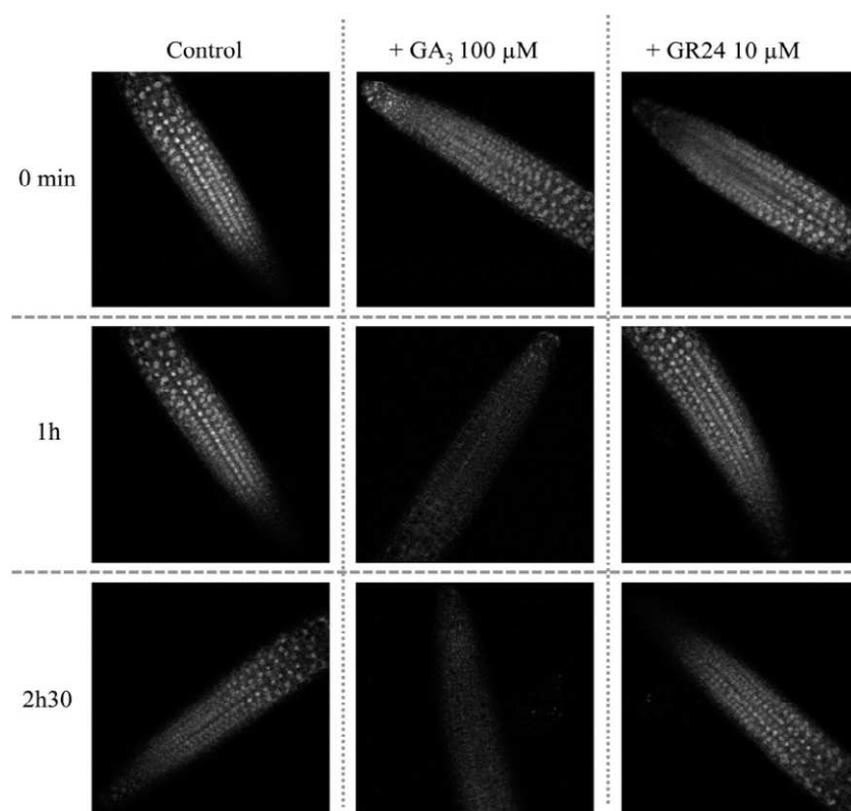


Figure 9. GA₃ but not GR24 treatment affects the expression of the GFP-RGA protein in root apex of Arabidopsis. Roots of transgenic plants (*rga/ga1-3* background) expressing the *pRGA::GFP-RGA* fusion were observed using confocal laser microscopy. Shown are three-dimensional projections of the fluorescence images of root tips treated with control solution (left column), 100 μM GA₃ (middle column), or 10 μM GR24 (right column) at different times as indicated.

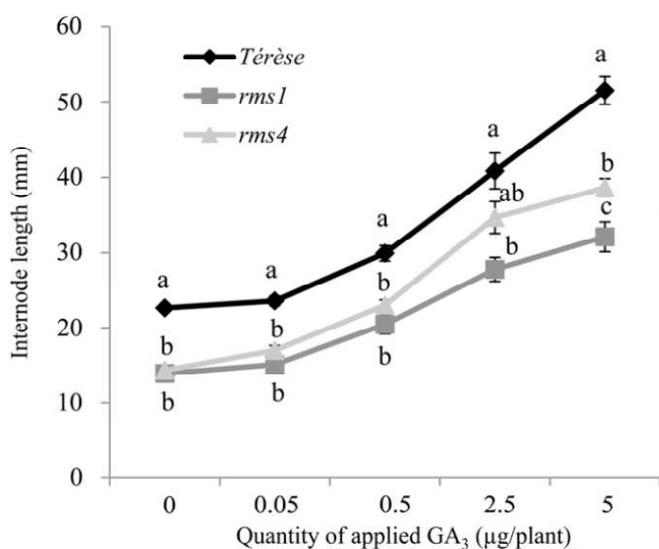


Figure 10. SL-related mutants respond to GA₃. Length of internode 4 of wild-type (diamonds), *rms1* (squares), and *rms4* (triangles) plants after treatment with various quantities of GA₃ (µg plant⁻¹). GA₃ was applied on stipules at node 3 when the plants were 8 d old. Measurements were made 8 d after treatment. Data are means ± SE ($n = 8-12$). Values with different lowercase letters are significantly different from one another (ANOVA, $P < 0.05$).

1 and 2). By contrast, the removal of axillary buds in rice led to a significant but partial restoration of reduced plant height in the *htd1/d17/Osccd7* SL-deficient mutant but had no significant effect on plant height in the wild type (Zou et al., 2006). This difference between pea and rice could be attributed to the huge difference of tiller numbers between the rice *htd1* mutant and the wild type (36 and one tillers, respectively); these tillers may act as a particularly strong sink; hence, their removal may substantially increase resources available to the main shoot for growth. In maize, a SL-independent action of the TB1 transcription factor to inhibit branching has been demonstrated, and, in contrast to other species, including rice, the branching of the *Zmccd8* mutant is particularly mild relative to *Tb1*. It is proposed that the dwarf phenotype of *Zmccd8* is not the result of competition for resources between the main stem and tillers, as the *Tb1* mutant displaying high branching is not affected in plant height (Guan et al., 2012). Similarly, in pea, the *Psbrc1* mutant is taller than *rms* mutants, although this comparison is less informative given that *Psbrc1* in pea has generally reduced branching compared with *rms* mutants (Braun et al., 2012).

As shown previously in rice (Umehara et al., 2008), continuously supplying GR24 to pea roots via hydroponics led to a significant increase of internode elongation in *rms1* SL-deficient plants but not in *rms4* SL-response mutant plants (Fig. 3B). This supports a role of SL in controlling plant height via an RMS4-dependent mechanism. This mechanism may be independent of the competition for resources between

growing branches and the main stem, since branch suppression by bud removal or direct application of SL to buds of pea has only minor effects on stem length. While we did not achieve a complete restoration of internode elongation in *rms1*, this may be related to the dose, duration, or starting point of GR24 treatment. Therefore, we suggest that, in addition to regulating shoot branching (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008), secondary growth (Agusti et al., 2011), and various aspects of root development (Koltai, 2011; Brewer et al., 2013), SLs also contribute to the regulation of internode elongation in the main shoot.

This function does not seem to occur via *PsBRC1*, a gene mostly expressed in axillary buds, as the pea *Psbrc1* mutant is not as reduced in plant height as the SL pea mutants (Fig. 1; Braun et al., 2012). The shade-avoidance response of the *brc1* mutant in *Arabidopsis* further demonstrates the lack of *BRC1* influence over stem elongation. In response to simulated shade (light conditions enriched in far-red light), wild-type *Arabidopsis* plants exhibit strongly reduced branching, but the *Arabidopsis brc1* mutant was partially insensitive, showing little reduction of branching (Gonzalez-Grandio et al., 2013). In contrast, when considering other shade-avoidance responses, including stem elongation, *brc1* mutants responded similarly to the wild type, suggesting that *BRC1* is involved in the control of branching but not of stem elongation in response to light enriched in far-red light (Gonzalez-Grandio et al., 2013). Whether SL biosynthesis and/or MAX2 are also regulated by these light conditions will need further investigation (Finlayson et al., 2010). Altogether, these observations add further support to the notion that SL can influence primary stem growth independently of its effect on axillary bud outgrowth. Nevertheless, it is still unclear why *Psbrc1* showed reduced plant height that was not changed when buds were manually removed together with a reduced stem width in both intact plants and plants with buds removed. Novel functions for *BRC1* are being discovered for this transcription factor, such as the regulation of flowering transition in axillary buds of *Arabidopsis* (Niwa et al., 2013), and further investigations are needed to have a good understanding of the mutant phenotype.

Tissue Specificity of SL Action on Cell Division

Among the three major plant hormones promoting stem elongation (IAA, GA, and BR), only GA has been shown to have an important effect on cell division, in addition to affecting cell elongation (Fig. 5; Achard et al., 2009; Lee et al., 2012). In pea, the length of epidermal cells in the internode is similar between *rms1* SL-deficient mutant plants and wild-type plants. Similarly, in rice, no difference in cell size was observed in the culm of the wild type and the *htd1/Osccd7* SL-deficient mutant (Zou et al., 2005). This suggests that SL does not act on cell elongation but rather stimulates cell division to regulate internode elongation. This

effect of SLs on cell division to increase plant height is in accordance with their effect on stimulating cambium-like cell divisions, as observed in the inflorescence stem of *Arabidopsis* and in the stem of other plants, including *Eucalyptus* species (Agusti et al., 2011). By contrast, it was shown that SLs repress mesocotyl elongation in dark-grown rice seedlings (Hu et al., 2010). This was also achieved by regulating cell division but not cell size in this tissue located between the coleoptile node and the cotyledon (Hu et al., 2010). Consequently, SLs appear to regulate cell division but with varying effects according to tissue. Whereas SLs would repress cell division in axillary meristems via the transcription factor PsBRC1 and repress cell division in the mesocotyl of dark-grown rice plants (Hu et al., 2010), SLs would promote cell division in the stem to stimulate longitudinal growth and secondary growth of the stem. Whether the stimulatory effect of SLs on internode elongation and their effect on secondary growth are independent will need further investigation, in particular by identifying the transcription factor(s) involved in these responses. Candidates might be found among the TCP family of transcription factors, comprising 24 members in *Arabidopsis* including BRC1. Several members of this plant-specific protein family have been shown to activate or repress the transcription of cell cycle genes, very likely in coordination with other proteins (Berckmans and De Veylder, 2009; Martín-Trillo and Cubas, 2010).

Applying GR24 to the shoot tip of SL-deficient *rms1* plants had no effect on main stem internode elongation (Fig. 4), suggesting that SL function in stem elongation is unlikely to be performed at the shoot tip. Nevertheless, in dicotyledons, stem tissues result from cell divisions occurring in a region called the rib meristem/rib zone, located at the base of the shoot apical meristem and consequently not directly at the surface of the shoot apex (Kerstetter and Hake, 1997). The strong difference between the GR24 and GA₁ effect when applied to the shoot tip is intriguing. It is possible that GR24 treatment could not reach the rib zone, where cells divide and elongate rapidly. One important characteristic of SL molecules is their low stability, which is essential for their role in the rhizosphere to signal the presence of a host root (Parniske, 2008). Moreover, SL reception seems to involve the hydrolysis of SLs into inactive compounds by the D14/DAD2 α/β -fold hydrolase (Hamiaux et al., 2012). Therefore, the continuous supply of SL may be essential (Smith and Waters, 2012) to observe an effect on internode elongation, which is a prolonged process, whereas axillary bud outgrowth is more a "switch on/off" process. This would explain why we observed an effect of GR24 on shoot elongation using hydroponics with continuous feeding and not by a single GR24 application to the shoot tip. In contrast, axillary bud outgrowth can be inhibited by a single GR24 application directly onto the bud.

An indirect growth effect due to the smaller root system of *Zmccd8* has been suggested in maize to

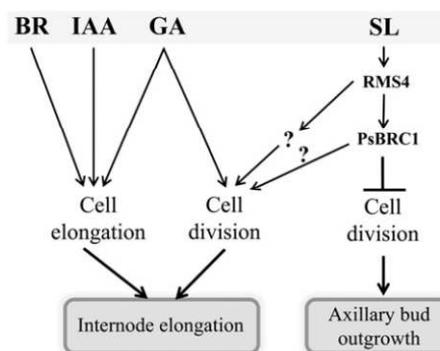


Figure 11. Model integrating the role of auxin (IAA), BR, GA, and SL on internode elongation in pea. Arrows indicate activation, and bars indicate repression. IAA and BR promote internode elongation by activating cell elongation; GA promotes internode elongation by activating both cell elongation and cell division; SL promotes internode elongation by cell division only independently from GA, via RMS4 and a transcription factor that, very likely, is not PsBRC1. In axillary buds, SL inhibits cell division via RMS4 and PsBRC1.

explain the dwarf phenotype of the mutant, which displays fewer nodal roots and shorter primary root than the wild type (Guan et al., 2012). In *Arabidopsis*, SLs have been shown to control different aspects of root growth (main and lateral roots, root hair; Koltai, 2011; Ruyter-Spira et al., 2011), and it is possible that root supply of GR24 influences root growth and, indirectly, shoot growth. Nevertheless, in pea, and in normal nutritive conditions, the root system is not much affected in the SL-deficient and SL-response *rms* mutants (Beveridge et al., 1997a; Foo et al., 2013; data not shown). By contrast, in another legume, *L. japonicus*, while transgenic *LjCCD7*-silenced SL-deficient plants have strongly reduced internode lengths, they have roots with higher biomass and a longer primary root than wild-type plants (Liu et al., 2013). Consequently, an indirect effect of the root system on internode length is unlikely to play a major role in the SL-related mutants based purely on effects on root growth. Of course, it remains possible that SL signaling in the roots regulates the level of another mobile signal that affects elongation.

SL and GA Stimulate Stem Growth Independently

It is tempting to speculate that SLs in the roots or stem affect the levels of other signals that control stem elongation by affecting cell division, such as GA. Here, different approaches (genetic, physiological, molecular) were used to test whether SLs affect GA levels or signaling to control internode elongation. GA₁ levels were not correlated with dwarfism, and no effect of GR24 application on the transcript level of GA metabolism genes was found. We showed that SL-deficient and SL-response mutants were able to respond to GA treatment and that functional DELLA proteins were not

de Saint Germain et al.

necessary for the SL regulation of internode elongation. Combined, our data strongly indicate that SLs do not act via GA to stimulate internode elongation in pea. Some results remain puzzling and will need further study, such as the reduced GA₁ levels observed in the SL-response *rms4* mutant. Nevertheless, it does not change our conclusion that SLs, independently of GA, stimulate cell division for the control of internode elongation in an RMS4-dependent pathway and possibly in a PsBRC1-independent pathway (Fig. 11). Another candidate for a SL-mediated signal in roots might be xylem-translocated cytokinins (CKs), which are considered to be anticorrelated in content with shoot SL signaling (Dun et al., 2009). CKs are known to play an important role in cell division, and xylem-CK content is known to be suppressed by reduced SL signaling. Unlike *rms* mutants, *Psbrcl* mutants do not contain depleted xylem sap CK levels, consistent with their taller stature. CKs are well known to affect cell proliferation in the shoot apical meristem, and reducing CK levels by overexpression of a catabolic CYTOKININ OXIDASE gene gives plants with shoot apical meristem containing fewer cells and slower leaf formation. Nevertheless, the role of CKs in the control of internode elongation still needs further investigation, as opposite results have been obtained in different species. Overexpression of a cytokinin oxidase to reduce endogenous levels of CK resulted in severe dwarf plants in tobacco due to both slower development and shorter internodes (Werner et al., 2001), but longer internodes were observed in transgenic poplar (*Populus tremula* × *tremuloides*) trees (Nieminen et al., 2008).

CONCLUSION

SLs were proposed to be central modulators of shoot architecture by modulating and coordinating shoot branching and secondary growth (Agusti and Greb, 2013). This study emphasizes the role of SLs in repressing or inducing the activities of different types of meristems to adjust shoot architecture to environmental conditions. We have shown by exogenous SL applications that control of branching and internode elongation can be independent. Whether, in natural conditions, these multiple actions of SLs are coordinated or not needs further investigation (Agusti and Greb, 2013).

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

The dwarf branching pea (*Pisum sativum*) mutants *rms1-10* (M3T-884), *rms1-11* (M3T-988), and *rms4-3* (M3T-946) were obtained in the dwarf (*le*) cv Tèrese and are described by Rameau et al. (1997). The *rms1-1* mutant (WL5237) obtained in the tall line Parvus and the *rms4-1* mutant (K164) obtained in the tall line cv Torsdag are described by Arumingtyas et al. (1992). The *rms1-2T* mutant line was obtained by backcrossing the *rms1-2* allele (derived from the cv Weitor background; Beveridge et al., 1997b) into the wild-type line Torsdag

three times. The *Psbrcl* used in this study corresponds to BC3 (*Psbrcl* × Tèrese). The mutant *Psbrcl*, identified by a TILLING (targeting-induced local lesions in genomes) approach from cv Caméor, is described by Braun et al. (2012). In the four *LE/le*, *RMS1/rms1* lines, *le RMS1* corresponds to cv Tèrese and *le rms1* corresponds to the *rms1-10* branching mutant. The *LE RMS1* line was obtained by backcrossing nine times the *LE* allele from Torsdag in cv Tèrese. The *LE rms1* line was obtained by crossing *LE RMS1* with the branching *rms1-10* mutant.

For Figure 8, the line HL178 *la cry-s* double mutant was crossed with the *rms1-10* line, and several slender F2 individuals (*la cry-s*) were selected phenotypically. Different F3 families, fixed for *la cry-s*, were followed that were either fixed for *RMS1* or *rms1* or segregating for *RMS1*. The branching phenotype of *rms1* plants was generally easy to identify; nevertheless, plants were genotyped for *RMS1* in the segregating F3 families. Because the *rms1* mutant and the double *la cry-s* mutant are not available in the same genetic background, comparisons of internode length were done for *rms1* F3 individuals (*rms1 rms1*) and nonbranching F3 individuals (*rms1 RMS1* and *RMS1 RMS1*) within the same segregating families (families 6–8 in Fig. 8). Other fixed *rms1* (families 9 and 10 in Fig. 8) and *RMS1* F3 (families 1–5 in Fig. 8) families were also analyzed for comparison.

The Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) transgenic line expressing the GFP-RGA protein under the control of the RGA promoter is described by Silverstone et al. (2001).

Growing Conditions and Phenotype Measurements

Pea plants were grown in 16-h-photoperiod glasshouse conditions as described (Braun et al., 2012). For Figures 2 and 4, pea plants were grown in an 18-h photoperiod as described (Dun et al., 2013). Nodes were numbered acropetally from the first scale leaf as node 1. Internodes were numbered acropetally, with internode 1 extending between node 1 and node 2. The indicated stage (leaves expanded) corresponds to the number of nodes with fully expanded leaves. Bud and branch lengths were measured with digital calipers. For longer culture, one or two plants were cultivated per 2-L pot. To study the effect of branching on internode elongation, axillary buds were removed every day.

Hormonal Treatments

For Figure 2, solutions applied directly to the axillary buds contained 50% ethanol, 2% polyethylene glycol 1450, 0.1% acetone, and 0 or 1 μM (3 ng) GR24.

For shoot apex treatments (Fig. 4), 2 μL of solution containing 0 or 10 μM (6 ng) GR24 or 1.4 mM GA₃ (0.1 μg; Sigma) in 0.2% Tween 20 with 1% acetone and 5% ethanol was applied with a pipette to the unexpanded stipules of the shoot tip.

For hydroponics treatments, culture was as described by Braun et al. (2012), except that 33-L polyvinyl chloride opaque pots were used, one for each genotype. Acetone or GR24 (dissolved in acetone) was added to the hydroponic culture solution to give a final concentration of 0 or 3 μM GR24 and 0.01% acetone. The hydroponic culture solution was continuously aerated by an aquarium pump and was replaced weekly. One day after the beginning of the treatment, expanding stem tissue (internode 5) and epicotyls were harvested for gene expression analyses.

For GA treatment, 2 μL of solution containing GA₃ (Sigma) at the concentrations specified dissolved in 95% ethanol was applied to each of the two stipules at node 3 of the main stem on 8-d-old plants.

Gene Expression Analyses

Elongating internodes were harvested, total RNA was isolated and quantified, complementary DNA was synthesized, and real-time PCR gene expression analyses were performed as described (Braun et al., 2012). The analysis was done in two independent experiments. Primer sequences were as follows for GA synthesis genes and GA deactivation genes: *PsGA20ox1*, 5'-CATICCATAGGCCAAATTTCAAT-3' and 5'-CTGCCCTATGTAAACAACCTCTGTATCT-3'; *PsGA3ox1*, 5'-TTCGAGAAGCTCTGGCCTCAAG-3' and 5'-ATGTTCTGCTAACTTTTTCATGGTT-3'; *PsGA2ox1*, 5'-CACAAACCAATCAGAACAACAATTTC-3' and 5'-CCCTTCTGCATCAAATCAAG-3'; *PsGA2ox2*, 5'-CCCTCCTGACCCAGTGAAT-3' and 5'-CTCACACTCACAATCTTCCATTG-3'. Transcript levels for the different genes were expressed relative to the expression of the *EF1α* gene (Johnson et al., 2006).

Segregation Studies

The cleaved-amplified polymorphic sequence marker for genotyping *RMS1* was based on amplification of the PCR fragment using primers *RMS1-118F* (5'-TTGGTTGGACTTCACCTTGAGG-3') and *RMS1-984R* (5'-CACACAACAT-CAGCAATGACAGC-3') and digestion with the *Cfr13I* enzyme (Fermentas).

Hormone Quantification

Harvested material (expanding internodes of 15-d-old plants) was extracted in cold 80% methanol and prepared for analysis by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry as described previously (Tivendale et al., 2012). The internal standard was [²H₂]GA₁, provided by Prof. Lewis Mander (Australian National University). The system consisted of a Waters Acquity H-series ultra-performance liquid chromatograph coupled to a Waters Xevo triple quadrupole mass spectrometer. A Waters Acquity UPLC BEH C18 column (2.1 × 100 mm × 1.7 μm particles) was used, with mobile phases A = 1% acetic acid (v/v) in water and B = acetonitrile. The program ran from 100% A to 85% A/15% B over 2 min, then to 77.5% A/22.5% B at 7 min. GA₁ eluted at approximately 6 min. The flow rate was 0.35 mL min⁻¹, and the column temperature was 35°C. Mass spectrometry was conducted in the electrospray and multiple reaction monitoring modes, monitoring negative ions. The ion source temperature was 130°C, the desolvation gas was nitrogen at 950 L h⁻¹, the cone gas was nitrogen at 50 L h⁻¹, the desolvation temperature was 450°C, the capillary voltage was 2.7 kV, and the cone voltage was 46 V. The transitions monitored, with collision energies in parentheses, were mass-to-charge ratio (*m/z*) 347.3 to 229.1 (28 V) and *m/z* 347.3 to 273.1 (22 V) for endogenous GA₁ and *m/z* 349.3 to 231.1 (28 V) and *m/z* 349.3 to 275.1 (22 V) for deuterated GA₁. The dwell time was 120 ms per channel.

Cell Measurements Using Scanning Electronic Microscopy

Freshly sampled tissues were cooled to -33°C by a Peltier cooling stage (Deben) and observed with a Hirox SH-1500 bench-top scanning electronic microscope. Internode 4 of 16-d-old plants was used, and its length was measured (eight plants per genotype). The epidermis cells of this internode were directly observed with a scanning electron microscope (MEB Hirox SH-1500). About 100 cells per plant were analyzed with ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), representing a total of 770 to 1,000 cells per genotype. The cell number in each internode 4 was estimated by the ratio of internode 4 length to mean cell length.

Confocal Laser Microscopy

Detection of GFP fluorescence was performed with a Zeiss LSM 710 confocal microscope. The excitation wavelength was 488 and 561 nm, and emission was collected at 565 to 720 nm for root tip imaging. For the experiments, root tips from 4-d-old transgenic plants expressing *pRGA::GFP-RGA* were mounted on standard microscope slides in the presence of water (5% acetone), 100 μM GA₃ (5% acetone), or 10 μM GR24 (5% acetone).

Sequence data from this article can be found in the GenBank/EMBL data libraries under accession numbers DQ403160 (*RMS5*), X91658 and U58830 (*PsGA2ox1*), AF001219 and U85045 (*PsGA3ox1*), AF100955 (*PsGA2ox1*), and AF100954 (*PsGA2ox2*).

Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Figure S1. Stem and stipule diameters of intact plants and plants with buds removed.

Supplemental Figure S2. Cell width of epidermal internode.

Supplemental Figure S3. Transcript levels of the SL biosynthesis gene *RMS5* after GR24 supply.

Supplemental Figure S4. Transcript levels of GA biosynthesis genes after GR24 supply.

Supplemental Figure S5. Transcript levels of GA catabolism genes after GR24 supply.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Sandrine Bonhomme (IJPB, Versailles) and Evelyne Costes (UMR AGAP, INRA Montpellier) for comments on the manuscript, François-Didier Boyer (ICSN, Gif-sur-Yvette) for kindly supplying GR24, and Noel Davies (Central Science Laboratory, University of Tasmania) for assistance with GA analyses.

Received April 26, 2013; accepted August 8, 2013; published August 13, 2013.

LITERATURE CITED

- Achard P, Gusti A, Cheminant S, Alioua M, Dhondt S, Coppens F, Beemster GT, Genschik P (2009) Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **19**: 1188–1193
- Aguilar-Martínez JA, Poza-Carrón C, Cubas P (2007) *Arabidopsis* BRANCHED1 acts as an integrator of branching signals within axillary buds. *Plant Cell* **19**: 458–472
- Agusti J, Greb T (2013) Going with the wind: adaptive dynamics of plant secondary meristems. *Mech Dev* **130**: 34–44
- Agusti J, Herold S, Schwarz M, Sanchez P, Ljung K, Dun EA, Brewer PB, Beveridge CA, Sieberer T, Sehr EM, et al (2011) Strigolactone signaling is required for auxin-dependent stimulation of secondary growth in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 20242–20247
- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **435**: 824–827
- Alder A, Jamil M, Marzorati M, Bruno M, Vermathen M, Bigler P, Ghisla S, Bouwmeester H, Beyer P, Al-Babli S (2012) The path from β-carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone. *Science* **335**: 1348–1351
- Arite T, Iwata H, Ohshima K, Maekawa M, Nakajima M, Kojima M, Sakakibara H, Kyoizuka J (2007) DWARF10, an *RMS1*/MAX4/DAD1 ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *Plant J* **51**: 1019–1029
- Arite T, Umehara M, Ishikawa S, Hanada A, Maekawa M, Yamaguchi S, Kyoizuka J (2009) d14, a strigolactone-insensitive mutant of rice, shows an accelerated outgrowth of tillers. *Plant Cell Physiol* **50**: 1416–1424
- Arumingtyas EL, Floyd RS, Gregory MJ, Murfet IC (1992) Branching in *Pisum*: inheritance and allelism tests with 17 *ramosus* mutants. *Pisum Genet* **24**: 17–31
- Berckmans B, De Veylder L (2009) Transcriptional control of the cell cycle. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 599–605
- Beveridge CA, Dun EA, Rameau C (2009) Pea has its tendrils in branching discoveries spanning a century from auxin to strigolactones. *Plant Physiol* **151**: 985–990
- Beveridge CA, Kyoizuka J (2010) New genes in the strigolactone-related shoot branching pathway. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 34–39
- Beveridge CA, Murfet IC, Kerhoas L, Sotta B, Miginiac E, Rameau C (1997a) The shoot controls zeatin riboside export from pea roots: evidence from the branching mutant *rms4*. *Plant J* **11**: 339–345
- Beveridge CA, Ross JJ, Murfet IC (1996) Branching in pea: action of genes *Rms3* and *Rms4*. *Plant Physiol* **110**: 859–865
- Beveridge CA, Symons GM, Murfet IC, Ross JJ, Rameau C (1997b) The *rms1* mutant of pea has elevated indole-3-acetic acid levels and reduced root-sap zeatin riboside content but increased branching controlled by graft transmissible signal(s). *Plant Physiol* **115**: 1251–1258
- Booker J, Auldridge M, Wills S, McCarty D, Klee H, Leyser O (2004) MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule. *Curr Biol* **14**: 1232–1238
- Booker J, Sieberer T, Wright W, Williamson L, Willett B, Stirnberg P, Turnbull C, Srinivasan M, Goddard P, Leyser O (2005) MAX1 encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of MAX3/4 to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone. *Dev Cell* **8**: 443–449
- Boyer FD, de Saint Germain A, Pillot JP, Pouvreau JB, Chen VX, Ramos S, Stévenin A, Simier P, Delavault P, Beau JM, et al (2012) Structure-activity relationship studies of strigolactone-related molecules for branching inhibition in garden pea: molecule design for shoot branching. *Plant Physiol* **159**: 1524–1544
- Braun N, de Saint Germain A, Pillot JP, Boutet-Mercey S, Dalmais M, Antoniadis I, Li X, Maia-Grondard A, Le Signor C, Bouteiller N, et al (2012) The pea TCP transcription factor *PsBRC1* acts downstream of strigolactones to control shoot branching. *Plant Physiol* **158**: 225–238

de Saint Germain et al.

- Brewer PB, Dun EA, Ferguson BJ, Rameau C, Beveridge CA (2009) Strigolactone acts downstream of auxin to regulate bud outgrowth in pea and Arabidopsis. *Plant Physiol* **150**: 482–493
- Brewer PB, Koltai H, Beveridge CA (2013) Diverse roles of strigolactones in plant development. *Mol Plant* **6**: 18–28
- Cleland RE (2010) *Auxin and Cell Elongation*. Springer, Dordrecht, The Netherlands
- Clouse SD, Sasse JM (1998) Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* **49**: 427–451
- Davies PJ, editor (2010) *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Springer, Dordrecht, The Netherlands
- Doebley JF, Gaut BS, Smith BD (2006) The molecular genetics of crop domestication. *Cell* **127**: 1309–1321
- Drummond RS, Martínez-Sánchez NM, Janssen BJ, Templeton KR, Simons JL, Quinn BD, Karunairetnam S, Snowden KC (2009) *Petunia hybrida* CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE7 is involved in the production of negative and positive branching signals in petunia. *Plant Physiol* **151**: 1867–1877
- Dun EA, de Saint Germain A, Rameau C, Beveridge CA (2013) Dynamics of strigolactone function and shoot branching responses in *Pisum sativum*. *Mol Plant* **6**: 128–140
- Dun EA, Hanan J, Beveridge CA (2009) Computational modeling and molecular physiology experiments reveal new insights into shoot branching in pea. *Plant Cell* **21**: 3459–3472
- Ellis TH, Hofer JM, Timmerman-Vaughan GM, Coyne CJ, Hellens RP (2011) Mendel, 150 years on. *Trends Plant Sci* **16**: 590–596
- Finlayson SA, Krishnareddy SR, Kebrom TH, Casal JJ (2010) Phytochrome regulation of branching in Arabidopsis. *Plant Physiol* **152**: 1914–1927
- Foo E, Yoneyama K, Hugill CJ, Quittenden LJ, Reid JB (2013) Strigolactones and the regulation of pea symbioses in response to nitrate and phosphate deficiency. *Mol Plant* **6**: 76–87
- Frigerio M, Alabadi D, Pérez-Gómez J, García-Cárcel L, Phillips AL, Hedden P, Blázquez MA (2006) Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol* **142**: 553–563
- Gao Z, Qian Q, Liu X, Yan M, Feng Q, Dong G, Liu J, Han B (2009) Dwarf 88, a novel putative esterase gene affecting architecture of rice plant. *Plant Mol Biol* **71**: 265–276
- Gendreau E, Traas J, Desnos T, Grandjean O, Caboche M, Höfte H (1997) Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **114**: 295–305
- Gomez-Roldan V, Feras S, Brewer PB, Puech-Pagès V, Dun EA, Pillot JP, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais JC, et al (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**: 189–194
- Gonzalez-Grandio E, Poza-Carrion C, Sorzano CO, Cubas P (2013) BRANCHED1 promotes axillary bud dormancy in response to shade in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 834–850
- Guan JC, Koch KE, Suzuki M, Wu S, Latshaw S, Petruff T, Goulet C, Klee HJ, McCarty DR (2012) Diverse roles of strigolactone signaling in maize architecture and the uncoupling of a branching-specific subnetwork. *Plant Physiol* **160**: 1303–1317
- Hamiaux C, Drummond RS, Janssen BJ, Ledger SE, Cooney JM, Newcomb RD, Snowden KC (2012) DAD2 is an α/β hydrolase likely to be involved in the perception of the plant branching hormone, strigolactone. *Curr Biol* **22**: 2032–2036
- Hedden P (2003) The genes of the Green Revolution. *Trends Genet* **19**: 5–9
- Heinrich M, Hattenhausen C, Lange T, Wünsche H, Fang J, Baldwin IT, Wu J (2013) High levels of jasmonic acid antagonize the biosynthesis of gibberellins and inhibit the growth of *Nicotiana attenuata* stems. *Plant J* **73**: 591–606
- Hu Z, Yan H, Yang J, Yamaguchi S, Maekawa M, Takamura I, Tsutsumi N, Kyojuka J, Nakazono M (2010) Strigolactones negatively regulate mesocotyl elongation in rice during germination and growth in darkness. *Plant Cell Physiol* **51**: 1136–1142
- Hubbard L, McSteen P, Doebley J, Hake S (2002) Expression patterns and mutant phenotype of teosinte branched1 correlate with growth suppression in maize and teosinte. *Genetics* **162**: 1927–1935
- Ingram TJ, Reid D, MacMillan J (1986) The quantitative relationship between gibberellin A₁ and internode growth in *Pisum sativum* L. *Planta* **168**: 414–420
- Ishikawa S, Maekawa M, Arite T, Onishi K, Takamura I, Kyojuka J (2005) Suppression of tiller bud activity in tillering dwarf mutants of rice. *Plant Cell Physiol* **46**: 79–86
- Jager CE, Symons GM, Nomura T, Yamada Y, Smith JJ, Yamaguchi S, Kamiya Y, Weller JL, Yokota T, Reid JB (2007) Characterization of two brassinosteroid C-6 oxidase genes in pea. *Plant Physiol* **143**: 1894–1904
- Jiang C, Fu X (2007) GA action: turning on de-DELTA repressing signaling. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 461–465
- Johnson X, Brcich T, Dun EA, Goussot M, Haurogné K, Beveridge CA, Rameau C (2006) Branching genes are conserved across species: genes controlling a novel signal in pea are coregulated by other long-distance signals. *Plant Physiol* **142**: 1014–1026
- Kagiyama M, Hirano Y, Mori T, Kim SY, Kyojuka J, Seto Y, Yamaguchi S, Hakoshima T (2013) Structures of D14 and D14L in the strigolactone and karrikin signaling pathways. *Genes Cells* **18**: 147–160
- Kapulnik Y, Delaux PM, Resnick N, Mayzlish-Gati E, Winer S, Bhattacharya C, Séjalon-Delmas N, Comber JP, Bécard G, Belausov E, et al (2011) Strigolactones affect lateral root formation and root-hair elongation in Arabidopsis. *Planta* **233**: 209–216
- Kerstetter RA, Hake S (1997) Shoot meristem formation in vegetative development. *Plant Cell* **9**: 1001–1010
- Kohlen W, Charnikhova T, Lammers M, Pollina T, Tóth P, Haider I, Pozo MJ, de Maagd RA, Ruyter-Spira C, Bouwmeester HJ, et al (2012) The tomato CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8 (SlCCD8) regulates rhizosphere signaling, plant architecture and affects reproductive development through strigolactone biosynthesis. *New Phytol* **196**: 535–547
- Koltai H (2011) Strigolactones are regulators of root development. *New Phytol* **190**: 545–549
- Kuppusamy KT, Walcher CL, Nemhauser JL (2009) Cross-regulatory mechanisms in hormone signaling. *Plant Mol Biol* **69**: 375–381
- Lee LY, Hou X, Fang L, Fan S, Kumar PP, Yu H (2012) STUNTED mediates the control of cell proliferation by GA in Arabidopsis. *Development* **139**: 1568–1576
- Lester DR, Ross JJ, Davies PJ, Reid JB (1997) Mendel's stem length gene (*Le*) encodes a gibberellin 3 β -hydroxylase. *Plant Cell* **9**: 1435–1443
- Lester DR, Ross JJ, Smith JJ, Elliott RC, Reid JB (1999) Gibberellin 2-oxidation and the SLN gene of *Pisum sativum*. *Plant J* **19**: 65–73
- Lin H, Wang R, Qian Q, Yan M, Meng X, Fu Z, Yan C, Jiang B, Su Z, Li J, et al (2009) DWARF27, an iron-containing protein required for the biosynthesis of strigolactones, regulates rice tiller bud outgrowth. *Plant Cell* **21**: 1512–1525
- Liu J, Novero M, Charnikhova T, Ferrandino A, Schubert A, Ruyter-Spira C, Bonfante P, Lovisolo C, Bouwmeester HJ, Cardinale F (2013) Carotenoid cleavage dioxygenase 7 modulates plant growth, reproduction, senescence, and determinate nodulation in the model legume *Lotus japonicus*. *J Exp Bot* **64**: 1967–1981
- Liu W, Wu C, Fu Y, Hu G, Si H, Zhu L, Luan W, He Z, Sun Z (2009) Identification and characterization of HTD2: a novel gene negatively regulating tiller bud outgrowth in rice. *Planta* **230**: 649–658
- Lo SF, Yang SY, Chen KT, Hsing YI, Zeevaert JA, Chen LJ, Yu SM (2008) A novel class of gibberellin 2-oxidases control semidwarfism, tillering, and root development in rice. *Plant Cell* **20**: 2603–2618
- López-Ráez JA, Matusova R, Cardoso C, Jamil M, Charnikhova T, Kohlen W, Ruyter-Spira C, Verstappen F, Bouwmeester H (2009) Strigolactones: ecological significance and use as a target for parasitic plant control. *Pest Manag Sci* **65**: 471–477
- Martin DN, Proebsting WM, Hedden P (1997) Mendel's dwarfing gene: cDNAs from the *Le* alleles and function of the expressed proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 8907–8911
- Martín-Trillo M, Cubas P (2010) TCP genes: a family snapshot ten years later. *Trends Plant Sci* **15**: 31–39
- McSteen P (2009) Hormonal regulation of branching in grasses. *Plant Physiol* **149**: 46–55
- Napoli C (1996) Highly branched phenotype of the petunia *dad1-1* mutant is reversed by grafting. *Plant Physiol* **111**: 27–37
- Nemhauser JL, Hong F, Chory J (2006) Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell* **126**: 467–475
- Nieminen K, Immanen J, Laxell M, Kauppinen L, Tarkowski P, Dolezal K, Tähtiharju S, Elo A, Decourteix M, Ljung K, et al (2008) Cytokinin signaling regulates cambial development in poplar. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 20032–20037
- Niwa M, Daimon Y, Kurotani K, Higo A, Prunedo-Paz JL, Breton G, Mitsuda N, Kay SA, Ohme-Takagi M, Endo M, et al (2013) BRANCHED1 interacts with FLOWERING LOCUS T to repress the floral transition of the axillary meristems in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 1228–1242

Strigolactones Stimulate Internode Elongation

- Olszewski N, Sun TP, Gubler F (2002) Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell (Suppl)* **14**: S61–S80
- O'Neill DP, Davidson SE, Clarke VC, Yamauchi Y, Yamaguchi S, Kamiya Y, Reid JB, Ross JJ (2010) Regulation of the gibberellin pathway by auxin and DELLA proteins. *Planta* **232**: 1141–1149
- O'Neill DP, Ross JJ (2002) Auxin regulation of the gibberellin pathway in pea. *Plant Physiol* **130**: 1974–1982
- Ongaro V, Leyser O (2008) Hormonal control of shoot branching. *J Exp Bot* **59**: 67–74
- Parniske M (2008) Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol* **6**: 763–775
- Peng J, Richards DE, Hartley NM, Murphy GP, Devos KM, Flintham JE, Beales J, Fish LJ, Worland AJ, Pelica F, et al (1999) 'Green Revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* **400**: 256–261
- Rameau C, Bodelin C, Cadier D, Grandjean O, Miard F (1997) New ramosus mutants at loci Rms1, Rms3 and Rms4 resulting from the mutation breeding program at Versailles. *Pisum Genet* **29**: 7–12
- Rasmussen A, Mason MG, De Cuyper C, Brewer PB, Herold S, Agusti J, Geelen D, Greb T, Goormachtig S, Beeckman T, et al (2012) Strigolactones suppress adventitious rooting in Arabidopsis and pea. *Plant Physiol* **158**: 1976–1987
- Reid JB (1983) Internode length in Pisum: do the internode length genes effect growth in dark-grown plants? *Plant Physiol* **72**: 759–763
- Reid JB, Davidson SE, Ross JJ (2011) Auxin acts independently of DELLA proteins in regulating gibberellin levels. *Plant Signal Behav* **6**: 406–408
- Reid JB, Ross JJ (2011) Mendel's genes: toward a full molecular characterization. *Genetics* **189**: 3–10
- Ross JJ, O'Neill DP, Rathbone DA (2003) Auxin-gibberellin interactions in pea: integrating the old with the new. *J Plant Growth Regul* **22**: 99–108
- Ross JJ, O'Neill DP, Smith JJ, Kerckhoffs LH, Elliott RC (2000) Evidence that auxin promotes gibberellin A1 biosynthesis in pea. *Plant J* **21**: 547–552
- Ross JJ, Reid JB (1986) Internode length in *Pisum*: the involvement of ethylene with the gibberellin insensitive erectoides phenotype. *Physiol Plant* **67**: 673–679
- Ross JJ, Reid JB, Dungey HS (1992) Ontogenetic variation in levels of gibberellin A1 in Pisum: implications for the control of stem elongation. *Planta* **186**: 166–171
- Ross JJ, Weston DE, Davidson SE, Reid JB (2011) Plant hormone interactions: how complex are they? *Physiol Plant* **141**: 299–309
- Ruyter-Spira C, Kohlen W, Charnikhova T, van Zeijl A, van Bezouwen L, de Ruijter N, Cardoso C, Lopez-Raez JA, Matusova R, Bours R, et al (2011) Physiological effects of the synthetic strigolactone analog GR24 on root system architecture in Arabidopsis: another belowground role for strigolactones? *Plant Physiol* **155**: 721–734
- Salamini F (2003) Hormones and the green revolution. *Science* **302**: 71–72
- Sasaki A, Ashikari M, Ueguchi-Tanaka M, Itoh H, Nishimura A, Swapan D, Ishiyama K, Saito T, Kobayashi M, Khush GS, et al (2002) Green Revolution: a mutant gibberellin-synthesis gene in rice. *Nature* **416**: 701–702
- Silverstone AL, Jung HS, Dill A, Kawaide H, Kamiya Y, Sun TP (2001) Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**: 1555–1566
- Silverstone AL, Mak PY, Martínez EC, Sun TP (1997) The new RGA locus encodes a negative regulator of gibberellin response in Arabidopsis thaliana. *Genetics* **146**: 1087–1099
- Smith SM, Waters MT (2012) Strigolactones: destruction-dependent perception? *Curr Biol* **22**: R924–R927
- Snowden KC, Simkin AJ, Janssen BJ, Templeton KR, Loucas HM, Simons JL, Karunairetnam S, Gleave AP, Clark DG, Klee HJ (2005) The *DECREASED APICAL DOMINANCE1/Petunia hybrida CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8* gene affects branch production and plays a role in leaf senescence, root growth, and flower development. *Plant Cell* **17**: 746–759
- Sorefan K, Booker J, Haurogné K, Goussot M, Bainbridge K, Foo E, Chatfield S, Ward S, Beveridge C, Rameau C, et al (2003) MAX4 and RMS1 are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in Arabidopsis and pea. *Genes Dev* **17**: 1469–1474
- Stirnberg P, Furner IJ, Ottoline Leyser HM (2007) MAX2 participates in an SCF complex which acts locally at the node to suppress shoot branching. *Plant J* **50**: 80–94
- Stirnberg P, van De Sande K, Leyser HM (2002) MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in Arabidopsis. *Development* **129**: 1131–1141
- Tivendale ND, Davidson SE, Davies NW, Smith JA, Dalmais M, Bendahmane AI, Quittenden LJ, Sutton L, Bala RK, Le Signor C, et al (2012) Biosynthesis of the halogenated auxin, 4-chloroindole-3-acetic acid. *Plant Physiol* **159**: 1055–1063
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, et al (2008) Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* **455**: 195–200
- Vogler H, Kuhlemeier C (2003) Simple hormones but complex signalling. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 51–56
- Waters MT, Nelson DC, Scaffidi A, Flematti GR, Sun YK, Dixon KW, Smith SM (2012) Specialisation within the DWARF14 protein family confers distinct responses to karrikins and strigolactones in Arabidopsis. *Development* **139**: 1285–1295
- Werner T, Motyka V, Strnad M, Sch Müller T (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 10487–10492
- Weston DE, Elliott RC, Lester DR, Rameau C, Reid JB, Murfet IC, Ross JJ (2008) The pea DELLA proteins LA and CRY are important regulators of gibberellin synthesis and root growth. *Plant Physiol* **147**: 199–205
- Wolbang CM, Chandler PM, Smith JJ, Ross JJ (2004) Auxin from the developing inflorescence is required for the biosynthesis of active gibberellins in barley stems. *Plant Physiol* **134**: 769–776
- Wolbang CM, Ross JJ (2001) Auxin promotes gibberellin biosynthesis in decapitated tobacco plants. *Planta* **214**: 153–157
- Zentella R, Zhang ZL, Park M, Thomas SG, Endo A, Murase K, Fleet CM, Jikumaru Y, Nambara E, Kamiya Y, et al (2007) Global analysis of della direct targets in early gibberellin signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 3037–3057
- Zou J, Chen Z, Zhang S, Zhang W, Jiang G, Zhao X, Zhai W, Pan X, Zhu L (2005) Characterizations and fine mapping of a mutant gene for high tillering and dwarf in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* **222**: 604–612
- Zou J, Zhang S, Zhang W, Li G, Chen Z, Zhai W, Zhao X, Pan X, Xie Q, Zhu L (2006) The rice HIGH-TILLERING DWARF1 encoding an ortholog of Arabidopsis MAX3 is required for negative regulation of the outgrowth of axillary buds. *Plant J* **48**: 687–698

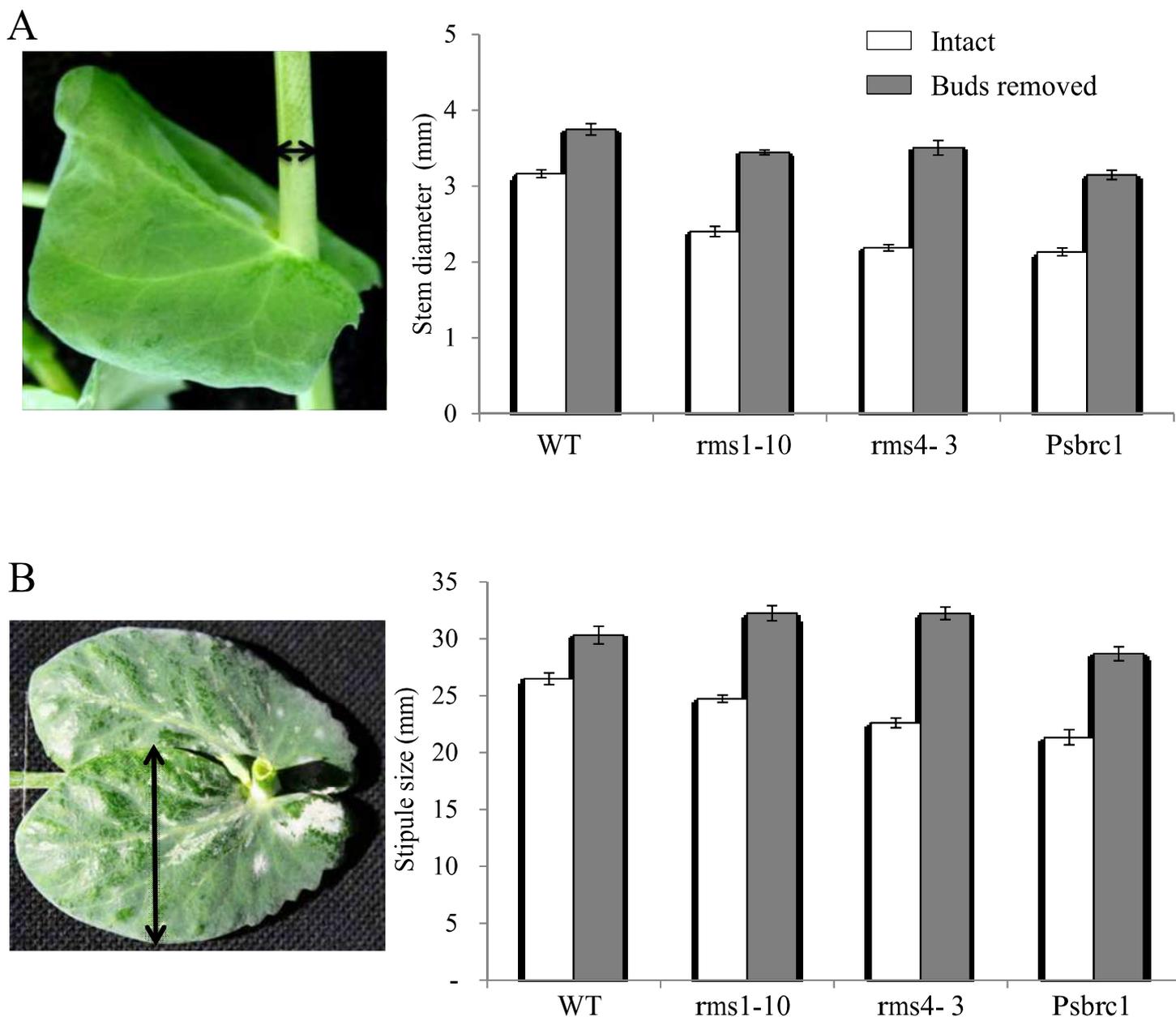


Figure S1. Quantification of stem diameter and stipule diameter of intact plants and plants with buds removed

- A. The stem diameter (arrow) at the base of node 3 was measured when the plants were 30-d-old. Data are means \pm standard error (n = 7-8).
- B. The stipule width (arrow) at node 3 was measured when the plants were 30-d-old. Data are means \pm standard error (n = 7-8).

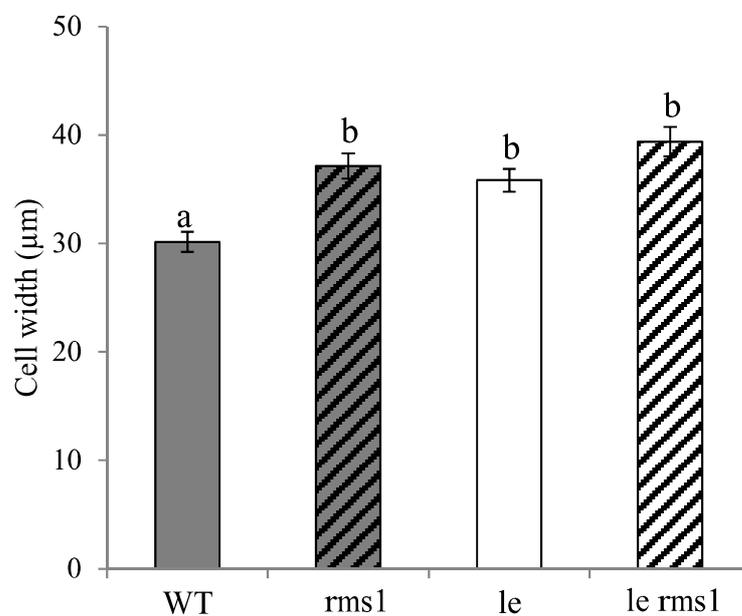


Figure S2. Cell width of epidermal internode of pea WT, rms1, le, le rms1 plants. Data are means \pm SE (n = 8 plants; 70-100 cells per plant). Values with different lowercase letters are significantly different from one another (ANOVA, $P < 0.05$).

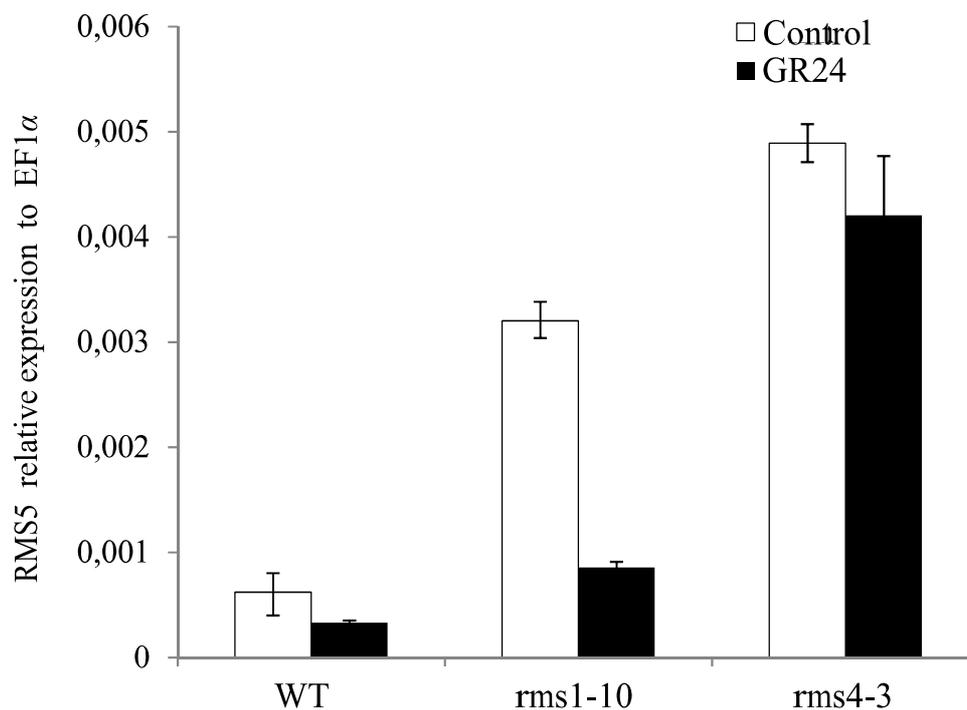


Figure S3. Relative transcript levels of the SL biosynthesis gene RMS5/PsCCD7 in pea epicotyl tissue. RMS5 transcript level relative to EF1 α was quantified 24 h after supply of 0 or 3 μ M GR24 via hydroponics to 6-d-old WT, rms1-10 and rms4-3 plants (cultivar Tèrese). Data are means \pm SE (n = 3 pools of 6 plants).

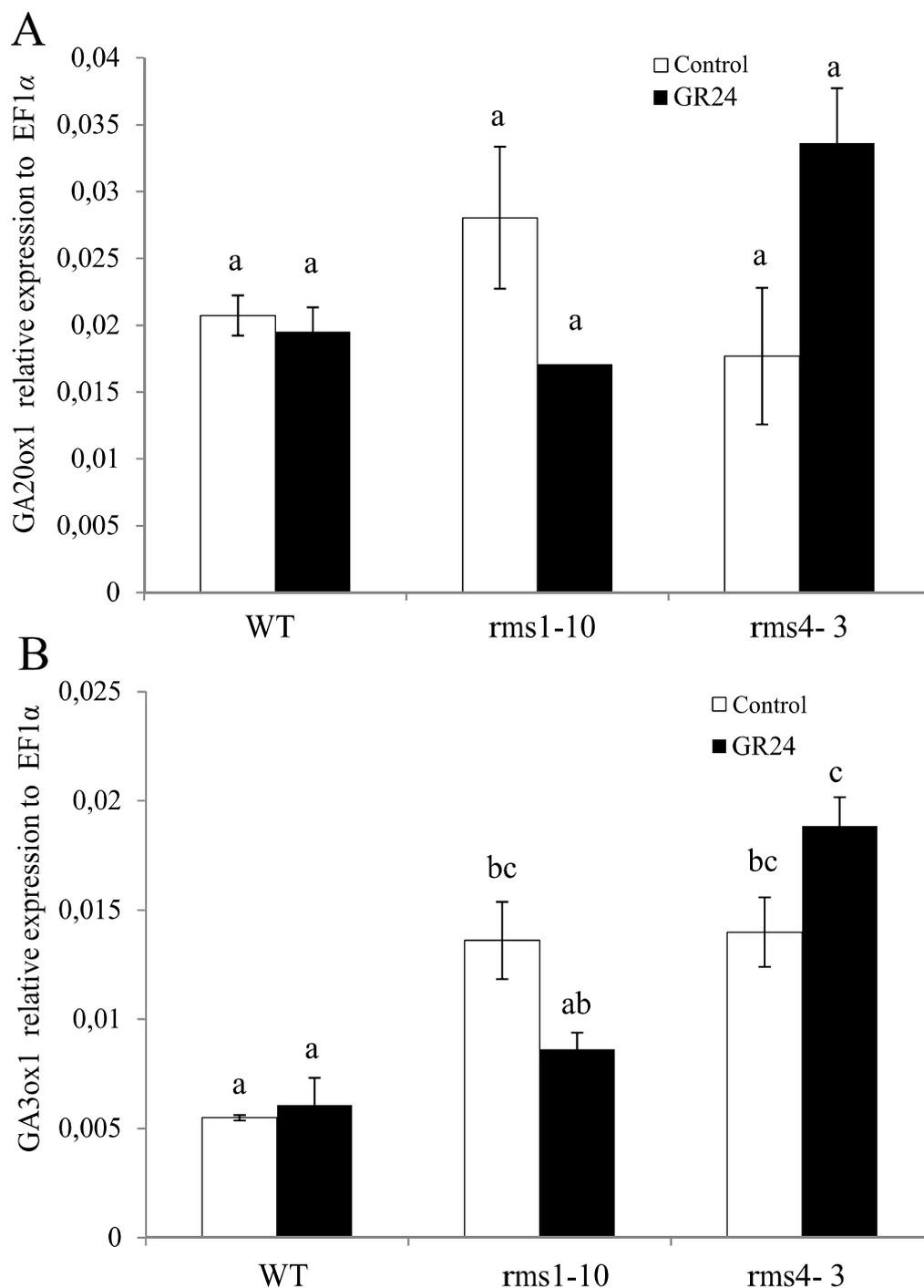


Figure S4. Relative transcript levels of GA biosynthesis genes (A) GA20ox1 and (B) GA3ox1 (LE) in pea expanding stem tissue 24 h after supply of 0 or 3 μ M GR24 via hydroponics. Transcript levels relative to EF1 α were measured in the expanding internode (between node 6 and 7) of 12-d-old WT, rms1-10 and rms4-3 plants (cultivar Tère). Data are means \pm SE (n = 3 pools of 6 plants). Values with different lowercase letters are significantly different from one another (one-way ANOVA, P < 0.05).

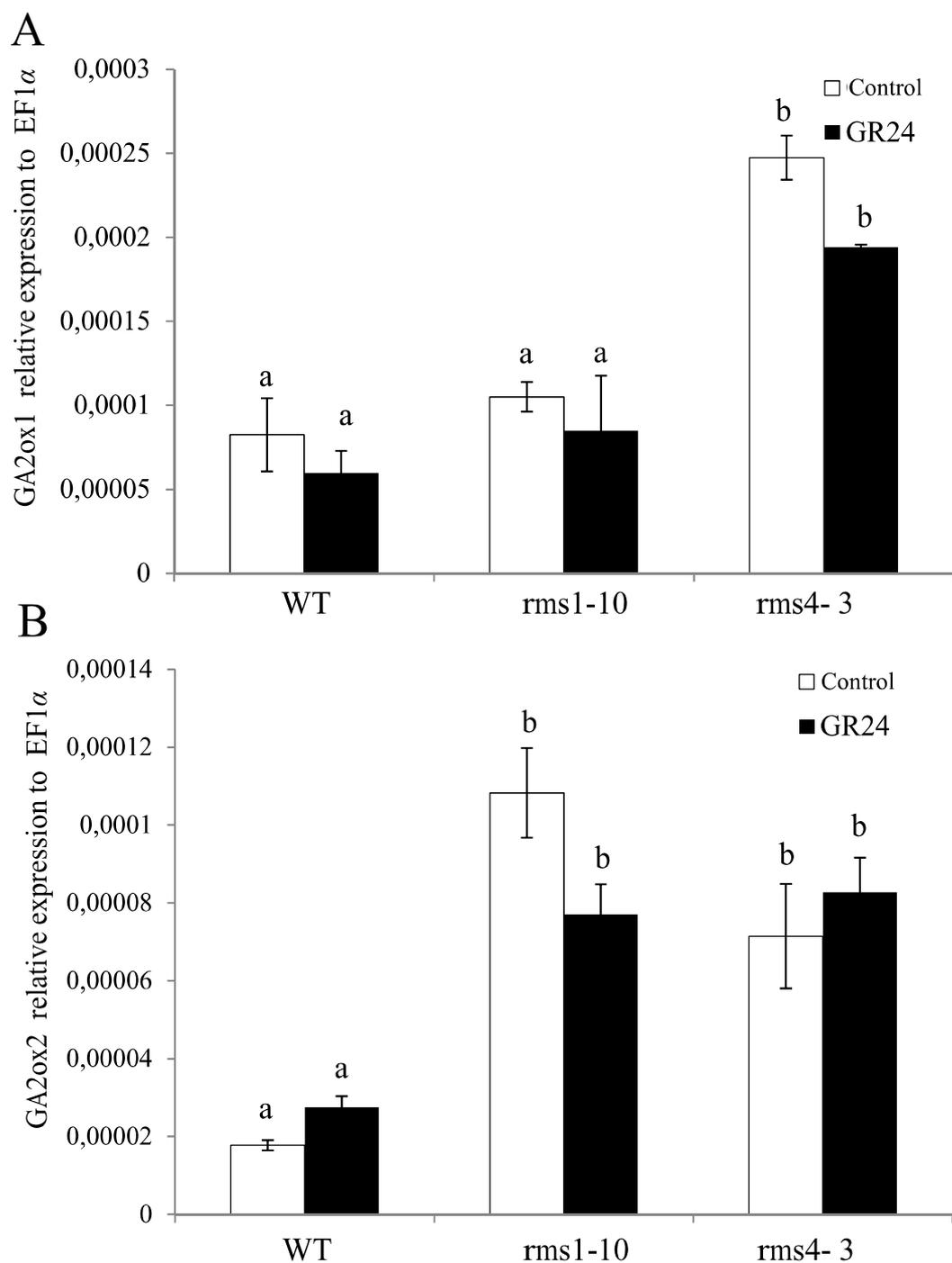
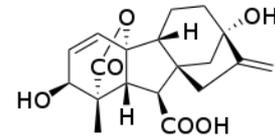
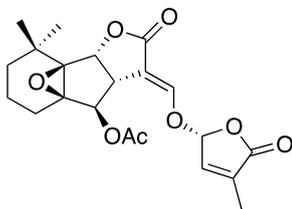


Figure S5. Relative transcript levels of GA catabolism genes (A) GA2ox1 (SLN) and (B) GA2ox2 in pea expanding stem tissue 24 h after supply of 0 or 3 μ M GR24 via hydroponics. Transcript levels relative to EF1 α were measured in the expanding internode (between node 6 and 7) of 12-d-old WT, rms1-10 and rms4-3 plants (cultivar Tère \grave{s} e). Data are means \pm SE (n = 3 pools of 6 plants). Values with different lowercase letters are significantly different from one another (one-way ANOVA, P < 0.05).

CHAPITRE n° 2

Partie n°III : Discussion

Strigolactones Stimulate Internode Elongation Independently of Gibberellins.



Partie n°III : Discussion

Depuis la parution de l'article « **Strigolactones stimulate internode elongation independently of gibberellins** », plusieurs articles permettant de mieux comprendre la voie de signalisation des SLs sont parus. Notamment plusieurs cibles dégradées lors de la signalisation des SLs ont été identifiées :

- la protéine D53 identifiée chez le riz (Jiang et al., 2013 ; Zhou et al., 2014). Elle interagit avec le récepteur des SLs (D14) et la protéine à boîte F D3/MAX2, et en présence de SLs elle est dégradée via le protéasome. Le mutant de riz dominant *d53* présente un phénotype hyper-ramifié et produit une protéine mutante insensible à la dégradation. La protéine D53 est par conséquent impliquée dans le phénotype de ramification chez le riz.

Chez *Arabidopsis* la protéine *SMAX1* (*SUPPRESSOR OF MORE AXILLARY GROWTH2 1*) homologue de D53 est aussi dégradée par les SLs, cependant elle ne semble intervenir que dans le développement précoce de la plantule lors des processus de germination, d'élongation de l'hypocotyle ou d'expansion des cotylédons (Stanga et al., 2013). *SMAX1* appartient à une famille de 8 gènes chez *Arabidopsis*, *SMAX1* et *SMXL2* à 8, et les fonctions des différents membres cette famille ne sont pas encore connues. Cependant, D53 fait partie du même clade que les protéines *SMXL6*, *SMXL7* et *SMXL8*, et l'expression de *SMXL7* est préférentielle dans les tissus aériens de la plante (Stanga et al., 2013). Ces observations font de la protéine *SMXL7* un bon candidat comme répresseur de la voie de signalisation des SLs dans les parties aériennes de la plante, pour contrôler la ramification ou la hauteur des plantes (Stanga et al., 2013 ; Waldie et al., 2014).

- La protéine SLR1, une protéine DELLA, est aussi dégradée par le complexe SCF^{D3} en réponse aux SLs chez le riz (Nakamura et al., 2013). Comme vu précédemment (Chap n°1. Partie n°III.B.3.b) les protéines DELLAs sont des acteurs de la voie des GAs connues pour leurs rôles à la fois dans l'élongation et la division cellulaires, lors de l'allongement des entre-nœuds chez le pois.

- La protéine BES1, est un facteur de transcription régulateur positif de la voie de signalisation des BRs (Yin et al., 2002). Chez le riz cette protéine est dégradée en présence de SLs, et la lignée *BES1-RNAi/max2-1*, qui n'exprime plus la protéine BES1 dans un fond *max2*, supprime le phénotype *max2* pour la ramification, ainsi que pour la longueur de l'hypocotyle (Wang et al., 2013).

Ces résultats biochimiques suggèrent des interactions entre les voies de signalisation SLs et GA d'une part, et SLs et BR d'autre part. Nos résultats basés sur des approches génétiques et phénotypiques montrent que la régulation de l'élongation des entre-nœuds par les SLs est indépendante des GAs chez le pois. Par conséquent il existe une apparente contradiction entre nos résultats, ce qui suggère que les interactions entre voies hormonales peuvent varier, d'une espèce à l'autre, et/ou d'un tissu à l'autre, et/ou d'un stade de développement à l'autre. Une hypothèse serait que la dégradation de SLR1 en réponse aux SLs interviendrait dans d'autres processus que l'élongation des entre-nœuds. On peut imaginer par exemple que les SLs stimulent la voie des GAs dans le processus de floraison ou de germination de la graine.

*** Les mécanismes de contrôle de la taille des plantes par les SLs sont-ils conservés chez différentes espèces ?**

Les mutants de biosynthèse et de réponse aux SLs sont nains, cependant le phénotype de nanisme n'est pas aussi fort chez toutes les espèces. Les mutants *max* et *d14* d'*Arabidopsis* notamment ont un phénotype nain peu marqué comparé à celui des mutants *rms* de pois, des mutants *d* (pour *dwarf*) de riz ou des mutants *dad* de pétunia.

De plus chez le riz, l'expérience de retirer les ramifications des mutants hyper-ramifiés restaure partiellement la taille des plantes (Zou et al., 2006) ce qui n'a pas été observé dans nos expériences sur le pois. Chez le riz la réduction de la taille des mutants *d* de riz serait en partie due à une allocation des ressources en faveur de la ramification chez ces mutants. Au contraire, chez le pois, l'allocation des ressources ne semble pas avoir d'effet significatif dans le phénotype des mutants *rms* qui conservent un phénotype nain lorsqu'on enlève leurs ramifications (Figure n°II.5).

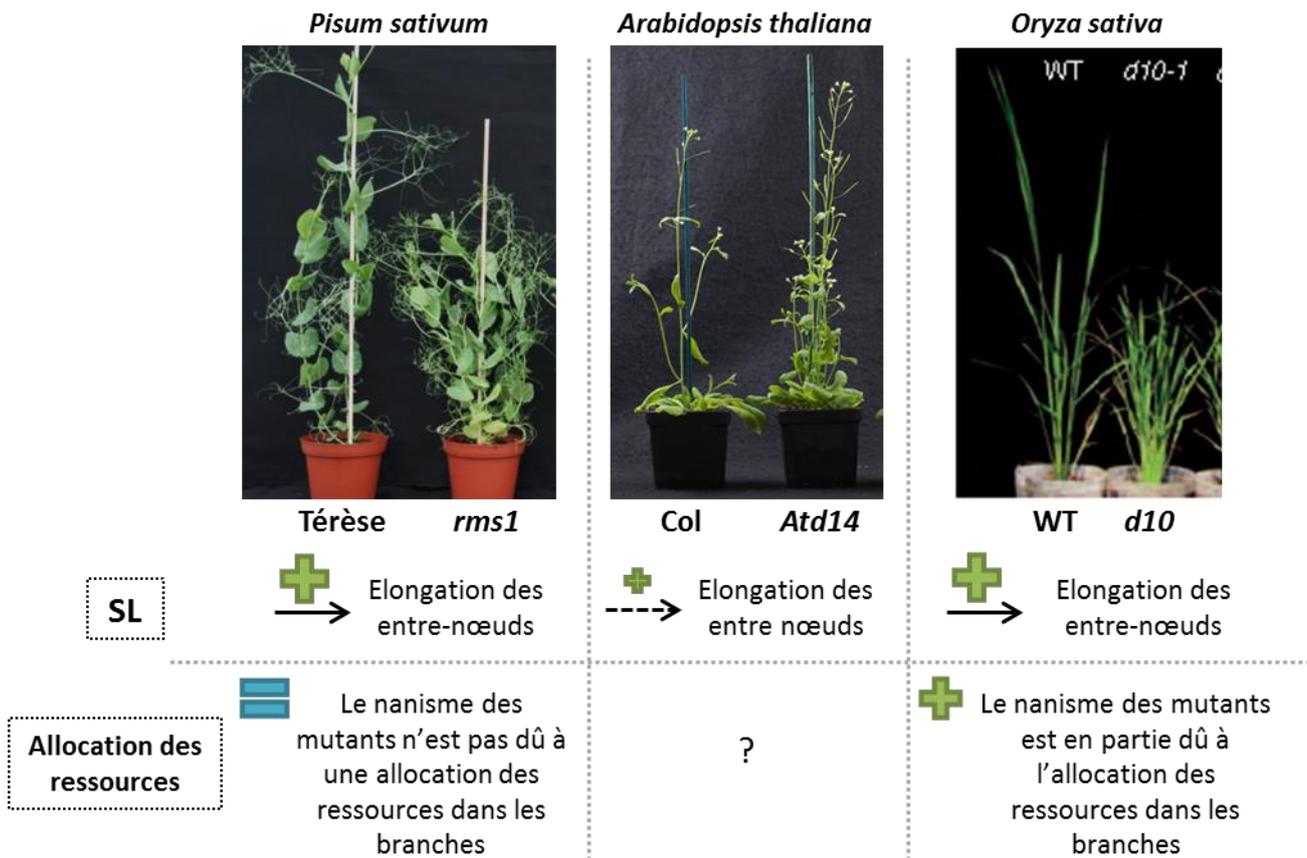


Figure n°II.5 : Conservation des mécanismes de contrôle de la taille des plantes par les SLs entre espèces ?

*** Quelles sont les potentielles cibles dégradées par la signalisation des SLs et impliquées dans le contrôle de la taille des plantes ?**

L'identification de plusieurs cibles dégradées par les SLs offre de nombreuses hypothèses quant aux potentiels acteurs moléculaires qui permettent de réguler la taille des plantes (Figure n°II.6).

Comme c'est le cas pour l'identification de SMAX1 chez *Arabidopsis*, les cribles de mutants supresseurs de phénotype sont utiles pour trouver des gènes candidats. Un tel crible a été effectué au laboratoire et il semble qu'un homologue de *D53* du riz (appelé *DOR3/PsSMXL6*) restaure non seulement la ramification du mutant *rms3* mais aussi la hauteur de la plante (Chap n°3.Partie IV. Annexe n°1).

Les SLs ont des rôles multiples autant dans le développement aérien que racinaire de la plante. L'existence de plusieurs cibles potentielles dégradées par la signalisation des SLs pourrait expliquer l'action pléiotrope de cette hormone.

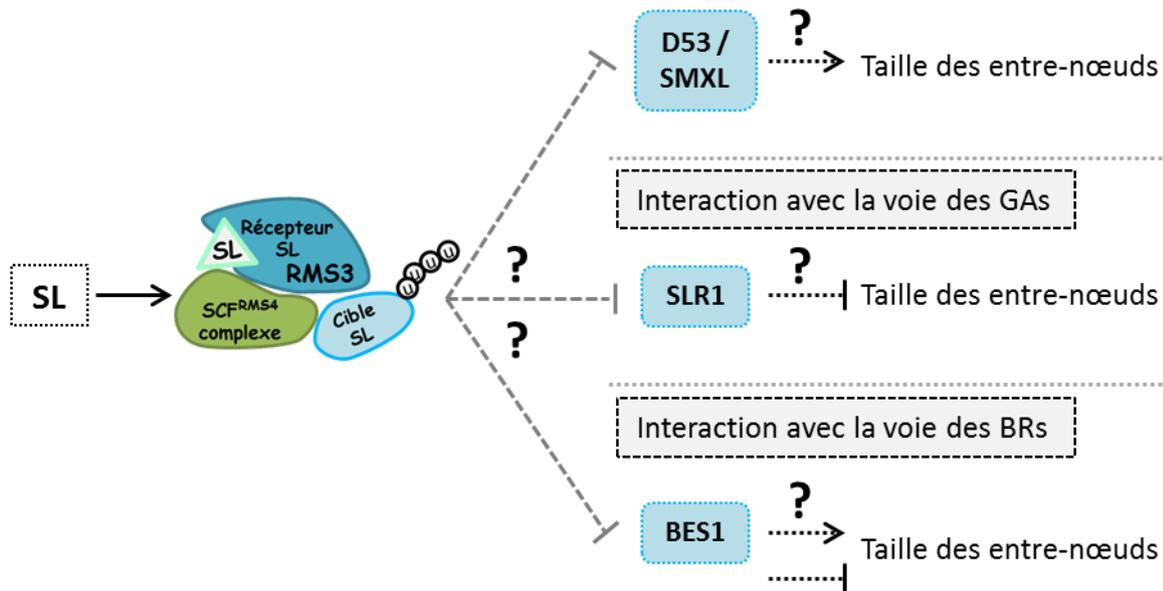


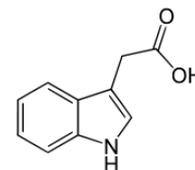
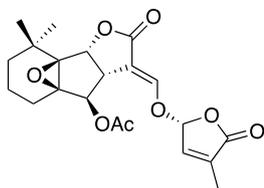
Figure n°II.6 Quelles sont les cibles dégradées par les SLs impliquées dans le contrôle de la taille des plantes ?

Le contrôle de la taille de la tige par les SLs chez le pois passe-t-il par la dégradation de protéines cibles ?

CHAPITRE n°3

RMS2, un récepteur de l'auxine de la famille de TIR1/AFB.

Partie n° I : Introduction



CHAPITRE n° 3 : RMS2, un récepteur de l'auxine de la famille de TIR1/AFB.

Partie I : Introduction

Chez le pois plusieurs mutants impliqués dans la voie des strigolactones ont été identifiés. Ces mutants *rms* (*ramosus*) présentent un phénotype hyper-ramifié et nain. Différentes expériences, de greffes notamment, ont permis de mettre en évidence que les gènes *RMS1* (*CCD8 / AtMAX4*) et *RMS5* (*CCD7 / AtMAX3*) sont impliqués dans la biosynthèse des strigolactones et que les gènes *RMS3* (récepteur SLs) et *RMS4* sont impliqués dans la réponse aux strigolactones. Un phénomène de rétro-contrôle *RMS2*-dépendant de la transcription des gènes de biosynthèse des SLs et de la teneur en X-CKs a été mis en évidence chez le pois. Les mutants déficients en SLs ont un niveau de transcrits des gènes de biosynthèse des SLs plus élevé que le type sauvage et des concentrations en X-CKs plus faibles que le type sauvage. Ce rétro-contrôle est aboli chez le mutant *rms2*, qui présente aussi un phénotype hyper ramifié et nain (figure n°III.1).

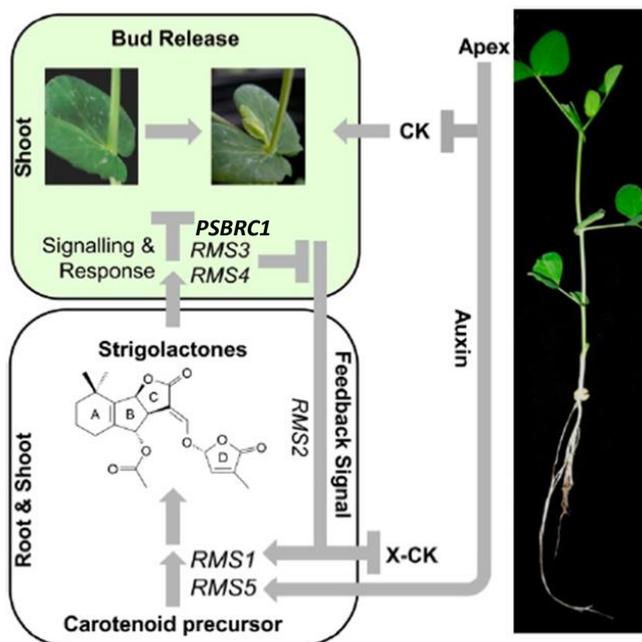


Figure n°III.1 : Modèle du contrôle de la ramification chez le pois.

Les gènes *RMS1* et *RMS5* sont requis pour la synthèse des strigolactones qui a lieu essentiellement dans les racines. Le signal SL est transporté via la sève xylémienne vers les bourgeons axillaires où il permet le maintien de leur dormance.

En absence de réponse aux SLs, un signal de rétro-contrôle faisant intervenir le gène *RMS2* permet la régulation positive de l'expression de *RMS1* & *RMS5* et négative des teneurs en cytokinines dans la sève brute.

(Beveridge et al ; 2009)

A. Caractéristiques du mutant *rms2*

A.1 Un mutant EMS identifié sur un crible de ramification : *rms2*.

Les mutants *rms2* de pois sont issus d'un crible EMS, ils présentent un nombre de branches supérieur au sauvage ainsi qu'une taille réduite d'environ 40% (Beveridge et al., 1994). Deux mutants indépendants ont été identifiés *rms2-1* et *rms2-2*, présentant chacun un phénotype branché et nain. En comparaison des autres mutants *rms*, *rms2* possède une ramification plus basale, il a aussi des racines plus courtes que le sauvage (Figure n°III.2.A). Une greffe entre la tige *rms2* et des racines de sauvage permet l'inhibition de la ramification à tous les nœuds (Figure n°III.2.B), cependant elle ne permet pas la restauration de la taille de la plante.

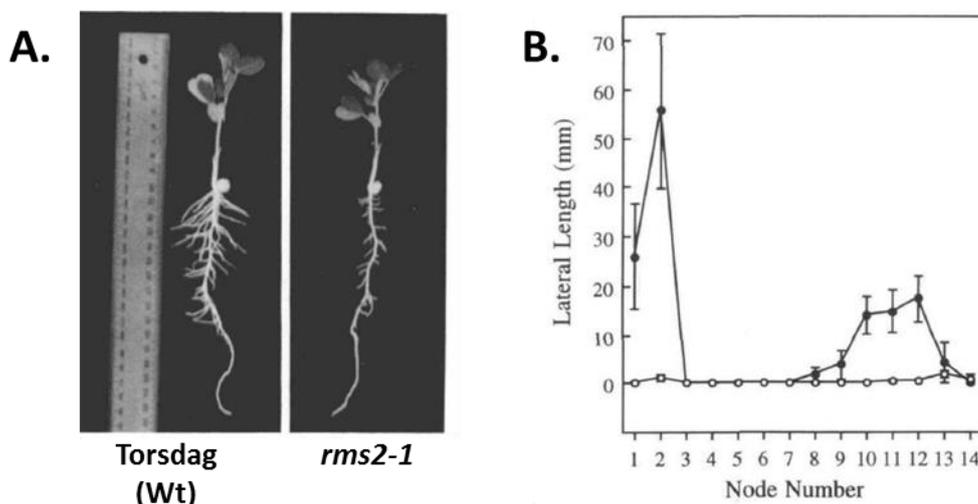
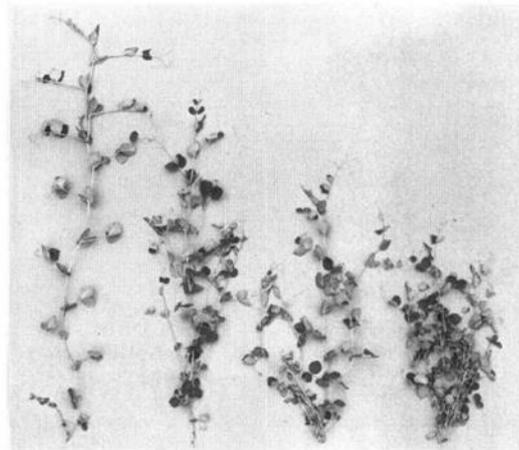


Figure n°III.2: Phénotype du mutant *rms2*.

(A). Photo de plantes âgées de 17 jours, à gauche Torsdag (WT) & à droite le mutant *rms2-1*. (Beveridge et al., 1994).

(B). Longueur des ramifications à chaque nœud d'un porte greffe *rms2-1* (To) greffé soit à lui-même (rond noir) ou à un greffon sauvage (point blanc). (Beveridge et al., 1994).

Le double mutant *rms1 rms2* possède un phénotype plus ramifié et plus petit que les simples mutants démontrant une additivité de phénotypes (Figure n°III.3). On peut donc penser que les gènes *RMS1* et *RMS2* sont impliqués dans deux voies indépendantes (Beveridge et al., 1997)



Parvus *rms1* *rms2* *rms1 rms2*
(WT)

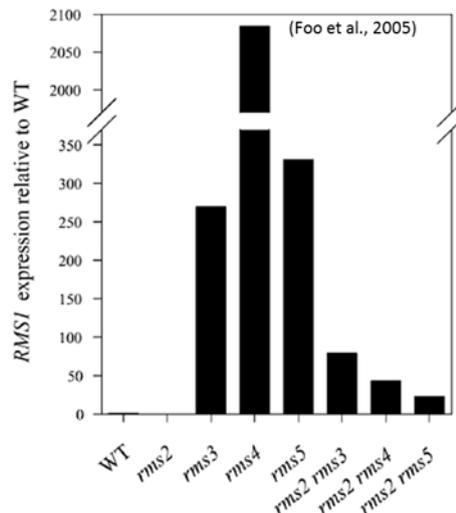
Figure n°III.3: Le double mutant *rms1 rms2* a un phénotype additif.
(Beveridge et al., 1997).

A.2 La caractérisation physiologique de *rms2*, met en évidence le rôle de *RMS2* comme signal de rétro-contrôle dans la voie strigolactone.

La caractérisation physiologique détaillée du mutant *rms2* suggère l'implication de *RMS2* dans un signal de rétro-contrôle contrôlant à la fois les gènes de biosynthèse des SLs et la teneur en cytokinines dans la sève xylémienne.

En effet les gènes de biosynthèses de SLs (*RMS1* et *RMS5*) sont surexprimés chez tous les mutants *rms* hormis *rms2*. De plus les doubles mutants *rms rms2* présentent une expression de *RMS1* diminuée par rapport aux simples mutants *rms*, la mutation *rms2* induit donc une réduction du taux de transcrits *RMS1* chez les autres mutants *rms* (figure n°III.5). Ces résultats suggèrent un signal de rétro-contrôle régulant la biosynthèse des SLs (Beveridge et al., 1994 / 1997).

1 L'hypothèse d'un signal de rétro-contrôle tige-racine régulant l'expression de *RMS1* :



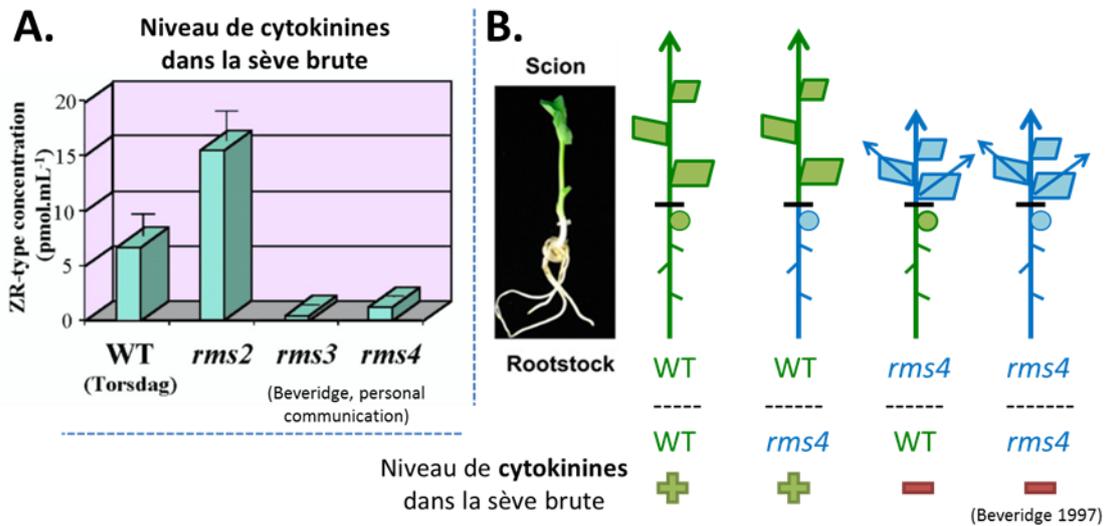
➔ Un signal provenant de la tige sans SL permet de réguler positivement l'expression de *RMS1*.

Figure n°III.4 : Le signal *RMS2* régule l'expression de *RMS1*.

Expression du gène *RMS1* dans l'épicotyle de différents mutants *rms* de pois (Foo et al., 2005).

En plus contrairement aux autres mutants *rms* qui présentent des teneurs en CKs dans la sève xylémienne (X-CKs) plus faibles que le sauvage, le mutant *rms2* a des teneurs en X-CKs plus élevées que le sauvage (Figure n°III.5). Des expériences de greffe entre le sauvage et le mutant de réponse aux SLs *rms4*, montre que le niveau X-CKs est dépendant du génotype (ou du phénotype ramifié ou non) de la tige et non du système racinaire. Ainsi le niveau de X-CKs d'un greffon sauvage sur un porte greffe *rms4* est faible comme chez le mutant *rms4*. Alors que la greffe, tige WT sur greffon *rms4*, permet de restaurer un niveau de X-CKs identique au sauvage (Beveridge et al., 1997).

2 L'hypothèse d'un signal de rétro-contrôle tige-racine régulant le niveau de cytokinines dans la sève brute :



➡ C'est le génotype et/ou le phénotype de la tige qui détermine le niveau en CKs dans la sève brute.

➡ Le signal de rétro-contrôle est régulé par *RMS2*.

Figure n°III.5 : Le signal *RMS2* régule l'expression de des teneurs en cytokinines dans la sève xylémienne.

(A). Niveau de cytokinines dans la sève xylémienne chez différents mutants *rms*. (Beveridge, communication personnelle).

(B). Niveau de cytokinines dans la sève xylémienne, après réalisation de greffes entre le mutant *rms4* et le sauvage. (Beveridge et al., 1997).

Ces expériences de greffes suggèrent que le signal *RMS2* est transmissible par greffe dans une direction tige-racine. Cependant de nombreuses interrogations subsistent principalement sur l'identité même de ce signal. Une hypothèse serait qu'une non-réponse aux strigolactones (rencontrée par exemple chez les mutants déficitaires en SLs) déclenche ce signal stimulant la synthèse de strigolactones et réprimant la synthèse de cytokinines dans la sève brute xylémienne.

Les caractéristiques physiologiques des différents mutants *rms*, sont résumées Figure n°III.6.

Caractéristiques	Mutants					
	<i>rms1</i>	<i>rms5</i>	<i>rms3</i>	<i>rms4</i>	<i>rms2</i>	<i>Psbrc1</i>
Fonction du gène	biosynthèse	biosynthèse	récepteur	réponse	Rétro-contrôle	transduction
Protéine	CCD8	CCD7	α/β -hydrolase	F-box	?	Facteur de transcription
Expression de RMS1 (épicotyle)	forte	forte	forte	forte	faible	faible
Réponse à la greffe (porte greffe wt)	oui	oui	non	non	oui	non
Réponse au GR24	oui	oui	non	non	?	non
Niveau de cytokinines dans le xylème	faible	faible	faible	faible	fort	WT / fort
Niveau d'auxine dans la tige	fort	fort	fort	fort	Très fort	?
Taille de la plante	nain	nain	nain	nain	nain	Proche WT

Figure n°III.6 : Résumé des caractéristiques physiologiques des mutants ramifiés chez le pois.
« Réponse à la greffe » indique l'inhibition de la ramification suite à une greffe *rms* (greffon)// wt (porte greffe) ; « Réponse au GR24 » (SL synthétique) indique l'effet du GR24 sur l'inhibition de la ramification.

B. Les hypothèses sur l'identité du signal *RMS2*, auxine ou autre signal ?

Deux hypothèses ont été proposées quant à l'identité du signal *RMS2* :

(1) le signal *RMS2* est dépendant de l'auxine.

En effet *RMS2* est décrit comme un signal mobile acropète, qui contrôle positivement la régulation de la transcription des gènes *CCD7/RMS5* et *CCD8/RMS1* de biosynthèse des SLs (Beveridge., 1997 ; Foo et al., 2005). Le rôle de *RMS2* semble donc similaire à celui de l'auxine dans la plante.

(2) le signal *RMS2* est indépendant de l'auxine.

Pour ce qui concerne le niveau de transcrits *CCD8/RMS1*, le mutant *rms2* ne répond pas à la décapitation mais répond à une application exogène d'auxine. Il semble donc que l'auxine et le signal *RMS2* agissent indépendamment dans le contrôle de l'expression de *CCD8/RMS1* chez le pois (Foo et al., 2005).

B.1 Hypothèse (1) : Le signal *RMS2*-dépendant est-il l'auxine

Les gènes de la biosynthèse des SLs sont régulés transcriptionnellement par l'auxine (Chap n°1 partie III.A.3.a). En effet on observe que le niveau de transcrits *RMS1* dans l'épicotyle d'une plante sauvage diminue très vite après décapitation et qu'il est restauré si la décapitation est suivie d'une application exogène d'auxine (Foo et al., 2005 ; Figure n°III.7.A).

D'autre part chez le pois les gènes de biosynthèse des CKs *PsIPT1* and *PsIPT2* (*ISOPENTENYL TRANSFERASE 1* et 2) sont régulés par l'auxine (Tanaka et al., 2006). Ils sont induit après décapitation, suite à la déplétion de l'auxine dans la tige.

Les mutants *rms* ont des teneurs en X-CKs plus faibles que le sauvage (Beveridge et al., 1997 ; Morri et al., 2001). Ce qui n'est pas le cas du mutant *rms2* qui présente au contraire des teneurs en X-CKs très élevées en comparaison au type sauvage (Beveridge et al., 1997 ; Foo et al., 2005). Suggérant l'existence d'un rétro-contrôle *RMS2*-dépendant régulant la teneur en X-CKs.

3 Les hypothèses sur l'identité du signal de rétro-contrôle de la voie SLs régulée par le gène *RMS2* :

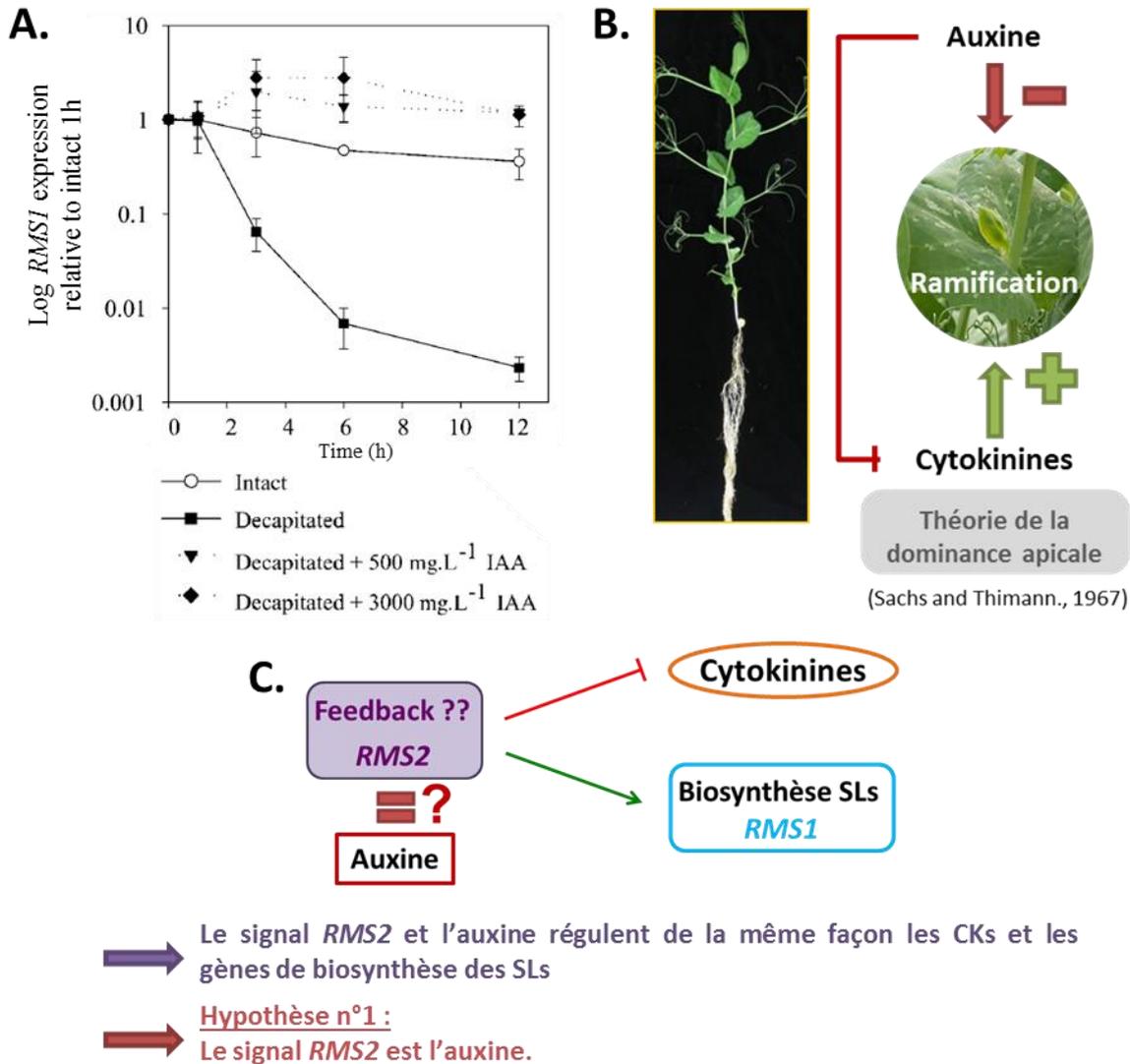


Figure n°III.7 : Hypothèse n°1 : Le signal *RMS2* est l'auxine.

(A). Niveau d'expression de *RMS1* dans l'entre-nœud 5 chez le sauvage intact (point blanc), décapité (carré noir), décapité + application de 500mg.L⁻¹ d'IAA (triangle noir) et décapité + application de 3000mg.L⁻¹ d'IAA (losange noir) . (Foo et al., 2005).

(B). Schéma de la théorie de la dominance apicale d'après Sach & Thimann (1967).

(C). Schéma du rôle de *RMS2*.

Ainsi le sens du signal *RMS2* (de la tige vers les racines), et son rôle à la fois sur la régulation positive de l'expression de *RMS1* et négative de la synthèse de X-CKs rappelle l'effet de l'auxine qui a un transport basipète. Une des hypothèses proposées sur l'identification du signal *RMS2* est qu'il soit de nature auxinique (Ongaro and Leyser ; 2008).

B. 2 Hypothèse (2) : Le signal *RMS2*-dépendant est indépendant de l'auxine ?

Cette 2^{ème} hypothèse a été proposée car plusieurs expériences pouvaient suggérer que le rétro-contrôle *RMS2*-dépendant était auxine-indépendant.

Chez le sauvage et les mutants de réponse aux SLs (*rms3* et *rms4*), la décapitation de la plante induit une diminution de l'expression de *RMS1* dans les entre-nœuds, qui est restaurée par l'application d'auxine exogène (Figure n°III.8). Le mutant *rms2* quant à lui ne répond pas à la décapitation, son niveau de transcrits *RMS1*, déjà faible, ne change pas suite à la décapitation. Par contre il répond à une application d'auxine exogène par une augmentation de l'expression du gène *RMS1*, rétablissant le niveau de transcrit *RMS1* identique à celui du sauvage.

Cependant le traitement par l'auxine n'augmente pas les niveaux de transcrits de *RMS1* à des niveaux tels que ceux observés chez les mutants *rms*. D'où l'hypothèse que le feedback *RMS2*-dépendant n'était pas l'auxine.

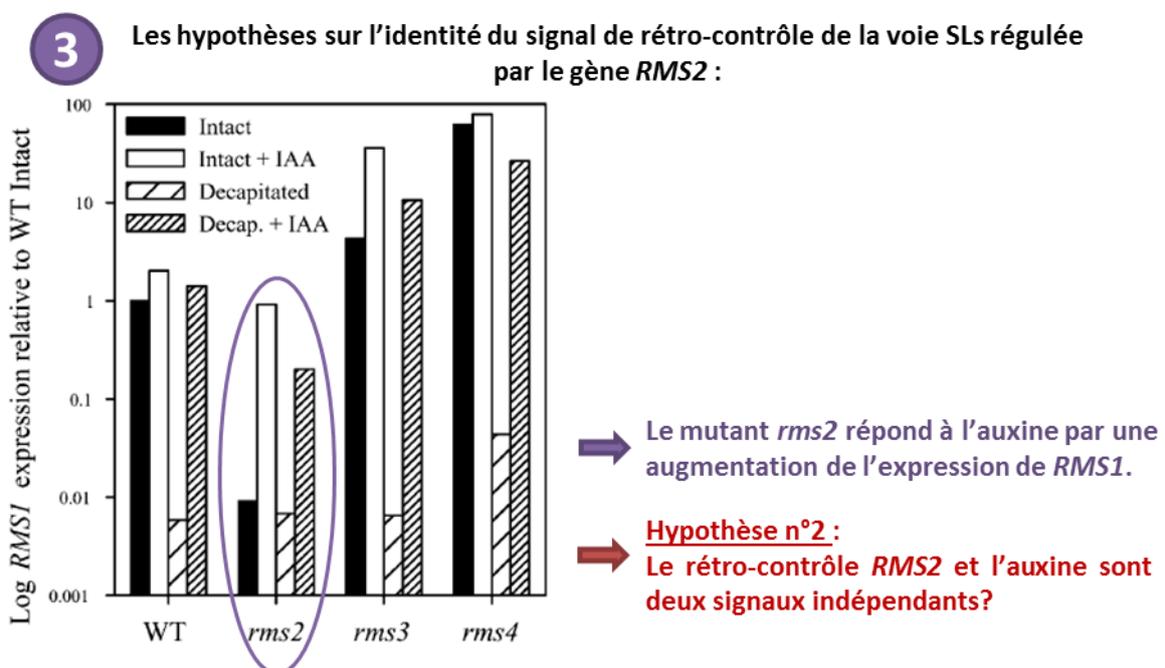


Figure n°III.8 : Hypothèse n°2 : Le signal *RMS2* est indépendant de l'auxine.

Expression de *RMS1* dans l'entre-nœud 4 de plantes intacts ou après décapitation, 12h après un traitement avec ou sans 3000mg.L⁻¹ d'IAA (Foo et al.,2005).

Ces arguments vont dans le sens de l'existence d'un rétro-contrôle de l'auxine sur *RMS1* indépendant de *RMS2*. Ainsi l'autre hypothèse concernant le/les signaux de rétro-contrôle notamment sur les gènes de biosynthèse des SLs est qu'il y aurait deux voies, l'une dépendante de l'auxine et l'autre dépendante de *RMS2* et indépendante de l'auxine (Dun et al., 2009).

C. Objectifs

C.1 Identifier le signal *RMS2*

L'identification du signal dépendant de *RMS2* requiert le clonage de ce gène. Avant mon arrivée en thèse, le clonage positionnel du gène *RMS2* a été réalisé en collaboration avec F.Debellé (INRA de Toulouse), A.Bendhamane et C.Traodec (URGV). L'analyse des événements de recombinaison génétique entre des marqueurs issus de la synténie avec *Medicago truncatula* et le locus étudié (*RMS2*) dans une population F2 de 548 individus issus du croisement entre K524 (lignée homozygote mutante *rms2-1*) et JI281 (lignée homozygote originaire d'Ethiopie) a été réalisée. Le résultat de cette approche met en avant un gène candidat : le gène *PsAFB4/5*.

Le gène *PsAFB4/5* de pois code pour une protéine à boîte F de la famille des récepteurs d'auxine TIR1/AFB. Les homologues de pois de cette petite famille de 6 gènes chez *Arabidopsis* ont été obtenus grâce au travail réalisé à l'INRA de Dijon (REF + <http://bios.dijon.inra.fr/FATAL/cgi/pscam.cgi>). Des études phylogénétiques des séquences protéiques des récepteurs de l'auxine chez *Arabidopsis*, *Medicago truncatula* et *Pisum sativum* montrent qu'il existe un seul homologue *PsAFB4/5* chez le pois alors que deux gènes *AFB4* et *AFB5* sont présent respectivement chez *Arabidopsis* comme chez *Medicago* (Figure n°III.9). Il n'est pas complètement exclu qu'un autre homologue soit présent chez le pois.

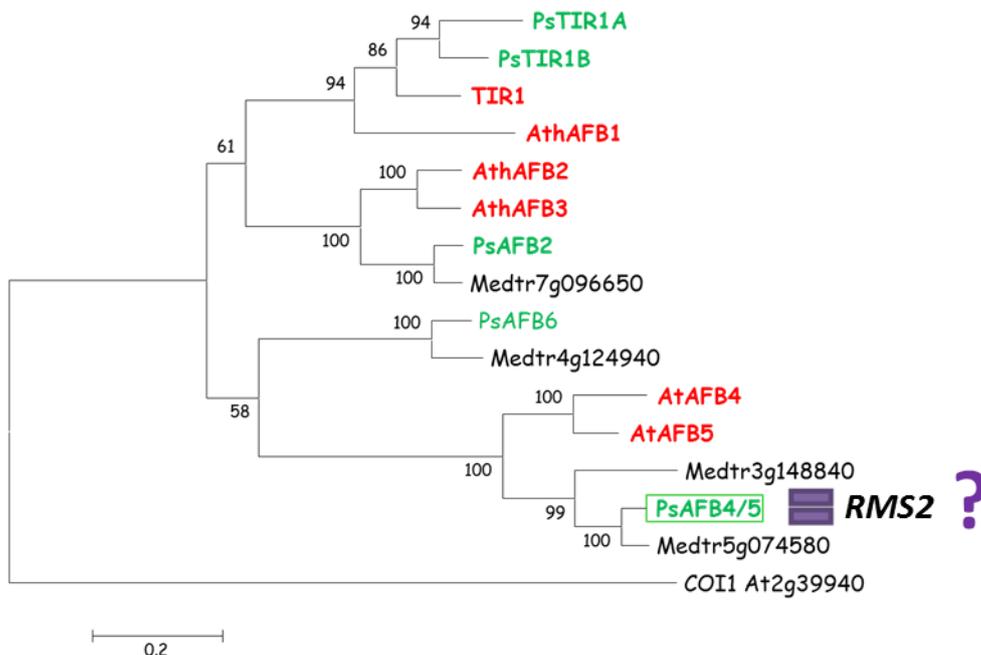


Figure n°III.9 : Arbre phylogénétique des récepteurs d’auxine de la famille TIR1/AFB.
 Légende : *Arabidopsis* / *Pisum sativum* / *Medicago*
 Seulement un homologue de *AtAFB4* et *AtAFB5* a été identifié chez le pois, il correspondrait au gène *RMS2*.

Le séquençage du locus *PsAFB4/5* dans les deux mutants indépendants *rms2-1* et *rms2-2* permet de valider la présence d’une mutation dans le locus *PsAFB4/5* pour chacun de ces mutants (Figure n°III.10).

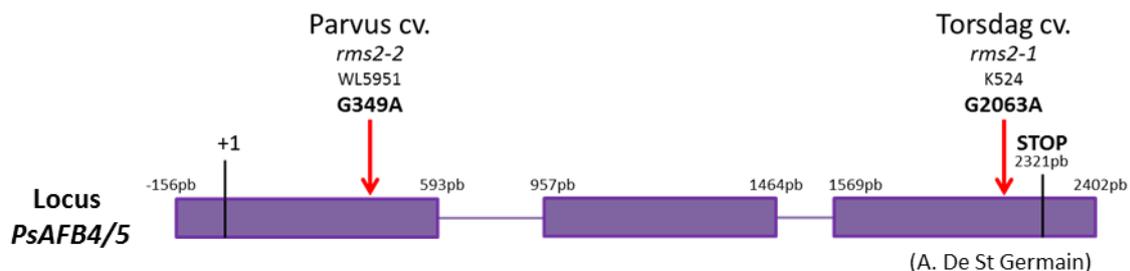


Figure n°III.10 : Les mutants *rms2-1* et *rms2-2* présentent une mutation dans le locus *PsAFB4/5*.

Pour confirmer ce résultat, une approche de TILLING du locus *PsAFB4/5* a été mise en place à l’URGV de manière à obtenir de nouveaux mutants *Psafb4/5*. Le TILLING a permis d’obtenir 81 mutants, mais aucun avec un codon STOP. Parmi ces mutants, 10 dont les mutations sont dans des endroits stratégiques pour un récepteur d’auxine (boîte F, domaine de liaison à l’auxine, voir Chap n°3 partie III) ont été sélectionnés pour une étude phénotypique de la ramification.

Aucun phénotype de ramification n'a été observé parmi ces mutants. Cependant les mutants de TILLING étant dans un fond génétique Caméor (à floraison précoce), le phénotype de ramification n'est pas toujours facile à observer. Les mutants TILLING ont donc été retro-croisés non seulement avec la lignée de départ Caméor pour s'affranchir d'autres mutations mais aussi dans des fonds génétiques pour lesquels le phénotype de ramification est plus facilement repérable.

L'étude de ces mutants TILLING fait l'objet de la partie III de ce chapitre (pages 177).

C. 2 Valider la nature auxinique du signal *RMS2* :

La mise en évidence de mutations dans le gène *PsAFB4/5* chez les mutants *rms2* soulève un certain nombre de questions :

- Est-ce que les mutants *afb4* et *afb5* d'*Arabidopsis* présentent des phénotypes communs à *rms2* comme l'hyper-ramification ou le nanisme ? Et réciproquement est-ce que *rms2* présente des phénotypes communs à ceux d'*afb4* et *afb5* d'*Arabidopsis* ?
- Est-ce que *RMS2* est capable de percevoir l'auxine ?
- Comme *RMS2* a été identifié comme récepteur d'auxine, l'hypothèse la plus probable sur l'identité du signal de rétro-contrôle *RMS2*-dépendant soit l'auxine.

Concernant les homologues *AFB4* et *AFB5* d'*Arabidopsis*, des études *in vitro* montrent que ces protéines sont des récepteurs de l'auxine capables de lier l'IAA, le 2,4-D, le NAA et aussi le picloram (Greenham et al., 2011). Le mutant *afb5* a été caractérisé comme spécifiquement résistant au picloram (Walsh et al., 2006). Le phénotype, de réponse à l'application exogène d'auxine, du simple mutant *afb5-5* montre qu'il répond à l'IAA et au picloram pour le phénotype racinaire de longueur totale de la racine au stade plantule (Greenham et al., 2011). Mais pour des phénotypes comme la taille de l'hypocotyle, la taille des pétioles ou la longueur des racines latérales le mutant *afb5-5* est insensible au picloram (Greenham et al., 2011).

La caractérisation du phénotype du mutant *afb4* a été initialement réalisée à partir d'un allèle *afb4-2* (Greenham et al., 2011), les conclusions sur les phénotypes de ce mutant ont été rétractées en Mars 2015, par les auteurs du papier, uniquement pour les données

concernant le mutant *afb4-2*. Les auteurs nous ont fourni le mutant *afb4-8* utilisé pour nos expériences, qui est un mutant dans lequel l'expression d'*AFB4* est nulle.

Les résultats de l'identification du signal *RMS2* sont présentés directement en anglais sous format d'article scientifique incluant l'introduction, les résultats, le matériels et méthodes, les données supplémentaires, ainsi que la bibliographie (relative à l'introduction de l'article). L'article est en préparation pour la soumission dans la revue Plos Biology (Chap n°3 partie n°II).

Dans un premier temps la comparaison des phénotypes entre le pois et *Arabidopsis*, montre que les mutations respectives des locus *AtAFB4* & *AtAFB5* et *PsAFB4/5* conduisent à des phénotypes similaires partagés par les deux espèces.

Dans un second temps une approche biochimique permet de montrer que *RMS2* a bien une fonction de récepteur d'auxine. *RMS2* est capable de se lier à *ASK1* et en présence d'auxine peut lier les Aux/IAAs. Sa capacité à former une sous-unité d'un complexe SCF et sa capacité de liaison à l'auxine et aux Aux/IAAs fait de la protéine *RMS2* un récepteur à l'auxine.

Enfin des approches de physiologies combinées à des approches moléculaires ont permis de mettre en évidence le rôle des SLs dans l'inhibition de la synthèse d'auxine via la régulation des gènes de biosynthèse de cette hormone.

L'ensemble de ces résultats permettent l'inclusion de nouveaux éléments dans le modèle du contrôle de la ramification chez le pois (Figure n°III.11).

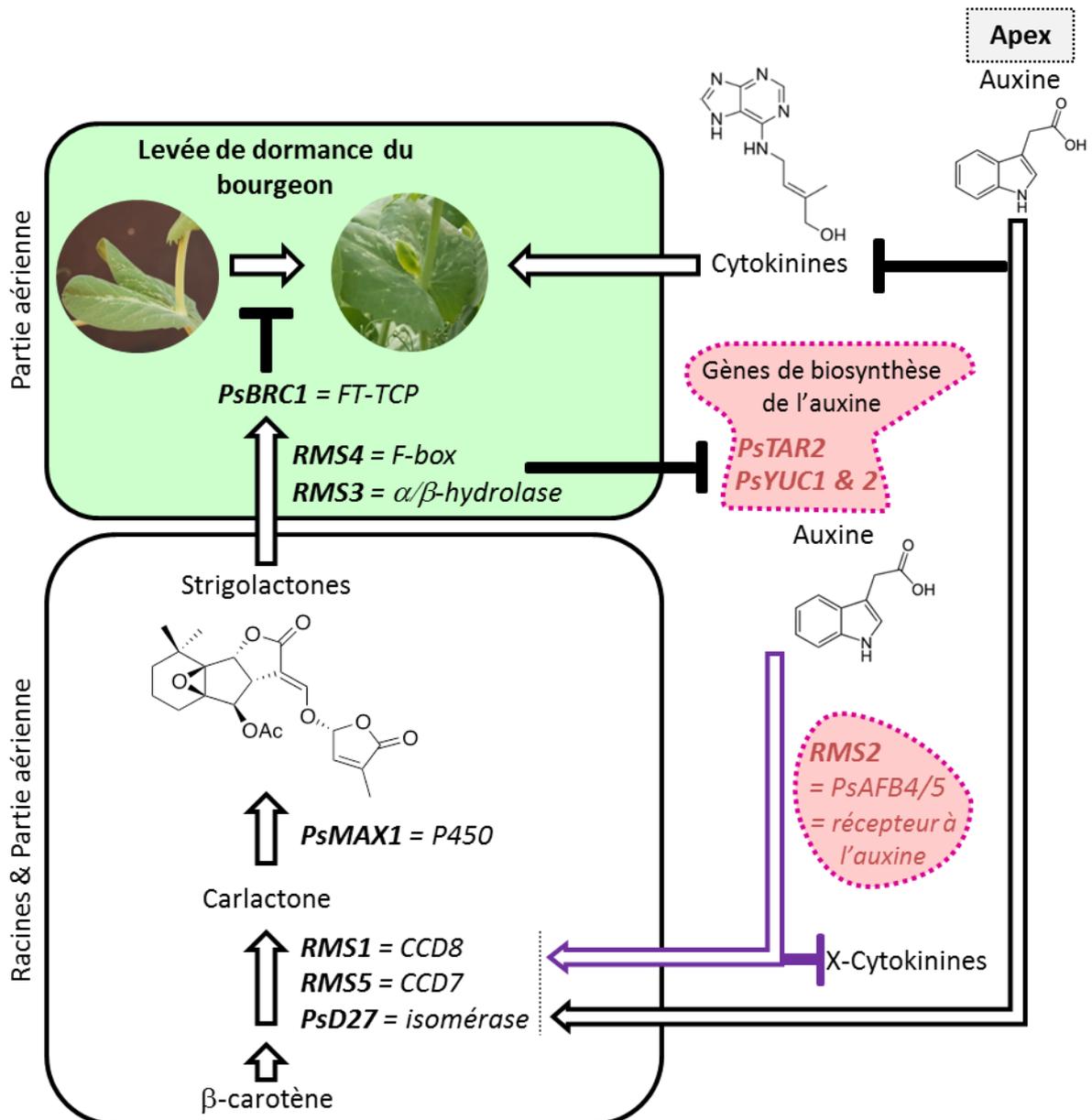


Figure n°III.11: Modèle du contrôle de la ramification chez le pois.

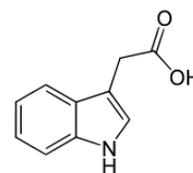
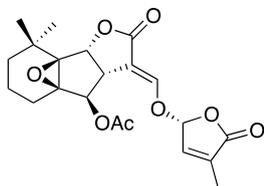
Le travail de cette thèse a permis l'établissement d'éléments nouveaux indiqués en rose dans le schéma :

- RMS2 = PSAFB4/5 = récepteur à l'auxine
- Les gènes de biosynthèses de l'auxine sont inhibés par les SLs, entraînant ainsi une diminution de la teneur en auxine dans la tige suite à l'application de SLs.

CHAPITRE n°3

Partie n° II : [Article en préparation](#)

The pea branching *RMS2* gene encodes the PsAFB4/5 auxin receptor



The pea branching *RMS2* gene encodes the PsAFB4/5 auxin receptor

Y. Ligerot, T. Waldie, A. de Saint Germain, S. Citerne, N. Kadakia, R. Novaretti, C. Troadec, F. Debellé, A. Bendahmane, O. Leyser, M. Estelle, C. Rameau

Introduction

In vascular plants, pattern of shoot branching is a major component of their architecture. Branches originate from the initiation of axillary meristems forming axillary buds at the axils of most leaves. The precise regulation of axillary bud outgrowth or their maintenance in a dormant state depends on numerous endogenous, developmental, and environmental factors [1]. In the 30's, early studies on shoot branching were based on the removal of the shoot apex, the major source of auxin, to induce outgrowth of axillary buds. The theory of apical dominance proposed that auxin from the shoot apex inhibits bud outgrowth and CKs from the roots stimulate shoot branching [2,3]. Rapidly it was suggested that auxin was not acting directly but through an unknown second messenger transported in a root-to-shoot direction [3]. The genetic approach was later developed with the screening of high shoot branching mutants in several species [4–9]. In pea, physiological characterization (grafting, hormone quantifications) of these high shoot branching mutants, called *ramosus* (*rms1* to *rms5*), led to a model in which two novel long distance signals, graft transmissible, other than auxin and CKs were involved [4,10]. A root-to-shoot signal, acting as a branching inhibitor, is now identified as strigolactones (SLs) [11,12] and a shoot-to-root feedback signal *RMS2*-dependent is still unknown [4]. *RMS1* and *RMS5* genes (*MAX4* and *MAX3* in *Arabidopsis*, respectively) were involved in the biosynthesis of the branching inhibitor [10] and were found to encode two CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE (CCD8 and CCD7) [13,14] leading to carlactone, a key intermediate in SL biosynthesis [15]. *RMS3* and *RMS4* were involved in the response to branching inhibitor SLs [4], *RMS3* encoding the SL receptor (*AtD14* in *Arabidopsis*), an α/β -hydrolase containing a conserved catalytic triad [16–18] and *RMS4*, encoding an F-box protein (*MAX2* in *Arabidopsis*) [14]. The additive branching phenotype of *rms1 rms2* double mutant in comparison with single mutants supported the model where *RMS1* and *RMS2* were controlling two different long distance signals [19]. The *RMS2*-dependent feedback signal was shown to be a negative regulator of xylem-sap cytokinin (X-CK) exported from roots [10,20,21] and a positive regulator of *RMS1*

and *RMS5* transcript levels in pea epicotyl [14,22]. Quantifications of X-CK in branching mutants showed that all mutants, except *rms2*, were strongly depleted in X-CK [19,20] and grafting studies indicated that the cause of this depletion was the scion [20,23]. Interestingly no major changes in CK levels in mutant shoot were observed [24,25]. *RMS1* transcript levels in pea epicotyls were highly up-regulated in epicotyl and basal stem of *rms1*, *rms3*, *rms4* and *rms5* mutants, up to 1000 fold in *rms4* in comparison to WT [22]. In contrast, *rms2* epicotyl showed reduced levels of *RMS1* transcripts relative to WT (where levels are already very low). In comparison with those in *rms4*, *RMS1* transcript levels were strongly down-regulated in *rms2 rms4* double mutant supporting the action of *RMS2* in the feedback regulation of *RMS1* expression [22]. It was proposed that the feedback signal was negatively regulated by SL via *RMS3* and *RMS4* as an absence of SL-perception as found in SL-biosynthesis (*rms1*, *rms5*) and SL response mutants (*rms3*, *rms4*) led to low X-CK and high *RMS1* expression. Moreover, application of the synthetic SL GR24 decreased transcript levels in the SL deficient *rms1* mutant but not in the SL response *rms4* mutant. This feedback signal appeared to be conserved in other species as the higher transcript levels of SL biosynthesis genes (*CCD7*, *CCD8*) are also observed in *Arabidopsis max* mutants [26], in *d* rice mutants [5,27], and also in the *Ppccd8* SL deficient mutant of the moss *Physcomitrella patens* [28]. The reduced X-CKs were also observed in the *Arabidopsis max1* to *max4* mutants and reciprocal grafting experiments with WT and *max2* also indicate that a shoot-derived feedback signal down-regulated X-CK in *Arabidopsis* mutants [24].

The chemical nature of this feedback signal, shoot derived and graft transmissible was highly discussed [29][30]. A good candidate for this signal is auxin because of similarities of properties of auxin and the feedback signal [29]. Auxin is known to repress CK biosynthesis and to upregulate transcript levels of SL biosynthesis genes. Nevertheless, several reasons indicated that the *RMS2*-dependent signal could be auxin-independent. In particular exogenous applications of IAA failed to reproduce the strong increases in expression of *RMS1* and the very low X-CK observed in *rms* mutants. Moreover the *rms2* mutant, which lacks the feedback signal, has high IAA levels and seems to respond to IAA applications.

Here we investigated further the nature of the feedback signal by cloning the pea *RMS2* gene. We demonstrate that *RMS2* encodes the pea homolog of the *Arabidopsis* auxin receptor AFB4 and AFB5 indicating that the feedback signal-*RMS2* dependent is very likely auxin. We show that mutants in both species display similar phenotypes including shoot branching phenotype, high IAA levels and picloram resistance. Using binding experiments

with truncated Aux/IAA proteins from *Arabidopsis* we confirm that RMS2 can bind different auxins and can interact with the *Arabidopsis* ASK1 protein, a core SCF subunit. Using SL exogenous treatments we demonstrate that SLs down-regulate IAA levels via *RMS3* and *RMS4* by rapidly down-regulating IAA biosynthesis gene transcript levels. We propose a model where SLs and IAA regulate each other metabolism highlighting the important homeostatic system involved in the precise control of shoot branching in plants.

RESULTS

The *RMS2* pea branching gene encodes the putative auxin receptor PsAFB4/5

The *RMS2* gene has been mapped on linkage group (LG) I of the pea genetic map in the region of the ENOD40, sym19 and PSU81288 classical markers [31,32]. The pea LGI corresponds to chromosome 5 of *Medicago truncatula*. We looked for candidate genes in this region in *M. truncatula* and identified a putative auxin receptor, Medtr5g074580, related to TIR1 and more closely related to the *Arabidopsis* AFB4/AFB5 clade (Figure 1). The pea homologues of the TIR1/AFB small family of auxin receptors were obtained from the pea RNA-Seq gene atlas (<http://bios.dijon.inra.fr/FATAL/cgi/pscam.cgi> ; [33]) and phylogenetic analysis indicated that only one pea homologue, named PsAFB4/5, related to the *Arabidopsis* AFB4/AFB5 clade was found. The PsAFB4/5 was sequenced in the 2 available *rms2* mutants and in their respective wild-type lines. Mutations were found for each *rms2* mutant. The *rms2-1* mutation (line K524 from Torsdag) led to the replacement of E by K at position 532 and *rms2-2* mutation (line W5951 from Parvus) led to the replacement of G by R at position 117 (Figure S1). Both mutations are located close to important amino acids involved in the IAA binding pocket of TIR1[34].

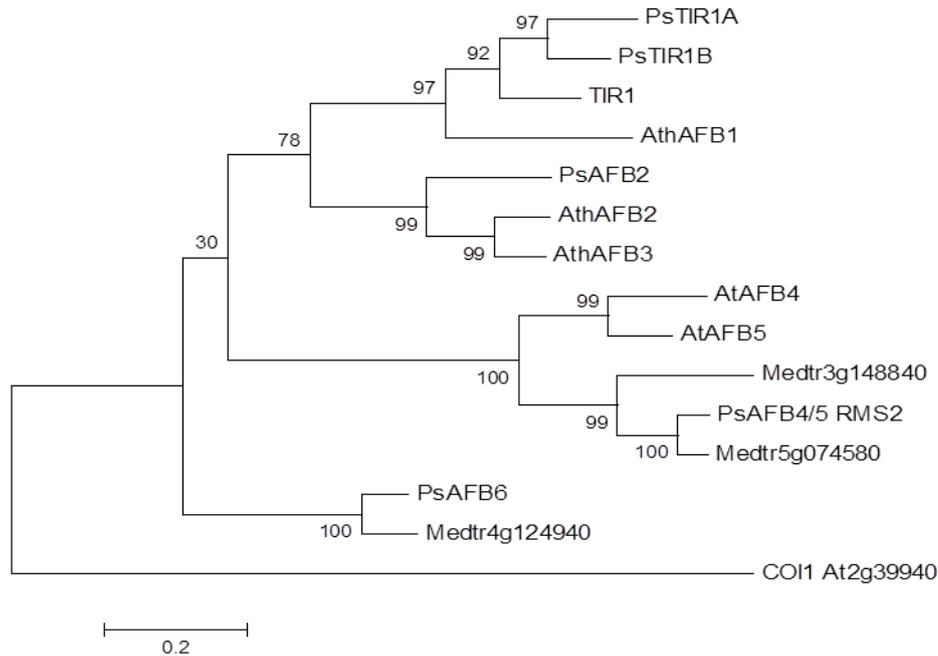


Figure 1. **Phylogenetic tree of TIR1/AFB auxin receptor family from Arabidopsis, pea and *Medicago truncatula*.** The tree was constructed using the Maximum Likelihood method based on the Dayhoff matrix based model. Evolutionary analyses were conducted in MEGA5.

Pea *rms2* mutant and *Arabidopsis afb5* & *afb4* share shoot phenotypes

To confirm that *RMS2* is orthologous to *AFB4/5* from *Arabidopsis*, we investigated whether *rms2* showed the picloram resistance of the *afb5* mutant and reciprocally whether the *Arabidopsis* mutants have the characteristic phenotypes of *rms2* mutants.

In pea, the *rms2* mutants are picloram resistant

It was previously reported that the *Arabidopsis afb5* mutant shows a specific resistance to picloram [35]. The resistance of the *rms2* pea mutants to this synthetic picolinate auxin was investigated. A foliar spray application of picloram at 200 g/l was first performed on 20-d old plants of WT (T r se background), *rms2-1*, and *rms4-3* mutants. After 72 h of picloram application, severe auxinic symptoms including stem curvature and foliar curling were observed on all genotypes except on *rms2-1* (*data not show*). After 10 days, depigmentation was also observed but not on *rms2-1* which was weakly affected with some few foliar curling (Figure 2A). To have a more quantitative analysis of genotype picloram resistance, we

estimated chlorophyll amount with a SPAD system on WT (Térèse background), *rms1-10*, *rms2-1*, *rms4-3* mutants and *rms1-10 rms2-1* double mutant 8 days after picloram foliar treatment at 200 g/l and 500 g/l. A strong picloram dose-dependent decrease in chlorophyll content was observed for all genotypes but not on *rms2-1* and *rms1-10 rms2-1* double mutant which were highly resistant even at higher dose (Figure 2B).

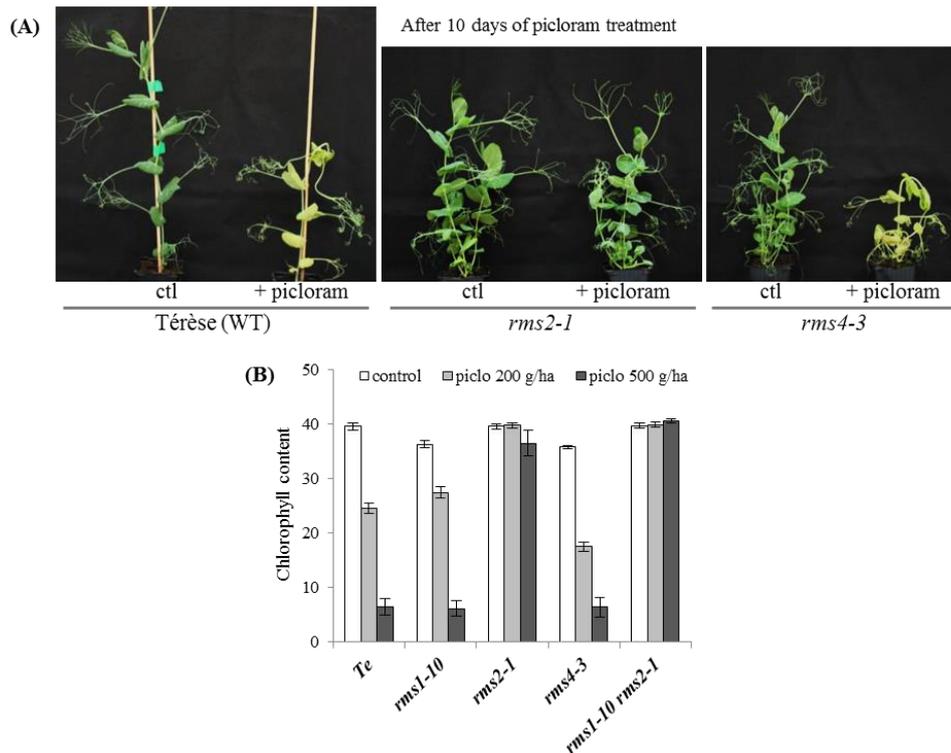


Figure 2. *rms2-1* pea mutant is picloram resistant.

(A). Two week-d-old plants were sprayed with control or 200g/ha of picloram solutions. Representative plants 10 days after treatment.

(B). Two week-d-old plants were sprayed with control, 200g/ha or 500g/ha of picloram solutions. After 8 days of treatment, chlorophyll content were estimated using SPAD instrument (n = 12 plants/condition).

The picloram resistance of the *rms2-1* mutant allele in Torsdag background and of the other allele, *rms2-2*, in Parvus background was also confirmed (Figure S2).

These results clearly showed the strong picloram resistance conferred by the two pea *rms2-1* and *rms2-2* mutations similar to what was observed for the *Arabidopsis afb5-1* mutant.

The *Arabidopsis afb5* and double *afb4 afb5* mutants have a shoot branching phenotype

The pea *rms2* mutants display a high shoot branching particularly at basal nodes. Total number of rosette axillary branches of Columbia (WT), *afb4-8*, *afb5-5* and *afb4-8 afb5-5* double mutant was compared with those of *max2-1*, *max4-1* and *tir1-1 afb2-3* double mutant (Figure 3). The SL response mutant *max2-1* had the highest number of branches and *afb5-5* and *afb4-8 afb5-5* double mutant were more branched than the WT Columbia in contrast to *afb4-8* and *tir1-1 afb2-3*. The *afb4-8 afb5-5* double mutant had similar number of axillary branches as the SL deficient *max4-1* mutant. Interestingly the classification of axillary branches into three groups according their length, showed that *afb* mutants presented a large proportion of small branches in contrast to the *max* mutants. This particular branching phenotype is also found in the pea *rms2* mutant which displays long basal branches and small aerial branches whereas SL mutants have long branches at most nodes ([36]; data not shown).

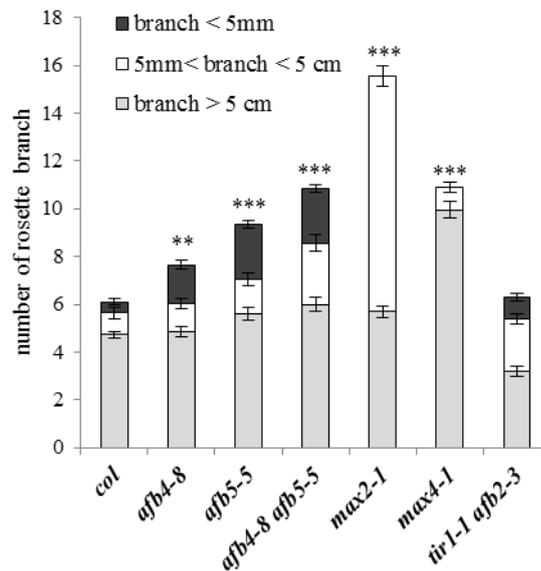


Figure 3. *afb4-8* and *afb5-5* mutations induced branching phenotype.

Total number of rosette axillary branches was measured on 40 day-old plants, axillary were classified according to their length. Asterisks denote significant differences from the (***) $P < 0.001$, (**) $P < 0.01$, Student's *t* test)($n = 19 - 24$).

Arabidopsis* *afb4-8* and *afb5-5* mutants do not have high *MAX3* transcript levels in basal stem in contrast to *max2-1* and *max4-1

In pea, *RMS2* was proposed to have a role in feedback regulation of *RMS1* (*PsCCD8*) expression because it was the only *rms* branching mutant not accumulating high *RMS1* transcript levels in epicotyl in comparison to WT plants (Foo et al., 2005). Therefore *MAX3* (*AtCCD7*) expression was quantified in adult basal stem of the different *Arabidopsis* genotypes. Whereas *MAX3* transcript levels were very high in *max2-1* and *max4-1*, they were similar to the WT Columbia for *afb4-8*, *afb5-5* single mutants, *afb4-8 afb5-5* and *tir1-1 afb2-3* double mutants (Figure 4). Therefore, despite the high shoot branching phenotype of *afb4*, *afb5-5* and *afb4-8 afb5-5* double mutant, expression of SLs biosynthesis genes are not altered in these mutants.

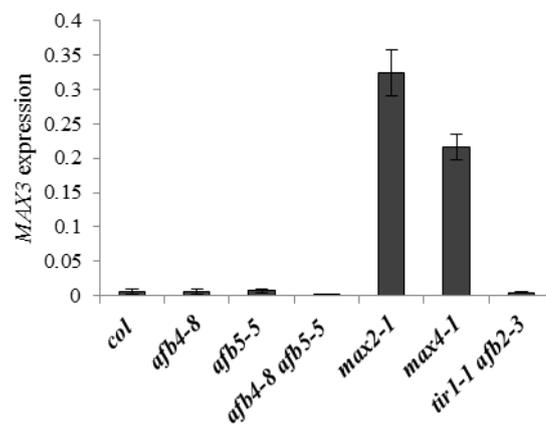


Figure 4. **Expression of *MAX3* in basal stem of *Arabidopsis*.** *MAX3* expression relative to *APT* in various genotypes of 40 d-old plants. Data are means of three biological pools of 10 to 15 plants (n = 3).

***Arabidopsis* single and double *afb4-8 afb5-5* mutants have high IAA levels in stem**

Another important physiological trait of pea *rms2* mutants is their high level of IAA in the stem, up to 5 fold, in comparison to WT [36]. Similarly, IAA level was found higher in *afb4-8*, *afb5-5* single mutants and up to 4 fold higher in *afb4-8 afb5-5* double mutant in comparison to WT (Figure 5). Higher IAA level than WT was also observed in *max2-1* and *max4-1* basal stem which is also found in pea *rms* branching mutants [19].

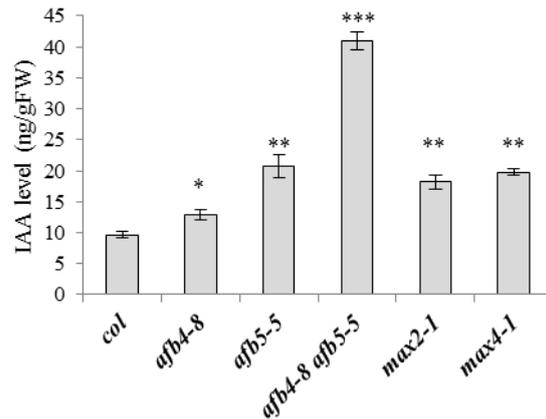


Figure 5. **IAA level in basal stem of *Arabidopsis*.**

IAA level was analyzed in various genotypes on 40 d-old plants. Data are the mean of four different pools of 12 – 15 plants. Asterisks denote significant differences from the wild type (***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05, Student's *t* test)(n = 4).

RMS2 is an auxin receptor

RMS2 protein participates in an SCF complex and can bind different auxins with truncated Aux/IAA proteins from *Arabidopsis*

To confirm that RMS2 is able to participate in an SCF complex, we tested its interaction with one core component of this complex, the ASK1 protein from *Arabidopsis*. Interestingly, both the RMS2 WT protein and the mutant rms2-1 protein bound ASK1 but not the rms2-2 protein.

To investigate whether pea RMS2 can act as an auxin receptor, in a first experiment, we analyzed, interaction between pea RMS2 protein (from WT, *rms2-1* and *rms2-2* mutants) and *Arabidopsis* IAA7 and IAA3 proteins with or without IAA using yeast two-hybrid (Y2H). We chose these two Aux/IAA proteins, because previous studies showed that IAA7 interacts with *Arabidopsis* AFB5 and other auxin receptors, whereas no interaction was observed between IAA3 and AFB5 (Calderón-Villalobos et al., 2012).

Auxin perception and signaling by TIR1/AFBs requires presence of SCF^{TIR1/AFB} system, in which one TIR1/AFBs bind to ASK1 protein. We tested in Y2H interaction between ASK1 and pea RMS2. Results showed that both wild type RMS2 and mutant rms2-1 bind ASK1 but not rms2-2 (Figure 6). Consistent with their similarity to TIR/AFB proteins, RMS2 interacted with ASK1 and presumably can form an SCF complex.

Similarly to TIR1, RMS2 pea protein interacted with IAA7, even when no IAA was present. Addition of IAA appeared to increase the binding of TIR1 and RMS2 with IAA7 and particularly with IAA3. AFB5 seems to have generally weaker binding than RMS2 and TIR1 even in the presence of IAA. For both *rms2-1* and *rms2-2* mutated proteins, no interaction with IAA7 or IAA3 was detected neither in presence or absence of auxin (Figure 6). These results indicated that pea RMS2 can participate in an SCF complex and can bind Aux/IAA proteins in an IAA-dependent manner.

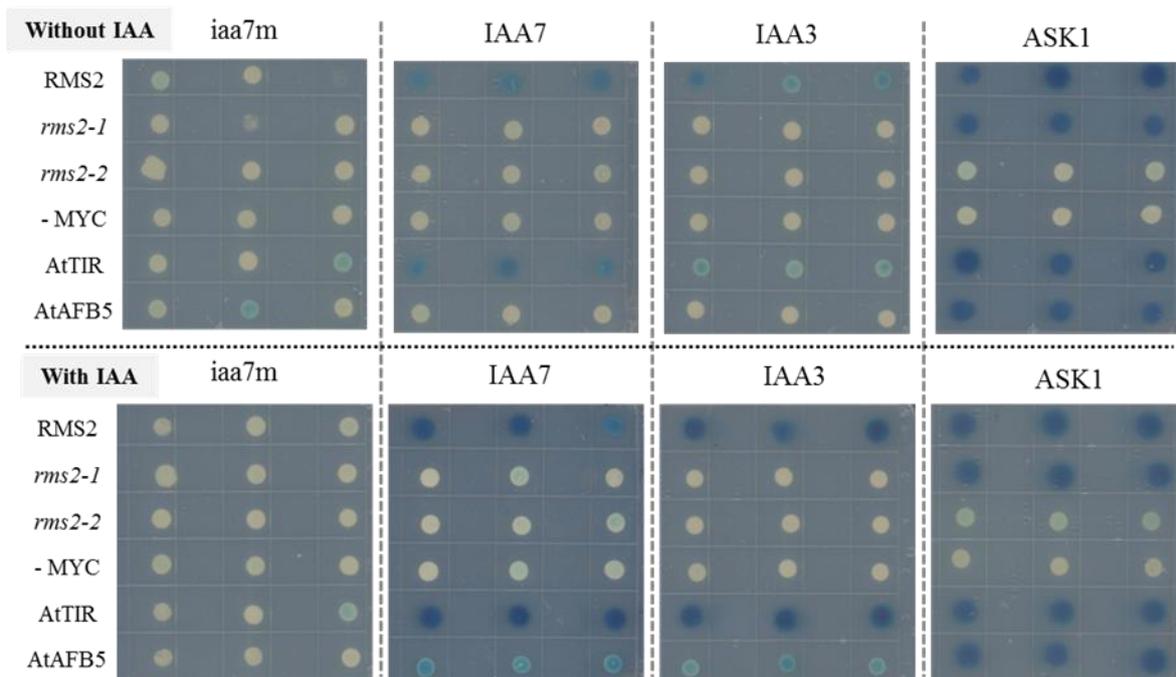


Figure 6. **RMS2 protein participates in an SCF complex and can bind Aux/IAA proteins from *Arabidopsis*.** Y2H interaction experiments of pea RMS2 (WT), *rms2-1m*, *rms2-2m* and *Arabidopsis* TIR1, and AFB5 with *Arabidopsis* *iaa7m*, IAA7, IAA3, and ASK1. Triploids containing LexA DBD–RMS2/TIR1/AFB and AD–Aux/IAAs/ASK1 were generated and spotted in selective medium containing IAA or not. β -galactosidase reporter expression evidenced protein-protein interactions.

RMS2 protein can bind IAA and other auxins

To investigate further at the biochemical level the picloram specificity of RMS2 (and AFB5) we tested the binding of these proteins, together with TIR1, with IAA7 or IAA3 in the presence of natural auxins (IAA, 4-Cl-IAA, PAA) and the synthetic auxin Picloram (Figure 7). The pea RMS2 and the *Arabidopsis* TIR1 proteins have the same behavior whereas AFB5 showed globally very weak binding. RMS2 and TIR1 interacted with IAA7 without auxin and the binding was increased in the presence of all auxins except with picloram for which the strength of the binding appeared to be similar to the binding without auxin. The binding with

IAA3 was stimulated in the presence of IAA and 4-Cl-IAA at 50 μ M but not with PAA and picloram (Figure 7). This experiment needs to be repeated but it showed that RMS2 is acting as an auxin receptor similarly to the TIR1 protein. To investigate and have a better understanding of the specificity of RMS2 and AFB5 towards picloram, different other techniques should be used (e.g. Differential Scanning Fluorometry, crystal structure or Surface plasmon resonance as used in [37] to test and quantify the binding activities of the proteins with Aux/IAA proteins in the presence of different auxins.

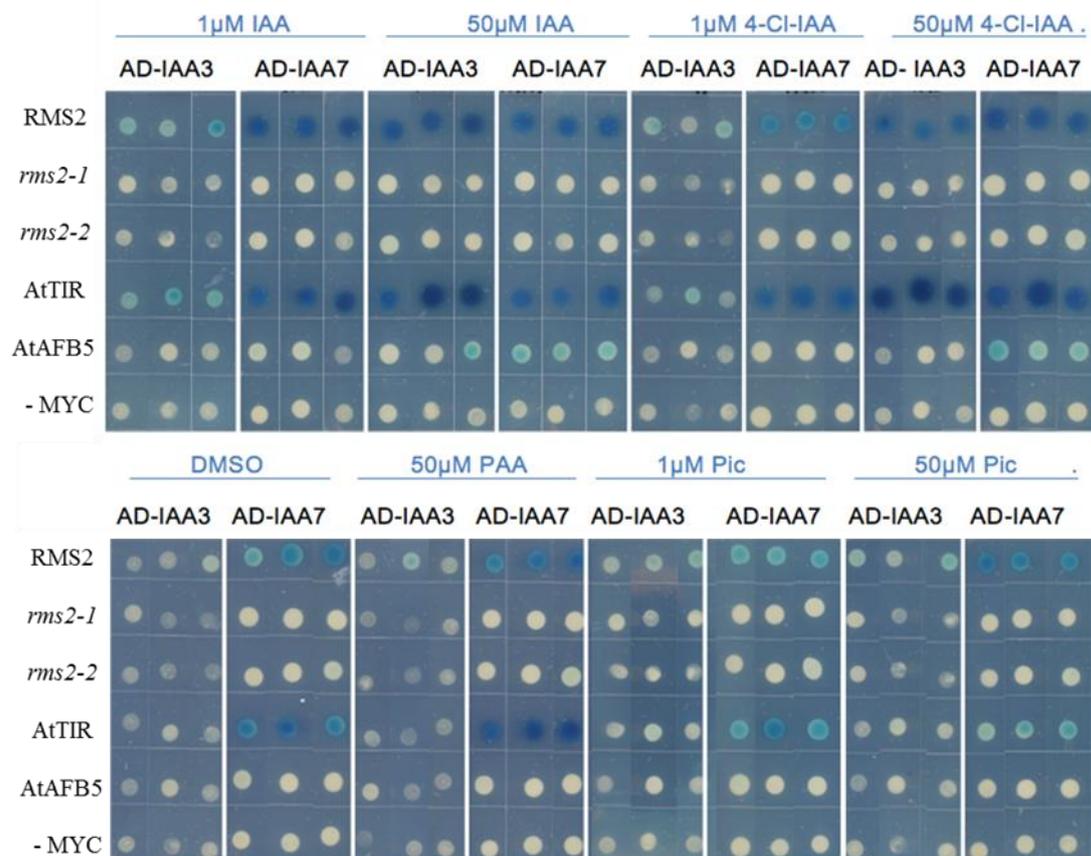


Figure 7. **RMS2 protein can bind IAA and other auxins .**

Y2H interaction experiments of Pea RMS2 (WT), *rms2-1m*, *rms2-2m* and *Arabidopsis* TIR1, and AFB5 with *Arabidopsis* IAA3 and IAA7. Triploids containing LexA DBD–RMS2/TIR1/AFB and AD–Aux/IAAs were generated and spotted in selective medium containing increasing concentrations of IAA, 4-Cl-IAA, PAA or picloram. β -galactosidase reporter expression evidenced IAA-induced protein-protein interactions.

Strigolactones repress IAA biosynthesis via *RMS3* and *RMS4*

If *RMS2* encodes an auxin receptor, the best candidate for the shoot-to-root *RMS2*-dependent feed-back signal is auxin. Auxin is well known for its role in repressing CK biosynthesis and stimulating SL biosynthesis gene expression. Therefore we can propose a model where a non-response to SLs, which happens in SL-biosynthesis and SL-response *rms* mutants, stimulates the synthesis of a feedback signal, auxin, that will control via *RMS2*, CK levels in the xylem sap and SL biosynthesis. Previous physiological characterization of the *rms* branching mutants showed that rather than being depleted in IAA levels, they contained elevated IAA levels [19,36]. To test this model, we investigated whether SL treatment can repress IAA biosynthesis using the pea SL *rms* mutants.

Strigolactone application down regulates IAA level in the stem

To investigate if SLs decrease auxin content in the pea stem, the *rms1-2* mutant (in Torsdag background) was grown in hydroponic system and the synthetic SL analog (\pm)-3'-Me-GR24 was used. This analog is more stable than GR24 and more bioactive for inhibiting shoot branching in pea (Boyer et al., 2012). Levels of IAA were quantified in stem segments at upper, middle and basal nodes 6 h and 24 h after SL treatment. For all stem segments, *rms1-2* had higher IAA levels than wild type (Figure 8A, 8B and 8C). A significant reduction of IAA levels was observed in the different stem segments after 24 h of (\pm)-3'-Me-GR24 application. A slight reduction, but not significant, was observed after 6 h.

In a second experiment, IAA levels were quantified in stem segments at upper and middle nodes after 24 h of (\pm)-3'-Me-GR24 application in *rms1-2*, *rms2-1*, *rms3-2* and *rms4-1* in Torsdag background. IAA levels were not affected by (\pm)-3'-Me-GR24 application in both *rms3-2* and *rms4-1* SL-response mutants and decreased in *rms1-2* and *rms2-1* mutants (Figure 8D and 8E). These results indicated that SLs repress IAA levels in stem via *RMS3* and *RMS4* and that *RMS2* is not needed for the regulation of IAA synthesis by SLs. It also indicates that the *rms2* mutant can respond to SL (Figure 8D and 8E).

To confirm that *rms2* also responds to SLs for the control of shoot branching, *rms1-2* and *rms2-1* (Torsdag background) were cultivated using hydroponic and treated with (\pm)-3'-Me-GR24 at 3 μ M and total lateral length was measured after one week. Shoot branching was totally inhibited for *rms1-2*, and significantly reduced for *rms2-1* and WT (Figure S3). These

results confirmed the previous grafting studies showing that shoot branching of *rms2* scion was inhibited when grafted on WT rootstock [19].

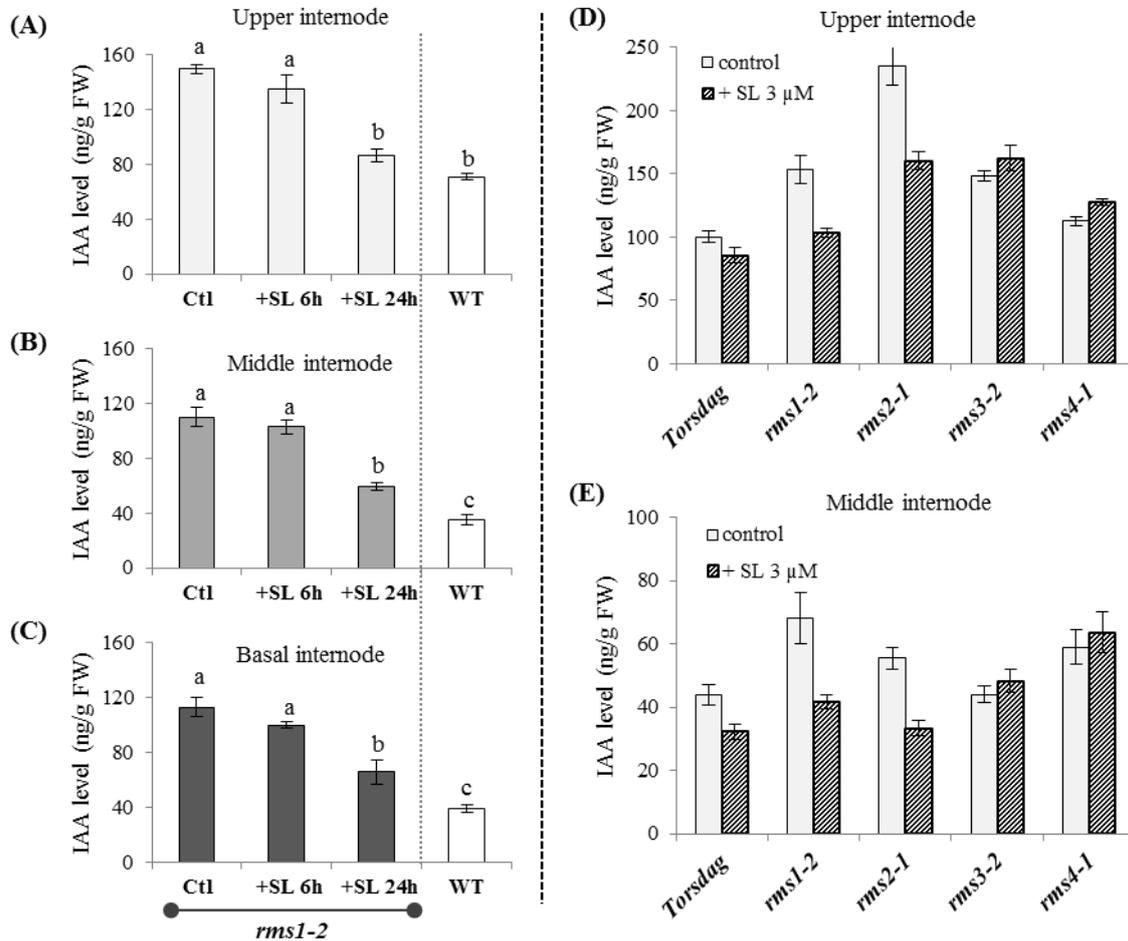


Figure 8. Strigolactone application down regulates IAA level in pea stem via *RMS3* and *RMS4*. (A,B,C) IAA level was measured for *rms1-2* (Torsdag background) and WT. 3 w-old plants were treated by hydroponic with (±)-3'-Me-GR24 (3 μM) 6 h or 24 h or with control solution (ctl and WT). Portions harvested were (A) internode below the apex (EN9-10), (B) middle internode (EN 6-7) and (C) basal internode (EN 3-4). Data represented are the mean of four different pools of 8 – 10 plants. Different letters indicate significant difference between treatments. (D,E) IAA level was measured for *rms1-2*, *rms2-1*, *rms3-2*, *rms4-1* (Torsdag background) and WT. 3 w-old plants were treated by hydroponic 24 h with (±)-3'-Me-GR24 (3 μM) or with control solution. (D) internode below the apex = upper internode (EN 8-9). (E) middle internode (EN 4-5). Data represented are the mean of four different pools of 8 – 10 plants.

IAA level in shoot of *rms1 rms2* double mutants is additive

The *rms2* mutant contains very high levels of IAA in stem (Figure 8D and Figure 9). To confirm that the high IAA levels of *rms2* stem is not related to SLs i.e. an absence of SL response, but rather to a lack of auxin response, IAA levels were quantified in *rms1-1 rms2-2*

double mutant (Parvus background) and compared to IAA levels in WT and single mutants. For both basal and upper internodes, IAA levels were higher in *rms1-1 rms2-2* than in WT and *rms1-1* and *rms2-2* single mutants (Figure 9) indicating an additive effect of SL deficiency and lack of auxin response on auxin content in the stem. Interestingly, in *Arabidopsis*, IAA levels were also very high in the double *afb4-8 afb5-5* double mutant (Figure 5) indicating that a lack of auxin response induces IAA biosynthesis.

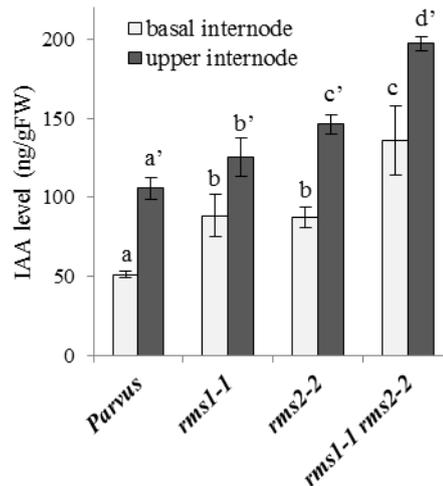


Figure 9. IAA level in shoot of *rms1 rms2* double mutants is additive.

20 days plants, of *rms1-1*, *rms2-2*, *rms1-1 rms2-2* double mutant (Parvus background). Internode below the apex = upper internode (EN 6-7) and basal internode (EN 3-4) were harvested for IAA quantification. Data represented are the mean of four different pools of either 10 – 12 plants. Different letters indicate significant difference between genotypes.

Strigolactone application regulates transcription of auxin biosynthesis genes

To investigate the possible mechanism of regulation of IAA levels by SLs at the molecular level, transcription of IAA biosynthesis genes (*YUC1*, *TAR2*) were analyzed after SL application. We also examined the timing of this regulation by applying SLs for 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h and 6 h on the SL-deficient mutant *rms1-2* (Torsdag background). Transcript levels of the SL biosynthesis gene *RMS5* (= *PsCCD7*), analyzed as a control to confirm the effectiveness of the SL treatment, were higher in the *rms1* mutant than in the WT and decreased after SL treatment. The decrease was significant after 2 h. *TAR2* and *YUC1* followed the same pattern as *RMS5* with a significant decrease of transcript levels after 3 h for *TAR2* and only 30 min for *YUC1* (Figure 10).

These results suggest that when SLs were fed to the plant by the roots (hydroponic system), a significant decrease in *YUC1* transcript levels was observed as soon as 30 min before a

significant decrease in *RMS5* transcript levels (2 h) and far before a significant decrease in IAA levels was observed (between 6 and 24 h).

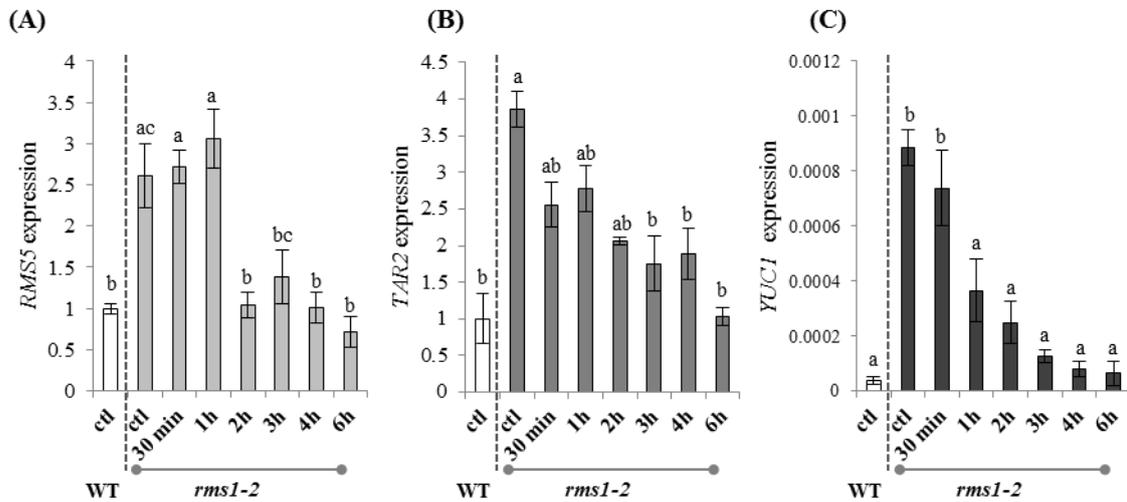


Figure 10. Strigolactone application down regulates expression of auxin biosynthetic genes.

In 3 w-old *rms1-2* (Torsdag background) plants, internodes below the apex were harvested for gene expression : *RMS5* (A), *TAR2* (B) and *YUC1* (C) expression relative to *ACTINE*. Plants were treated by hydroponic with (±)-3'-Me-GR24 (3 μM) during 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h or 6 h; or with control solution (ctl). Data are the mean of three different pools of 8 – 10 plants. Different letters indicate significant difference between treatments.

Timing of auxin biosynthesis genes regulation by SLs is coherent with what we know about SLs feedback. We can propose a model where (1) SLs repress auxin biosynthesis via regulation of auxin biosynthesis gene expression, and (2) auxin acts via *RMS2* to stimulate SLs biosynthesis and repress X-CK export from the roots (Figure 11).

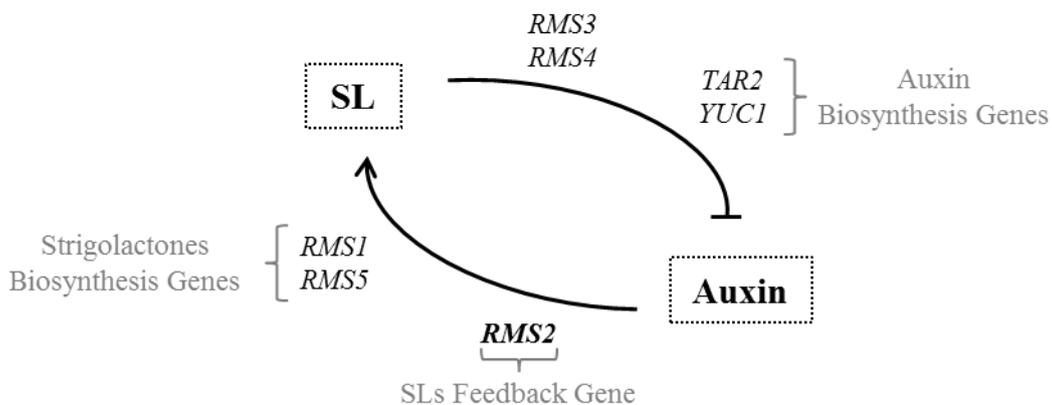


Figure 11. Model of feedback loop regulating strigolactone biosynthesis via *RMS2*.

Materials & Methods

Plant material

For pea plants, the WT cultivars Tèrese, Torsdag and Parvus were used with the derived mutants.

The dwarf branching mutants *rms1-10* (M3T-884) and *rms4-3* (M3T-946) were obtained in the dwarf (*le*) cv Tèrese and are described in Rameau et al., 1997. The *rms1-1* mutant (WL5237) obtained in the tall line Parvus and the *rms4-1* mutant (K164) obtained in the tall line Torsdag are described in (Arumingtyas et al., 1992). The *rms1-2* (*Torsdag*) mutants line was obtained by back-crossing the *rms1-2* allele (derived from Weitor background; Beveridge et al., 1997) into the WT line Torsdag three times.

The *rms2-1* was also obtained in Tèrese background by back-crossing the *rms2-1* allele (line K524 from Torsdag) and *rms2-2* in Parvus is from line W5951.

All *Arabidopsis thaliana* mutants are in Columbia background. Wild type used is Col-0 and the following mutants : *max2-1*, isolated from a EMS mutagenesis (as described on Strinberg et al., 2002) ; *max4-1*, isolated from the Sainsbury Laboratory Arabidopsis Transposant (SLAT) collection (Tissier et al., 1999) and characterized on Sorefan et al., 2003; *tir1-1* and *afb2-3* SALK T-DNA insertion described respectively on (Ruegger M et al., 1998) and (Savaldi-Goldstein et al., 2008); *afb5-5*, SALK T-DNA insertion line (SALK_110643); *afb4-8* & *afb5-5 afb4-8* double mutant providing by Michael Prigge. Primers used for genotyping Arabidopsis lines, are in the table (Table n°1)

For picloram essay:

Pea seedlings were grown in the greenhouse (23°C day/ 15°C night; continuous light 16h days/ 24h night), after 2 weeks plants were sprayed with control solution (water, 4% ethanol) or picloram solution (0.02% (=200g/ha) or 0.05% (=500g/ha) picloram, 4% ethanol). Fig n° 1.A et n°1.B are two independent experiments.

For fig n°2.A: 2 weeks plants were sprayed with control or 200g/ha of picloram solutions. Representative pictures of the 24 plants used per genotype/treatment were taken 10 days after treatment.

For fig n°2.B: 2 weeks plants were sprayed with control, 200g/ha or 500g/ha of picloram solutions. After 8 days of treatment, chlorophyll content were measure using SPAD instrument (SPAD 502-Plus Minolta), average of 2 mesures/for each stipule at node 6 were done, 12 plants for each genotype/ treatment were used.

For hydroponic culture:

Seeds were sown on sand. After 6 days they were transferred to aerated hydroponic complete nutrient solution (described in Braun et al 2012). Plants were grown on a 33L-polyvinyl chloride opaque pots. Acetone or (\pm)-3'-Me-GR24 (dissolved in acetone) (kindly provided by F.D. Boyer, Institut de Chimie des Substances Naturelles) was added to the hydroponic culture solution to give a final concentration of 0 or 3 μ M of (\pm)-3'-Me-GR24 and 0.01 % acetone. The hydroponic culture solution was continuously aerated by an aquarium pump and was replaced weekly.

For fig n°7: 8 days after the beginning of the treatment, 12 plants per genotype/treatment were measured.

For fig n°9 : 6 or 24h after the beginning of the treatment, different tissues were harvested for auxin quantification. (for each condition 4 repetition were done with 8 to 10 plants/condition).

For fig n°10 : 24h after the beginning of the treatment, different tissues were harvested for auxin quantification. (for each condition 4 repetition were done with 8 to 10 plants/condition).

For fig n°11 : after 30min, 1h, 2h, 3h, 4h or 6h of SLs treatment internode below the apex were harvested for gene expression analyses. (for each condition 3 repetition were done with 8 to 10 plants/condition).

Gene expression analyses

RNA Extraction and cDNA Synthesis

Tissue samples were harvested and crushed into liquid nitrogen. Total RNA was isolated from 8 to 10 pea internodes or 10 to 15 *Arabidopsis* basal stem using TRIZOL reagent (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. DNase treatment was performed to remove DNA using the Qiagen RNase-Free DNase Set (79254) and the RNeasy Mini Kit (74904) and eluted in 50 mL of RNase-free water. RNA was quantified using NanoDrop 1000 and migrated on gels to check RNA non degradation. The absence of contamination with genomic DNA was checked using 35 cycles of PCR with *RMS1* primers (see below). Total cDNA was synthesized from 2 mg of total RNA using 50 units of RevertAid H Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Fermentas) in 30 μ L following the manufacturer's instructions with poly(T)18 primer. cDNA was diluted 10 times before subsequent analysis.

Real-Time PCR Analysis

Quantitative reverse transcription-PCR analyses were performed using SsoAdvancedTM Universal SYBR[®] Green SuperMix (Biorad) with the following specific primers (table n°1). Cycling conditions for amplification were 95°C for 10 min, 50 cycles of 95°C for 5 s, 62°C for 5 s, and 72°C for 15 s, followed by 0.1°C s⁻¹ ramping up to 95°C for fusion curve characterization. Three biological repeats were analyzed in duplicate. To calculate relative transcript levels, the comparative cycle method based on non-equal efficiencies was used (Pfaffl, 2001). Transcript levels for the different genes were expressed relative to the expression of the *ACTIN* gene for pea and of *APT* gene for *Arabidopsis*.

IAA quantification (protocole made by "L'observatoire du vegetal" – IJBP)

For each sample, 100mg of fresh powder were extracted with 0.8 mL of acetone/water/acetic acid (80/19/1 v:v:v). Abscisic acid, salicylic acid, jasmonic acid, and indole-3-acetic acid stable labelled isotopes used as internal standards were prepared as described in Le Roux et al. (2014). 2 ng of each standard was added to the sample. The extract was vigorously shaken for 1min, sonicated for 1 min at 25 Hz, shaken for 10 minutes at 4°C in a Thermomixer (Eppendorf[®]), and then centrifuged (8,000g, 4 °C, 10 min.). The

supernatants were collected, and the pellets were re-extracted twice with 0.4 mL of the same extraction solution, then vigorously shaken (1 min) and sonicated (1 min; 25 Hz). After the centrifugations, the three supernatants were pooled and dried (Final Volume 1.6 mL). Each dry extract was dissolved in 100 μ L of acetonitrile/water (50/50 v/v), filtered, and analyzed using a Waters Acquity ultra performance liquid chromatograph coupled to a Waters Xevo Triple quadrupole mass spectrometer TQS (UPLC-ESI-MS/MS). The compounds were separated on a reverse-phase column (Uptisphere C18 UP3HDO, 100*2.1 mm*3 μ m particle size; Interchim, France) using a flow rate of 0.4 mL min⁻¹ and a binary gradient: (A) acetic acid 0.1 % in water (v/v) and (B) acetonitrile with 0.1 % acetic acid, the column temperature was 40 °C, for Abscisic acid, salicylic acid, jasmonic acid, and indole-3-acetic acid we used the following binary gradient (time, % A): (0 min., 98 %), (3 min., 70 %), (7.5 min., 50 %), (8.5 min., 5 %), (9.6 min., 0%), (13.2 min., 98 %), (15.7 min., 98 %), Mass spectrometry was conducted in electrospray and Multiple Reaction Monitoring scanning mode (MRM mode), in positive ion mode for the indole-3-acetic acid and in negative ion mode for the other hormones. Relevant instrumental parameters were set as follows: capillary 1.5 kV (negative mode), source block and desolvation gas temperatures 130 °C and 500 °C, respectively. Nitrogen was used to assist the cone and desolvation (150 L h⁻¹ and 800 L h⁻¹, respectively), argon was used as the collision gas at a flow of 0.18 mL min⁻¹.

Table n°1: Primers sequences

Gene	Primer Sequence (3' --> 5')	Reference
<i>Arabidopsis</i> Q-PCR primers		
<i>AtAPT F</i>	CGGGGATTTTAAGTGGAAACA	
<i>AtAPT R</i>	GAGACATTTTGC GTGGGATT	
<i>AtMAX3 F</i>	TCGTTGGTGAGCCCATGTTTGTC	Waters et al., 2012
<i>AtMAX3 R</i>	TCTCCACCGAAACCGCATACTC	Waters et al., 2012
<i>Pea</i> Q-PCR primers		
<i>PsACTINE F</i>	GTGTCTGGATTGGAGGAT	
<i>PsACTINE R</i>	GGCCACGCTCATCATATT	
<i>PsRMS5 R</i>	TGACCGACGGTTGTGATTTGG	
<i>PsRMS5 F</i>	GCGGCATCTTAAAGACTCCGTAC	
<i>PsYUC1 F</i>	TTGCTACCGGTGAAAATGCTGA	Tivendale et al., 2012
<i>PsYUC1 R</i>	CATGAAAATGTTCCATACCATGAATC	Tivendale et al., 2012
<i>PsTAR2 F</i>	TGGTGAACCGTGGTGCATTG	Tivendale et al., 2012
<i>PsTAR2 R</i>	GCTGGTTGAGGTTCCAACACCTG	Tivendale et al., 2012

Supplemental data -- Pea Q-PCR primers

<i>PsRMS1F</i>	GGAATGGTCCGGGCATGTG	
<i>PsRMS1R</i>	TGAGACTCGATCTGCCGGTGA	
<i>PsYUC2 R</i>	AGAGAATGCCGAGGCTGTTGTG	Tivendale et al., 2012
<i>PsYUC2 F</i>	CATGAAAATGTTCCATACCATGAATC	Tivendale et al., 2012
<i>PsIAA4 F</i>	AAAGCCACGGAGTTAAGGTT	
<i>PsIAA4 R</i>	CCTTTTGGTCTTGTTGATGGA	
<i>PsIAA19 F</i>	CTTTGGCTTTGGAGAAGCTC	
<i>PsIAA19 R</i>	GGACATCTCCAACCAGCATC	
<i>PsIAA14 F</i>	TCCGGCAGAAGCAAAGTAAC	
<i>PsIAA14 R</i>	CTGCACCTTCTTTGGGAGAG	
<i>PsTAR1 F</i>	CCTTGCCAAAGTATCCATCCGCCTA	
<i>PsTAR1 R</i>	GCAGGATATTGCTCGGATATTC	
<i>PsTAR3 F</i>	GCAAACGTCTCGTGAAGGAA	
<i>PsTAR3 R</i>	GCCTTTGGATACTTGTTACAGTG	
<i>PsSMXL6 R</i>	AAGGTTCCAAGCTCCATTCC	
<i>PsSMXL6 F</i>	ATCAAAAGGTTGCGAAAACG	
<i>PsSMXL7 R</i>	GAAGGCATACTCCAAGATCAGG	
<i>PsSMXL7 F</i>	CAGTGGAGGATTGGGTAGAAAG	
<i>PsSMXL8 R</i>	TTGTTGGACCTGATAGGCTTG	
<i>PsSMXL8 F</i>	TTGTTGGACCTGATAGGCTTG	

Primer for genotyping**Pea**

<i>CAPS_RMS2-1 R</i>	ACAGGACGACATCCAAAGGA	Trul –65°C –2 h [cut m]
<i>CAPS_RMS2-1 F</i>	GGATGAGGGTTTTGGTGCTA	--
<i>dCAPS_RMS2-3 R</i>	TGAAGTAACCCAAGGAGTG	Pvull – 37°C –2 h [cut m]
<i>dCAPS_RMS2-3 F</i>	AAAGACCGCAACGCCGCTCATTGGTCA GC	--

Arabidopsis

<i>AtAFB4-8_569 F</i>	CCTTGGGTTGCTGCTACAGCTAAG	(Provided M.Pridge)
<i>AtAFB4-8_8+ R</i>	CTGCATAATCCGGTTGTTGTT	(Provided M.Pridge)
<i>AtAFB5-5_TR2</i>	GCATAATCTGGTTCTTGCTCACTC	(Provided M.Pridge)
<i>AtAFB5-5+F2</i>	AAATCTTGGTGCGTGTTG	(Provided M.Pridge)
<i>AtTIR1-1_1R2</i>	CAGGAACAACGCAGCAAAA	Bsa I – [cut wt]
<i>AtTIR1-1_1F2</i>	AGCGACGGTGATTAGGAGGT	--
<i>AtAFB2-3_TR</i>	TAGCGCAATAGAGGCAAGA	
<i>AtAFB2-3+F</i>	TTCTCCTTCGATCATTGTCAAC	
<i>AtAFB3-4_TR</i>	CAATGGCTGAATTACGGTGA	
<i>AtAFB3-4+F</i>	GGGTCTAAGACGGCTCTCTG	
<i>pROK_LB</i>	GGAACCACCATCAAACAGGA	

Bibliographie relative à la partie résultats de l'article en préparation

1. Rameau C, Bertheloot J, Leduc N, Andrieu B, Foucher F, Sakr S. Multiple pathways regulate shoot branching. 2015;5: 1–15. doi:10.3389/fpls.2014.00741
2. Thimann K V, Skoog F. Studies on the Growth Hormone of Plants: III. The Inhibiting Action of the Growth Substance on Bud Development. Proc Natl Acad Sci U S A. 1933;19: 714–716. doi:10.1073/pnas.19.7.714
3. Cline MG. Concepts and terminology of apical dominance. Am J Bot. 1997;84: 1064–1069. doi:10.2307/2446149
4. Beveridge C a, Dun E a, Rameau C. Pea has its tendrils in branching discoveries spanning a century from auxin to strigolactones. Plant Physiol. 2009;151: 985–990. doi:10.1104/pp.109.143909
5. Arite T, Iwata H, Ohshima K, Maekawa M, Nakajima M, Kojima M, et al. DWARF10, an RMS1/MAX4/DAD1 ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. Plant J. 2007;51: 1019–1029. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03210.x
6. Stirnberg P, Sande K Van De, Leyser H. MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in Arabidopsis. Development. 2002;1141: 1131–1141. Available: <http://dev.biologists.org/content/129/5/1131.short>
7. Zou J, Chen Z, Zhang S, Zhang W, Jiang G, Zhao X, et al. Characterizations and fine mapping of a mutant gene for high tillering and dwarf in rice (*Oryza sativa* L.). Planta. 2005;222: 604–612. doi:10.1007/s00425-005-0007-0
8. Zou J, Zhang S, Zhang W, Li G, Chen Z, Zhai W, et al. The rice HIGH-TILLERING DWARF1 encoding an ortholog of Arabidopsis MAX3 is required for negative regulation of the outgrowth of axillary buds. Plant J. 2006;48: 687–696. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02916.x
9. Waldie T, McCulloch H, Leyser O. Strigolactones and the control of plant development: Lessons from shoot branching. Plant J. 2014;79: 607–622. doi:10.1111/tj.12488
10. Morris SE, Turnbull CGN, Murfet IC, Beveridge CA. Mutational Analysis of Branching in Pea . Evidence That Rms1 and Rms5 Regulate the Same Novel Signal 1. 2001;126: 1205–1213.
11. Gomez-Roldan V, Feras S, Brewer PB, Puech-Pagès V, Dun E a, Pillot J-P, et al. Strigolactone inhibition of shoot branching. Nature. 2008;455: 189–94. doi:10.1038/nature07271
12. Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, et al. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. Nature. 2008;455: 195–200. doi:10.1038/nature07272
13. Sorefan K, Booker J, Haurogné K, Goussot M, Bainbridge K, Foo E, et al. MAX4 and RMS1 are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in Arabidopsis and pea. Genes Dev. 2003;17: 1469–74. doi:10.1101/gad.256603
14. Johnson X, Brcich T, Dun E a, Goussot M, Haurogné K, Beveridge C a, et al. Branching genes are conserved across species. Genes controlling a novel signal in pea are coregulated by other long-distance signals. Plant Physiol. 2006;142: 1014–26. doi:10.1104/pp.106.087676
15. Alder a., Jamil M, Marzorati M, Bruno M, Vermathen M, Bigler P, et al. The Path from β -Carotene to Carotenoid, a Strigolactone-Like Plant Hormone. Science (80-). 2012;335: 1348–1351. doi:10.1126/science.1218094
16. Nakamura H, Xue Y-L, Miyakawa T, Hou F, Qin H-M, Fukui K, et al. Molecular mechanism of strigolactone perception by DWARF14. Nat Commun. Nature Publishing Group; 2013;4: 2613. doi:10.1038/ncomms3613
17. Zhao L-H, Zhou XE, Wu Z-S, Yi W, Xu Y, Li S, et al. Crystal structures of two phytohormone signal-transducing α/β hydrolases: karrikin-signaling KAI2 and strigolactone-signaling DWARF14. Cell Res. 2013;23: 436–9. doi:10.1038/cr.2013.19

18. Hamiaux C, Drummond RSM, Janssen BJ, Ledger SE, Cooney JM, Newcomb RD, et al. DAD2 is an α/β hydrolase likely to be involved in the perception of the plant branching hormone, strigolactone. *Curr Biol.* Elsevier Ltd; 2012;22: 2032–6. doi:10.1016/j.cub.2012.08.007
19. Beveridge C, Symons G, Murfet I, Ross JJ, Rameau C. The rms1 mutant of pea has elevated indole-3-acetic acid levels and reduced root-sap zeatin riboside content but increased branching controlled by graft-transmissible signal (s. *Plant Physiol.* 1997;115: 1251–1258. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1539165/>
20. Beveridge C, Murfet I, Kerhoas L, Sotta B, Miginiac E, Rameau C. The shoot controls zeatin riboside export from roots. Evidence from the branching mutant rms4. *Plant Physiol.* 1997; 339–345.
21. Beveridge CA, Symons GM, Turnbull CGN. Auxin Inhibition of Decapitation-Induced Branching Is Dependent on Graft-Transmissible Signals Regulated by Genes Rms1 and Rms2 1. 2000;123: 689–697.
22. Foo E, Bullier E, Goussot M, Foucher F, Rameau C. The Branching Gene RAMOSUS1 Mediates Interactions among Two Novel Signals and Auxin in Pea. 2005;17: 464–474. doi:10.1105/tpc.104.026716.1
23. Beveridge CA. Long-distance signalling and a mutational analysis of branching in pea. 2000; 193–203.
24. Foo E, Morris SE, Parmenter K, Young N, Wang H, Jones A, et al. Feedback regulation of xylem cytokinin content is conserved in pea and Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2007;143: 1418–28. doi:10.1104/pp.106.093708
25. Young NF, Ferguson BJ, Antoniadis I, Bennett MH, Beveridge C a, Turnbull CGN. Conditional Auxin Response and Differential Cytokinin Profiles in Shoot Branching Mutants. *Plant Physiol.* 2014;165: 1723–1736. doi:10.1104/pp.114.239996
26. Hayward A, Stirnberg P, Beveridge C, Leyser O. Interactions between auxin and strigolactone in shoot branching control. *Plant Physiol.* 2009;151: 400–12. doi:10.1104/pp.109.137646
27. Minakuchi K, Kameoka H, Yasuno N, Umehara M, Luo L, Kobayashi K, et al. FINE CULM1 (FC1) works downstream of strigolactones to inhibit the outgrowth of axillary buds in rice. *Plant Cell Physiol.* 2010;51: 1127–1135. doi:10.1093/pcp/pcq083
28. Proust H, Hoffmann B, Xie X, Yoneyama K, Schaefer DG, Yoneyama K, et al. Strigolactones regulate protonema branching and act as a quorum sensing-like signal in the moss *Physcomitrella patens*. *Development.* 2011;138: 1531–1539. doi:10.1242/dev.058495
29. Ongaro V, Leyser O. Hormonal control of shoot branching. *J Exp Bot.* 2008;59: 67–74. doi:10.1093/jxb/erm134
30. Dun EA, Hanan J, Beveridge CA. Computational Modeling and Molecular Physiology Experiments Reveal New Insights into Shoot Branching in Pea. *Plant Cell.* 2009;21: 3459–3472. doi:10.1105/tpc.109.069013
31. Rameau C, Fraval F, Haurogne K, Josserand J, Laucou V, Batge S, et al. Genetic mapping in pea . 2 . Identification of RAPD and SCAR markers linked to genes affecting plant architecture. 1998; 916–928.
32. Duarte J, Rivière N, Baranger A, Aubert G, Burstin J, Cornet L, et al. Transcriptome sequencing for high throughput SNP development and genetic mapping in Pea. *BMC Genomics.* 2014;15: 126. doi:10.1186/1471-2164-15-126
33. Alves-Carvalho S, Aubert G, Carrère S, Cruaud C, Brochot A-L, Jacquin F, et al. Full-length *de novo* assembly of RNA-seq data in pea (*Pisum sativum* L.) provides a gene expression atlas and gives insights into root nodulation in this species. *Plant J.* 2015;84: 1–19. doi:10.1111/tpj.12967
34. Tan X, Calderon-Villalobos LIA, Sharon M, Zheng C, Robinson C V., Estelle M, et al. Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature.* 2007;446: 640–645. doi:10.1038/nature05731
35. Walsh TA, Neal R, Merlo AO, Honma M, Hicks GR, Wolff K, et al. Mutations in an auxin receptor homolog AFB5

and in SGT1b confer resistance to synthetic picolinic auxins and not to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid or indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2006;142: 542–52. doi:10.1104/pp.106.085969

36. Beveridge CA, Ross JJ, Murfet C. Branching Mutant *rms-2* in *Pisum sativum* *Plant Physiol.* 1994; 953–959.
37. Lee S, Sundaram S, Armitage L, Evans JP, Hawkes T, Kepinski S, et al. Defining Binding Efficiency and Specificity of Auxins for SCF. 2014; 1–10.

Supplemental data S1:

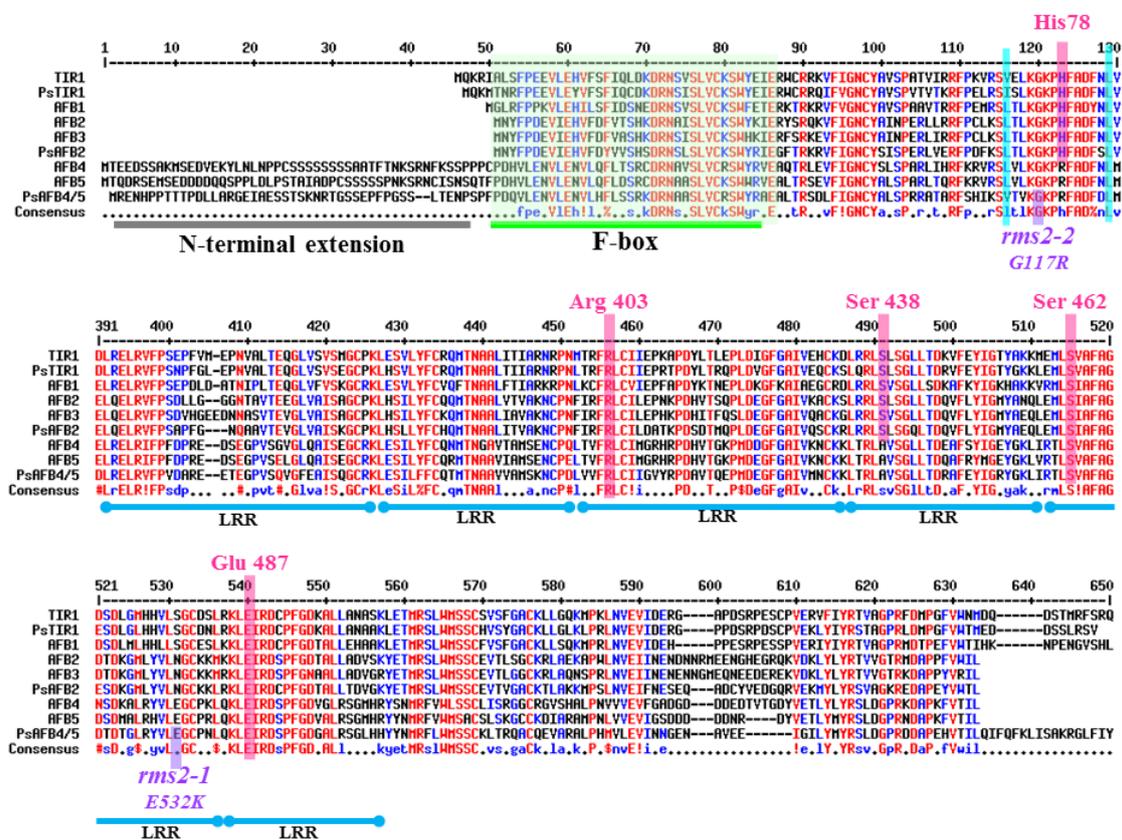


Figure S1. Protein sequence alignment of pea and *Arabidopsis* TIR1/AFB auxin receptor family.

Protein sequences from *Arabidopsis* TIR1, AFB 1 to 5 were obtained by TAIR ® ; from pea PsTIR1, PsAFB2 and PsAFB4/5 (RMS2) are from INRA of Dijon.

Sequence alignment was done using Multalin ® web-interface.

Position of leucines rich domains (LLR) (in blue) and F-box domain (in green) were obtained by NCBI ® web-interface.

Position of 5 essential amino acids which formed the auxin binding pocket of the AtTIR1 receptor are indicated in pink according to Tan et al., 2007. For both AtAFB4, AtAFB5 and PsAFB4/5 (RMS2) His 78 and Ser 438 were missing.

Specific N-terminal domain (in grey) from AtAFB4 and AtAFB5 (Dharmasiri et al., 2005) is also present in pea PsAFB4/5 (RMS2) protein.

Position of *rms2-1* (E532K) and *rms2-2* (G117R) mutation are indicated in purple.

Supplemental data S2 & S3 :

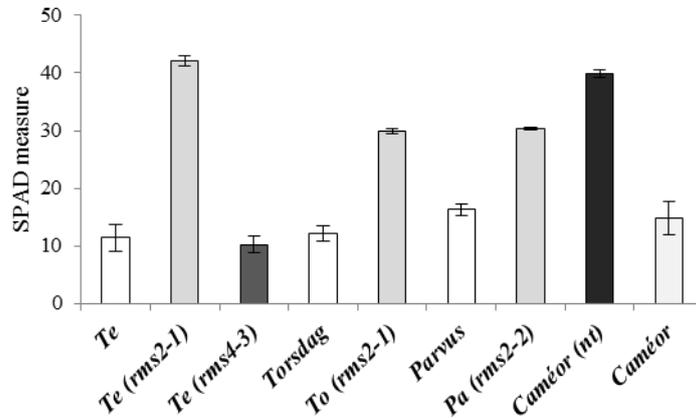


Figure S2. *rms2* pea mutants are picloram resistant.

2 w-old plants were sprayed with control (nt) or 200g/ha of picloram solutions. After 9 days of treatment, chlorophyll content were measured using SPAD instrument. (n = 8).

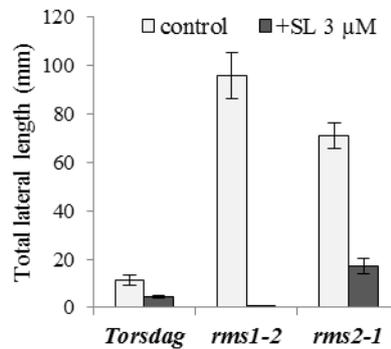
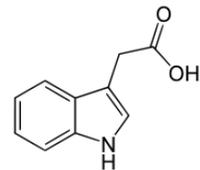
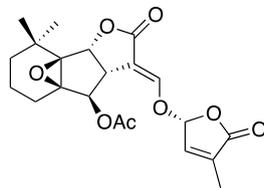


Figure S3. *rms2* is not affected in SL response.

Total length of branches was measured on 2 w-old plants *rms1-2*, *rms2-1* and WT (Torsdag background) after 1 week of hydroponic treatment with (±)-3^l-Me-GR24 (3 μM) or control solution. (n = 12).

CHAPITRE n°3

Partie n° III : Identification de nouveaux mutants *Psafb4/5* par une approche TILLING



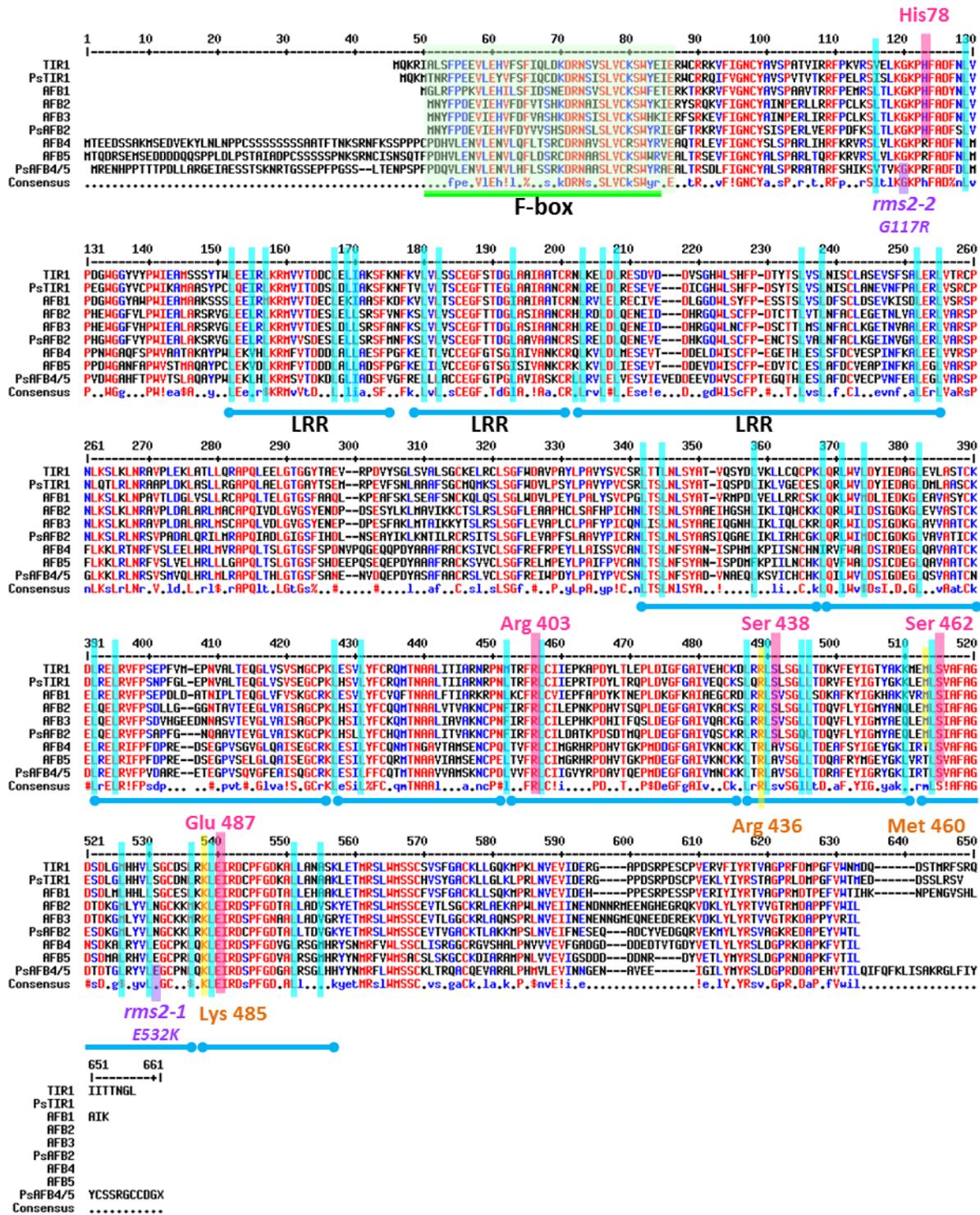


Figure n°III.12 : Alignement des séquences protéiques des récepteurs d'auxine de la famille TIR1/AFB.
 Les séquences protéiques de TIR1, AFB1 à AFB5 d'*Arabidopsis* ont été obtenues grâce au logiciel TAIR®; les séquences de pois PsTIR1, PsAFB2 et PsAFB4/5 (RMS2) ont été fournies par l'INRA de Dijon. L'alignement a été réalisé à l'aide de l'interface Multalin® développée par l'INRA de Toulouse.
 Légende : en violet, sont notées les 2 mutations *rms2-1* et *rms2-2*; les positions des domaines à boîte F (en vert) et domaines riches en leucines LRR (en bleu), la position des domaines a été obtenue par l'analyse de la séquence PsAFB4/5 sur le site NCBI®.
 La position des acides aminés constituant la poche de liaison à l'auxine sont indiqués en rose et ceux du domaine de liaison au co-facteur InsP6 sont indiqués en orange (Tan et al., 2007)

Partie n°3 : Identification de nouveaux mutants *Psafb4/5* par une approche TILLING

A. Mise en place d'une approche TILLING sur le locus *PsAFB4/5*.

Une approche de TILLING du locus *PsAFB4/5* a été mise en place à l'URGV (laboratoire d'A. Bendahmane) de manière à obtenir de nouveaux mutants *Psafb4/5* dans d'autres domaines et dans l'objectif de valider le clonage du gène RMS2. Le TILLING, effectué dans une population de mutagenèse du génotype Caméor, a permis d'obtenir 81 mutants, 6 introniques et 75 exoniques, mais aucun avec un codon STOP.

Un premier tri a été effectué pour sélectionner les mutants à étudier plus en détails. La plateforme de TILLING de l'URGV possède une base de données incluant des données phénotypiques sur la collection de mutants de pois (<http://urgv.evry.inra.fr/UTILLdb>). Nous avons donc sélectionné parmi les mutants de TILLING ceux possédant un phénotype d'architecture aérienne altéré comme la ramification ou le nanisme.

Puis l'analyse de la séquence protéique de *PsAFB4/5* a permis d'isoler des mutants dans des domaines conservés et importants pour la fonction de récepteur d'auxine comme la boîte-F, le domaine de liaison à l'auxine ou encore les séquences LLR présentes chez *PsAFB4/5*.

Pour cela un alignement des séquences protéiques, des 6 récepteurs d'auxine de la famille TIR1/AFB présents chez *Arabidopsis* (obtenues par TAIR®) et de 3 de ceux du pois : *PstIR1*, *PsAFB2* et *PsAFB4/5* (séquences obtenues par l'INRA de Dijon), a été réalisé grâce à l'interface Multalin® (INRA de Toulouse) (Figure n°III.13). L'analyse de la présence de domaines chez *PsAFB4/5* (sur NCBI®) montre la présence d'un domaine à boîte-F, et de 11 motifs riches en leucines (domaines LLR). Comme *AtAFB4* et *AtAFB5*, la protéine de pois *PsAFB4/5* présente une queue N-terminale d'une quarantaine d'acides aminés non présente chez les autres membres de la famille TIR1/AFB.

L'étude du récepteur TIR1 chez *Arabidopsis* a permis d'identifier des acides aminés clés pour la perception de l'auxine (Tan et al., 2007). Parmi les 5 acides aminés formant la poche de liaison à l'auxine chez le récepteur TIR1 d'*Arabidopsis*, seuls 3 d'entre eux sont conservés chez *PsAFB4/5*, *AtAFB4* et *AtAFB5* (Arg403, Ser462 et Glu487). L'His78 est remplacé par l'Arginine et Ser438 par l'Alanine. De même parmi les 3 acides aminés permettant la liaison au cofacteur InsP6, seuls 2 sont conservés chez *PsAFB4/5*, *AtAFB4* et *AtAFB5* (Arg436 et Lys485) ; Met460 est remplacée par la thréonine (Figure n°III.14.A). Cette similarité entre les

séquences protéiques AtAFB4, AtAFB5 et PsAFB4/5 sont cohérentes avec les analyses phylogénétiques réalisées au préalable montrant que ces trois protéines forment un clade particulier dans la famille des récepteurs à l'auxine TIR1/AFB (Chap n°1. Partiel.B.1.c). Ces différences auraient pu être à l'origine de la spécificité d'AtAFB5 et PsAFB4/5 pour la réception du picloram sauf que le récepteur AtAFB4 ne semble pas percevoir cette auxine synthétique.

Ainsi l'analyse de la séquence protéique de PsAFB4/5 par des outils informatiques et le recoupement avec les informations déjà connues sur le récepteur AtTIR1, permet donc de mettre en évidence des différences et des similarités avec le récepteur AtTIR1.

Si l'on replace sur la séquence protéique PsAFB4/5 les mutations *rms2-1* et *rms2-2* on observe que :

- la mutation *rms2-1* est située dans un domaine LLR (le 10^{ème}), 9 acides aminés en amont de la sérine faisant partie de la poche de liaison à l'auxine.
- la mutation *rms2-2* est située dans un domaine très conservé, 3 acides aminés en amont de la position de l'histidine faisant partie de la poche de liaison à l'auxine (non conservée dans le clade AFB4/AFB5 (Figure n°III.13.B).

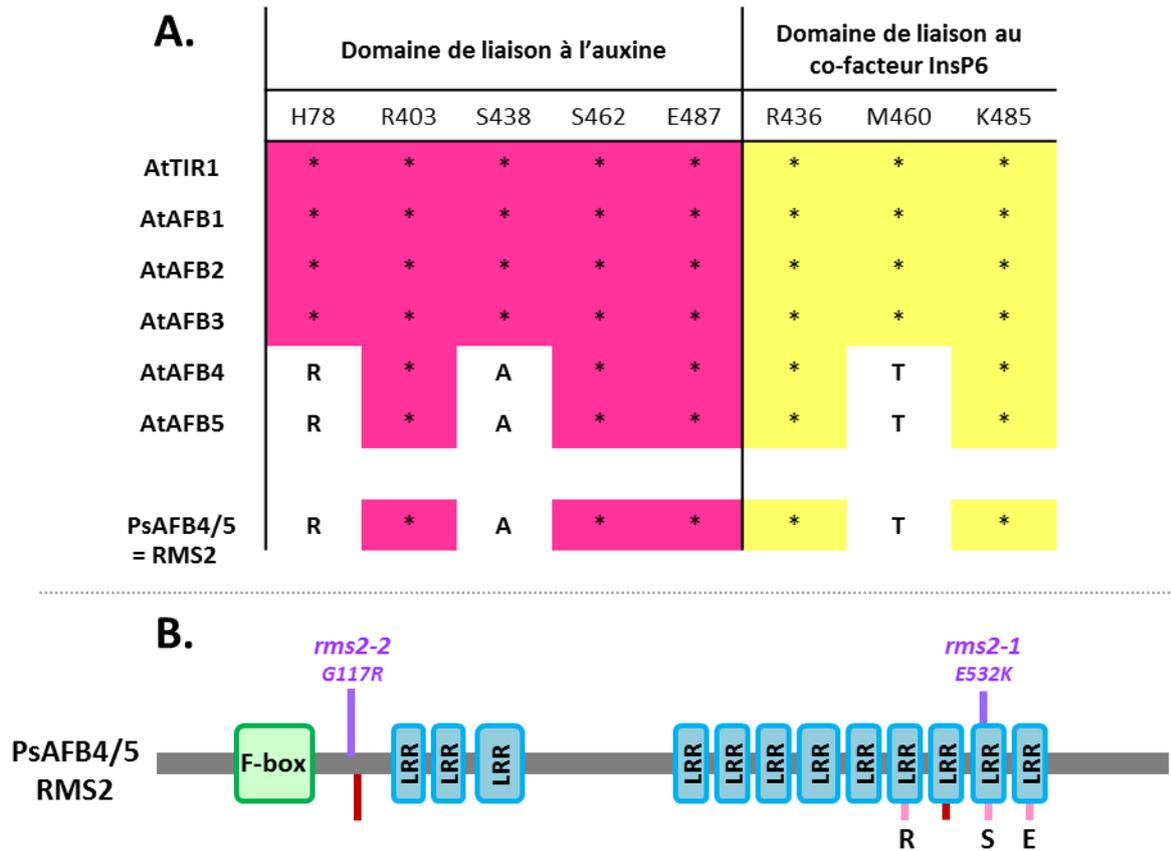


Figure n°III.13 : La protéine PsAFB4/5 (RMS2) de pois présente des domaines caractéristiques des récepteurs d'auxine.

(A). Tableau récapitulatif des différents acides aminés caractérisés par (Tan et al., 2007) comme essentiels à la liaison de l'auxine par le récepteur AtTIR1.

(B). Représentation schématique de la protéine PsAFB4/5 (RMS2). En vert le domaine à boîte F, en bleu les séquences répétées riche en leucine (LRR); en violet sont notées les 2 mutations *rms2-1* et *rms2-2*. La position des acides aminés constituant la poche de liaison à l'auxine présents chez PsAFB4/5 sont indiqués en rose, la position de ceux absent chez PsAFB4/5 est indiquée en rouge.

La liste des 20 mutants choisis pour l'étude ainsi que les positions des mutations dans d'éventuels domaines sont indiquées dans le tableau figure n°III.14.

Famille	Mutation nucléique	Changement d'acide aminé	Position de la mutation
604	C382T	P128S	
606	C1335T	P324L	
648	C194T	S65F	F-Box
648bis	C2114T	H549Y	LRR
740	G551A	G184E	LRR
783	G995A	E211K	LRR
1066	C1701T	A411V	LRR
1099	G1325A	E321K	
1275	C1764T	A432V	LRR
1349	G1697A	E410K	LRR
1445	G974A	E204K	LRR
1825	G337A	V113I	
1965	G550A	G184R	LRR
2048	C86T	T29I	
2063	G1617A	C383Y	LRR
3518	C229T	R77C	F-Box
3563	G1586A	D373N	LRR
3816	G1586A	D373N	LRR
3823	G1025A	V221I	LRR
4264	T232C	S78P	F-Box

Figure n°III.14 : Tableau récapitulatif des mutants de TILLING *PsAFB4/5* (RMS2).

Le TILLING réalisé à l'URGV (laboratoire de A.Bendahmane) a permis d'obtenir 81 mutants dans le locus *PsAFB4/5*, mais aucun avec un codon STOP.

Le tableau indique la position des mutations et le changement d'acide aminé qui en résulte ainsi que la position éventuellement de la mutation dans un des domaines de la protéine *PsAFB4/5*.

B. Résultats : Etudes des mutants de TILLING *Psafb4/5*

Les différentes familles contenant potentiellement les mutations dans *RMS2* identifiées par TILLING sont fournies par Dijon (en général un maximum de 6 graines par famille, le plus souvent 2 ou 3). Ces graines sont semées pour multiplication, rétrocroisement et, en même temps, pour une première observation du phénotype aérien. Lors des premières observations, aucun phénotype de ramification n'a été observé parmi les mutants identifiés. Cependant les mutants TILLING étant dans le fond génétique Caméor à floraison précoce, le phénotype de ramification n'est pas toujours facile à observer. Les mutants ont donc été rétro-croisés, non seulement avec la lignée de départ Caméor pour s'affranchir des autres

mutations mais aussi dans des fonds génétiques pour lesquels le phénotype de ramification est plus facilement repérable (comme Tèreze par exemple).

B.1 Crible picloram sur les mutants de TILLING *Psafb4/5*

Les homologues de *rms2* chez *Arabidopsis*, *afb4* et *afb5*, ont été caractérisés pour plusieurs phénotypes dont une résistance au picloram (auxine de synthèse) spécifique du mutant *afb5*. Après avoir confirmé la résistance au picloram des mutants de pois *rms2-1* et *rms2-2* (Chap n°3.Partiell), nous avons utilisé cette résistance comme crible, sur les mutants de TILLING.

Un premier crible avec une dose de picloram de 200 g/ha (*cf* Walsh et al., 2006) a été réalisé permettant de repérer à l'œil nu les résistants (restant assez verts) et les sensibles (dont les feuilles jaunissent)(Figure n°III.15.B). Parmi les mutants de TILLING, les mutants identifiés dans les familles 648, 1825, 3518 et 3563 semblent montrer une meilleure résistance que les autres. Ils sont donc choisis pour un crible picloram avec des mesures quantitatives de la résistance par analyse SPAD qui donne une donnée relative de la chlorophylle présente dans les feuilles (Figure n°III.15.B).

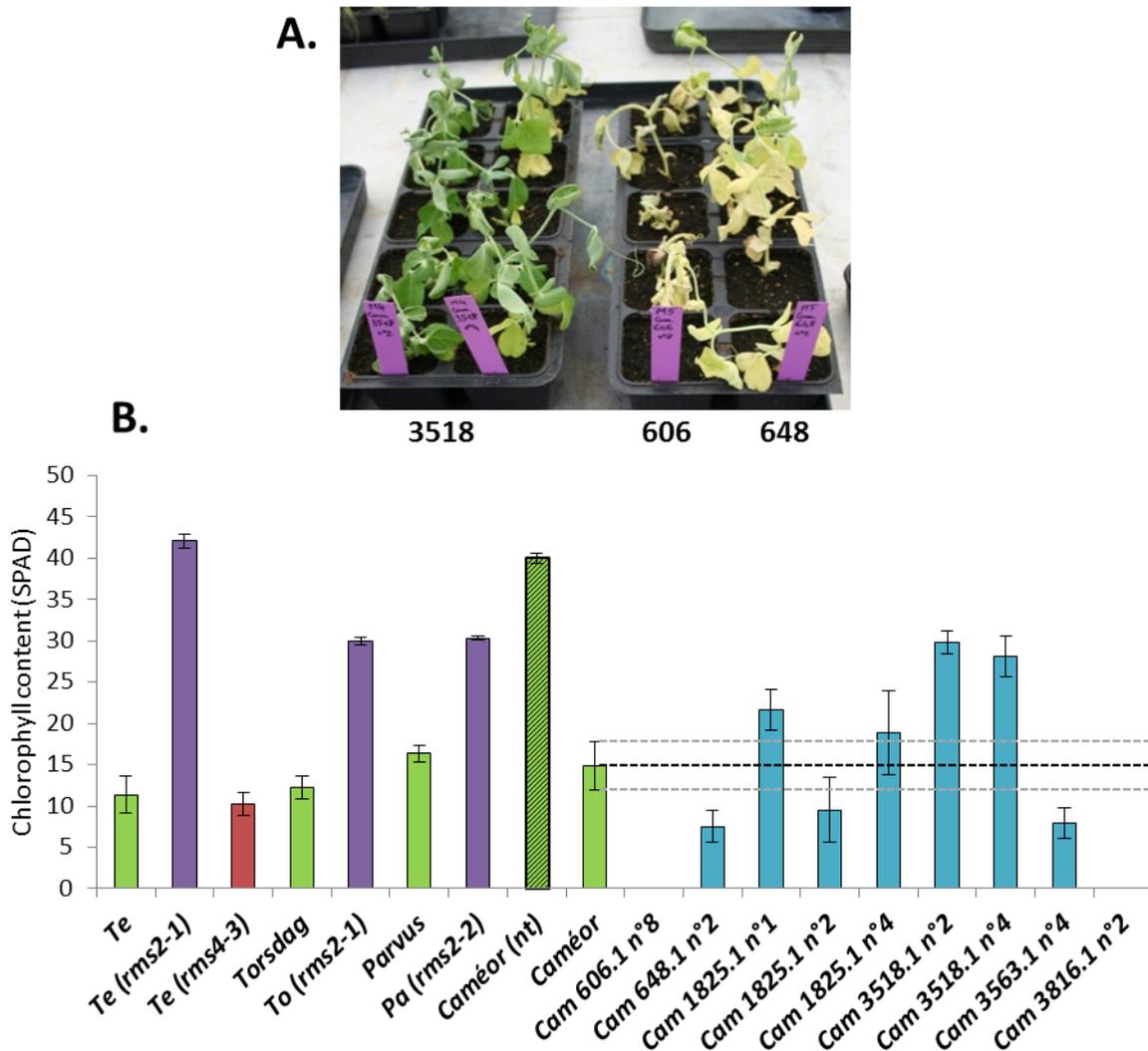


Figure n°III.15 : Crible picloram sur les mutants TILLING *Psafb4/5*.

[A] Photo de mutants TILLING après 10 jours de traitement picloram(200g/ha).

[B] Mesure SPAD 9 jours après un traitement par spray au picloram (200g/ha).

En vert les génotypes sauvages (Térèse, Torsdag et Caméor) en violet les mutants *rms2-1* (Te & To) et *rms2-2* (Pa), en rouge le mutant *rms4-3* (Te) de réponse au SLs. (nt) indique que la plante n'a pas été traitée au picloram. En bleu les mesures SPAD pour 6 des mutants de TILLING. Cam 606, Cam 648 & Cam 1825 (M5); Cam 3518, Cam 3563 & Cam 3816 (M4). Les traits en pointillés représente un intervalle en dessous duquel on peut considérer que les mutants sont plus sensibles que le sauvage Caméor et au dessus duquel les mutants sont moins sensibles que le sauvage Caméor .

Cette analyse montre que les mutants 3518 et 1825 ont une résistance au picloram intermédiaire entre le sauvage Caméor, et les lignées contenant les mutations *rms2-1* et *rms2-2* (Figure n°III.15.B). Par contre les autres mutants (606, 648, 3563 et 3816) sont très sensibles. Au moment du test il n'y avait pas du mutant *rms2* dans le génotype Caméor de disponible, nous avons donc utilisé les autres génotypes comme contrôles.

Ce test picloram met en avant le mutant 3518, dont la mutation est située dans le domaine à boîte F, comme plus résistant au picloram parmi tous les mutants TILLING testés. Son

phénotype de résistance semble moins fort que celui des mutants *rms2-1* et *rms2-2* ce qui pourrait expliquer que nous n'avons pas mis en évidence de phénotype ramifié. La mutation 3518 sera notée par la suite *rms2-3*.

B.2 Le mutant de TILLING *rms2-3* est un allèle faible

Pour approfondir le phénotype de résistance au picloram du mutant *rms2-3* (3518) nous avons effectué un test de dose réponse au picloram et pris des mesures SPAD à 11 jours et 15 jours après traitement (figure n°III.16).

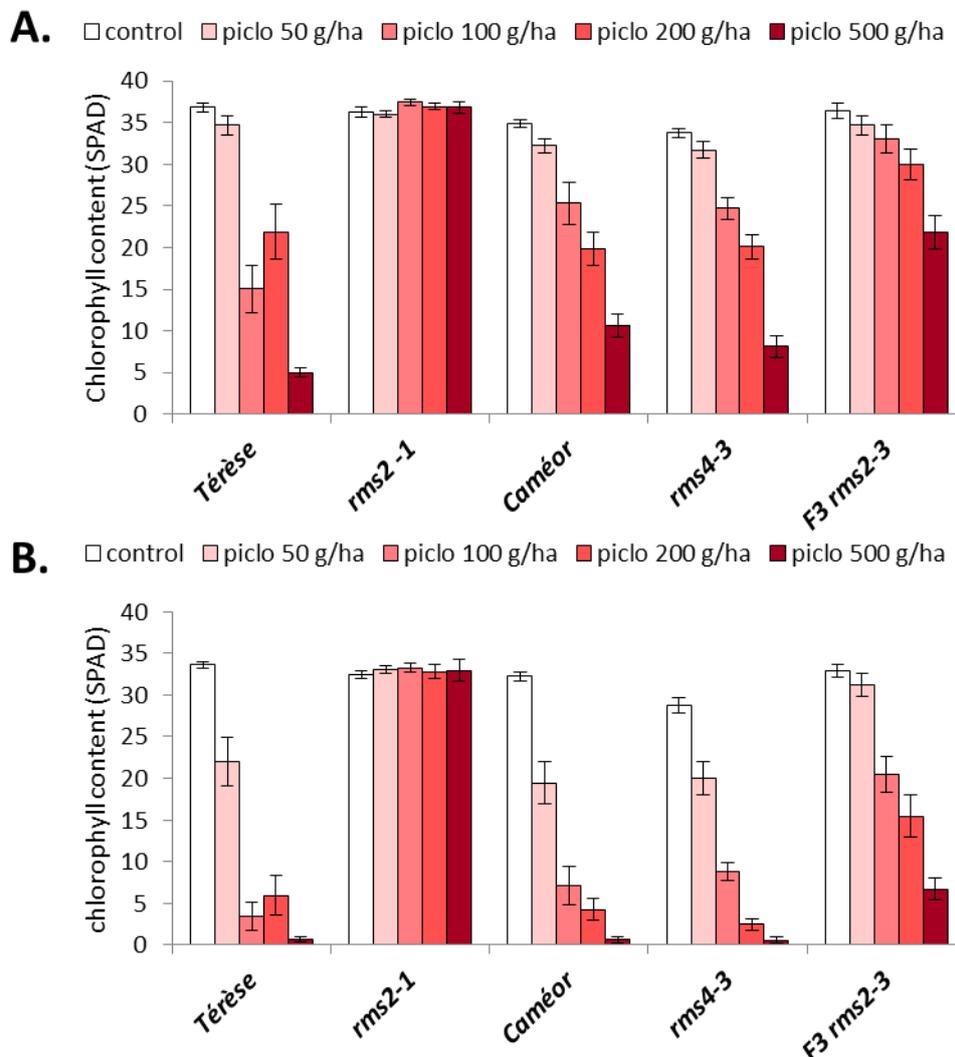


Figure n°III.16 : Le mutant TILLING 3518 (*rms2-3*) est partiellement résistant au picloram. Mesure de la chlorophylle (SPAD) sur des plantes traitées avec une dose croissante de picloram. (A). 11 jours après traitement; (B). 15 jours après traitement. Les mutants *rms2-1* et *rms4-3* sont dans un fond génétique Térèse. F3 *rms2-3* correspond à la F3 issue du rétro-croisement du mutant 3518 (Cam) par Caméor.

En dehors de *rms2-1* qui ne répond pas au picloram quelle que soit la concentration, on observe une dose-réponse pour tous les autres génotypes à 11 jours et 15 jours après traitement y compris pour le mutant *rms2-3* (3518). Cependant on peut observer qu'après 11 jours et 15 jours de traitement que le mutant *rms2-3* (3518) a toujours des teneurs en chlorophylles plus élevées que le sauvage même pour la dose la plus élevée de picloram. La réponse au picloram semble donc intermédiaire chez le mutant *rms2-3* (3518) entre celle des sauvages et du mutant *rms2-3* (3518). On peut donc qualifier le mutant *rms2-3* (3518) de partiellement résistant au picloram.

Suite à l'observation de ce phénotype de résistance partielle au picloram, nous avons voulu observer à nouveau le phénotype de ramification chez le mutant *rms2-3* (3518), après un 1 croisement par Caméor et sur un nombre d'individus plus important. Les croisements avec Caméor nous permettant alors de mesurer les ramifications sur une population BC1-F4 issue du croisement *rms2-3* x Caméor. Pour cela nous avons mesuré à tous les nœuds la longueur des ramifications d'une part chez Térése et le mutant *rms2-1* (figure n°III.17.A) et d'autre part chez Caméor et BC1- F4 (*rms2-3* x Caméor) (figure n°III.17.B).

Les résultats montrent que le mutant *rms2-3* (3518) présente une augmentation de la taille des branches aux nœuds 1 et 2 à 21j en comparaison au sauvage et seulement au nœud 1 à 29j. Si l'on compare la longueur totale de ramifications, on constate que la mutation *rms1-2* entraîne une augmentation de 50% de la ramification dans le génotype Térése (figure n°III.17.A.3) ; la mutation *rms2-3* entraîne une augmentation du même ordre (45%) de la ramification dans le génotype Caméor (figure n°III.17.B.3).

Le cultivar Caméor présente une variabilité de la taille de la ramification au nœud 1 plus importante que Térése, on peut le voir sur les graphiques grâce à l'erreur standard.

On peut donc considérer que le mutant TILLING présente un phénotype de ramification partiel.

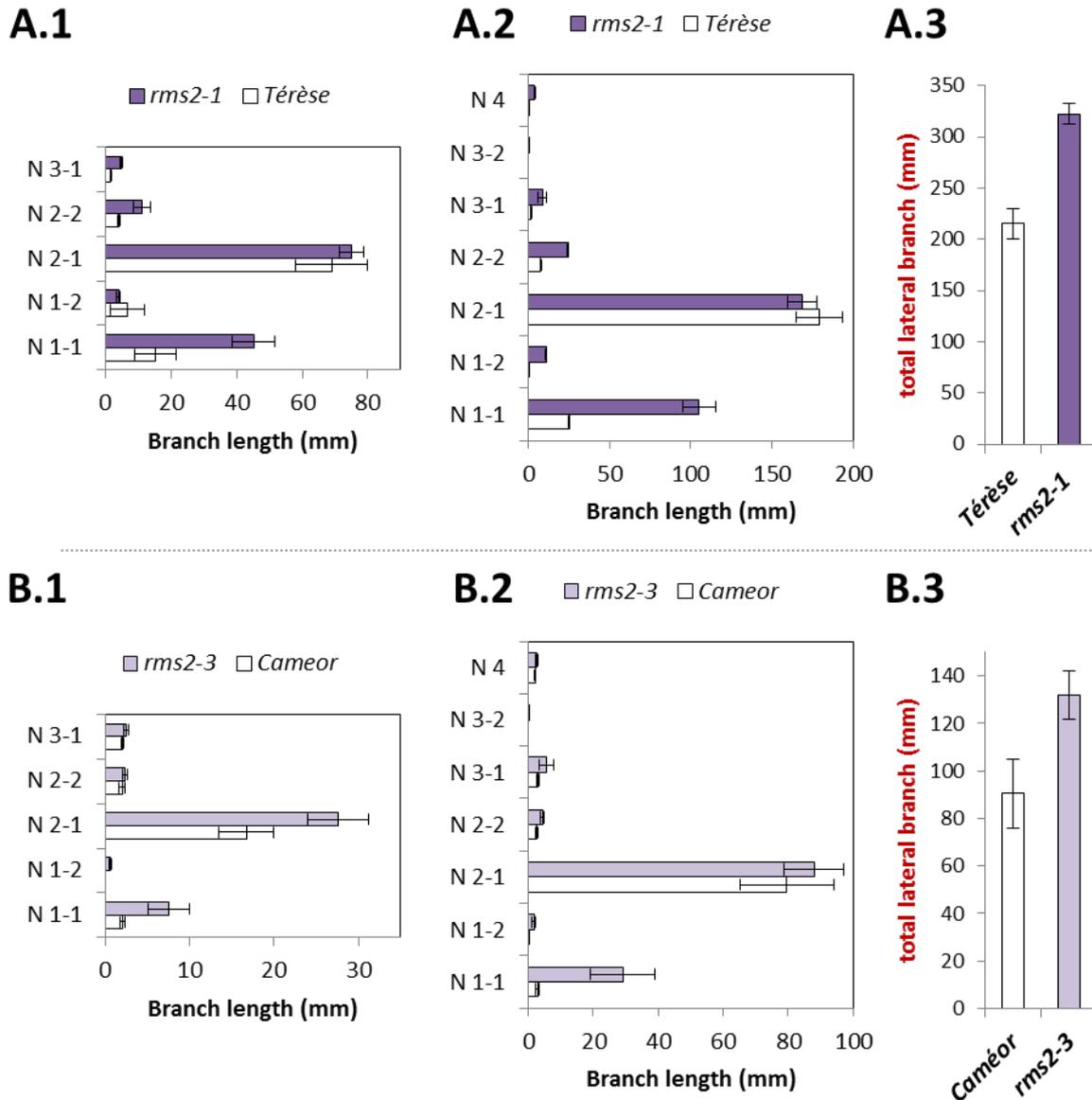


Figure n°III.17 : Le mutant TILLING 3518 (*rms2-3*) est partiellement ramifié.

Une mesure de la taille des ramifications à chaque nœuds à été réalisée.

(A) chez les sauvage *Térèse* et le mutant *rms2-1* à 21 jours, (A.1) ou 29 jours (A.2 et A.3).

(B) Chez le sauvage *Caméor* et le mutant TILLING 3518 (F4 Cam x Cam3518) (= *rms2-3*) à 21 jours, (B.1) ou 29 jours (B.2 et B.3).

C. Conclusion

L'étude des mutants de TILLING pour le locus *PsAFB4/5* a permis de mettre en évidence parmi les 81 mutants obtenus, un mutant partiel, le mutant 3518 que nous avons rebaptisé *rms2-3*. Ainsi la mutation R77C, situé dans le domaine à boîte F rend la protéine *PsAFB4/5* moins sensible au picloram, ce qui induit une résistance partielle du mutant lors du traitement au picloram. L'analyse fine de la ramification chez le mutant 3518 (*rms2-3*) nécessiterait, d'un part plus de rétro-croisement avec le parent sauvage Caméor (en cours en serre en ce moment) ainsi que son introgression dans les géotypes Tèrese et Torsdag pour mieux la caractériser.

Annexe n° 1

Résultats complémentaires

Résultats complémentaires

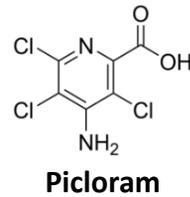
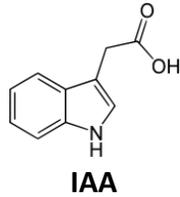
Figure n°III.18: La mutation *afb5-5* induit une résistance au picloram mais pas la mutation *afb4-8* chez *Arabidopsis*.

Figure n°III. 19 : Expressions des gènes de la famille TIR1/AFBs dans différents tissus de pois.

Figure n°III.20: Localisation de l'expression des gènes de biosynthèse de l'auxine de la famille *TAR* chez le pois.

Figure n°III.21 : La mutation *dor3 (smx16)* restaure le phénotype de *rms3*.

A



B



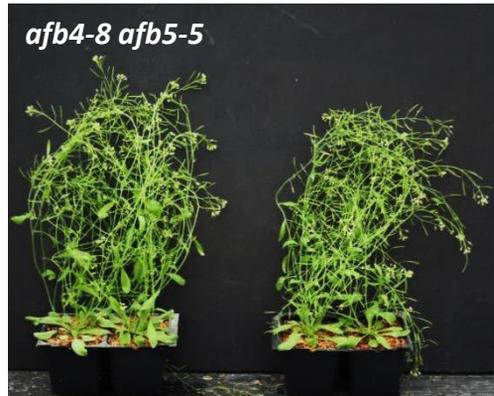
Contrôle + picloram
200 g/ha



Contrôle + picloram
200 g/ha



Contrôle + picloram
200 g/ha



Contrôle + picloram
200 g/ha

Figure n°III.18: La mutation *afb5-5* induit une résistance au picloram mais pas la mutation *afb4-8* chez *Arabidopsis*.

[A]. Structure chimique de l'auxine naturelle IAA (indole-3-acetic acid) et de l'auxine de synthèse picloram. [B]. Test de résistance au picloram réalisé sur des *Arabidopsis*, les plantes âgées de 20 jours ont reçu un traitement contrôle ou avec une solution de picloram 200 g^{-ha} appliqué par spray, les photos correspondent à des plantes représentatives de l'effet du traitement après 20 jours. (12 plantes/génotype/traitement)

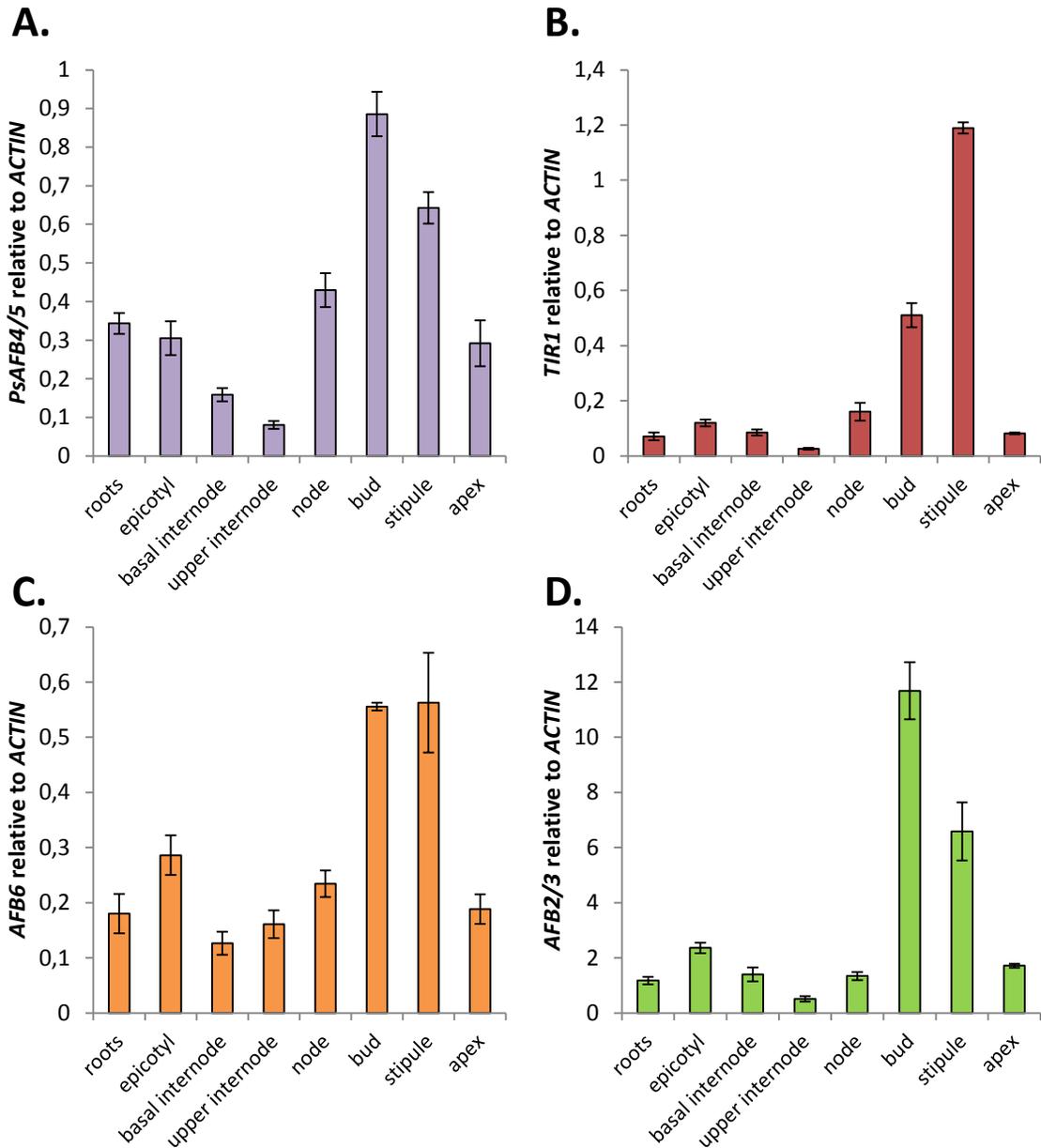
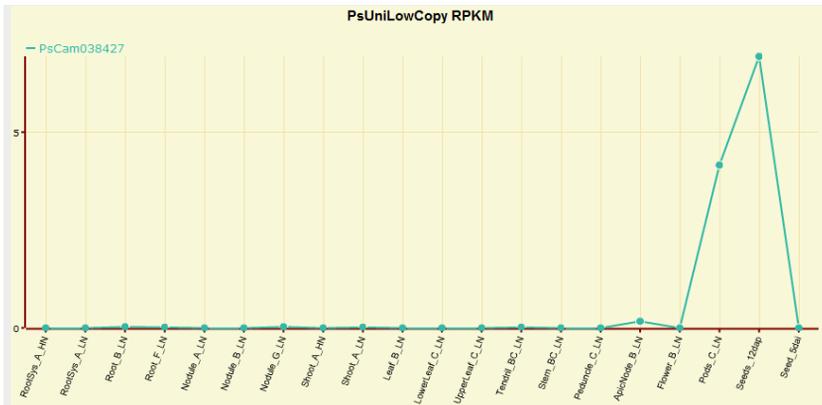
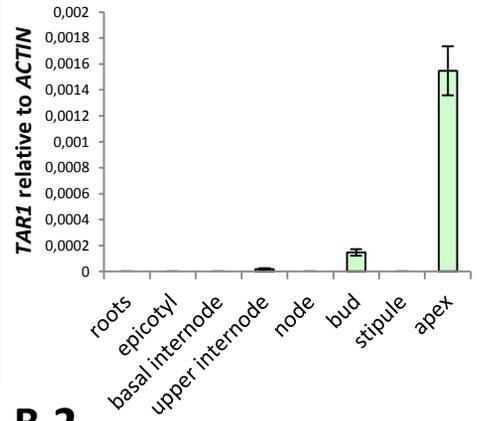
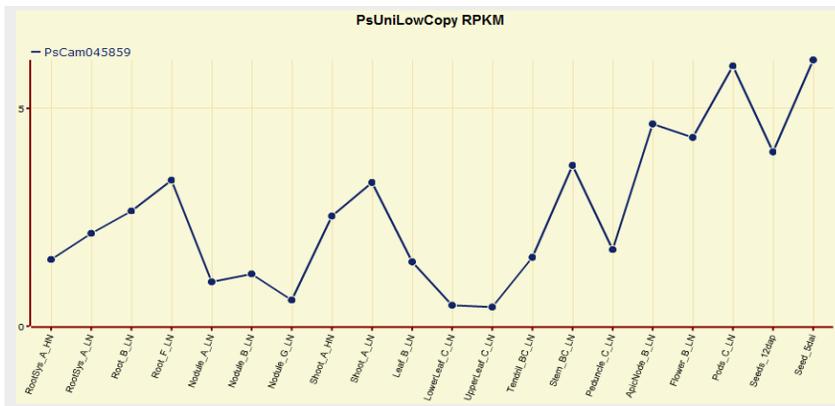


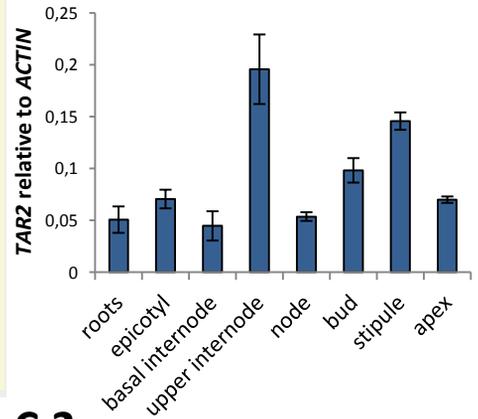
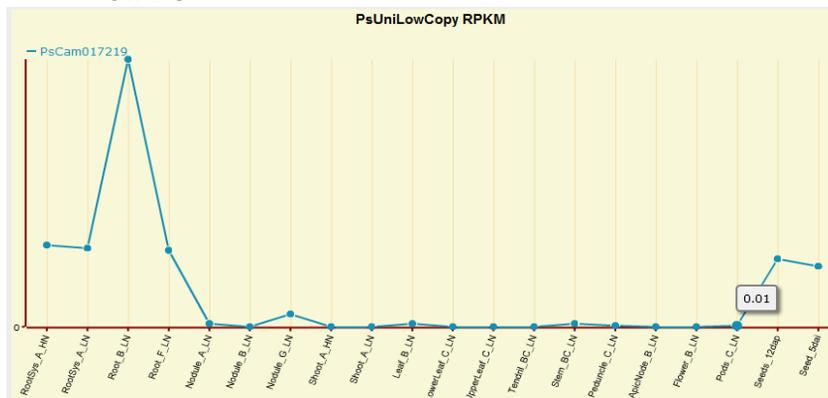
Figure n°III. 19 : Expression des gènes de la famille TIR1/AFBs dans différents tissus de pois. Les expressions des gènes sont relatives à celle de l'ACTINE. [A]. *PsAFB4/5*. [B]. *TIR1*. [C]. *PsAFB6*. [D]. *PsAFB2/3*. Les tissus ont été prélevés sur des plantes sauvages (Torsdag) en phase végétative, âgées de 20 jours. (n = 3 pools de 8-12 plantes).

A.1 *PsSTAR1*

A.2

B.1 *PsSTAR2*

B.2

C.1 *PsSTAR3*

C.2

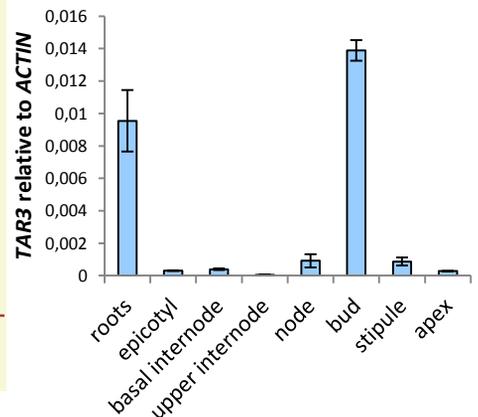


Figure n°III.20: Localisation de l'expression des gènes de biosynthèse de l'auxine de la famille *TAR* chez le pois.

[A.1]. *PsSTAR1* est préférentiellement exprimé dans la graine et la gousse [B.1]. *PsSTAR2* est exprimé dans la plupart des organes [C.1]. *PsSTAR3* est préférentiellement exprimé dans les racines.

Données fournies par l'INRA de Dijon, les tissus ont été prélevés sur des plantes sauvages en floraison.

[A.2]. *PsSTAR1* est préférentiellement exprimé dans l'apex [B.2]. *PsSTAR2* est exprimé dans la plupart des organes, préférentiellement dans l'entre-nœuds sous l'apex (upper internode) et dans les stipules [C.2].

PsSTAR3 est préférentiellement exprimé dans les racines et dans les bourgeons. Les gènes sont exprimés de façon relative à l'ACTINE. Les tissus ont été prélevés sur des plantes sauvage (Torsdag) en phase végétative, âgées de 20 jours. (n = 3 pools de 8 -12 plantes).

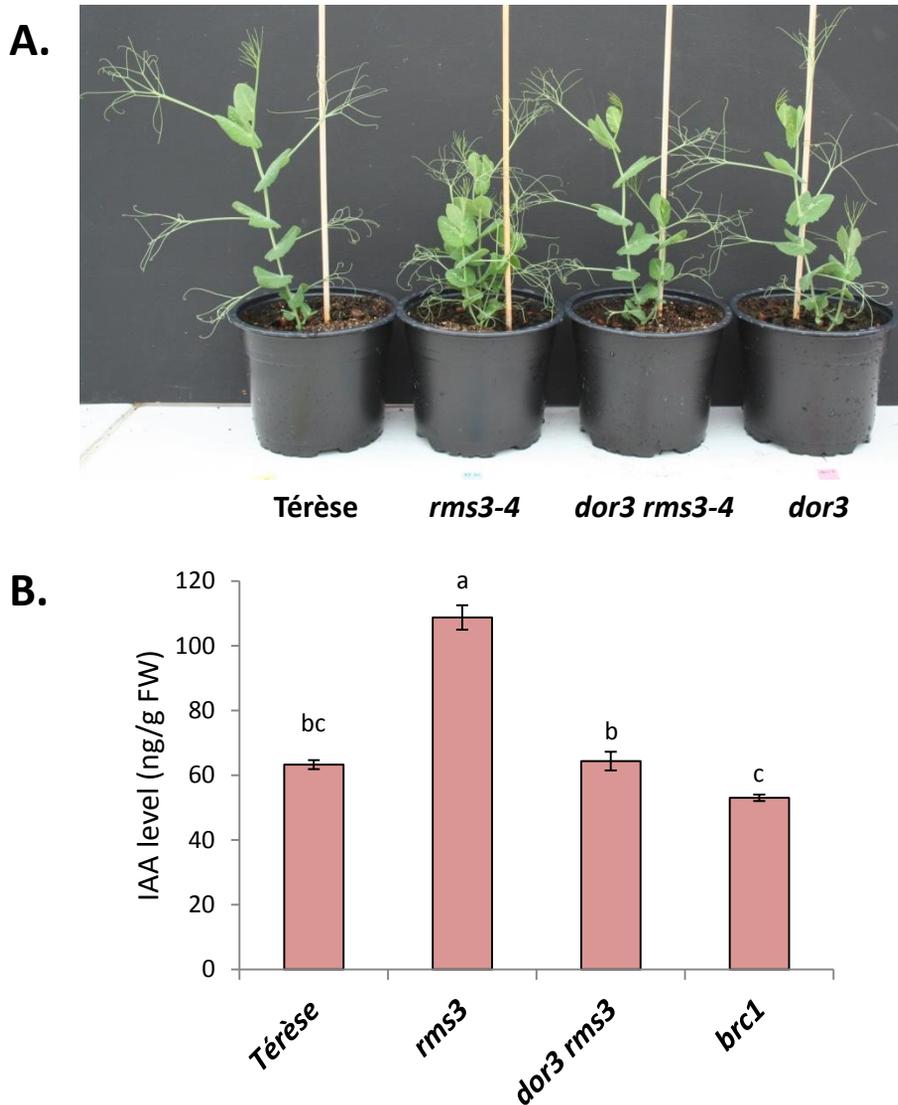


Figure n°III.21 : La mutation *dor3* (*smxl6*) restaure le phénotype de *rms3*.

(A). Phénotype des mutants *rms3-4*, *dor3 rms3-4* et *dor3* dans le fond génétique Tèrese.

(B). L'IAA est quantifié dans les entre nœuds sous l'apex de plantes de 15 jours. Les données représentent la moyenne sur quatre pools de 8 – 10 plantes. Les lettres indiquent une différence statistique entre génotype.

Annexe n° 2

Localisation de l'expression des gènes de la famille TIR1/AFBs dans différents tissus chez *Arabidopsis*.

M & M :

L'étude du patron d'expression global des 6 gènes de la famille TIR1/AFBs d'*Arabidopsis* : *TIR1*, *AFB1*, *AFB2*, *AFB3*, *AFB4* et *AFB5* est présentée, à différents stades du développement et dans différents tissus d'une plante sauvage.

L'échelle indiquée par un gradient de couleurs, représente la valeur absolue de l'expression du gène. Ainsi les tissus apparaissent colorés : en jaune quand les gènes sont peu exprimés, en rouge quand les gènes sont fortement exprimés. Les données des analyses transcriptomiques sont en libre consultation sur le site <http://bar.utoronto.ca/>.

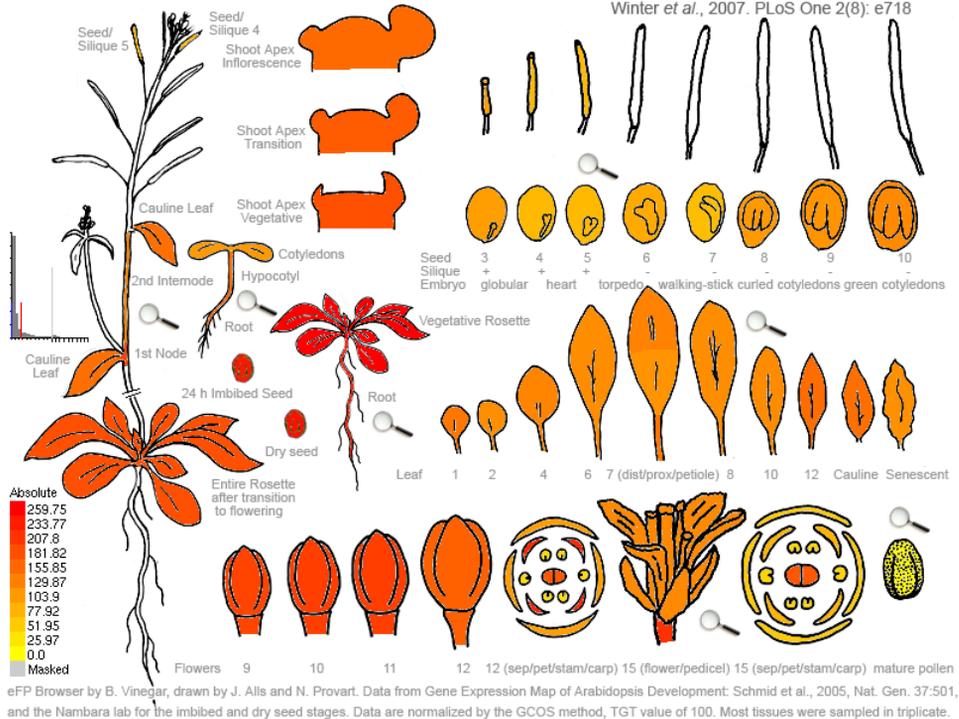
Ces patrons d'expression montrent que les gènes *AFB4* et *AFB5* d'*Arabidopsis* s'expriment surtout dans les parties aériennes de la plante. À l'exception de l'expression de *AFB4* dans les cellules du centre quiescent du méristème racinaire.

Bien qu'appartenant à un clade différent de *TIR1*, *AFB4* et *AFB5* ont un patron d'expression assez similaire.

AtTIR1

At3g62980 251199_at *AT1R1*

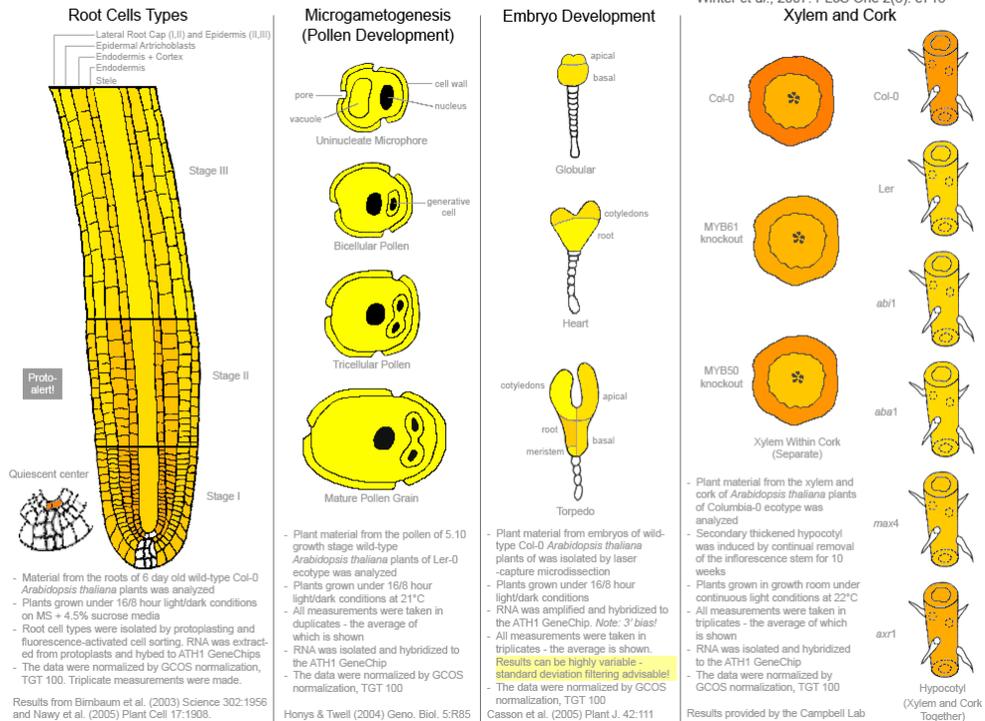
Arabidopsis eFP Browser at bar.utoronto.ca
Winter et al., 2007. PLoS One 2(8): e718



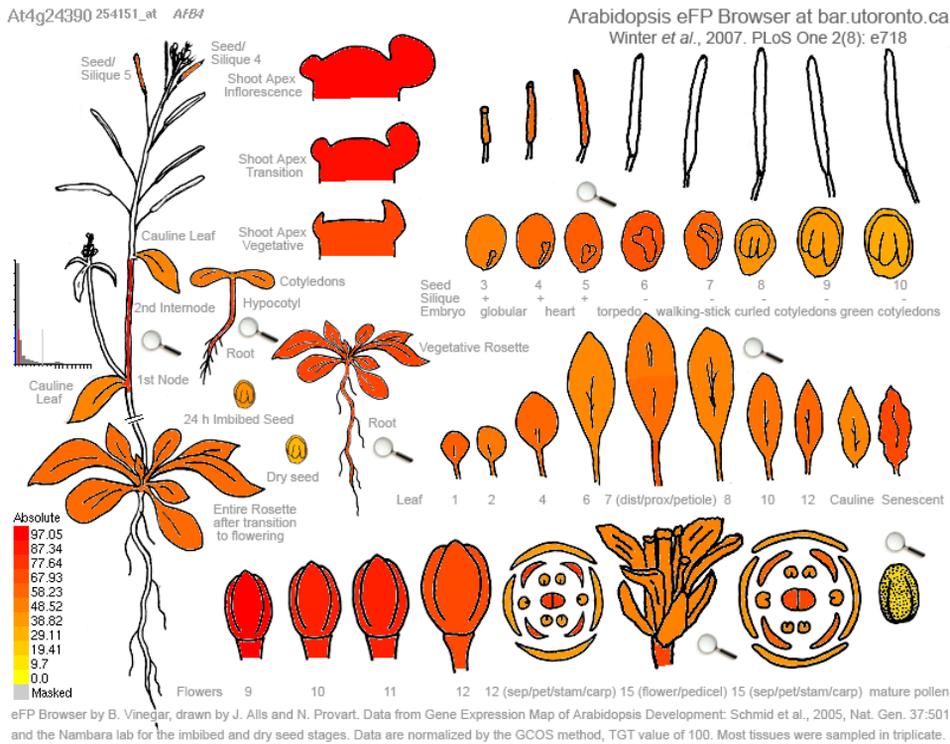
eFP Browser by B. Vinegar, drawn by J. Ails and N. Provar. Data from Gene Expression Map of Arabidopsis Development: Schmid et al., 2005, Nat. Gen. 37:501, and the Nambara lab for the imbibed and dry seed stages. Data are normalized by the GCOS method, TGT value of 100. Most tissues were sampled in triplicate.

At3g62980 251199_at *AT1R1*

Arabidopsis eFP Browser at bar.utoronto.ca
Winter et al., 2007. PLoS One 2(8): e718

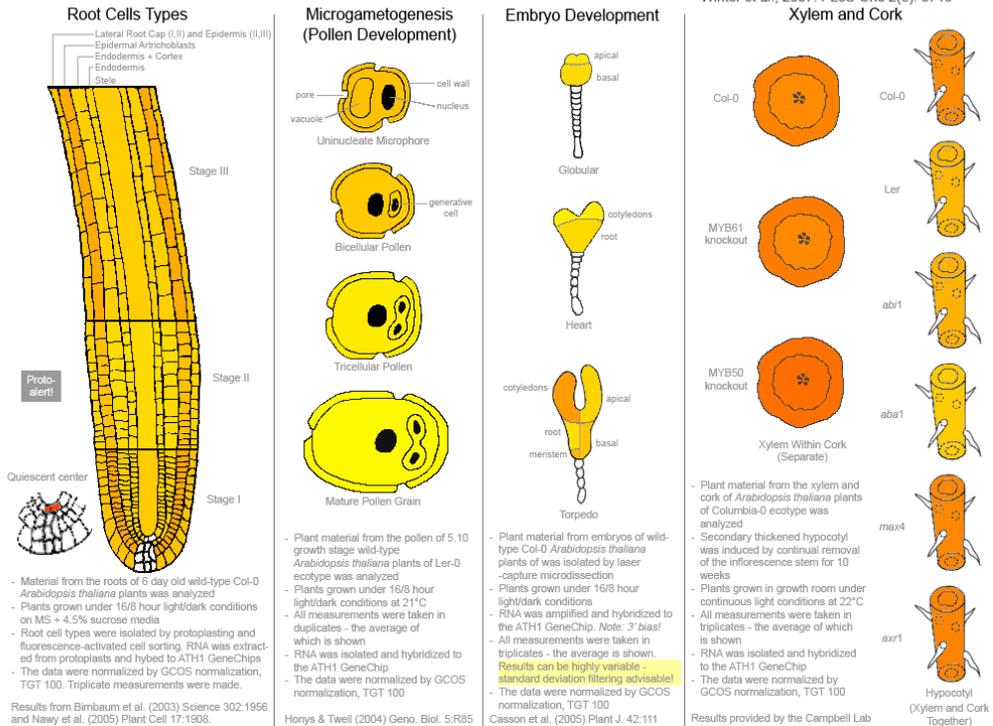


AtAFB4



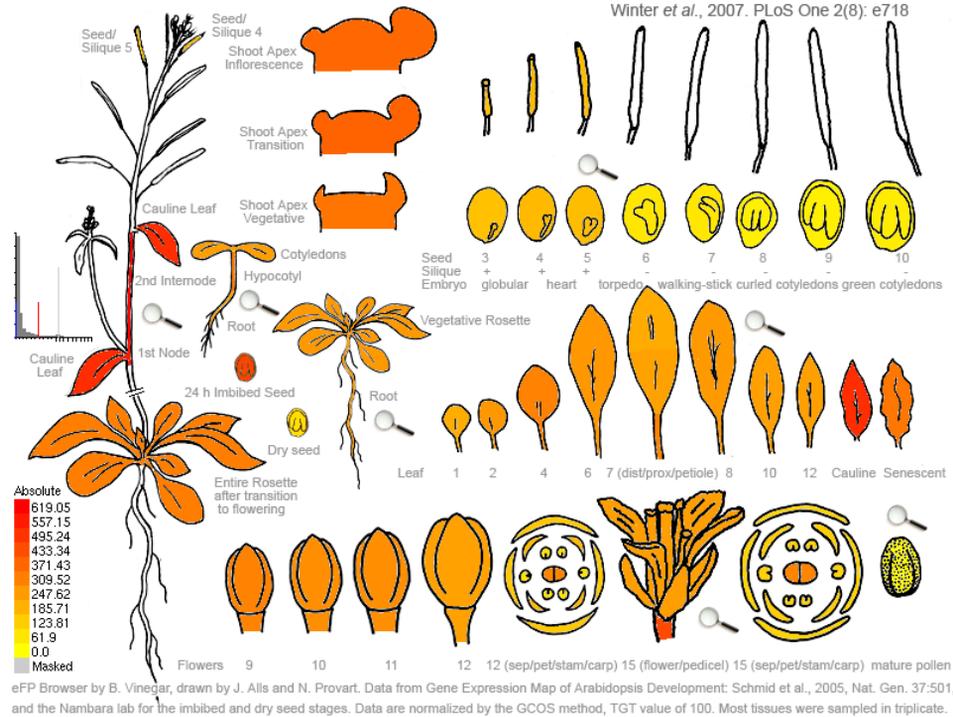
At4g24390 254151_at *AFB4*

Arabidopsis eFP Browser at bar.utoronto.ca
Winter et al., 2007. PLoS One 2(8): e718

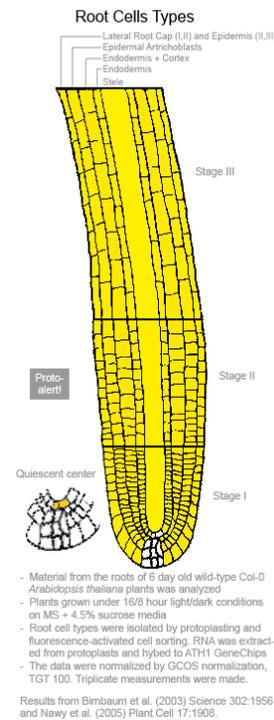


AtAFB5

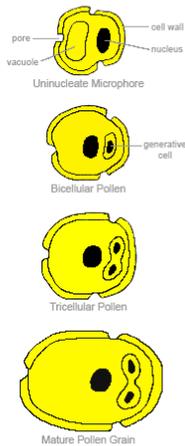
At5g49980 248557_at AFB5



At5g49980 248557_at AFB5



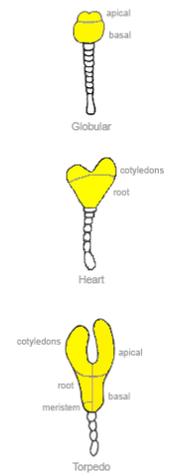
Microgametogenesis (Pollen Development)



- Plant material from the pollen of 5.10 growth stage wild-type *Arabidopsis thaliana* plants of Ler-0 ecotype was analyzed
- Plants grown under 16/8 hour light/dark conditions at 21°C
- All measurements were taken in duplicates - the average of which is shown
- RNA was isolated and hybridized to the ATH1 GeneChip
- The data were normalized by GCOS normalization, TGT 100

Honyts & Twell (2004) Gen. Biol. 5:R85

Embryo Development

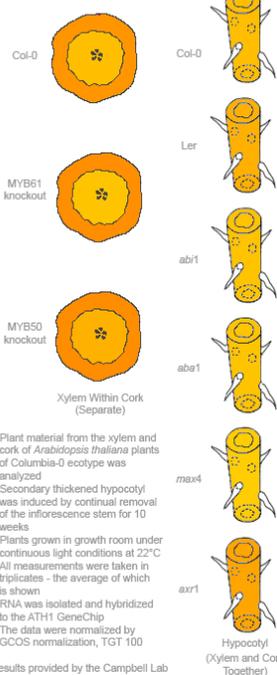


- Plant material from embryos of wild-type Col-0 *Arabidopsis thaliana* plants was isolated by laser capture microdissection
- Plants grown under 16/8 hour light/dark conditions
- RNA was amplified and hybridized to the ATH1 GeneChip. Note: 3' bias!
- All measurements were taken in triplicates - the average is shown. Results can be highly variable - standard deviation filtering advisable!
- The data were normalized by GCOS normalization, TGT 100

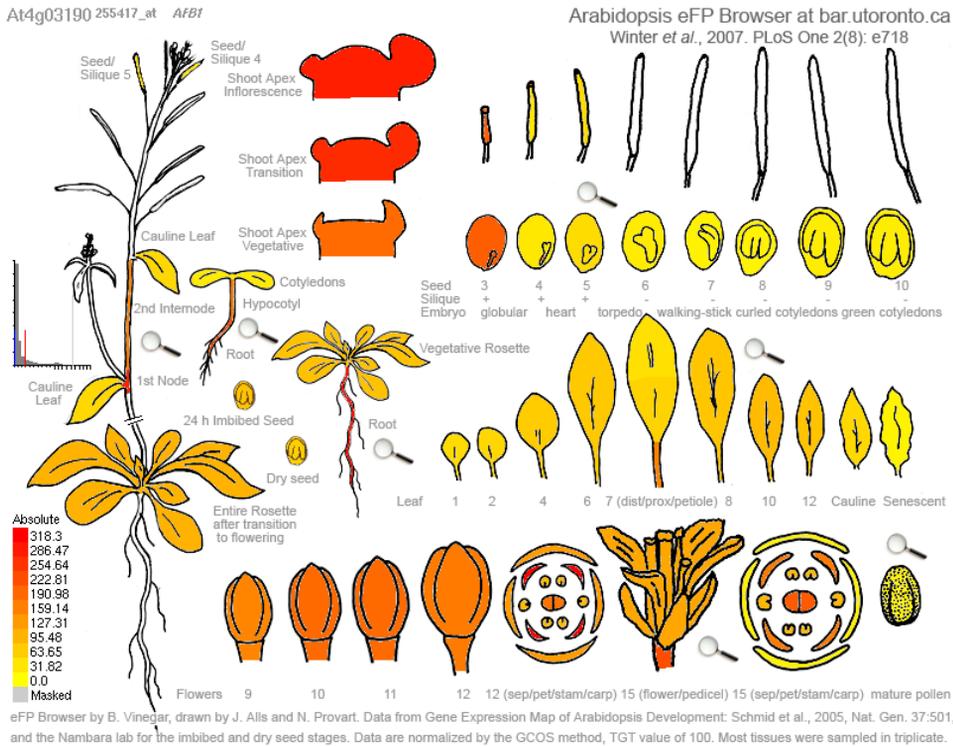
Casson et al. (2005) Plant J. 42:111

Arabidopsis eFP Browser at bar.utoronto.ca
Winter et al., 2007. PLoS One 2(8): e718

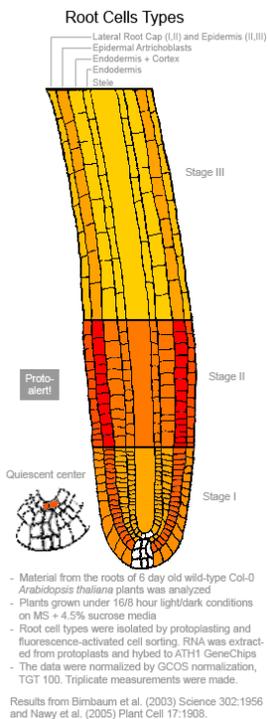
Xylem and Cork



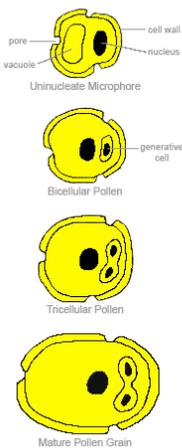
AtAFB1



At4g03190 255417_at *AFB1*



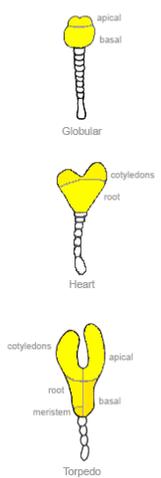
Microgametogenesis (Pollen Development)



- Plant material from the pollen of 5.10 growth stage wild-type *Arabidopsis thaliana* plants of Ler-0 ecotype was analyzed
- Plants grown under 16/8 hour light/dark conditions at 21°C
- All measurements were taken in triplicates - the average of which is shown
- RNA was isolated and hybridized to the ATH1 GeneChip
- The data were normalized by GCOS normalization, TGT 100

Hony & Twill (2004) Gen. Biol. 5:R65

Embryo Development

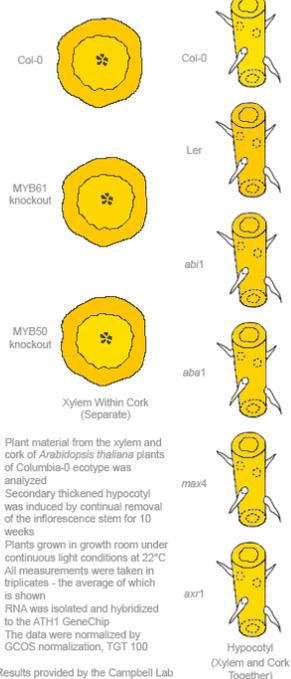


- Plant material from embryos of wild-type Col-0 *Arabidopsis thaliana* plants of was isolated by laser capture microdissection
- Plants grown under 16/8 hour light/dark conditions
- RNA was amplified and hybridized to the ATH1 GeneChip. Note: '3' bias'
- All measurements were taken in triplicates - the average is shown.
- Results can be highly variable - standard deviation filtering advisable!
- The data were normalized by GCOS normalization, TGT 100

Casson et al. (2005) Plant J. 42:111

Arabidopsis eFP Browser at bar.utoronto.ca
Winter et al., 2007. PLoS One 2(8): e718

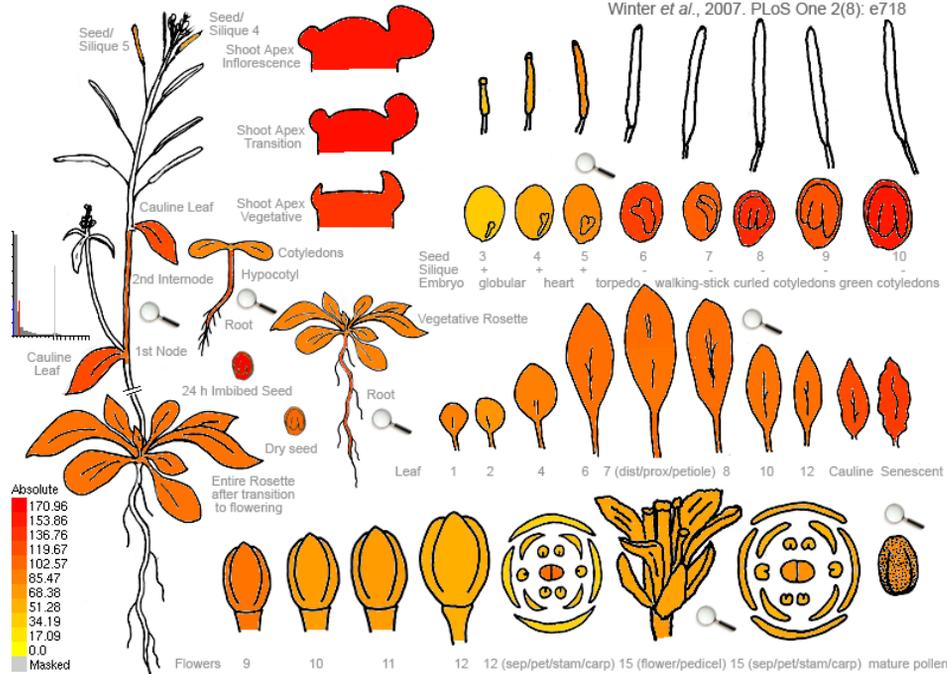
Xylem and Cork



AtAFB2

At3g26810 258311_at AFB2

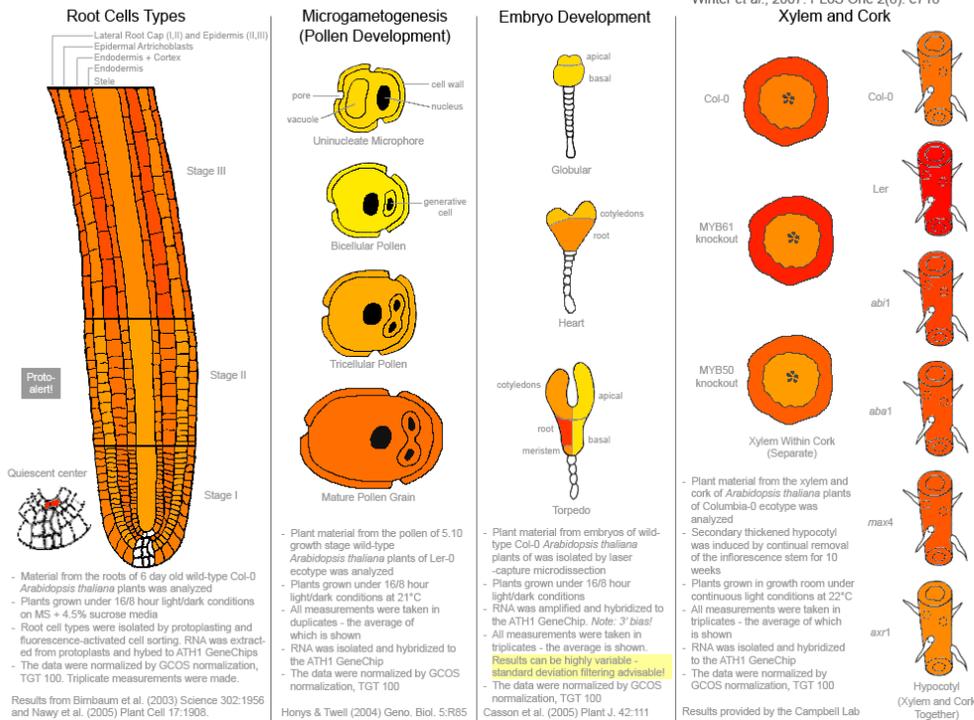
Arabidopsis eFP Browser at bar.utoronto.ca
Winter et al., 2007. PLoS One 2(8): e718



eFP Browser by B. Vinegar, drawn by J. Allis and N. Provart. Data from Gene Expression Map of Arabidopsis Development: Schmid et al., 2005, Nat. Gen. 37:501, and the Nambara lab for the imbibed and dry seed stages. Data are normalized by the GCOS method, TGT value of 100. Most tissues were sampled in triplicate.

At3g26810 258311_at AFB2

Arabidopsis eFP Browser at bar.utoronto.ca
Winter et al., 2007. PLoS One 2(8): e718



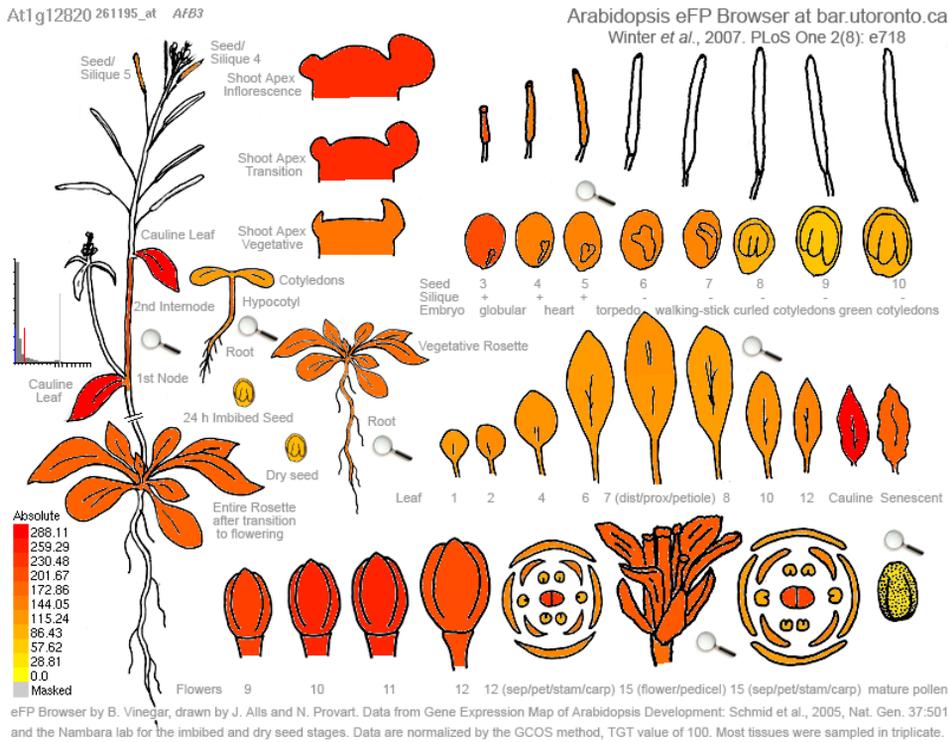
Results from Bimbaum et al. (2003) Science 302:1956 and Nawy et al. (2005) Plant Cell 17:1908.

Hony & Twell (2004) Gen. Biol. 5:R65

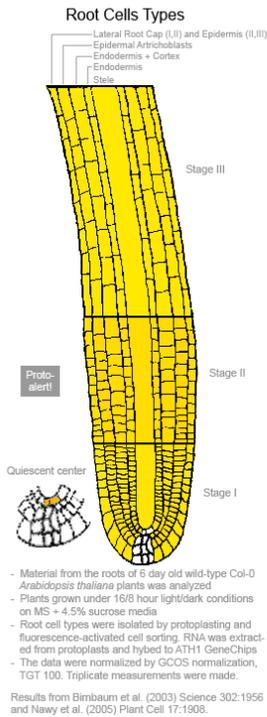
Casson et al. (2005) Plant J. 42:111

Results provided by the Campbell Lab

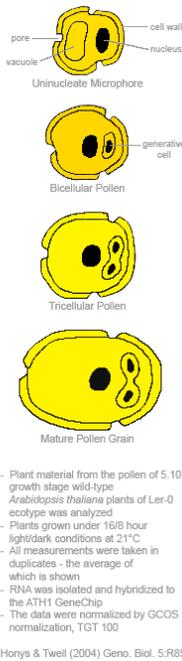
AtAFB3



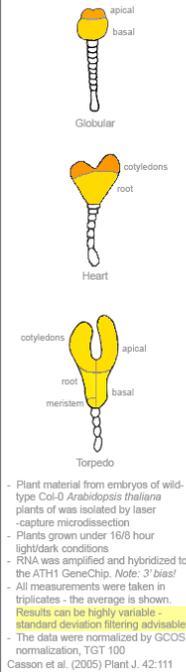
At1g12820 261195_at AFB3



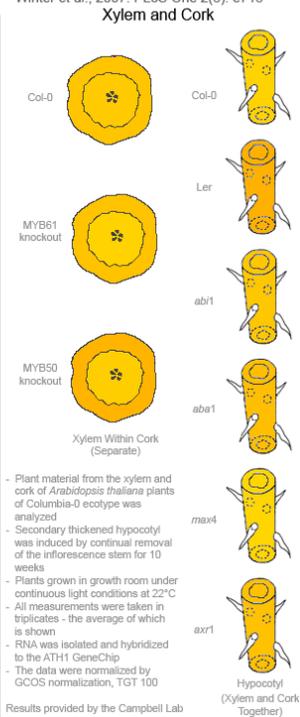
Microgametogenesis (Pollen Development)



Embryo Development



Arabidopsis eFP Browser at bar.utoronto.ca
Winter et al., 2007. PLoS One 2(8): e718



Annexe n° 3

Résultats préliminaires d'une étude de transcriptomique réalisé chez le pois

Figure n°III.22: Résultats préliminaires d'une étude transcriptomique de la réponse aux strigolactones chez le pois.

M & M : Le noeuds 5 de plantes âgées de 10 jours a été prélevé après 24h d'application de (\pm)-3'-Me-GR24 3 μ M via hydroponique. Les ARNs totaux ont été extraits, après vérification de l'absence de contamination par de l'ADNg, et de la qualité des ARNs; les ARNs ont été envoyés à la plateforme de l'URGV pour une analyse transcriptomique sur puce haute densité de pois en cours de développement (collaboration J. Burstin (URLEG, Dijon) et S. Balzergue (URGV, Evry)).

Les résultats présentés sont des résultats préliminaires, nous avons cherché à identifier parmi les gènes régulés par les SLs ceux qui sont connus comme étant des gènes de réponses ou des gènes du métabolisme de l'auxine.

Figure n°III.23 : Validation des gènes régulés positivement par les strigolactones.

Figure n°III.24 : Validation des gènes régulés négativement par les strigolactones.

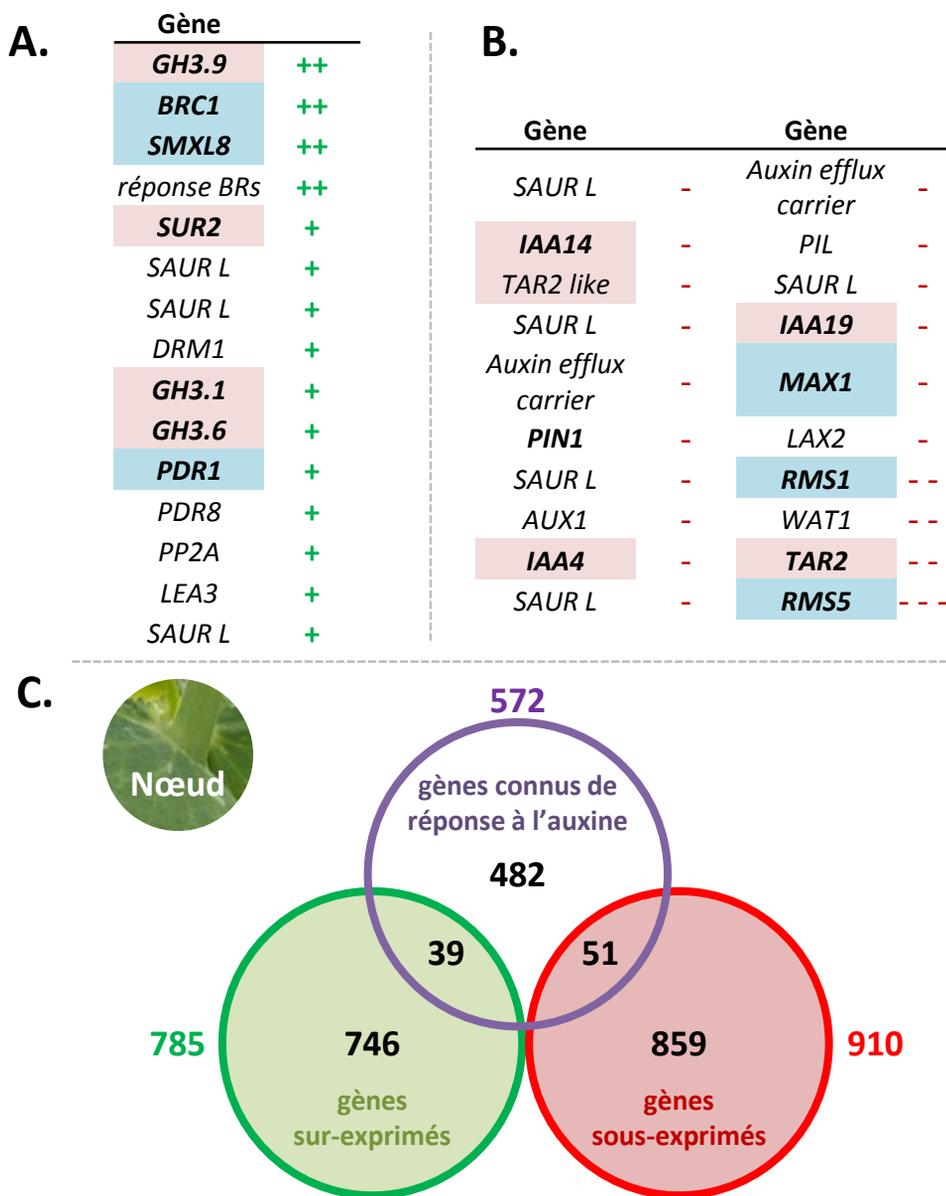


Figure n°III.22: Résultats préliminaires d'une étude transcriptomique de la réponse au strigolactones chez le pois.

Ce diagramme est une analyse préliminaire des résultats d'une étude de transcriptomique réalisée sur le mutant *rms1-2* (Torsdag).

[A]. Liste partielle des gènes (connus) sur-exprimés par les SLs dans l'analyse transcriptomique. **[B].** Liste partielle des gènes (connus) sous-exprimés par les SLs dans l'analyse transcriptomique. En bleu, les gènes de la voie SLs. En rouge les gènes impliqués dans le métabolisme de l'auxine.

[C]. Dans l'optique d'analyser si la réponse aux SLs passe par la régulation de gènes de réponse à l'auxine, nous avons identifier les potentiels gènes de réponse à l'auxine grâce à une analyse GO (Genes Ontologie) (Collaboration Fabienne Granier– IJPB). En effet une partie des gènes de pois de la puce utilisés pour la transcriptomique ont un numéro attribué correspondant à son homologue chez *Arabidopsis*.

1695 gènes de pois qui répondent aux SLs ont un numéro *Arabidopsis* correspondant.

Parmi eux 90 sont des gènes connus de réponses à l'auxine, dont des Aux/IAAs, des GH3s et des gènes du métabolisme de l'auxine.

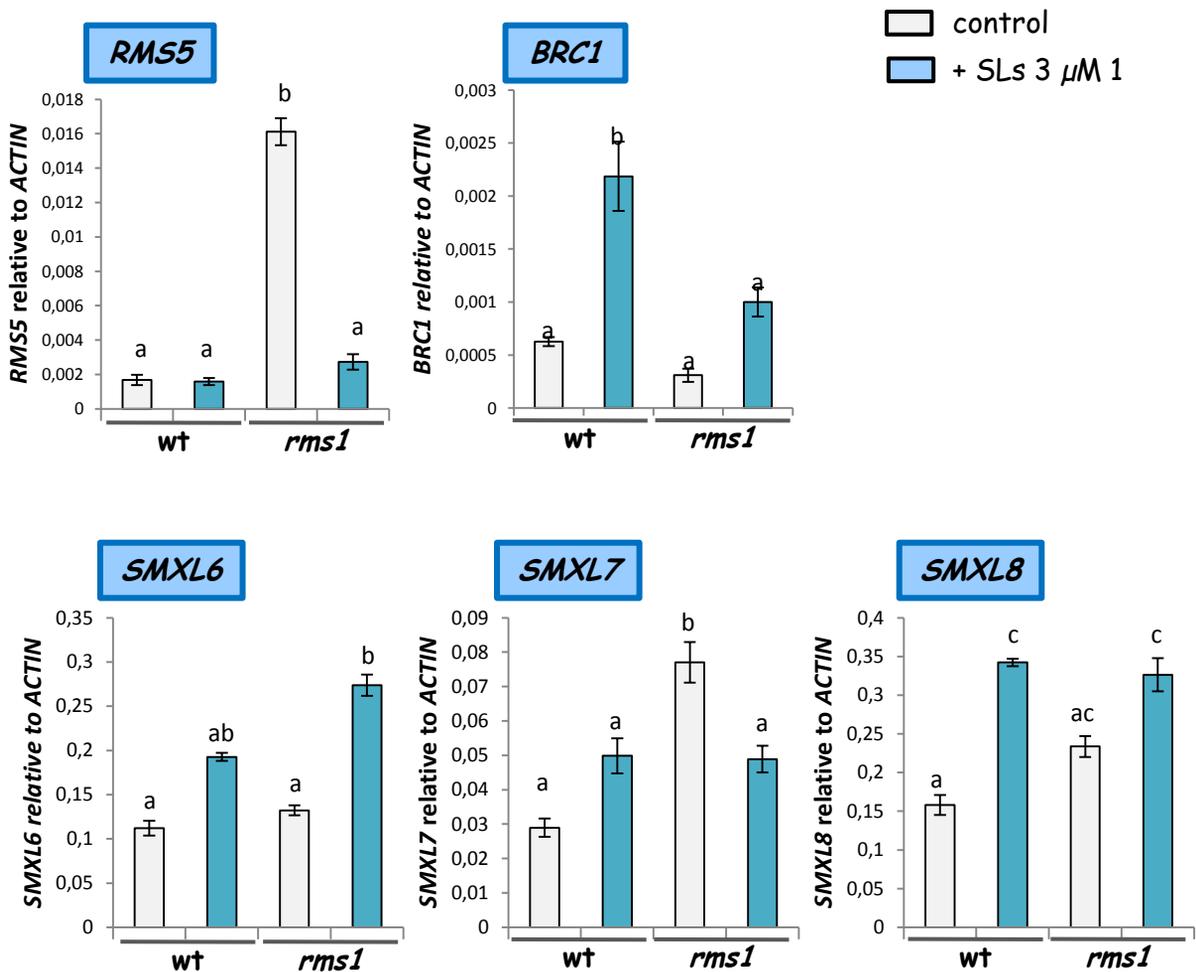


Figure n°III.23 : Validation des gènes régulés positivement par les strigolactones.

Les nœuds 7 sont prélevés sur des plantes Torsdag et *rms1-2* âgées de 21 jours, après 1 semaine de culture en milieu hydroponique dans une solution contrôle ou avec (\pm)-3'-Me-GR24 (3 μ M). Les expressions des différents gènes réalisées par RT-QPCR sont relatives à celle de l'ACTINE. Les lettres indiquent une différence statistique entre génotype/condition (Test Anova) (n = 3 pools de 8-12 plantes).

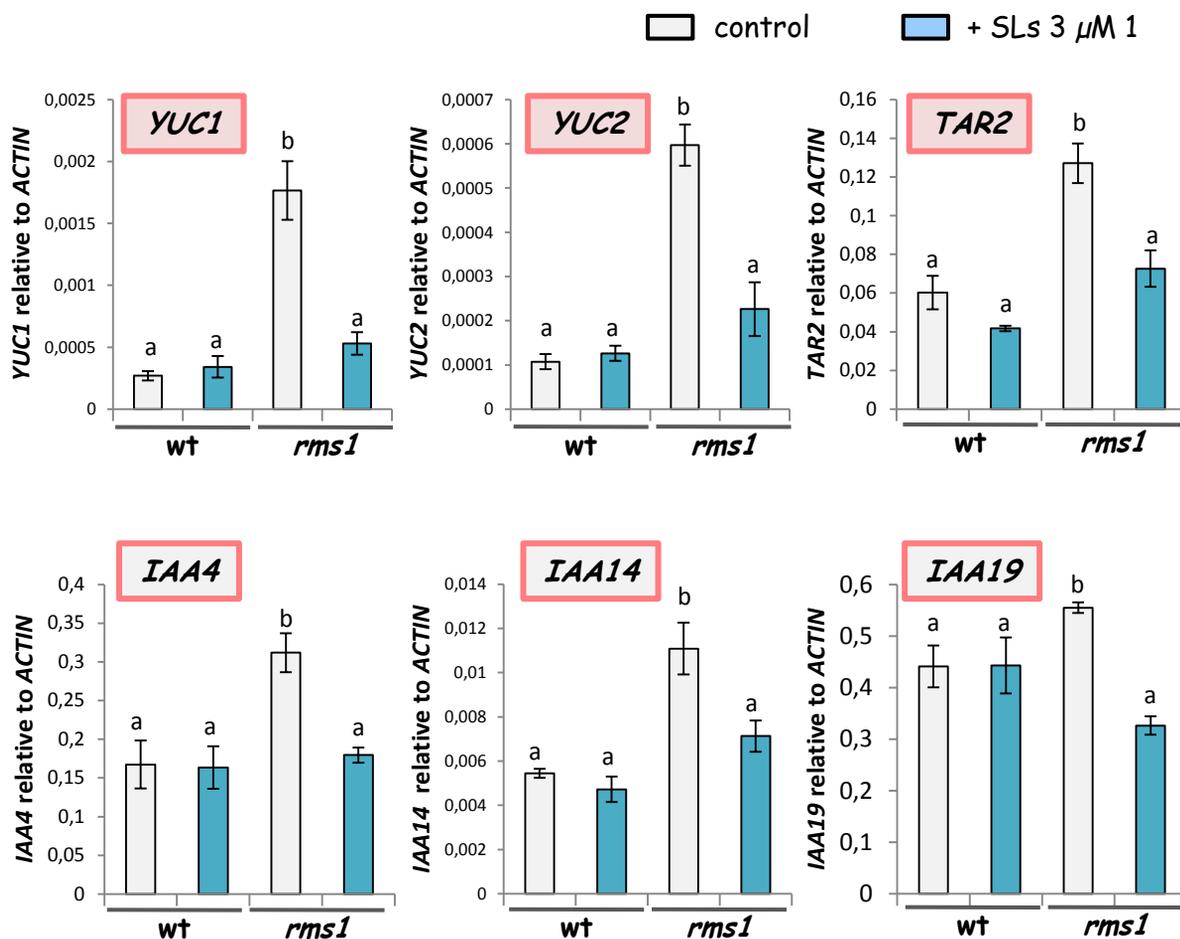
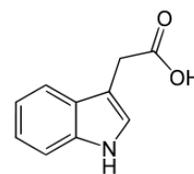
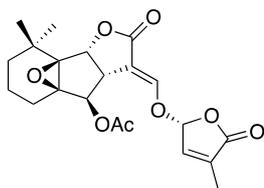


Figure n°III.24 : Validation des gènes régulés négativement par les strigolactones.

Les nœuds 7 sont prélevés sur des plantes Torsdag et *rms1-2* âgées de 21 jours, après 1 semaine de culture en milieu hydroponique dans une solution contrôle ou avec (\pm)-3'-Me-GR24 (3 μ M). Les expressions des différents gènes réalisées par RT-QPCR sont relatives à celle de l'ACTINE. Les lettres indiquent une différence statistique entre génotype/condition (Test Annona) (n = 3 pools de 8 -12 plantes).

CHAPITRE n°3

Partie n° V : Discussion



Partie n° V : Discussion

Le signal de rétro-contrôle *RMS2*-dépendant est une auxine

Le modèle du contrôle de la ramification développé chez le pois dans les années 90 proposait l'existence d'un signal de rétro-contrôle *RMS2*-dépendant et auxine-indépendant. La démonstration que *RMS2* code un récepteur à l'auxine suggère que ce signal est l'IAA. Un des arguments pour réfuter l'hypothèse que le feedback n'était pas l'auxine était la forte teneur en auxine du mutant *rms2* qui semble liée au fait que c'est un mutant de réponse à l'auxine et qu'il existe un rétro-contrôle négatif de l'auxine sur sa propre synthèse. Une telle régulation a été proposée récemment (Suzuki et al. 2015) et il a été montré que le niveau d'expression des gènes *TAR2*, *YUC1*, *YUC2*, *YUC4*, et *YUC6* d'*Arabidopsis* était réprimé par traitement exogène d'auxines synthétiques (NAA et 2,4-D). Un autre argument pour rejeter l'auxine comme signal de rétro-contrôle était que le mutant *rms2* répond à l'auxine par exemple dans des expériences où l'application exogène d'IAA stimule le niveau de transcrits de *RMS1* chez ce mutant. On peut supposer qu'il existe une redondance parmi les AFBs de pois pour expliquer cette réponse à l'auxine de *rms2*.

Spécificités du clade AFB4/AFB5

RMS2 fait partie du même clade que les protéines AFB4 et AFB5 d'*Arabidopsis* qui présentent des particularités dans la famille des récepteurs à l'auxine. Les protéines présentent par exemple une extension N-terminale qui n'explique pas cependant la résistance au picloram des mutants *rms2* et *afb5* puisque le gène *AFB4* possède aussi cette partie N-terminale et le mutant n'est pas résistant au picloram. Cette résistance au picloram est intrigante puisqu'elle est conservée entre *Arabidopsis* et le pois et que le picloram est une auxine synthétique. On dénombre *in planta* plusieurs types d'auxines, et on peut penser que la spécificité du récepteur *RMS2* réside dans la perception d'une auxine autre que l'IAA. Nous avons testé dans des expériences *in vitro* de double hybride l'interaction de *RMS2* avec les auxines naturelles 4-Cl-IAA et le PAA mais ces expériences de biochimie ne montrent pas de spécificité de la protéine de pois *RMS2* pour l'une d'entre elles puisque *RMS2* est capable de lier ces deux auxines, tout comme la protéine TIR1 d'*Arabidopsis*. Des approches

biochimiques pour mieux analyser la liaison des récepteurs de l'auxine avec différentes auxines sont nécessaires pour mieux comprendre cette spécificité de réponse au picloram.

Une autre spécificité du clade AFB4/AFB5 concerne l'implication de ces récepteurs à l'auxine pour une régulation fine de la ramification de la plante. Chez le pois, les 2 mutants *rms2-1* et *rms2-2* ont été identifiés pour leur forte ramification. Les simples mutants *afb4-8* et *afb5-5* et surtout le double mutant *afb4-8 afb5-5* d'*Arabidopsis* présentent aussi une plus forte ramification que le sauvage Columbia alors que le double mutant *tir1-1 afb2-3* ne présente pas ce phénotype. Le type de ramification semble différent de celui observé chez les mutants SLs qui présentent de longues ramifications à la plupart des nœuds. La plus forte ramification des mutants *rms2* peut s'expliquer par des teneurs en cytokinines plus élevées chez le mutant qui pourraient expliquer ce type de ramification un peu différent. On peut aussi se demander si les niveaux de transcrits de *RMS1* observés chez *rms2* correspondent à des niveaux en strigolactones plus faibles ce qui pourrait expliquer le phénotype de ramification. Cependant des quantifications de SLs dans les exsudats racinaires et les racines de *rms2* montrent que *rms2* n'est pas déficient en SLs (Foo et al. 2013). Cependant chez le petunia, l'étude de l'expression de *PhCCD8 (DAD1)* dans les tiges et les racines des mutants SLs montrent que si on retrouve la forte expression de *PhCCD8* dans les tiges de mutants par rapport au sauvage, dans les racines, l'expression est similaire à celle du sauvage (Snowden et al., 2005). Il est possible par conséquent que dans les tiges de *rms2*, le niveau de SLs est moindre que chez le sauvage. A l'heure actuelle, il n'est pas possible de tester cette hypothèse, les concentrations en SLs étant trop faibles dans ces tissus pour être détectées. Cette spécificité du clade AFB4/AFB5 pour le contrôle de la ramification pourrait aussi être liée aux protéines Aux/IAAs qui se lieraient aux protéines AFB4/AFB5. Des expériences de biochimie de type double hybrides sur une banque de protéines de pois (Aux/IAAs) permettraient d'identifier les différents acteurs moléculaires impliqués dans le rétro-contrôle *RMS2* et peut-être de faire émerger des spécificités par rapport à la voie auxinique actuellement décrite (Figure n°III.25).

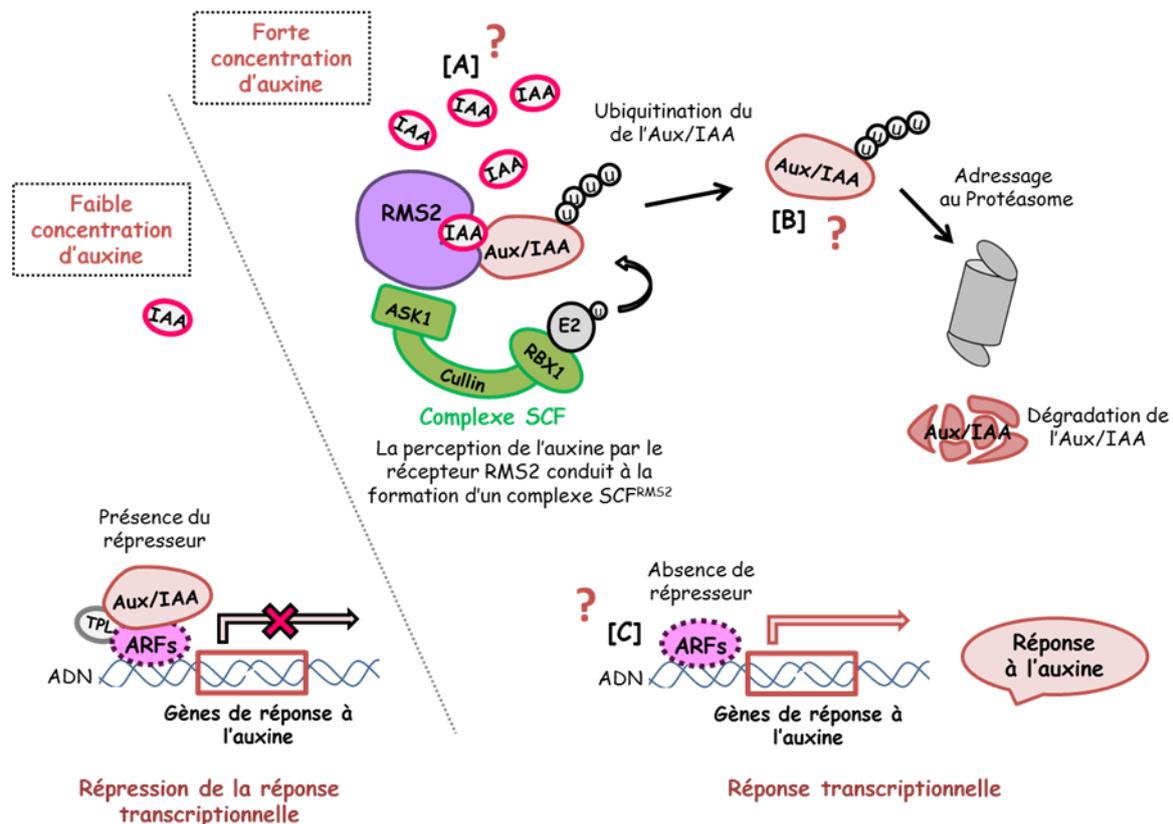


Figure n°III.25: Modèle putatif de la signalisation auxinique via *RMS2*. Quelle spécificité pour le clade *AFB4/5 – RMS2* ?

Le complexe SCF^{RMS2} lie l'auxine et cible des protéines Aux/IAAs qui sont dégradées via le protéasome. à faible concentration d'auxine, la transcription des gènes de réponse à l'auxine est inhibée par les Aux/IAAs. Quand le niveau d'auxine cellulaire augmente, l'auxine se lie au récepteur RMS2, augmentant son affinité pour les Aux/IAAs et entraînant l'ubiquitination puis la dégradation des Aux/IAAs via le protéasome, ce qui *in fine* permet la libération des facteurs de transcription de type ARFs et la transcription des gènes de réponse à l'auxine (Adapté de Santner et al., 2009).

Plusieurs interrogations demeurent sur les acteurs de la signalisation auxinique via *RMS2* chez le pois :

- [A] Est-ce que *RMS2* a une affinité spécifique pour une auxine naturelle ?
- [B] Quelles sont les protéines Aux/IAAs de pois qui sont dégradées via le signal *RMS2* ?
- [C] Quelles protéines ARFs sont impliquées dans la signalisation *RMS2* ?

Le rétro-contrôle *RMS2*-dépendant semble conservé chez les plantes

Chez le riz, le pétunia, *Arabidopsis* et la mousse, le niveau de transcrits des gènes *CCD7* et *CCD8* est plus élevé chez les mutants SLs et l'application de SLs rétablit le niveau sauvage. De plus la présence de fortes teneurs en IAA dans les mutants déficients ou de réponse aux SLs a été montrée chez plusieurs espèces (Beveridge et al., 1997.b ; Foo et al., 2005 ; Arite et al., 2007 ; Hayward et al., 2009). Chez *Arabidopsis*, des quantifications des X-CK ont aussi été réalisées y compris dans des expériences de greffes qui reproduisent les résultats obtenus sur le pois. Il semble que ce rétro-contrôle permettant une bonne

homéostasie du nombre de ramifications portées par la plante soit bien conservé chez les plantes vasculaires. Il serait intéressant de tester chez la mousse si on retrouve cette régulation de la synthèse d'IAA par les SLs. Nos résultats sur le pois montrent le rôle des SLs dans l'inhibition de la teneur en IAA dans la plante et montre que cette régulation passe par le contrôle de l'expression des gènes de biosynthèse de l'IAA par les SLs. Des expériences similaires de suivi de l'expression des gènes de biosynthèse de l'IAA en réponse aux SLs chez d'autres espèces permettraient de comprendre si ce mécanisme est conservé entre espèces. Chez le riz la régulation négative des SLs sur le teneur en IAA dans la plante a été proposé chez le riz pour contrôler le gravitropisme des tiges et l'angle des branches (Sang et al., 2014).

Modèle de la régulation de la biosynthèse d'IAA par les SLs : rôle des gènes *SMXL* et du FT *BRC1* ?

Le gène de pois *PsBRC1* code un FT de la famille des TCP et est spécifiquement exprimé dans le bourgeon axillaire. Contrairement aux autres mutants de la voie SLs, ni le mutant *Psbrc1* de pois (Braun et al., 2012), ni le mutant *fc1* de riz (Minakuchi et al., 2010) ne présentent une surexpression des gènes de biosynthèse des SLs. De plus, la quantification d'IAA dans la tige du mutant de pois *Psbrc1* montre qu'il a un niveau en IAA similaire à celui du sauvage (Annexe n°1; Figure n° III.21; données non publiées). Il semblerait donc que la régulation de la biosynthèse de l'auxine par les SLs ne passe pas par *PsBRC1*.

La voie de signalisation des SLs fait intervenir la dégradation de protéines cibles via le protéasome (Jiang et al., 2013 ; Zhou et al., 2013 ; Stanga et al., 2013). Chez le pois trois homologues des protéines appartenant au clade SMXL6/7/8 auquel appartient le gène D53 de riz ont été identifiés (Travail mené par Julie Saffar (stage M1)). Nous avons montré que les SLs régulent la synthèse d'IAA via *RMS3* et *RMS4*. On peut se demander si cette régulation s'effectue aussi via la dégradation d'une de ces cibles (Figure n°III.26).

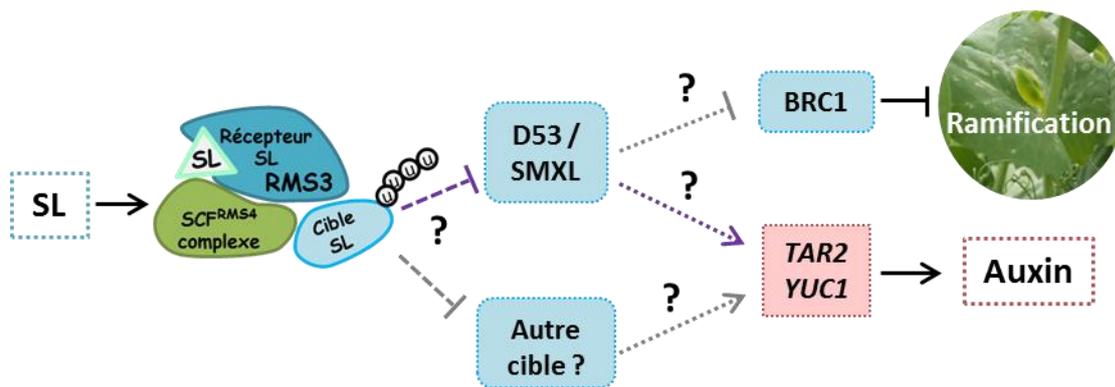


Figure n°III.26 Modèle de la régulation de la biosynthèse de l'IAA par les strigolactones : Quel est l'implication des protéines SMXL (D53) et du facteur de transcription BRC1 dans la régulation de la biosynthèse de l'IAA par les SLs. Les résultats présentés suggèrent que le contrôle des SLs sur la biosynthèse d'IAA est indépendant de BRC1 et nécessiterait l'implication de la protéine DOR3 (SMXL6). Le signal SLs suivrait la voie indiquée en violet sur le schéma.

Le mutant de pois *dor3* a été isolé au laboratoire lors d'un crible de mutants suppresseurs du phénotype hyper-ramifié des mutants *rms3* et *rms4*. Le double mutant *dor3 rms3* présente un phénotype de ramification très proche de celui du sauvage. Par séquençage de 2 mutants alléliques *dor3*, nous avons démontré que DOR3 correspond à un des homologues du clade D53 que nous avons appelé PsSMXL6 (stage M1 Julie Saffar, stage M2 Yoann Kerbrat ; données non publiées). Des expériences préliminaires de dosages d'IAA dans la tige montrent que contrairement au mutant *rms3* qui a des teneurs en IAA supérieur au sauvage, la teneur en IAA du double mutant *dor3 rms3* est identique à celle du sauvage. Par conséquent la mutation *dor3* restaure (partiellement) la ramification de *rms3* mais aussi la teneur en IAA. Ces résultats suggèrent l'implication de la protéine DOR3 (SMXL6) dans le contrôle de la biosynthèse d'auxine via la signalisation SLs.

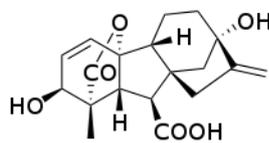
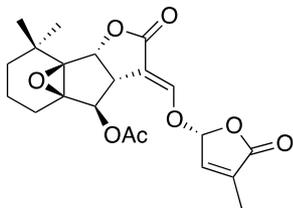
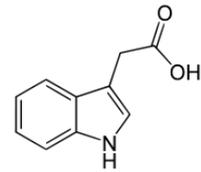
Ces résultats préliminaires demandent à être répétés et complétés par une meilleure caractérisation du double mutant *rms3 dor3* et du simple mutant *dor3* pour confirmer l'implication de DOR3 dans la régulation des niveaux en IAA par les SLs. Il sera important d'analyser par exemple le niveau de transcrits de *RMS1* et de quantifier les X-CK chez ces plantes.

L'effet des SLs sur la synthèse d'IAA passe-t-il par la régulation du PAT ?

Chez *Arabidopsis*, les mutants déficients en SLs (*max3*, *max4*) ou ne répondant pas aux SLs (*max2*) présentent un transport polarisé de l'auxine (PAT) augmenté par rapport au sauvage et une accumulation de protéines PIN1 dans la tige (Bennett et al., 2006). Il a été montré de plus que les SLs répriment très rapidement (10 mn), via *MAX2*, l'accumulation des protéines PIN à la membrane plasmique (Shinohara et al., 2013). Un modèle a été proposé dans lequel les SLs régulent la ramification en réprimant le PAT dans la tige. Chez le WT, le faible PAT dans la tige principale « empêcherait » l'exportation d'auxine supplémentaire des bourgeons axillaires et réprimerait ainsi leur démarrage (Bennett et al 2006 ; Crawford 2010 ; Waldie et al 2014). Les interactions entre PAT et synthèse d'auxine sont complexes. Le PAT est contrôlé par de multiples facteurs endogènes et environnementaux (Habets and Offringa, 2014). L'auxine stimule son propre transport en régulant l'expression des gènes PIN (Vietsen et al 2005 ; Habets and Offringa, 2014) et en inhibant l'endocytose des protéines PIN (Paciorek et al 2005). Réciproquement, un traitement avec un inhibiteur du PAT, l'acide naphthylphthalamique (NPA), induit un rétrocontrôle réprimant la synthèse d'IAA permettant un contrôle très précis de l'homéostasie de l'auxine (Ljung et al 2001). Nous avons montré que les SLs réprimaient les niveaux d'IAA dans la tige en réprimant l'expression des gènes de biosynthèse d'auxine (*TAR2*, *YUC1*). Afin de tester si cette régulation se fait via la répression du PAT par les SLs, des expériences sont en cours au laboratoire en combinant des traitements NPA et SLs. L'objectif est de tester si un traitement SL dans des plantes (*rms1*) traitées au NPA induit toujours une réduction des niveaux d'IAA. On peut rappeler cependant que chez le pois, les mutants *rms1*, *rms4*... ne semblent pas affectés dans le PAT.

CHAPITRE n° 4

Conclusion et Perspectives



Chapitre n° 4 : Conclusion et Perspectives

I. L'utilisation de plusieurs espèces modèles, une étape essentielle dans l'étude de la voie strigolactones.

La biologie en tant que science expérimentale a vu émerger, au fil des découvertes, des modèles biologiques. Les premiers biologistes à s'intéresser aux plantes ont utilisé des modèles agronomiques tels que le riz, le pois chez lesquels de nombreux mutants ont été identifiés. Depuis une vingtaine d'années, le modèle *Arabidopsis thaliana* a permis des progrès considérables dans la compréhension de nombreux mécanismes chez les plantes. Aujourd'hui avec l'évolution des techniques de séquençage, l'avènement de la génétique inverse, les progrès en microscopie et l'arrivée des techniques dites -omics (transcriptomique, protéomique, métabolomique) on aurait pu voir émerger l'utilisation d'un modèle unique *Arabidopsis*. Si l'utilisation et l'intégration de ces techniques a en effet d'abord concerné *Arabidopsis*, d'autres espèces émergent justement ces dernières années. En effet bien que de nombreux mécanismes soient conservés entre espèces, il est aussi nécessaire de maintenir l'utilisation de modèles variés de manière à prendre en compte leurs divergences et optimiser les avantages de chaque modèle.

Le mutant *rms2* n'a été sélectionné pour son hyper-ramification que chez le pois. Nous avons montré que le gène *RMS2* de pois, jusqu'alors non identifié, code pour un récepteur de l'auxine homologue de *AtAFB4* et *AtAFB5* (Ligerot et al., en préparation). Un rétro-contrôle de la voie de signalisation des SLs avait été proposé chez plusieurs espèces, mais à part chez le pois, où le signal *RMS2*-dépendant régulant la biosynthèse de SLs et le niveau de X-CKs a été identifié, aucun acteur de ce signal n'avait été identifié chez d'autres espèces. Le génome du pois n'étant pas encore séquencé, l'identification du gène affecté chez un mutant dont le phénotype a été décrit prend du temps mais peut se révéler très utile.

Chez *Arabidopsis*, les mutants *afb4* et *afb5* n'ont été identifiés et étudiés qu'en tant que mutants dans des récepteurs de l'auxine. Ainsi, l'implication des gènes *AFB4* et *AFB5* dans un signal de rétro-contrôle pour le contrôle de la ramification n'avait pas été envisagée.

D'ailleurs le phénotype d'hyper-ramification de ces mutants, qui est plus faible que chez les mutants de biosynthèse et de réponse aux SLs (*max4/3* et *max2*), n'avait pas été caractérisé. C'est finalement l'utilisation conjointe de ces deux modèles qui a conduit à l'identification du signal *RMS2*-dépendant comme étant l'auxine.

II. Le contrôle de la croissance des plantes est sous l'influence de multiples facteurs dont les strigolactones.

Les SLs régulent de nombreux processus développementaux (Lopez-Obando et al., *accepted*). Les SLs semblent produites en majorité dans les parties racinaires, et bien que ces molécules soient mobiles (transmissibles par greffe), il est vraisemblable que les mécanismes régulés par les SLs au niveau des parties aériennes incombent à une synthèse locale de SLs au niveau des tiges. En effet, bien que les teneurs en SLs n'aient jamais été quantifiées dans les parties aériennes, l'observation de l'expression des gènes de biosynthèse des SLs, *CCD7* et *CCD8* dans la tige (épicotyle, et entre-nœuds) et la conservation du phénotype non ramifié d'une tige sauvage greffée sur un mutant de biosynthèse (*rms1* ou *rms5*) vont dans le sens de l'existence d'une synthèse locale dans la tige.

On peut alors se demander quel est le rôle du transport des SLs des racines vers la tige ?

Il a été montré que la disponibilité en nutriments présents dans le sol était un facteur important de régulation de la biosynthèse des SLs (Yoneyama et al., 2012).

Les SLs au niveau des racines permettent la mise en place de deux types de relations symbiotiques, avec des champignons lors de l'établissement de la mycorhization (AM) établie par 80% des plantes terrestres, et avec des bactéries dans le processus de nodulation uniquement chez les légumineuses. Ainsi dans des situations de carences en nutriments, les plantes utilisent des stratégies de « partenariats » avec d'autres organismes pour optimiser l'accès aux ressources.

En plus d'agir comme des molécules de signalisation de la présence d'une plante hôte, les SLs permettent de réguler la croissance des racines pour optimiser l'acquisition de nutriments. L'implication des SLs dans les processus de croissance des parties aériennes, suggère que les SLs ont un rôle d'harmonisation du développement global de la plante

(racine et tige) en fonction des conditions environnementales. Ainsi les SLs permettent une communication entre les racines et les tiges, elles sont en quelque sorte des « senseurs » de l'état des ressources présentes dans la rhizosphère.

Un des enjeux agronomiques majeur pour les prochaines années est la lutte contre les plantes parasites. La germination des plantes parasites *Striga* ou *Orobanches* se fait à cause de la production et de l'exsudation de SLs par la plante hôte. Ainsi l'obtention de plantes d'intérêt agronomique qui ne produisent plus de SLs ou n'exsudent pas de SLs par les racines serait une piste dans la lutte contre ces plantes parasites. Cependant l'absence de production de SLs par la plante peut être un inconvénient pour les caractères agronomiques (comme le rendement) car les SLs jouent aussi un rôle dans le contrôle de l'architecture aérienne de la plante. Une autre stratégie envisagée est la « stratégie suicide », l'utilisation de SLs synthétiques ayant l'habilité de faire germer les graines de plantes parasites pourraient être pulvérisées aux champs dans l'optique de faire germer les plantes parasites qui sans hôtes ne survivraient pas. Cependant cette stratégie semble difficile à mettre en œuvre, les plantes parasites produisent un grand nombre de graines, les faire toutes germer semble donc compliqué. Une autre stratégie envisagée pourrait être l'utilisation de plantes produisant des SLs par les racines mais qui ne sont pas des hôtes des plantes parasites, ce qui reviendrait à une « stratégie suicide » en utilisant les SLs naturelles produites par les plantes, cette solution nécessiterait l'utilisation de plusieurs type de cultures sur un même champ.

III. Auxine et strigolactones, une boucle de contrôle à l'échelle locale ?

L'étude des mécanismes de rétro-contrôle et des boucles de régulation entre hormones est complexe. En effet les liens entre les hormones sont multiples et une hormone A peut réguler une hormone B en jouant sur différents processus : le métabolisme (biosynthèse, dégradation, mise en réserve), le transport, la perception ou sur la transduction du signal B. Chez les plantes, on dénombre neuf hormones connues qui interagissent ensemble pour réguler la croissance de la plante en fonction des facteurs environnementaux du milieu de vie de la plante.

Nous montrons dans cette thèse un nouveau lien dans la relation entre l'auxine et les SLs : les SLs régulent la teneur en auxine dans les tiges de pois via la régulation de l'expression des gènes de biosynthèse de l'auxine (Ligerot et al., en préparation).

Cependant de nombreuses questions sont encore ouvertes, par exemple : le même contrôle des SLs sur la biosynthèse d'auxine existe-t-il dans les racines de pois ? Ce mécanisme est-il conservé entre espèces ?

Chez *Arabidopsis* les SLs semblent jouer sur le transport de l'auxine via l'endocytose des transporteurs PINs alors que chez le pois le transport de l'auxine ne semble pas affecté par les SLs. Il semble donc important de tester si on retrouve la régulation des gènes de biosynthèse de l'auxine chez *Arabidopsis* et chez d'autres espèces pour comprendre si ce processus est commun au règne végétal (au moins aux angiospermes) ou s'il constitue une spécificité de l'espèce pois, des légumineuses ou des dicotylédones.

L'auxine et les SLs sont des molécules anciennes, elles sont toutes deux présentes chez la mousse *Physcomitrella patens*. L'étude de l'impact des SLs sur la biosynthèse de l'auxine chez cette espèce pourrait nous donner des indices sur l'apparition de cette boucle de régulation hormonale d'un point de vue évolutif.

IV. Les strigolactones, acteurs de la division cellulaire – Une molécule candidate dans l'élaboration de stratégies « anti-cancer »?

Les études menées lors de cette thèse et présentées au Chapitre n°1. Partie.2 (De Saint Germain et al., 2013) montrent que les mutants *rms* de pois sont nains, car ils ont un nombre réduit de cellules comparé au sauvage. Ceci suggère une régulation de la taille des plantes par les SLs via le contrôle de la division cellulaire. Cependant, les mécanismes moléculaires mis en jeu dans ce processus sont encore indéterminés, même si de nombreux gènes sont connus pour intervenir dans la division cellulaire (les cyclines, CDKs, CDSs). Les études de transcriptomiques réalisées sur le pois en réponse aux SLs pourraient nous aider à détecter d'éventuelles cibles des SLs, dont des acteurs du contrôle du cycle cellulaire, comme le facteur de transcription PsBRC1.

Les mécanismes de la division cellulaire sont des mécanismes anciens et très conservés aussi bien dans le règne végétal que dans le règne animal, bactérien ou chez les

levures. Le cycle cellulaire est très étudié en biologie, d'une part pour en décortiquer les mécanismes, et d'autre part dans l'optique de développer d'éventuels traitements contre des maladies telles que le cancer. En effet le cancer est un nom générique pour désigner des maladies qui impliquent une prolifération anormale des cellules, et l'utilisation de traitements pharmacologiques « anti-cancer » à base de molécules (drogues dans le jargon médical) capables d'en inhiber le fonctionnement est une des stratégies envisageables pour pallier les divisions anormales des cellules cancéreuses (Malumbres & Barbacid, 2009).

Des études ont d'ailleurs été effectuées en utilisant des SLs sur des lignées de cellules cancéreuses (cancer du sein) montrant un rôle inhibiteur du GR24 sur les divisions cellulaires via l'arrêt de la transition G2/M et l'induction de l'apoptose (mécanisme de mort programmée des cellules) (Pollock et al., 2012). L'utilisation d'analogues de SLs, testés sur différentes lignées cellulaires (colon, prostate, fibroblastes) confirme ce rôle, et suggère l'implication de MAPKs (Mitogen-activated protein kinases) dans ce processus (Pollock et al., 2014).

Le développement de nouveaux analogues des SLs pourrait contribuer à long terme à l'émergence d'une thérapie « anti-cancer » utilisant des molécules actives de SLs.

Liste des Publications & Communications

Article publié :

Strigolactones stimulate internode elongation independently of gibberellins

Alexandre de Saint Germain¹, Yasmine Ligerot¹, Elizabeth A. Dun, Jean-Paul Pillot, John J. Ross, Christine A. Beveridge and Catherine Rameau. *Plant Physiology* 163 (2): 1012–25. doi:10.1104/pp.113.220541.

¹ These authors contributed equally to the article.

Article en préparation :

The pea branching *RMS2* gene encodes the PsAFB4/5 auxin receptor

Y. Ligerot, T. Waldie, A. de Saint Germain, S. Citerne, N. Kadakia, R. Novaretti, C. Troadec, F. Debellé, A. Bendahmane, O. Leyser, M. Estelle, C. Rameau

(Article en préparation pour soumission prévue en novembre 2015 dans *Plant Biology*)

Strigolactone biosynthesis and signaling in plant development

Mauricio Lopez-Obando, Yasmine Ligerot, Sandrine Bonhomme, François-Didier Boyer, and Catherine Rameau

(Article de revue Accepté en septembre 2015, *Development at a glance*)

Communication orale:

Complex interactions between auxin and strigolactones in controlling shoot branching

Y. Ligerot, A. De Saint Germain, C. Troadec, T. Waldie, F. Debellé, A. Bendahmane, O. Leyser & C. Rameau

Travaux de thèse présentés lors :

- du **1er congrès international sur les Strigolactones** (Wageningen -- Mars 2015)

- de l'**EPSR 2015** (Paris – Juillet 2015) journées de rencontre entre doctorants européens travaillant dans le domaine de la biologie végétale, organisées cette année par l'association Doc en Herbe (doctorant ED145) – Membre du staff des organisateurs du congrès

Strigolactones/Auxin crosstalk, role of the pea *RMS2* gene?

Y. Ligerot, A. De Saint Germain, C. Troadec, T. Waldie, F. Debellé, A. Bendahmane, O. Leyser & C. Rameau

Travaux de thèse présentés lors des **PhD Days** (Orsay – novembre 2014) journées de l'école doctorale ED145. - Membre du staff des organisateurs des PhD-Days

Toward a better understanding of strigolactone function in interactions with other plant hormones for controlling plant architecture

Présentation réalisée à l'Université d'Utsunomiya pour présenter mon sujet de thèse à mon équipe d'accueil, Yoneyama Lab. (juin 2013)

Poster:

The pea *RMS2* branching gene, controlling a shoot-to-root feedback signal, encodes an auxin receptor.

Y. Ligerot, A. De Saint Germain, C. Troadec, T. Waldie, F. Debellé, A. Bendahmane, O. Leyser and C. Rameau.

IPGSA conference 2013 (Shanghai)

PhD-Days 2013 (Orsay) & EPSR 2014 (Amsterdam)

Bibliographie

- Abel, S., Oeller, P.W. and Theologis, A. (1994). Early auxin-induced genes encode short-lived nuclear proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 91, 326-330.
- Adamowski, Maciek, and Jiří Friml. 2015. "PIN-Dependent Auxin Transport: Action, Regulation, and Evolution." *The Plant Cell* 27 (1): 20–32. doi:10.1105/tpc.114.134874.
- Aguilar-Martinez, J. a., C. Poza-Carrion, and P. Cubas. 2007. "Arabidopsis BRANCHED1 Acts as an Integrator of Branching Signals within Axillary Buds." *The Plant Cell Online* 19 (2): 458–72. doi:10.1105/tpc.106.048934.
- Agusti, Javier, Silvia Herold, Martina Schwarz, Pablo Sanchez, Karin Ljung, Elizabeth a Dun, Philip B Brewer, et al. 2011. "Strigolactone Signaling Is Required for Auxin-Dependent Stimulation of Secondary Growth in Plants." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (50): 20242–47. doi:10.1073/pnas.1111902108.
- Akiyama, K., Ogasawara, S., Ito, S., and Hayashi, H. (2010). Structural requirements of strigolactones for hyphal branching in AM fungi. *Plant Cell Physiol.* 51, 1104–1117.
- Akiyama, Kohki, Ken-ichi Matsuzaki, and Hideo Hayashi. 2005. "Plant Sesquiterpenes Induce Hyphal Branching in Arbuscular Mycorrhizal Fungi." *Nature* 435 (7043): 824–27. doi:10.1038/nature03608.
- Al-Babili, Salim, and Harro J Bouwmeester. 2015. "Strigolactones, a Novel Carotenoid-Derived Plant Hormone." *Annual Review of Plant Biology* 66 (January): 161–86. doi:10.1146/annurev-arplant-043014-114759.
- Alder, A., Jamil, M., Marzorati, M., Bruno, M., Vermathen, M., Bigler, P., Ghisla, S., Bouwmeester, H., Beyer, P., and Al-Babili, S. (2012). The path from β -carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone. *Science*. 335, 1348–1351.
- Al-Karaki, G., McMichael, B. and Zak, J. (2004) Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress. *Mycorrhiza*, 14, 263-269.
- Arite, Tomotsugu, Hiromu Kameoka, and Junko Kyojuka. 2011b. "Strigolactone Positively Controls Crown Root Elongation in Rice." *Journal of Plant Growth Regulation* 31 (2): 165–72. doi:10.1007/s00344-011-9228-6.
- Arite, Tomotsugu, Hiromu Kameoka, and Junko Kyojuka. 2011a. "Strigolactone Positively Controls Crown Root Elongation in Rice." *Journal of Plant Growth Regulation* 31 (2): 165–72. doi:10.1007/s00344-011-9228-6.
- Arite, Tomotsugu, Hirotaka Iwata, Kenji Ohshima, Masahiko Maekawa, Masatoshi Nakajima, Mikiko Kojima, Hitoshi Sakakibara, and Junko Kyojuka. 2007. "DWARF10, an RMS1/MAX4/DAD1 Ortholog, Controls Lateral Bud Outgrowth in Rice." *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 51 (6): 1019–29. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03210.x.
- Arite, Tomotsugu, Mikiyoshi Umehara, Shinji Ishikawa, Atsushi Hanada, Masahiko Maekawa, Shinjiro Yamaguchi, and Junko Kyojuka. 2009. "D14, a Strigolactone-Insensitive Mutant of Rice, Shows an Accelerated Outgrowth of Tillers." *Plant & Cell Physiology* 50 (8): 1416–24. doi:10.1093/pcp/pcp091.
- Auger, Bathilde, Jean-bernard Pouvreau, Karinne Pouponneau, Kaori Yoneyama, Grégory Montiel, Bruno Le Bizec, Koichi Yoneyama, Philippe Delavault, Régine Delourme, and Philippe Simier. 2012. "Germination Stimulants of *Phelipanche ramosa* in the Rhizosphere of *Brassica napus* Are Derived from the Glucosinolate Pathway" 25 (7): 993–1004.

- Auldridge, Michele E, Donald R McCarty, and Harry J Klee. 2006. "Plant Carotenoid Cleavage Oxygenases and Their Apocarotenoid Products." *Current Opinion in Plant Biology* 9 (3): 315–21. doi:10.1016/j.pbi.2006.03.005.
- Bainbridge, Katherine, Karim Sorefan, Sally Ward, and Ottoline Leyser. 2005. "Hormonally Controlled Expression of the Arabidopsis MAX4 Shoot Branching Regulatory Gene." *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 44 (4): 569–80. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02548.x.
- Balla, Jozef, Petr Kalousek, Vilém Reinöhl, Jiří Friml, and Stanislav Procházka. 2011. "Competitive Canalization of PIN-Dependent Auxin Flow from Axillary Buds Controls Pea Bud Outgrowth." *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 65 (4): 571–77. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04443.x.
- Barbier, François F, John E Lunn, and Christine a Beveridge. 2015. "Ready, Steady, Go! A Sugar Hit Starts the Race to Shoot Branching." *Current Opinion in Plant Biology* 25 (June): 39–45. doi:10.1016/j.pbi.2015.04.004.
- Bebawi F.F., R.E. Eplee, C.E. Harris, et al., Longevity of witchweed (*Striga asiatica*) seed, *Weed Res.* 32 (1984) 494–497.
- Bennett, S.R., Alvarez, J., Bossinger, G., and Smyth, D.R. (1995). Morphogenesis in pinoid mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 8: 505–520.
- Bennett, Tom, and Ottoline Leyser. 2014. "Strigolactone Signalling: Standing on the Shoulders of DWARFs." *Current Opinion in Plant Biology* 22 (December). Elsevier Ltd: 7–13. doi:10.1016/j.pbi.2014.08.001.
- Bennett, Tom, Samuel F Brockington, Carl Rothfels, Sean W Graham, Dennis Stevenson, Toni Kutchan, Megan Rolf, et al. 2014. "Paralogous Radiations of PIN Proteins with Multiple Origins of Noncanonical PIN Structure." *Molecular Biology and Evolution* 31 (8): 2042–60. doi:10.1093/molbev/msu147.
- Bennett, Tom, Tobias Sieberer, Barbara Willett, Jon Booker, Christian Luschnig, and Ottoline Leyser. 2006. "The Arabidopsis MAX Pathway Controls Shoot Branching by Regulating Auxin Transport." *Current Biology : CB* 16 (6): 553–63. doi:10.1016/j.cub.2006.01.058.
- Besserer A, Puech-Pagès V, Kiefer P, Gomez-Roldan V, Jauneau A, Roy S, Portais J-C, Roux C, Bécard G, Séjalon-Delmas N. 2006. Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS biology* 4: e226.
- Besserer, A., Puech-Pages, V., Kiefer, P., Gomez-Roldan, V., Jauneau, A., Roy, S., Portais, J.C., Roux, C., Becard, G. and Sejalon-Delmas, N. (2006) Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biol*, 4, e226.
- Beveridge Christine A, John J Ross, and C Murfet. 1995. "Branching in Pea ' , " no. 1 1996: 859–65.
- Beveridge et Al 1997 _ The Shoot Controls Zeatin Riboside Export from Pea Roots. Evidence from the Branching Mutant rms4.pdf."
- Beveridge, CA, GM Symons, and CGN Turnbull. 2000. "Auxin Inhibition of Decapitation-Induced Branching Is Dependent on Graft-Transmissible Signals Regulated by Genes Rms1 and Rms2." *Plant Physiology* 123 (June): 689–97. <http://www.plantphysiol.org/content/123/2/689.short>.
- Beveridge, Christine a, Elizabeth a Dun, and Catherine Rameau. 2009. "Pea Has Its Tendrils in Branching Discoveries Spanning a Century from Auxin to Strigolactones." *Plant Physiology* 151 (3): 985–90. doi:10.1104/pp.109.143909.

- Beveridge, Christine A, Gregory M Symons, Ian C Murfet, John J Ross, and Catherine Rameau. 2009. "The Rms1 Mutant of Pea Has Elevated Indole-3-Acetic Acid Levels and Reduced Root-Sap Zeatin Riboside Content but Increased Branching Controlled by Graft-Transmissible Signal (S)" 115 (3): 1251–58.
- Beveridge, Christine A, John J Ross, and C Murfet. 1994. "Branching Mutant Rms-2 in *Pisum Sativum* '," 953–59.
- Beveridge, Christine Anne, and Junko Kyoizuka. 2010. "New Genes in the Strigolactone-Related Shoot Branching Pathway." *Current Opinion in Plant Biology* 13 (1). Elsevier Ltd: 34–39. doi:10.1016/j.pbi.2009.10.003.
- Bilsborough, Gemma D, Adam Runions, Michalis Barkoulas, Huw W Jenkins, Alice Hasson, and Carla Galinha. 2011. "Model for the Regulation of Arabidopsis Thaliana Leaf Margin Development" 108 (8). doi:10.1073/pnas.1015162108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1015162108.
- 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.
- Booker, Jonathan, Michele Auldridge, Sarah Wills, Donald McCarty, Harry Klee, and Ottoline Leyser. 2004. "MAX3/CCD7 Is a Carotenoid Cleavage Dioxygenase Required for the Synthesis of a Novel Plant Signaling Molecule." *Current Biology : CB* 14 (14): 1232–38. doi:10.1016/j.cub.2004.06.061.
- Booker, Jonathan, Tobias Sieberer, Wendy Wright, Lisa Williamson, Barbara Willett, Petra Stirnberg, Colin Turnbull, Murali Srinivasan, Peter Goddard, and Ottoline Leyser. 2005. "MAX1 Encodes a Cytochrome P450 Family Member That Acts Downstream of MAX3/4 to Produce a Carotenoid-Derived Branch-Inhibiting Hormone." *Developmental Cell* 8 (3): 443–49. doi:10.1016/j.devcel.2005.01.009.
- Bouwmeester, Harro J, Radoslava Matusova, Sun Zhongkui, and Michael H Beale. 2003. "Secondary Metabolite Signalling in Host–parasitic Plant Interactions." *Current Opinion in Plant Biology* 6 (4): 358–64. doi:10.1016/S1369-5266(03)00065-7.
- Bouwmeester, Harro J., Christophe Roux, Juan Antonio Lopez-Raez, and Guillaume Bécard. 2007. "Rhizosphere Communication of Plants, Parasitic Plants and AM Fungi." *Trends in Plant Science* 12 (5): 224–30. doi:10.1016/j.tplants.2007.03.009.
- Boyer, François-Didier, Alexandre de Saint Germain, Jean-Bernard Pouvreau, Guillaume Clavé, Jean-Paul Pillot, Amélie Roux, Amanda Rasmussen, et al. 2014. "New Strigolactone Analogs as Plant Hormones with Low Activities in the Rhizosphere." *Molecular Plant* 7 (4): 675–90. doi:10.1093/mp/sst163.
- Braun, Nils, Alexandre de Saint Germain, Jean-Paul Pillot, Stéphanie Boutet-Mercey, Marion Dalmais, Ioanna Antoniadou, Xin Li, et al. 2012. "The Pea TCP Transcription Factor PsBRC1 Acts Downstream of Strigolactones to Control Shoot Branching." *Plant Physiology* 158 (1): 225–38. doi:10.1104/pp.111.182725.
- Breullin F, Schramm J, Hajirezaei M, Ahkami A, Favre P, Druège U, et al. Phosphate systemically inhibits development of arbuscular mycorrhiza in *Petunia hybrid* and represses genes involved in mycorrhizal functioning. *Plant J* 2010; 64:1002-17; PMID:21143680;
- Brewer, Philip B, Hinanit Koltai, and Christine a Beveridge. 2013. "Diverse Roles of Strigolactones in Plant Development." *Molecular Plant* 6 (1): 18–28. doi:10.1093/mp/sss130.
- Brewer, Philip, B., Elizabeth, Ann Dun, Renyi Gui, Michael Mason, and Christine, a. Beveridge. 2015. "Strigolactone Inhibition of Branching Independent of Polar Auxin Transport." *Plant Physiology* 168 (August): pp.00014.2015. doi:10.1104/pp.15.00014.
- Brian PW (1959) Effects of gibberellins on plant growth and development. *Biol Rev Camb Philos Soc* 34(1):37–84.

- Bu, Qingyun, Tianxiao Lv, Hui Shen, Phi Luong, Jimmy Wang, Zhenyu Wang, Zhigang Huang, et al. 2014. "Regulation of Drought Tolerance by the F-Box Protein MAX2 in Arabidopsis." *Plant Physiology* 164 (1): 424–39. doi:10.1104/pp.113.226837.
- Busch, Bernhard L, Gregor Schmitz, Susanne Rossmann, Florence Piron, Jia Ding, Abdelhafid Bendahmane, and Klaus Theres. 2011. "Shoot Branching and Leaf Dissection in Tomato Are Regulated by Homologous Gene Modules." *The Plant Cell* 23 (10): 3595–3609. doi:10.1105/tpc.111.087981.
- Calderón Villalobos, Luz Irina a, Sarah Lee, Cesar De Oliveira, Anthony Ivetac, Wolfgang Brandt, Lynne Armitage, Laura B Sheard, et al. 2012. "A Combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA Co-Receptor System for Differential Sensing of Auxin." *Nature Chemical Biology* 8 (5): 477–85. doi:10.1038/nchembio.926.
- Chapman, Elisabeth J, Kathleen Greenham, Cristina Castillejo, Ryan Sartor, Agnieszka Bialy, Tai-Ping Sun, and Mark Estelle. 2012. "Hypocotyl Transcriptome Reveals Auxin Regulation of Growth-Promoting Genes through GA-Dependent and -Independent Pathways." *PLoS One* 7 (5): e36210. doi:10.1371/journal.pone.0036210.
- Cline M (1991) Apical dominance. *Bot Rev* 57: 318–358
- Conti, Lucio, Nelis, Stuart, Zhang, Cunjin, Woodcock, Ailidh, Swarup, Ranjan, Galbiati, Massimo, Tonelli, Chiara, Napier, Richard M. , Hedden, Peter, Bennett, Malcolm and Sadanandom, Ari. (2014) Small ubiquitin-like modifier protein SUMO enables plants to control growth independently of the phytohormone gibberellin. *Developmental Cell*, Volume 28 (Number 1). pp. 102-110. ISSN 1534-5807
- Cook c.e., Whichard l.p., Turner b., Wall m.e. & Egley g.h. (1966) Germination of witchweed {*Striga lutea*): isolation and properties of a potent stimulant. *Science*, 154, 1189-1190.
- Coudert, Yoan, Wojtek Palubicki, Karin Ljung, Ondrej Novak, Ottoline Leyser, and C Jill Harrison. 2015. "Three Ancient Hormonal Cues Co-Ordinate Shoot Branching in a Moss." *eLife* 4 (January): 1–26. doi:10.7554/eLife.06808.
- Crawford, Scott, Naoki Shinohara, Tobias Sieberer, Lisa Williamson, Gilu George, Jo Hepworth, Dörte Müller, Malgorzata a Domagalska, and Ottoline Leyser. 2010. "Strigolactones Enhance Competition between Shoot Branches by Dampening Auxin Transport." *Development (Cambridge, England)* 137 (17): 2905–13. doi:10.1242/dev.051987.
- Dai, C., and Xue, H.W. (2010). Rice early flowering1, a CKI, phosphorylates DELLA protein SLR1 to negatively regulate gibberellin signalling. *EMBO J.* 29, 1916–1927.
- Dai, Cheng, and Hong-Wei Xue. 2010. "Rice Early flowering1, a CKI, Phosphorylates DELLA Protein SLR1 to Negatively Regulate Gibberellin Signalling." *The EMBO Journal* 29 (11). Nature Publishing Group: 1916–27. doi:10.1038/emboj.2010.75.
- Davière, Jean-Michel, and Patrick Achard. 2013. "Gibberellin Signaling in Plants." *Development (Cambridge, England)* 140 (6): 1147–51. doi:10.1242/dev.087650.
- Davies PJ (Ed): *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*. Kluwer Academic Publishers; 2004.
- De Saint Germain, Alexandre, Sandrine Bonhomme, François-Didier Boyer, and Catherine Rameau. 2013. "Novel Insights into Strigolactone Distribution and Signalling." *Current Opinion in Plant Biology* 16 (5): 583–89. doi:10.1016/j.pbi.2013.06.007.
- De Saint Germain, Alexandre, Yasmine Ligerot, Elizabeth a Dun, Jean-Paul Pillot, John J Ross, Christine a Beveridge, and Catherine Rameau. 2013. "Strigolactones Stimulate Internode Elongation Independently of Gibberellins." *Plant Physiology* 163 (2): 1012–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23943865>.

- Delaux, Pierre-marc, Xiaonan Xie, Ruth E Timme, Virginie Puech-pages, Christophe Dunand, Nathalie Se, Charles F Delwiche, Koichi Yoneyama, and Guillaume Be. 2012. "Origin of Strigolactones in the Green Lineage" *Nature* 450: 857–71.
- Dharmasiri, Nihal, Sunethra Dharmasiri, and Mark Estelle. 2005. "The F-Box Protein TIR1 Is an Auxin Receptor." *Nature* 435 (7041): 441–45. doi:10.1038/nature03543.
- 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.
- Ding, Zhaojun, Carlos S Galván-Ampudia, Emilie Demarsy, Łukasz Łangowski, Jürgen Kleine-Vehn, Yuanwei Fan, Miyo T Morita, et al. 2011. "Light-Mediated Polarization of the PIN3 Auxin Transporter for the Phototropic Response in Arabidopsis." *Nature Cell Biology* 13 (4): 447–52. doi:10.1038/ncb2208.
- Doebley, John, Adrian Stec, and Charles Gustus. 1995. "Teosinte branched1," no. 81.
- Doyle, Samsa M, Ash Haeger, Thomas Vain, Adeline Rigal, Corrado Viotti, Małgorzata Łangowska, Qian Ma, et al. 2015. "An Early Secretory Pathway Mediated by GNOM-LIKE 1 and GNOM Is Essential for Basal Polarity Establishment in Arabidopsis Thaliana." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (7): E806–15. doi:10.1073/pnas.1424856112.
- Dun, Elizabeth a, Alexandre de Saint Germain, Catherine Rameau, and Christine a Beveridge. 2012. "Antagonistic Action of Strigolactone and Cytokinin in Bud Outgrowth Control." *Plant Physiology* 158 (1): 487–98. doi:10.1104/pp.111.186783.
- Dun, Elizabeth a, Alexandre de Saint Germain, Catherine Rameau, and Christine a Beveridge. 2013. "Dynamics of Strigolactone Function and Shoot Branching Responses in Pisum Sativum." *Molecular Plant* 6 (1): 128–40. doi:10.1093/mp/sss131.
- Dun, Elizabeth a, Jim Hanan, and Christine a Beveridge. 2009. "Computational Modeling and Molecular Physiology Experiments Reveal New Insights into Shoot Branching in Pea." *The Plant Cell* 21 (11): 3459–72. doi:10.1105/tpc.109.069013.
- Dun, Elizabeth a, Philip B Brewer, and Christine a Beveridge. 2009. "Strigolactones: Discovery of the Elusive Shoot Branching Hormone." *Trends in Plant Science* 14 (7): 364–72. doi:10.1016/j.tplants.2009.04.003.
- Dun, Elizabeth Ann, Brett James Ferguson, and Christine Anne Beveridge. 2006. "Apical Dominance and Shoot Branching. Divergent Opinions or Divergent Mechanisms?" *Plant Physiology* 142 (3): 812–19. doi:10.1104/pp.106.086868.
- Ejeta, Gebisa. "Chapter 1 the," 3–16.
- Ferguson, Brett J, and Christine a Beveridge. 2009. "Roles for Auxin, Cytokinin, and Strigolactone in Regulating Shoot Branching." *Plant Physiology* 149 (4): 1929–44. doi:10.1104/pp.109.135475.
- Foo, Eloise, Colin G N Turnbull, and Christine A Beveridge. 2001. "Long-Distance Signaling and the Control of Branching in the rms1 Mutant of Pea 1" *126 (May)*: 203–9.
- Foo, Eloise, Erika Bullier, Magali Goussot, Fabrice Foucher, and Catherine Rameau. 2005. "The Branching Gene RAMOSUS1 Mediates Interactions among Two Novel Signals and Auxin in Pea" *17 (February)*: 464–74. doi:10.1105/tpc.104.026716.the.
- Foo, Eloise, Kaori Yoneyama, Cassandra Hugill, Laura J Quittenden, and James B Reid. 2013b. "Strigolactones: Internal and External Signals in Plant Symbioses?" *Plant Signaling & Behavior* 8 (3): e23168. doi:10.4161/psb.23168.

- Foo, Eloise, Kaori Yoneyama, Cassandra J Hugill, Laura J Quittenden, and James B Reid. 2013a. "Strigolactones and the Regulation of Pea Symbioses in Response to Nitrate and Phosphate Deficiency." *Molecular Plant* 6 (1): 76–87. doi:10.1093/mp/sss115.
- Foo, Eloise, Suzanne E Morris, Kathy Parmenter, Naomi Young, Huiting Wang, Alun Jones, Catherine Rameau, Colin G N Turnbull, and Christine a Beveridge. 2007. "Feedback Regulation of Xylem Cytokinin Content Is Conserved in Pea and Arabidopsis." *Plant Physiology* 143 (3): 1418–28. doi:10.1104/pp.106.093708.
- Friml, J., et al. (2004). A PINOID-dependent binary switch in apicalbasal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science* 306: 862– 865.
- Gagne, J. M., Downes, B. P., Shiu, S. H., Durski, A. M. & Vierstra, R. D. The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in Arabidopsis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 11519–11524 (2004).
- Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A., and Palme, K. (1998). Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue. *Science* 282: 2226–2230.
- Garbers, C., DeLong, A., Deruère, J., Bernasconi, P., and Söll, D. (1996). A mutation in protein phosphatase 2A regulatory subunit A affects auxin transport in Arabidopsis. *EMBO J.* 15: 2115–2124.
- Gomez-Roldan, Victoria, Soraya Fermas, Philip B Brewer, Virginie Puech-Pagès, Elizabeth a Dun, Jean-Paul Pillot, Fabien Letisse, et al. 2008. "Strigolactone Inhibition of Shoot Branching." *Nature* 455 (7210): 189–94. doi:10.1038/nature07271.
- Gomi, K. et al. GID2, an F-box subunit of the SCF E3 complex, specifically interacts with phosphorylated SLR1 protein and regulates the gibberellin-dependent degradation of SLR1 in rice. *Plant J.* 37, 626–634 (2004).
- Greb, T., Clarenz, O., Schafer, E., Muller, D., Herrero, R., Schmitz, G., et al. (2003). Molecular analysis of the LATERAL SUPPRESSOR gene in Arabidopsis reveals a conserved control mechanism for axillary meristem formation. *GeneDev.* 17, 1175–1187. doi:10.1101/gad.260703
- Greb, T., Clarenz, O., Schafer, E., Muller, D., Herrero, R., Schmitz, G., et al. (2003). Molecular analysis of the LATERAL SUPPRESSOR gene in Arabidopsis reveals a conserved control mechanism for axillary meristem formation. *GeneDev.* 17, 1175–1187. doi:10.1101/gad.260703
- Greenham, Katie, Aaron Santner, Cristina Castillejo, Sutton Mooney, Ilkka Sairanen, Karin Ljung, and Mark Estelle. 2011. "The AFB4 Auxin Receptor Is a Negative Regulator of Auxin Signaling in Seedlings." *Current Biology* : CB 21 (6). England: 520–25. doi:10.1016/j.cub.2011.02.029.
- Griffiths J, et al. (2006) Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis. *Plant Cell* 18(12):3399–3414.
- Guan, J. C., K. E. Koch, M. Suzuki, S. Wu, S. Latshaw, T. Petruff, C. Goulet, H. J. Klee, and D. R. McCarty. 2012. "Diverse Roles of Strigolactone Signaling in Maize Architecture and the Uncoupling of a Branching-Specific Subnetwork." *Plant Physiology* 160 (3): 1303–17. doi:10.1104/pp.112.204503.
- Guilfoyle TJ, Hagen G (2007) Auxin response factors. *Curr Opin Plant Biol* 10: 453–460
- Guo, Siyi, Yunyuan Xu, Huanhuan Liu, Zhiwei Mao, Cui Zhang, Yan Ma, Qirui Zhang, Zheng Meng, and Kang Chong. 2013. "The Interaction between OsMADS57 and OsTB1 Modulates Rice Tillering via DWARF14." *Nature Communications* 4 (January). Nature Publishing Group: 1566. doi:10.1038/ncomms2542.
- Ha, Chien Van, Marco Antonio Leyva-González, Yuriko Osakabe, Uyen Thi Tran, Rie Nishiyama, Yasuko Watanabe, Maho Tanaka, et al. 2014. "Positive Regulatory Role of Strigolactone in Plant Responses to

- Drought and Salt Stress." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (2): 851–56. doi:10.1073/pnas.1322135111.
- Habets, Myckel E J, and Remko Offringa. 2014. "Tansley Review PIN-Driven Polar Auxin Transport in Plant Developmental Plasticity : A Key Target for Environmental and Endogenous Signals."
- Hamiaux, Cyril, Revel S M Drummond, Bart J Janssen, Susan E Ledger, Janine M Cooney, Richard D Newcomb, and Kimberley C Snowden. 2012. "DAD2 Is an A/β Hydrolase Likely to Be Involved in the Perception of the Plant Branching Hormone, Strigolactone." *Current Biology : CB* 22 (21). Elsevier Ltd: 2032–36. doi:10.1016/j.cub.2012.08.007.
- Hansen, B. G. and Halkier, B. A. (2005). New insight into the biosynthesis and regulation of indole compounds in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 221, 603-606.
- Harberd, Nicholas P, Eric Belfield, and Yuki Yasumura. 2009. "The Angiosperm Gibberellin-GID1-DELLA Growth Regulatory Mechanism: How an 'Inhibitor of an Inhibitor' Enables Flexible Response to Fluctuating Environments." *The Plant Cell* 21 (5): 1328–39. doi:10.1105/tpc.109.066969.
- Hayward, Alice, Petra Stirnberg, Christine Beveridge, and Ottoline Leyser. 2009. "Interactions between Auxin and Strigolactone in Shoot Branching Control." *Plant Physiology* 151 (1): 400–412. doi:10.1104/pp.109.137646.
- He, Wenrong, Javier Brumos, Hongjiang Li, Yusi Ji, Meng Ke, Xinqi Gong, Qinglong Zeng, et al. 2011. "A Small-Molecule Screen Identifies L-Kynurenine as a Competitive Inhibitor of TAA1/TAR Activity in Ethylene-Directed Auxin Biosynthesis and Root Growth in *Arabidopsis*." *The Plant Cell* 23 (11): 3944–60. doi:10.1105/tpc.111.089029.
- Heisler, Marcus G, Olivier Hamant, Pawel Krupinski, Magalie Uyttewaal, Carolyn Ohno, Henrik Jönsson, Jan Traas, and Elliot M Meyerowitz. 2010. "Alignment between PIN1 Polarity and Microtubule Orientation in the Shoot Apical Meristem Reveals a Tight Coupling between Morphogenesis and Auxin Transport." *PLoS Biology* 8 (10): e1000516. doi:10.1371/journal.pbio.1000516.
- Hirsch, Sibylle, and Giles E.D. Oldroyd. 2014. "GRAS-Domain Transcription Factors That Regulate Plant Development." *Plant Signaling & Behavior* 4 (8): 698–700. doi:10.4161/psb.4.8.9176.
- Hoffmann, Beate, Hélène Proust, Katia Belcram, C ecile Labrune, François-Didier Boyer, Catherine Rameau, and Sandrine Bonhomme. 2014. "Strigolactones Inhibit Caulonema Elongation and Cell Division in the Moss *Physcomitrella Patens*." Edited by Michael M. Meijler. *PLoS ONE* 9 (6): e99206. doi:10.1371/journal.pone.0099206.
- Hou, Xingliang, Li Yen Candy Lee, Kuaifei Xia, Yuanyuan Yan, and Hao Yu. 2010. "DELLAs Modulate Jasmonate Signaling via Competitive Binding to JAZs." *Developmental Cell* 19 (6). Elsevier Inc.: 884–94. doi:10.1016/j.devcel.2010.10.024.
- Humphrey, Andrew J, Aimee M Galster, and Michael H Beale. 2006. "Strigolactones in Chemical Ecology: Waste Products or Vital Allelochemicals?" *Natural Product Reports* 23 (4): 592–614. doi:10.1039/b512776a.
- Ingram TJ, Reid D, MacMillan J (1986) The quantitative relationship between gibberellin A1 and internode growth in *Pisum sativum* L. *Planta* 168: 414–420
- Inhibition, The Correlative, and Axillary Buds. 1925. "The Correlative Inhibition of the Growth of Axillary Buds. •" XXXIX (Clvi).

- Jiang, Liang, Xue Liu, Guosheng Xiong, Huihui Liu, Fulu Chen, Lei Wang, Xiangbing Meng, et al. 2013. "DWARF 53 Acts as a Repressor of Strigolactone Signalling in Rice." *Nature* 504 (7480): 401–5. doi:10.1038/nature12870.
- Johnson, Xenie, Tanya Brcich, Elizabeth a Dun, Magali Goussot, Karine Haurogné, Christine a Beveridge, and Catherine Rameau. 2006. "Branching Genes Are Conserved across Species. Genes Controlling a Novel Signal in Pea Are Coregulated by Other Long-Distance Signals." *Plant Physiology* 142 (3): 1014–26. doi:10.1104/pp.106.087676.
- Kai, K., Horita, J., Wakasa, K. and Miyagawa, H. (2007). Three oxidative metabolites of indole-3-acetic acid from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 68, 1651-1663.
- Kapulnik, Yoram, Pierre-Marc Delaux, Natalie Resnick, Einav Mayzlish-Gati, Smadar Wininger, Chaitali Bhattacharya, Nathalie Séjalon-Delmas, et al. 2011. "Strigolactones Affect Lateral Root Formation and Root-Hair Elongation in Arabidopsis." *Planta* 233 (1): 209–16. doi:10.1007/s00425-010-1310-y.
- Katsumi, M., Foard, D. E. & Phinney, B. O. Evidence for the translocation of gibberellin A3 and gibberellin-like substances in grafts between normal, dwarf1 and dwarf5 seedlings of *Zea mays* L. *Plant Cell Physiol.* 24, 379–388 (1983).
- Katsumi. 1983. "Evidence for the Translocation of Gibberellin A3 and Gibberellin- Like Substances in Grafts between Normal , Dwarf1 and" 24 (3): 379–88.
- Keller, T., Abbott, J., Moritz, T., and Doerner, P. (2006). Arabidopsis REGULATOR OF AXILLARY MERISTEMS1 controls a leaf axil stem cell niche and modulates Vegetative development. *Plant Cell* 18, 598–611. doi:10.1105/tpc.105.038588
- Keller, T., Abbott, J., Moritz, T., and Doerner, P. (2006). Arabidopsis REGULATOR OF AXILLARY MERISTEMS1 controls a leaf axil stem cell niche and modulates Vegetative development. *Plant Cell* 18, 598–611. doi:10.1105/tpc.105.038588
- Kelley, D. R., and M. Estelle. 2012. "Ubiquitin-Mediated Control of Plant Hormone Signaling." *Plant Physiology* 160 (1): 47–55. doi:10.1104/pp.112.200527.
- Kepinski, Stefan, and Ottoline Leyser. 2005. "The Arabidopsis F-Box Protein TIR1 Is an Auxin Receptor." *Nature* 435 (7041): 446–51. doi:10.1038/nature03542.
- Kerr ID, Bennett MJ (2007) New insight into the biochemical mechanisms regulating auxin transport in plants. *Biochem J* 401 613–622
- Kleine-Vehn, J., Leitner, J., Zwiewka, M., Sauer, M., Abas, L., Luschign, C., and Friml, J. (2008b). Differential degradation of PIN2 auxin efflux carrier by retromer-dependent vacuolar targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 17812–17817.
- Kobe, B. and Kajava, A.V. 2001. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11 725–732.
- Kögl F, Erxleben H, Haagen-Smit AJ 1934. Über die Isolierung der Auxine a und b aus pflanzlichen Materialien. IX. Mitteilung. *Physiol Chem* 243: 209–226
- Kohlen, W., T. Charnikhova, Q. Liu, R. Bours, M. a. Domagalska, S. Beguerie, F. Verstappen, O. Leyser, H. Bouwmeester, and C. Ruyter-Spira. 2010a. "Strigolactones Are Transported through the Xylem and Play a Key Role in Shoot Architectural Response to Phosphate Deficiency in Nonarbuscular Mycorrhizal Host Arabidopsis." *Plant Physiology* 155 (2): 974–87. doi:10.1104/pp.110.164640.

- Kohlen, Wouter, Tatsiana Charnikhova, Ralph Bours, Juan A López Ráez, and Harro Bouwmeester. 2013. "Tomato Strigolactones A More Detailed Look," no. January: 1–6.
- Kretschmar T, Kohlen W, Sasse J, Borghi L, Schlegel M, Bachelier JB, Reinhardt D, Bours R, Bouwmeester HJ, Martinoia E. 2012. A petunia ABC protein controls strigolactone-dependent symbiotic signalling and branching. *Nature* 483: 341–4.
- Kretschmar, Tobias, Wouter Kohlen, Joelle Sasse, Lorenzo Borghi, Markus Schlegel, Julien B Bachelier, Didier Reinhardt, Ralph Bours, Harro J Bouwmeester, and Enrico Martinoia. 2012. "A Petunia ABC Protein Controls Strigolactone-Dependent Symbiotic Signalling and Branching." *Nature* 483 (7389). Nature Publishing Group: 341–44. doi:10.1038/nature10873.
- Kriechbaumer V, Park WJ, Gierl A, Glawischnig E 2006. Auxin biosynthesis in maize. *Plant Biol* 8:334–339
- Laurelsergues, Dominique, Olivier André, Jianling Peng, Jiangqi Wen, Rujin Chen, Pascal Ratet, Million Tadege, Kirankumar S Mysore, and Soizic F Rochange. 2015. "Strigolactones Contribute to Shoot Elongation and to the Formation of Leaf Margin Serrations in *Medicago truncatula* R108." *Journal of Experimental Botany* 66 (5): 1237–44. doi:10.1093/jxb/eru471.
- Lewis, Janet M, Caroline a Mackintosh, Sanghyun Shin, Edward Gilding, Sasha Kravchenko, Gerald Baldrige, Richard Zeyen, and Gary J Muehlbauer. 2008. "Overexpression of the Maize Teosinte Branched1 Gene in Wheat Suppresses Tiller Development." *Plant Cell Reports* 27 (7): 1217–25. doi:10.1007/s00299-008-0543-8.
- Li, C.J., and Bangerth, F. (1999). Auto inhibition of indole acetic acid transport in the shoots of two-branched pea (*Pisum sativum*) plants and its relationship to correlative dominance. *Physiol. Plant.* 106, 415–420. doi:10.1034/j.1399-3054.1999.106409.x
- Li, X.Y., Qian, Q., Fu, Z.M., Wang, Y.H., Xiong, G.S., Zeng, D.L., et al. (2003). Control of tillering in rice. *Nature* 422, 618–621. doi:10.1038/nature01518
- Lin H, Wang R, Qian Q, Yan M, Meng X, Fu Z, Yan C, Jiang B, Su Z, Li J, et al. 2009. DWARF27, an iron-containing protein required for the biosynthesis of strigolactones, regulates rice tiller bud outgrowth. *The Plant cell* 21: 1512–25.
- Liu W, Kohlen W, Lillo A, Op den Camp R, Ivanov S, Hartog M, Limpens E, Jamil M, Smaczniak C, Kaufmann K, et al. 2011a. Strigolactone Biosynthesis in *Medicago truncatula* and Rice Requires the Symbiotic GRAS-Type Transcription Factors NSP1 and NSP2. *the Plant Cell Online* 23: 3853–3865.
- Ljung, K. 2013. "Auxin Metabolism and Homeostasis during Plant Development." *Development* 140 (5): 943–50. doi:10.1242/dev.086363.
- Ljung, Karin, Rishikesh P. Bhalerao, and Göran Sandberg. 2002. "Sites and Homeostatic Control of Auxin Biosynthesis in *Arabidopsis* during Vegetative Growth." *The Plant Journal* 28 (4): 465–74. doi:10.1046/j.1365-313X.2001.01173.x.
- López-Ráez, Juan a, Iván Fernández, Juan M García, Estefanía Berrio, Paola Bonfante, Michael H Walter, and María J Pozo. 2015. "Differential Spatio-Temporal Expression of Carotenoid Cleavage Dioxygenases Regulates Apocarotenoid Fluxes during AM Symbiosis." *Plant Science : An International Journal of Experimental Plant Biology* 230 (January). Elsevier Ireland Ltd: 59–69. doi:10.1016/j.plantsci.2014.10.010.
- Lu, Zefu, Hong Yu, Guosheng Xiong, Jing Wang, Yongqing Jiao, Guifu Liu, Yanhui Jing, et al. 2013. "Genome-Wide Binding Analysis of the Transcription Activator Ideal Plant architecture1 Reveals a Complex Network Regulating Rice Plant Architecture." *The Plant Cell* 25 (10): 3743–59. doi:10.1105/tpc.113.113639.

- Ludwig-Müller, Jutta. 2011. "Auxin Conjugates: Their Role for Plant Development and in the Evolution of Land Plants." *Journal of Experimental Botany* 62 (6): 1757–73. doi:10.1093/jxb/erq412.
- MacMillan J. 2002. Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. *J. Plant Growth Regul.* 20:387–442
- Mano, Yoshihiro, and Keiichirou Nemoto. 2012. "The Pathway of Auxin Biosynthesis in Plants." *Journal of Experimental Botany* 63 (8): 2853–72. doi:10.1093/jxb/ers091.
- Malumbres.M & Barbacid.M Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm *Nature Reviews Cancer* 9, 153-166 (March 2009) | doi:10.1038/nrc2602
- Marhavý, Peter, Agnieszka Bielach, Lindy Abas, Anas Abuzeineh, Jerome Duclercq, Hirokazu Tanaka, Markéta Pařezová, et al. 2011. "Cytokinin Modulates Endocytic Trafficking of PIN1 Auxin Efflux Carrier to Control Plant Organogenesis." *Developmental Cell* 21 (4): 796–804. doi:10.1016/j.devcel.2011.08.014.
- Markmann K, Parniske M. Evolution of root endosymbiosis with bacteria: How novel are nodules? *Trends Plant Sci.* 2009 Feb;14(2):77-86.
- Mashiguchi, Kiyoshi, Eriko Sasaki, Yukihisa Shimada, Miyu Nagae, Kotomi Ueno, Takeshi Nakano, Koichi Yoneyama, Yoshihito Suzuki, and Tadao Asami. 2009. "Feedback-Regulation of Strigolactone Biosynthetic Genes and Strigolactone-Regulated Genes in Arabidopsis." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 73 (11): 2460–65. doi:10.1271/bbb.90443.
- Mason, Michael G, John J Ross, Benjamin a Babst, Brittany N Wienclaw, and Christine a Beveridge. 2014. "Sugar Demand, Not Auxin, Is the Initial Regulator of Apical Dominance." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (16): 6092–97. doi:10.1073/pnas.1322045111.
- Matusova, Radoslava, Kumkum Rani, Francel W A Verstappen, Maurice C R Franssen, Michael H Beale, and Harro J Bouwmeester. 2005. "The Strigolactone Germination Stimulants of the Plant-Parasitic Striga and Orobanche Spp . Are Derived from the Carotenoid Pathway 1" 139 (October): 920–34. doi:10.1104/pp.105.061382.920.
- Mayzlish-Gati, Einav, Sivarama P LekKala, Nathalie Resnick, Smadar Wininger, Chaitali Bhattacharya, J Hugo Lemcoff, Yoram Kapulnik, and Hinanit Koltai. 2010. "Strigolactones Are Positive Regulators of Light-Harvesting Genes in Tomato." *Journal of Experimental Botany* 61 (11): 3129–36. doi:10.1093/jxb/erq138.
- Mckay, Marcus, J Ross, Rosemary E Cramp, Christine A Beveridge, and B Reid. 1994. "Control of Internode Length in Pisum Sativum ' Further Evidence for the Involvement of Indole-3-Acetic Acid," 1521–26.
- McSteen P, Leyser O (2005) Shoot branching. *Annu Rev Plant Biol* 56:353–374
- Michniewicz, M., et al. (2007). Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. *Cell* 130: 1044–1056.
- Minakuchi, Kosuke, Hiromu Kameoka, Naoko Yasuno, Mikiyoshi Umehara, Le Luo, Kaoru Kobayashi, Atsushi Hanada, et al. 2010. "FINE CULM1 (FC1) Works Downstream of Strigolactones to Inhibit the Outgrowth of Axillary Buds in Rice." *Plant & Cell Physiology* 51 (7): 1127–35. doi:10.1093/pcp/pcq083.
- Mockaitis, Keithanne, and Mark Estelle. 2008. "Auxin Receptors and Plant Development: A New Signaling Paradigm." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 24 (January): 55–80. doi:10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123214.
- Morris, Suzanne E, Colin G N Turnbull, Ian C Murfet, and Christine A Beveridge. 2001. "Mutational Analysis of Branching in Pea . Evidence That Rms1 and Rms5 Regulate the Same Novel Signal 1" 126 (July): 1205–13.

- Morris, Suzanne E, Marjolein C H Cox, John J Ross, Santi Krisantini, and Christine A Beveridge. 2005. "Auxin Dynamics after Decapitation Are Not Correlated with the Initial Growth of Axillary Buds 1" 138 (July): 1665–72. doi:10.1104/pp.104.058743.1.
- Müller, Dörte, Tanya Waldie, Kaori Miyawaki, Jenn P.C. To, Charles W. Melnyk, Joseph J. Kieber, Tatsuo Kakimoto, and Ottoline Leyser. 2015. "Cytokinin Is Required for Escape but Not Release from Auxin Mediated Apical Dominance." *The Plant Journal*, April, n/a – n/a. doi:10.1111/tpj.12862.
- Nagahashi, Gerald, and David D. Douds. 2004. "Isolated Root Caps, Border Cells, and Mucilage from Host Roots Stimulate Hyphal Branching of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus, *Gigaspora Gigantea*." *Mycological Research* 108 (9): 1079–88. doi:10.1017/S0953756204000693.
- Nakamura, Hidemitsu, You-Lin Xue, Takuya Miyakawa, Feng Hou, Hui-Min Qin, Kosuke Fukui, Xuan Shi, et al. 2013. "Molecular Mechanism of Strigolactone Perception by DWARF14." *Nature Communications* 4 (January). Nature Publishing Group: 2613. doi:10.1038/ncomms3613.
- Nelson, David C, Adrian Scaffidi, Elizabeth a Dun, Mark T Waters, Gavin R Flematti, Kingsley W Dixon, Christine a Beveridge, Emilio L Ghisalberti, and Steven M Smith. 2011. "F-Box Protein MAX2 Has Dual Roles in Karrikin and Strigolactone Signaling in *Arabidopsis thaliana*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (21): 8897–8902. doi:10.1073/pnas.1100987108.
- Nelson, David C, Julie-Anne Riseborough, Gavin R Flematti, Jason Stevens, Emilio L Ghisalberti, Kingsley W Dixon, and Steven M Smith. 2009. "Karrikins Discovered in Smoke Trigger *Arabidopsis* Seed Germination by a Mechanism Requiring Gibberellic Acid Synthesis and Light." *Plant Physiology* 149 (2): 863–73. doi:10.1104/pp.108.131516.
- Nishimura, Takeshi, Ken-Ichiro Hayashi, Hiromi Suzuki, Atsuko Gyohda, Chihiro Takaoka, Yusuke Sakaguchi, Sachiko Matsumoto, et al. 2014. "Yucasin Is a Potent Inhibitor of YUCCA, a Key Enzyme in Auxin Biosynthesis." *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 77 (3): 352–66. doi:10.1111/tpj.12399.
- Nomura T, Nakayama M, Reid JB, Takeuchi Y, Yokota T (1997) Blockage of brassinosteroid biosynthesis and sensitivity causes dwarfism in garden pea. *Plant Physiol* 113: 31–37
- Nordstrom A, Tarkowski P, Tarkowska D, Norbaek R, Astot C, Dolezal K, Sandberg G (2004) Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin-cytokininregulated development. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 8039–8044
- Novák, O., Hényková, E., Sairanen, I., Kowalczyk, M., Pospíšil, T. and Ljung, K. (2012). Tissue-specific profiling of the *Arabidopsis thaliana* auxin metabolome. *Plant J.* 72, 523-536.
- 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.
- Ongaro, Veronica, and Ottoline Leyser. 2008. "Hormonal Control of Shoot Branching." *Journal of Experimental Botany* 59 (1): 67–74. doi:10.1093/jxb/erm134.
- Östin, A., Kowalczyk, 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 branch point of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 24, 327-334.
- Parker, Chris. 2009. "Observations on the Current Status of Orobanche and Striga Problems Worldwide." *Pest Management Science* 65 (5): 453–59. doi:10.1002/ps.1713.

- Parniske, Martin. 2008. "Arbuscular Mycorrhiza: The Mother of Plant Root Endosymbioses." *Nature Reviews. Microbiology* 6 (10): 763–75. doi:10.1038/nrmicro1987.
- Parry, Geraint, Alain Delbarre, Alan Marchant, Ranjan Swarup, Richard Napier, Catherine Perrot-rechenmann, and Malcolm J Bennett. 2001. "Novel Auxin Transport Inhibitors Phenocopy the Auxin Influx Carrier Mutation aux1" 25.
- Péret B, Clément M, Nussaume L, Desnos T. 2011. Root developmental adaptation to phosphate starvation: better safe than sorry. *Trends in plant science* 16: 442–50.
- Pollmann, S., Neu, D., Lehmann, T., Berkowitz, O., Schäfer, T. and Weiler, E. W. (2006). Subcellular localization and tissue specific expression of amidase 1 from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 224, 1241-1253.
- Pollock, Claire B, Sara McDonough, Victor S Wang, Hyojung Lee, Xin Li, Cristina Prandi, Richard J Lee, et al. "Strigolactone Analogues Induce Apoptosis through Activation of p38 and the Stress Response Pathway in Cancer Cell Lines and in Conditionally Reprogrammed Primary Prostate Cancer Cells . ABSTRACT ." 5 (6).
- Pollock CB1, McDonough S, Wang VS, Lee H, Ringer L, Li X, Prandi C, Lee RJ, Feldman AS, Koltai H, Kapulnik Y, Rodriguez OC, Schlegel R, Albanese C, Yarden RI. Strigolactone analogues induce apoptosis through activation of p38 and the stress response pathway in cancer cell lines and in conditionally reprogrammed primary prostate cancer cells. *Oncotarget*. 2014 Mar 30;5(6):1683-98
- Proebsting, W. M., Hedden, P., Lewis, M. J., Croker, S. J. & Proebsting, L. N. Gibberellin concentration and transport in genetic lines of pea. *Plant Physiol.* 100, 1354–1360 (1992).
- Proust, Hélène, Beate Hoffmann, Xiaonan Xie, Kaori Yoneyama, Didier G Schaefer, Koichi Yoneyama, Fabien Nogué, and Catherine Rameau. 2011. "Strigolactones Regulate Protonema Branching and Act as a Quorum Sensing-like Signal in the Moss *Physcomitrella Patens*." *Development (Cambridge, England)* 138 (8): 1531–39. doi:10.1242/dev.058495.
- Quint, Ab, Olaf Tietz, Pieter B F Ouwkerk, and Karin Ljung. 2004. "A PINOID-Dependent Binary Switch in Apical-Basal PIN Polar Targeting Directs Auxin Efflux" 306 (October): 862–66.
- Quittenden, Laura J, Noel W Davies, Jason a Smith, Peter P Molesworth, Nathan D Tivendale, and John J Ross. 2009. "Auxin Biosynthesis in Pea: Characterization of the Tryptamine Pathway." *Plant Physiology* 151 (3): 1130–38. doi:10.1104/pp.109.141507.
- Rameau, Catherine, Jessica Bertheloot, Nathalie Leduc, Bruno Andrieu, Fabrice Foucher, and Soulaïman Sakr. 2014. "Multiple Pathways Regulate Shoot Branching." *Frontiers in Plant Science* 5 (January): 741. doi:10.3389/fpls.2014.00741.
- Ramos JA, Zenser N, Leyser HM, Callis J. 2001. Rapid degradation of Aux/IAA proteins requires conserved amino acids of domain II and is proteasome-dependent. *Plant Cell* 13:2349–60
- Rasmussen, Amanda, Michael Glenn Mason, Carolien De Cuyper, Philip B Brewer, Silvia Herold, Javier Agusti, Danny Geelen, et al. 2012. "Strigolactones Suppress Adventitious Rooting in *Arabidopsis* and Pea." *Plant Physiology* 158 (4): 1976–87. doi:10.1104/pp.111.187104.
- Reed, Jason W. 2001. "Roles and Activities of Aux/IAA Proteins in *Arabidopsis*." *Trends in Plant Science* 6 (9): 420–25. doi:10.1016/S1360-1385(01)02042-8.
- Regnault, Thomas, Jean-Michel Davière, Michael Wild, Lali Sakvarelidze-Achard, Dimitri Heintz, Esther Carrera Bergua, Isabel Lopez Diaz, Fan Gong, Peter Hedden, and Patrick Achard. 2015. "The Gibberellin Precursor GA12 Acts as a Long-Distance Growth Signal in *Arabidopsis*." *Nature Plants* 1 (6): 15073. doi:10.1038/nplants.2015.73.

- Reid JB (1983) Internode length in *Pisum*: do the internode length genes effect growth in dark-grown plants? *Plant Physiol* 72: 759–763
- Reid JB, Davidson SE, Ross JJ (2011) Auxin acts independently of DELLA proteins in regulating gibberellin levels. *Plant Signal Behav* 6: 406–408
- Reid JB, Ross JJ (2011) Mendel's genes: toward a full molecular characterization. *Genetics* 189: 3–10
- Reid, James B., Sandra E. Davidson, and John J. Ross. 2014. "Auxin Acts Independently of DELLA Proteins in Regulating Gibberellin Levels." *Plant Signaling & Behavior* 6 (3): 406–8. doi:10.4161/psb.6.3.14352.
- Reinhardt, Didier, Eva-Rachele Pesce, Pia Stieger, Therese Mandel, Kurt Baltensperger, Malcolm Bennett, Jan Traas, Jiri Friml, and Cris Kuhlemeier. 2003. "Regulation of Phyllotaxis by Polar Auxin Transport." *Nature* 426 (6964): 255–60. doi:10.1038/nature02081.
- Remy, W., Taylor, T.N., Hass, H. and Kerp, H. (1994) Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 11841-11843.
- Rensing, S.A., Lang, D., Zimmer, A.D., Terry, A., Salamov, A., Shapiro, H., Nishiyama, T., Perroud, P.F., Lindquist, E.A., Kamisugi, Y., et al. (2008). The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 319, 64–69.
- Ross JJ, O'Neill DP, Rathbone DA (2003) Auxin-gibberellin interactions in pea: integrating the old with the new. *J Plant Growth Regul* 22: 99–108
- Ross JJ, O'Neill DP, Smith JJ, Kerckhoffs LH, Elliott RC (2000) Evidence that auxin promotes gibberellin A1 biosynthesis in pea. *Plant J* 21:
- Ross JJ, Reid JB (1986) Internode length in *Pisum*: the involvement of ethylene with the gibberellin insensitive erectoides phenotype. *PhysiolPlant* 67: 673–679
- Ross, John J, Diana E Weston, Sandra E Davidson, and James B Reid. 2011. "Plant Hormone Interactions: How Complex Are They?" *Physiologia Plantarum* 141 (4): 299–309. doi:10.1111/j.1399-3054.2011.01444.x.
- Ross, John J, James B Reid, Stephen M Swain, Omar Hasen, Andrew T Poole, Pater Hedden, and Christine L Willis. 1995. "Genetic Regulation of Gibberellin Deactivation in *Pisum*" 7: 513–23.
- Ross, John J., Damian P. O'Neill, and Damien a. Rathbone. 2003. "Auxin-Gibberellin Interactions in Pea: Integrating the Old with the New." *Journal of Plant Growth Regulation* 22 (1): 99–108. doi:10.1007/s00344-003-0021-z.
- Rumelhard, Guy. "143 FORMATION, MODIFICATION ET DISSOLUTION DU CONCEPT D'HORMONE DANS L'ENSEIGNEMENT Guy Rumelhard," 143–70.
- Ruyter-Spira, Carolien, Wouter Kohlen, Tatsiana Charnikhova, Arjan van Zeijl, Laura van Bezouwen, Norbert de Ruijter, Catarina Cardoso, et al. 2011. "Physiological Effects of the Synthetic Strigolactone Analog GR24 on Root System Architecture in *Arabidopsis*: Another Belowground Role for Strigolactones?" *Plant Physiology* 155 (2): 721–34. doi:10.1104/pp.110.166645.
- Sachs, T. 1968. "On the Determination of the Pattern of Vascular Tissue in Peas."
- Sang, Dajun, Dongqin Chen, Guifu Liu, Yan Liang, Linzhou Huang, Xiangbing Meng, Jinfang Chu, et al. 2014. "Strigolactones Regulate Rice Tiller Angle by Attenuating Shoot Gravitropism through Inhibiting Auxin Biosynthesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (30): 11199–204. doi:10.1073/pnas.1411859111

- Santner, Aaron, Luz Irina Calderon-Villalobos, and Mark Estelle. 2009. "Plant Hormones Are Versatile Chemical Regulators of Plant Growth." *Nature Chemical Biology* 5 (5): 301–7. doi:10.1038/nchembio.165.
- Sasaki A, Itoh H, Gomi K, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama K, Kobayashi M, Jeong DH, An G, Kitano H, Ashikari M et al.: Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. *Science* 2003, 299:1896-1898.
- Schmitz,G.,Tillmann,E.,Carriero,F.,Fiore,C.,Cellini,F.,andTheres,K.(2002). The tomato blind gene encodes a MYB transcription factor that controls the Formation of lateral meristems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 1064–1069.doi: 10.1073/pnas.022516199
- Schneider G, Jensen E, Spray CR, Phinney BO. 1992. Hydrolysis and re-conjugation of gibberellin A20 glucosyl ester by seedlings of *Zea mays* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:8045–48
- Schumacher,K.,Schmitt,T.,Rossberg,M.,Schmitz,C.,andTheres,K.(1999). The lateral suppressor (Ls) gene of tomato encodes a new member of The VHID protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 290–295.doi: 10.1073/pnas.96.1.290
- Schumacher,K.,Schmitt,T.,Rossberg,M.,Schmitz,C.,andTheres,K.(1999). The lateral suppressor (Ls) gene of tomato encodes a new member of The VHID protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 290–295.doi: 10.1073/pnas.96.1.290
- Science, Plant. 2000a. "Double Mutant rms2 rms5 Expresses a Transgressive , Profuse Branching Phenotype," 33–38.
- Seto,Y.,andYamaguchi,S.(2014).Strigolactonebiosynthesisandperception. *Curr. Opin.PlantBiol.* 21C, 1–6.doi:10.1016/j.pbi.2014.06.001
- Shani, Eilon, Roy Weinstain, Yi Zhang, Cristina Castillejo, Eirini Kaiserli, Joanne Chory, Roger Y Tsien, and Mark Estelle. 2013. "Gibberellins Accumulate in the Elongating Endodermal Cells of Arabidopsis Root." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (12): 4834–39. doi:10.1073/pnas.1300436110.
- Shimizu-sato, Sae, and Hitoshi Mori. 2001. "Control of Outgrowth and Dormancy in Axillary Buds 1." doi:10.1104/pp.010841.1.
- Shimizu-Sato,S.,Tanaka,M.,andMori, H.(2009). Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching. *Plant Mol. Biol.* 69, 429–435.doi:10.1007/s11103-008-9416-3
- Shinohara, Naoki, Catherine Taylor, and Ottoline Leyser. 2013. "Strigolactone Can Promote or Inhibit Shoot Branching by Triggering Rapid Depletion of the Auxin Efflux Protein PIN1 from the Plasma Membrane." *PLoS Biology* 11 (1): e1001474. doi:10.1371/journal.pbio.1001474.
- Simons, J. L., C. a. Napoli, B. J. Janssen, K. M. Plummer, and K. C. Snowden. 2006. "Analysis of the DECREASED APICAL DOMINANCE Genes of Petunia in the Control of Axillary Branching." *Plant Physiology* 143 (2): 697–706. doi:10.1104/pp.106.087957.
- Smith SE, Smith AF. 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual review of plant biology* 62: 227–50.
- Snow R (1937) On the nature of correlative inhibition. *New Phytol* 36: 283–300
- Snowden, Kimberley C, Andrew J Simkin, Bart J Janssen, Kerry R Templeton, Holly M Loucas, Joanne L Simons, Sakuntala Karunairetnam, Andrew P Gleave, David G Clark, and Harry J Klee. 2005a. "The Decreased Apical dominance1 / Petunia Hybrid CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8 Gene Affects Branch

- Production and Plays a Role in Leaf Senescence , Root Growth , and Flower Development” 17 (March): 746–59. doi:10.1105/tpc.104.027714.diversity.
- Snowden, Kimberley C., and Carolyn a. Napoli. 2003. “A Quantitative Study of Lateral Branching in Petunia.” *Functional Plant Biology* 30 (9): 987. doi:10.1071/FP03081.
- Soeno, Kazuo, Hideki Goda, Takahiro Ishii, Takehiko Ogura, Tomoe Tachikawa, Eriko Sasaki, Shigeo Yoshida, Shozo Fujioka, Tadao Asami, and Yukihiisa Shimada. 2010. “Auxin Biosynthesis Inhibitors, Identified by a Genomics-Based Approach, Provide Insights into Auxin Biosynthesis.” *Plant & Cell Physiology* 51 (4): 524–36. doi:10.1093/pcp/pcq032.
- Sorefan, Karim, Jon Booker, Karine Haurogné, Magali Goussot, Katherine Bainbridge, Eloise Foo, Steven Chatfield, et al. 2003. “MAX4 and RMS1 Are Orthologous Dioxygenase-like Genes That Regulate Shoot Branching in Arabidopsis and Pea.” *Genes & Development* 17 (12): 1469–74. doi:10.1101/gad.256603.
- Stanga, John P, Steven M Smith, Winslow R Briggs, and David C Nelson. 2013. “SUPPRESSOR OF MORE AXILLARY GROWTH2 1 Controls Seed Germination and Seedling Development in Arabidopsis.” *Plant Physiology* 163 (1): 318–30. doi:10.1104/pp.113.221259.
- Steeves, T.A. and Sussex, I.M. (1989) Patterns in Plant Development. Cambridge University Press, New York, NY.
- Steeves, Taylor a., and Ian M. Sussex. 1989. “Patterns in Plant Development.” Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/CBO9780511626227.
- Stepanova, A. N., Yun, J., Robles, L. M., Novák, 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, Anna N, Joyce Robertson-Hoyt, Jeonga Yun, Larissa M Benavente, De-Yu Xie, Karel Dolezal, Alexandra Schlereth, Gerd Jürgens, and Jose M Alonso. 2008. “TAA1-Mediated Auxin Biosynthesis Is Essential for Hormone Crosstalk and Plant Development.” *Cell* 133 (1): 177–91. doi:10.1016/j.cell.2008.01.047.
- Stirnberg, Petra, Shuqing Zhao, Lisa Williamson, Sally Ward, and Ottoline Leyser. 2012. “FHY3 Promotes Shoot Branching and Stress Tolerance in Arabidopsis in an AXR1-Dependent Manner.” *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 71 (6): 907–20. doi:10.1111/j.1365-313X.2012.05038.x.
- Stirnberg, P., Furner, I.J., and Ottoline Leyser, H.M. (2007). MAX2 participates in an SCF complex which acts locally at the node to suppress shoot branching. *Plant J.* 50, 80–94. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03032.x
- Stirnberg, P., VanDeSande, K., and Leyser, H.M. (2002). MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in Arabidopsis. *Development* 129, 1131–1141.
- Sugawara, S., Hishiyama, S., Jikumaru, Y., Hanada, A., Nishimura, T., Koshiba, T., Zhao, Y., Kamiya, Y. and Kasahara, H. (2009). Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 5430-5435.
- Sugawara, Satoko, Kiyoshi Mashiguchi, Keita Tanaka, Shojiro Hishiyama, Tatsuya Sakai, Kousuke Hanada, Kaori Kinoshita-Tsujimura, et al. 2015. “Distinct Characteristics of Indole-3-Acetic Acid and Phenylacetic Acid, Two Common Auxins in Plants.” *Plant & Cell Physiology* 56 (8): 1641–54. doi:10.1093/pcp/pcv088.
- Sun, Huwei, Jinyuan Tao, Shangjun Liu, Shuangjie Huang, Si Chen, Xiaonan Xie, Koichi Yoneyama, Yali Zhang, and Guohua Xu. 2014. “Strigolactones Are Involved in Phosphate- and Nitrate-Deficiency-Induced Root Development and Auxin Transport in Rice.” *Journal of Experimental Botany* 65 (22): 6735–46. doi:10.1093/jxb/eru029.

- Sun, Tai-Ping. 2011. "The Molecular Mechanism and Evolution of the GA-GID1-DELLA Signaling Module in Plants." *Current Biology : CB* 21 (9). Elsevier Ltd: R338–45. doi:10.1016/j.cub.2011.02.036.
- Sussex, Ian M, and Nancy M Kerk. 2001. "The Evolution of Plant Architecture." *Current Opinion in Plant Biology* 4 (1): 33–37. doi:10.1016/S1369-5266(00)00132-1.
- Suzuki, Masashi, Chiaki Yamazaki, Marie Mitsui, Yusuke Kakei, Yuka Mitani, Ayako Nakamura, Takahiro Ishii, Kazuo Soeno, and Yukihisa Shimada. 2015. "Transcriptional Feedback Regulation of YUCCA Genes in Response to Auxin Levels in Arabidopsis." *Plant Cell Reports* 34 (8). Springer Berlin Heidelberg: 1343–52. doi:10.1007/s00299-015-1791-z.
- Szemenyei H, Hannon M, Long JA. 2008. TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during *Arabidopsis* embryogenesis. *Science* 319:1384–86
- Takeda, Taito, Yuko Suwa, Makoto Suzuki, Hidemi Kitano, Miyako Ueguchi-tanaka, and Motoyuki Ashikari. 2003. "The OStB1 Gene Negatively Regulates Lateral Branching in Rice," 513–20.
- Tan, Xu, Luz Irina Calderon-Villalobos, Michal Sharon, Changxue Zheng, Carol V Robinson, Mark Estelle, and Ning Zheng. 2007. "Mechanism of Auxin Perception by the TIR1 Ubiquitin Ligase." *Nature* 446 (7136): 640–45. doi:10.1038/nature05731.
- Tao, Yi, Jean-Luc Ferrer, Karin Ljung, Florence Pojer, Fangxin Hong, Jeff a. Long, Lin Li, et al. 2008. "Rapid Synthesis of Auxin via a New Tryptophan-Dependent Pathway Is Required for Shade Avoidance in Plants." *Cell* 133 (1): 164–76. doi:10.1016/j.cell.2008.01.049.
- Tarkowski, Petr, Danuse Tarkowska, Rikke Norbaek, Crister Åstot, and Karel Dolezal. 2004. "Auxin Regulation of Cytokinin Biosynthesis in Arabidopsis Thaliana : A Factor of Potential Importance for Auxin – Cytokinin-Regulated Development" 101 (21).
- Teichmann, Thomas, and Merlin Muhr. 2015. "Shaping Plant Architecture." *Frontiers in Plant Science* 6 (April): 233. doi:10.3389/fpls.2015.00233.
- Thimann and Folke Skoog Source "On the Inhibition of Bud Development and Other Functions of Growth Substance in Vicia Faba Author (S): Kenneth V . : Proceedings of the Royal Society of London . Series B , Containing Papers of a Published by : The Royal Society Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/81830> On the Inhibition of Bud Development and Other Functions of Growth Substance in Vicia Faba ." 2008 114 (789): 317–39.
- Thimann KV, Skoog F (1933) Studies on the growth hormone of plants. III. The inhibitory action of the growth substance on bud development. *Proc Natl Acad Sci USA* 19: 714–716
- Thimann Source : "The Role of Auxins and Cytokinins in the Release of Buds From Dominance Author (S): Tsvi Sachs and Kenneth V . American Journal of Botany , Vol . 54 , No . 1 , (Jan . , 1967), Pp . 136-144 Published by : Botanical Society of America Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2440896>." 2008 54 (1): 136–44.
- Tokunaga, Tamami, Hideo Hayashi, and Kohki Akiyama. 2015. "Medicaol, a Strigolactone Identified as a Putative Didehydro-Orobanchol Isomer, from Medicago Truncatula." *Phytochemistry* 111 (March). Elsevier Ltd: 91–97. doi:10.1016/j.phytochem.2014.12.024.
- Tong, Hongning, Yunhua Xiao, Dapu Liu, Shaopei Gao, Linchuan Liu, Yanhai Yin, Yun Jin, Qian Qian, and Chengcai Chu. 2014. "Brassinosteroid Regulates Cell Elongation by Modulating Gibberellin Metabolism in Rice." *The Plant Cell* 26 (11): 4376–93. doi:10.1105/tpc.114.132092.

- Tsuchiya, Yuichiro, Danielle Vidaurre, Shigeo Toh, Atsushi Hanada, Eiji Nambara, Yuji Kamiya, Shinjiro Yamaguchi, and Peter McCourt. 2010. "A Small-Molecule Screen Identifies New Functions for the Plant Hormone Strigolactone." *Nature Chemical Biology* 6 (10). Nature Publishing Group: 741–49. doi:10.1038/nchembio.435.
- Turnbull, C.G.N., Raymond, M.A.A., Dodd, I.C., and Morris, S.E. (1997). Rapid increases in cytokinin concentration in lateral buds of chick pea (*Cicer arietinum* L) during release of apical dominance. *Planta* 202, 271–276. doi: 10.1007/s004250050128
- Ueguchi-Tanaka, Miyako, Masatoshi Nakajima, Etsuko Katoh, Hiroko Ohmiya, Kenji Asano, Shoko Saji, Xiang Hongyu, et al. 2007. "Molecular Interactions of a Soluble Gibberellin Receptor, GID1, with a Rice DELLA Protein, SLR1, and Gibberellin." *The Plant Cell* 19 (7): 2140–55. doi:10.1105/tpc.106.043729.
- Ueguchi-Tanaka, Miyako, Motoyuki Ashikari, Masatoshi Nakajima, Hironori Itoh, Etsuko Katoh, Masatomo Kobayashi, Teh-yuan Chow, et al. 2005. "GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 Encodes a Soluble Receptor for Gibberellin." *Nature* 437 (7059): 693–98. doi:10.1038/nature04028.
- Umehara, Mikiyoshi, Atsushi Hanada, Hiroshi Magome, Noriko Takeda-Kamiya, and Shinjiro Yamaguchi. 2010. "Contribution of Strigolactones to the Inhibition of Tiller Bud Outgrowth under Phosphate Deficiency in Rice." *Plant & Cell Physiology* 51 (7): 1118–26. doi:10.1093/pcp/pcq084.
- Umehara, Mikiyoshi, Atsushi Hanada, Satoko Yoshida, Kohki Akiyama, Tomotsugu Arite, Noriko Takeda-Kamiya, Hiroshi Magome, et al. 2008. "Inhibition of Shoot Branching by New Terpenoid Plant Hormones." *Nature* 455 (7210): 195–200. doi:10.1038/nature07272.
- Varbanova M, Yamaguchi S, Yang Y, McKelvey K, Hanada A, et al. 2007. Methylation of gibberellins by Arabidopsis GAMT1 and GAMT2. *Plant Cell* 19:32–45
- Vert, G., and Chory, J. (2006). Downstream nuclear events in brassinosteroid signalling. *Nature* 441, 96–100.
- Vieten, Anne, Steffen Vanneste, Justyna Wisniewska, Eva Benková, René Benjamins, Tom Beeckman, Christian Luschnig, and Jiri Friml. 2005. "Functional Redundancy of PIN Proteins Is Accompanied by Auxin-Dependent Cross-Regulation of PIN Expression." *Development (Cambridge, England)* 132 (20): 4521–31. doi:10.1242/dev.02027.
- Waldie, Tanya, Hayley McCulloch, and Ottoline Leyser. 2014. "Strigolactones and the Control of Plant Development: Lessons from Shoot Branching." *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 79 (4): 607–22. doi:10.1111/tj.12488.
- Walsh, Terence A, Roben Neal, Ann Owens Merlo, Mary Honma, Glenn R Hicks, Karen Wolff, Wendy Matsumura, and John P Davies. 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 Physiology* 142 (2). United States: 542–52. doi:10.1104/pp.106.085969.
- Wang, Bing, Jinfang Chu, Tianying Yu, Qian Xu, Xiaohong Sun, Jia Yuan, Guosheng Xiong, Guodong Wang, Yonghong Wang, and Jiayang Li. 2015. "Tryptophan-Independent Auxin Biosynthesis Contributes to Early Embryogenesis in Arabidopsis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (15): 4821–26. doi:10.1073/pnas.1503998112.
- Wang, Yijun, and Dexiang Deng. 2014. "Molecular Basis and Evolutionary Pattern of GA-GID1-DELLA Regulatory Module." *Molecular Genetics and Genomics : MGG* 289 (1): 1–9. doi:10.1007/s00438-013-0797-x.
- Wang, Yuan, Shiyong Sun, Wenjiao Zhu, Kunpeng Jia, Hongquan Yang, and Xuelu Wang. 2013. "Strigolactone/MAX2-Induced Degradation of Brassinosteroid Transcriptional Effector BES1 Regulates Shoot Branching." *Developmental Cell* 27 (6). Elsevier Inc.: 681–88. doi:10.1016/j.devcel.2013.11.010.

- Waters, Mark T, and Steven M Smith. 2013. "KAI2- and MAX2-Mediated Responses to Karrikins and Strigolactones Are Largely Independent of HY5 in Arabidopsis Seedlings." *Molecular Plant* 6 (1): 63–75. doi:10.1093/mp/sss127.
- Waters, Mark T, David C Nelson, Adrian Scaffidi, Gavin R Flematti, Yueming K Sun, Kingsley W Dixon, and Steven M Smith. 2012. "Specialisation within the DWARF14 Protein Family Confers Distinct Responses to Karrikins and Strigolactones in Arabidopsis." *Development (Cambridge, England)* 139 (7): 1285–95. doi:10.1242/dev.074567.
- Westwood, James H, John I Yoder, Michael P Timko, and Claude W dePamphilis. 2010. "The Evolution of Parasitism in Plants." *Trends in Plant Science* 15 (4). Elsevier Ltd: 227–35. doi:10.1016/j.tplants.2010.01.004.
- Willige, B.C., Ahlers, S., Zourelidou, M., Barbosa, I.C.R., Demarsy, E., Trevisan, M., Davis, P.A., Roelfsema, M.R.G., Hangarter, R., Fankhauser, C., and Schwechheimer, C. (2013). D6PK AGCVIII kinases are required for auxin transport and phototropic hypocotyl bending in Arabidopsis. *Plant Cell* 25: 1674–1688.
- Won, C., Shen, X., Mashiguchi, K., Zheng, Z., Dai, X., Cheng, Y., Kasahara, H., Kamiya, Y., Chory, J. and Zhao, Y. (2011). Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by tryptophan aminotransferases of arabidopsis and YUCCAs in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 18518-18523.
- Woo, Hye Ryun, Kyung Min Chung, Joon-hyun Park, Sung Aeong Oh, Taejin Ahn, Sung Hyum Hong, Sung Key Jang, and Hong Gil Nam. 2001. "ORE9 , an F-Box Protein That Regulates Leaf Senescence in Arabidopsis" 13 (August): 1779–90.
- Woodward, A. W. and Bartel, B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann. Bot.* 95, 707-735.
- Xie X, Yoneyama K, Harada Y, Fusegi N, Yamada Y, Ito S, Yokota T, Takeuchi Y, Yoneyama K. 2009. Fabacyl acetate, a germination stimulant for root parasitic plants from *Pisum sativum*. *Phytochemistry* 70: 211–5.
- Xie, Xiaonan, Kaori Yoneyama, and Koichi Yoneyama. 2010. "The Strigolactone Story." *Annual Review of Phytopathology* 48 (January): 93–117. doi:10.1146/annurev-phyto-073009-114453.
- Yamada, M., Greenham, K., Prigge, M. J., Jensen, P. J. and Estelle, M. (2009). The TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE2 gene is required for auxin synthesis and diverse aspects of plant development. *Plant Physiol.* 151, 168-179.
- Yamada, Yusuke, Soya Furusawa, Seiji Nagasaka, Koichiro Shimomura, Shinjiro Yamaguchi, and Mikihisa Umehara. 2014. "Strigolactone Signaling Regulates Rice Leaf Senescence in Response to a Phosphate Deficiency." *Planta* 240 (2): 399–408. doi:10.1007/s00425-014-2096-0.
- Yamaguchi, Shinjiro. 2008. "Gibberellin Metabolism and Its Regulation." *Annual Review of Plant Biology* 59 (January): 225–51. doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092804.
- Yang, Dong-Lei, Jian Yao, Chuan-Sheng Mei, Xiao-Hong Tong, Long-Jun Zeng, Qun Li, Lang-Tao Xiao, et al. 2012. "Plant Hormone Jasmonate Prioritizes Defense over Growth by Interfering with Gibberellin Signaling Cascade." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (19): E1192–1200. doi:10.1073/pnas.1201616109.
- Yin, Y., Wang, Z.Y., Mora-Garcia, S., Li, J., Yoshida, S., Asami, T., and Chory, J. (2002). BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell* 109, 181–191.

- Yoneyama K, Xie X, Kusumoto D, Sekimoto H, Sugimoto Y, Takeuchi Y, Yoneyama K. 2007a. Nitrogen deficiency as well as phosphorus deficiency in sorghum promotes the production and exudation of 5-deoxystrigol, the host recognition signal for arbuscular mycorrhizal fungi and root parasites. *Planta* 227: 125–132.
- Yoneyama K, Xie X, Sekimoto H, Takeuchi Y, Ogasawara S, Akiyama K, Hayashi H, Yoneyama K. 2008. Strigolactones, host recognition signals for root parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi, from Fabaceae plants. *The New phytologist* 179: 484–94.
- Yoneyama, Kaori, Takaya Kisugi, Xiaonan Xie, Ryota Arakawa, Tatsuhiro Ezawa, Takahito Nomura, and Koichi Yoneyama. 2015. "Shoot-Derived Signals Other than Auxin Are Involved in Systemic Regulation of Strigolactone Production in Roots." *Planta* 241 (3): 687–98. doi:10.1007/s00425-014-2208-x.
- Yoshida S, Kameoka H, Tempo M, Akiyama K, Umehara M, Yamaguchi S, Hayashi H, Kyojuka J, Shirasu K. 2012. The D3 F-box protein is a key component in host strigolactone responses essential for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The New phytologist*.
- Yu, Nan, Dexian Luo, Xiaowei Zhang, Junzhong Liu, Wanxiao Wang, Yue Jin, Wentao Dong, et al. 2014. "A DELLA Protein Complex Controls the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis in Plants." *Cell Research* 24 (1): 130–33. doi:10.1038/cr.2013.167.
- Zhang, X.H., Lin, A.J., Chen, B.D., Wang, Y.S., Smith, S.E. and Smith, F.A. (2006) Effects of *Glomus mosseae* on the toxicity of heavy metals to *Vicia faba*. *J Environ Sci (China)*, 18, 721-726.
- Zhang, Yanxia, Aalt D J van Dijk, Adrian Scaffidi, Gavin R Flematti, Manuel Hofmann, Tatsiana Charnikhova, Francel Verstappen, et al. 2014. "Rice Cytochrome P450 MAX1 Homologs Catalyze Distinct Steps in Strigolactone Biosynthesis." *Nature Chemical Biology* 10 (12): 1028–33. doi:10.1038/nchembio.1660.
- Zhao, Jinfeng, Tao Wang, Minxia Wang, Yuanyuan Liu, Shoujiang Yuan, Yanan Gao, Liang Yin, et al. 2014a. "DWARF3 Participates in an SCF Complex and Associates with DWARF14 to Suppress Rice Shoot Branching." *Plant & Cell Physiology* 55 (6): 1096–1109. doi:10.1093/pcp/pcu045.
- Zhao, Li-Hua, X Edward Zhou, Zhong-Shan Wu, Wei Yi, Yong Xu, Suling Li, Ting-Hai Xu, et al. 2013. "Crystal Structures of Two Phytohormone Signal-Transducing A/β Hydrolases: Karrikin-Signaling KAI2 and Strigolactone-Signaling DWARF14." *Cell Research* 23 (3): 436–39. doi:10.1038/cr.2013.19.
- Zhao, Shu-Qing, Jing-Jing Xiang, and Hong-Wei Xue. 2013. "Studies on the Rice LEAF INCLINATION1 (LC1), an IAA-Amido Synthetase, Reveal the Effects of Auxin in Leaf Inclination Control." *Molecular Plant* 6 (1): 174–87. doi:10.1093/mp/sss064.
- Zhao, Yunde, Sioux K Christensen, Christian Fankhauser, John R Cashman, Jerry D Cohen, Detlef Weigel, and Joanne Chory. 2001. "R EPORTS A Role for Flavin Monooxygenase – Like Enzymes in Auxin Biosynthesis" 291 (January): 306–9.
- Zhao, Yunde. 2014a. "Auxin Biosynthesis." *The Arabidopsis Book* 12 (January): e0173. doi:10.1199/tab.0173.
- Zhou, F., Lin, Q., Zhu, L., Ren, Y., Zhou, K., Shabek, N., et al. (2013). D14-SCFD3- dependent degradation of D53 regulates strigolactone signalling. *Nature* 504, 406–410. doi:10.1038/nature12878
- Zhou, Feng, Qibing Lin, Lihong Zhu, Yulong Ren, Kunneng Zhou, Nitzan Shabek, Fuqing Wu, et al. 2013. "D14-SCF(D3)-Dependent Degradation of D53 Regulates Strigolactone Signalling." *Nature* 504 (7480). Nature Publishing Group: 406–10. doi:10.1038/nature12878.
- Zhou, Z. Y., Zhang, C. G., Wu, L., Zhang, C. G., Chai, J., Wang, M., Jha, A., Jia, P. F., Cui, S. J., Yang, M. et al. (2011). Functional characterization of the CKRC1/TAA1 gene and dissection of hormonal actions in the Arabidopsis root. *Plant J.* 66, 516-527.

- Zhu Y, Nomura T, Xu Y, Zhang Y, Peng Y, et al. 2006. *ELONGATED UPPERMOST INTERNODE* encodes a cytochrome P450 monooxygenase that epoxidizes gibberellins in a novel deactivation reaction in rice. *Plant Cell* 18:442–56
- Zou, Junhuang, Shuying Zhang, Weiping Zhang, Gang Li, Zongxiang Chen, Wenxue Zhai, Xianfeng Zhao, Xuebiao Pan, Qi Xie, and Lihuang Zhu. 2006. "The Rice HIGH-TILLERING DWARF1 Encoding an Ortholog of Arabidopsis MAX3 Is Required for Negative Regulation of the Outgrowth of Axillary Buds." *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 48 (5): 687–98. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02916.x.
- Zou,J.,Chen,Z.,Zhang,S.,Zhang,W.,Jiang,G.,Zhao,X.,etal.(2005).Character izations and fine mapping of a mutant gene for high tillering and dwarf in rice (*Oryzasativa* L.). *Planta* 222, 604–612.doi:10.1007/s00425-005-0007-0
- Zourelidou, M., et al. (2014). Auxin efflux by PIN-FORMED proteins is activated by two different protein kinases, D6 PROTEIN KINASE and PINOID. *eLife* 3: e02860.
- Zourelidou, M., Müller, I., Willige, B.C., Nill, C., Jikumaru, Y., Li, H., and Schwechheimer, C. (2009). The polarly localized D6 PROTEIN KINASE is required for efficient auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 136: 627–636.
- Zwanenburg, B., Nayak, S.K., Charnikhova, T.V., and Bouwmeester, H.J. (2013). New strigolactone mimics: structure– activity relationship and mode of action as germinating stimulants for parasitic weeds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23,5182–5186.

Titre : Rôle des Strigolactones dans le Développement de l'Architecture Aérienne de la Plante en Interaction avec les autres Hormones Végétales

Mots clés : Strigolactones, auxine, ramification, pois, interaction hormonale

Résumé : La croissance et le développement des plantes sont sous l'influence de nombreux facteurs génétiques et environnementaux. Parmi eux les hormones végétales participent aux multiples processus qui conduisent à la formation d'une plante via la mise en place d'un réseau complexe d'interactions et de rétro-contrôles. Le contrôle de la ramification implique trois d'entre-elles : l'auxine et les strigolactones (SLs) qui inhibent le démarrage des bourgeons et les cytokinines (CKs) qui le stimulent. Différents mécanismes d'interactions entre ces signaux dans le contrôle de la ramification sont connus. L'auxine contrôle les niveaux de SLs et de CKs, et les voies SLs et CKs convergent vers la même cible, le facteur de transcription BRC1.

Chez le pois, les mutants hyper-ramifiés *ramosus* (*rms*) sont affectés dans la voie SLs. Les gènes *RMS1* (*PsMAX4*) et *RMS5* (*PsMAX3*) contrôlent la biosynthèse des SLs alors que *RMS3* (*PsD14*) (récepteur) et *RMS4* (*PsMAX2*) sont impliqués dans la perception des SLs. En plus de partager un phénotype hyper-ramifié, les mutants *rms* présentent un phénotype de nanisme. Cependant le rôle des SLs dans le contrôle de la taille des plantes n'était pas encore connu. Nous avons montré que les SLs contrôlent la taille des plantes en jouant sur le processus de division cellulaire indépendamment de la voie gibbérelline.

Les mutants *rms* montrent des caractéristiques physiologiques similaires : un haut niveau d'expression des gènes de biosynthèse des SL et une faible teneur en CKs dans la sève xylémienne (X-CKs). En revanche, le mutant hyper-ramifié *rms2* présente une faible expression des gènes de biosynthèse des SLs et une forte teneur en X-CKs. De précédentes études suggèrent que *rms2* est affecté dans un signal tige-racine de rétro-contrôle régulant la biosynthèse des SLs et le niveau de X-CKs. La nature biochimique de ce signal est inconnue et il a été proposé que ce signal soit auxine-indépendant.

Nous avons montré que le gène *RMS2* est l'homologue chez le pois des gènes *AFB4/5* d'*Arabidopsis* codant pour une protéine à boîte-F de la famille des récepteurs de l'auxine TIR1/AFBs (Auxin signaling F-Box). Ce qui suggère que le signal de rétro-contrôle *RMS2*-dépendant est l'auxine. De plus nos résultats montrent que les SLs jouent un rôle de répresseur du niveau d'auxine dans la tige via la régulation de l'expression des gènes du métabolisme de l'auxine.

L'ensemble de ces résultats montrent que dans le processus de contrôle de la ramification les interactions entre auxine et SLs sont complexes. Les multiples mécanismes en jeux aboutissent à la formation d'une boucle de régulation dans laquelle chaque hormone est capable de contrôler la biosynthèse de l'autre.

Title : Roles of strigolactones for the control of shoot architecture in interaction with other plant hormones

Keywords : Strigolactones, auxin, branching, pea, hormonal interaction

Abstract : The different processes of plant growth and development are under the influence of growth regulators which interact in complex hormonal networks and feedback mechanisms. The control of shoot branching involves 3 key plant hormones, auxin, cytokinins (CKs) and strigolactones (SLs). Auxin and SLs repress axillary bud outgrowth whereas CKs stimulate it. Different mechanisms of interactions between these signals have already been suggested in controlling shoot branching. Auxin controls SLs and CKs levels, and SLs and CKs pathways converge on the same target, the TCP transcription factor BRC1 in the axillary bud.

In pea, the high shoot branching of *ramosus* (*rms*) mutants are known for being impaired in the SLs pathway. *RMS1* (*PsMAX4*) and *RMS5* (*PsMAX3*) genes are involved in SL biosynthesis while *RMS3* (*PsD14*) (receptor) and *RMS4* (*PsMAX2*) are involved in SL perception. In addition to sharing their high branching phenotype, the *rms* mutants display a dwarf phenotype. However the role of SLs in controlling plant height was unknown. Here we show that SLs control internode length by acting on cell division in a gibberellin-independent way.

The *rms* mutants show similar physiological characteristics: high expression of the SL-biosynthesis genes and very low xylem-sap CKs (X-CKs) content. In contrast, the *rms2* mutant with similar shoot phenotype shows very low expression of SL-biosynthesis genes and high X-CKs content. Previous studies suggested that *rms2* was affected in a shoot-to-root feedback signal controlling both SL biosynthesis and X-CKs level. Whether this feedback signal was auxin or not was highly discussed.

Here we demonstrated that the *RMS2* gene is the pea homologue of the *Arabidopsis* *AFB4/5* gene, encoding an F-box protein which belongs to the TIR1/AFB (Auxin signaling F-Box) auxin receptor family. This suggests that the *RMS2*-dependent feedback signal is very likely auxin. Moreover our results suggest a role for SLs in the repression of auxin content in pea stem via the regulation of auxin metabolism gene expression.

These results highlighted that for the control of shoot branching, interactions between auxin and strigolactones involve multiple mechanisms leading to regulation loop where both hormones are able to regulate the biosynthesis of each other.