



HAL
open science

Identification des modules de la signalisation auxinique impliqués dans la morphogenèse foliaire

Manon Boudin

► **To cite this version:**

Manon Boudin. Identification des modules de la signalisation auxinique impliqués dans la morphogenèse foliaire. Biologie végétale. Université Paris Saclay (COmUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS463 . tel-01688818

HAL Id: tel-01688818

<https://theses.hal.science/tel-01688818>

Submitted on 19 Jan 2018

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 : 2017SACLS463

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

Manon Boudin

Identification des modules de la signalisation auxinique impliqués dans la
morphogénèse foliaire.

Thèse présentée et soutenue à Versailles, le 28 Novembre 2017 :

Composition du Jury :

| | | |
|--------------------------|------------------------------------|---------------------|
| Mme Delarue Marianne | Professeur, IPS2, Orsay | Président du Jury |
| Mme Legué Valérie | Professeur, INRA, Clermont-Ferrand | Rapportrice |
| M Luu Doan-Trung | CR, CNRS, Montpellier | Rapporteur |
| Mme Rechenmann Catherine | DR2, CNRS, Versailles | Directrice de thèse |



C'est avec un certain soulagement, de la joie mais aussi avec un petit pincement au cœur que ces trois ans se terminent.

Cette thèse n'aurait pas été possible sans Catherine. Merci de m'avoir permis de la réaliser et pour tes conseils avisés.

Patrick, merci pour tout, et surtout pour avoir réussi à me remotiver quand je pensais que cela n'était plus possible. Sans toi je ne serai pas là à écrire ces lignes aujourd'hui.

Merci également à toutes les personnes qui ont rendu mes journées au labo plus belles, et qui me donnaient envie d'aller travailler chaque matin. Nicolas et JC, le sous-sol ne serait pas aussi animé sans vous. Merci de nous faire tant rire.

Magali, merci d'avoir toujours été là. Nos conversations de bureau vont me manquer.

Ces mois de rédactions en pleines vacances estivales auraient été moins motivant sans Aude, ma camarade de rédaction et première averti des araignées qui rodent.

Merci également à Véro, d'avoir été si prévenante avec nous durant cette période, et pour les roses qui égayaient nos bureaux.

Bernard et Pierre, un grand merci pour votre aide lorsque j'étais noyée dans les génotypages.

Merci aussi à l'équipe MIN, et surtout à Jasmine pour ton enthousiasme, pour avoir trouvé le moyen de réaliser les cartographies ainsi que de m'avoir aidé à chaque fois que je rencontrais des problèmes avec les scripts.

Merci Abdou, pour ta bonne humeur et nos conversations diverses et variées. J'espère que tu trouveras le CDI que tu souhaites tant.

Leo, merci pour la quantification de la fluo et tes macarons.

Merci également à Marianne, Marine, Zsolt, Lionel, JD, Jean-Luc, Yannick, d'avoir participé à l'animation du sous-sol et des repas.

Merci également à Emeline, et à toutes les personnes de l'ISV que j'ai pu côtoyer, et en particulier les FF et les MC, ainsi que Thibaud et Jean-Pierre qui m'ont si bien accueilli au 063 quand je n'étais encore que de passage. Mon début de thèse n'aurait pas été le même sans vous.

Durant ma thèse, j'ai également eu la chance d'aller à Lyon pour apprendre à faire des hybridations *in situ*. Merci Teva, de m'avoir accueilli au sein de ton labo et merci Frédérique pour avoir pris sur ton temps pour me montrer la manip.

Je souhaite également remercier Françoise et Magalie d'avoir participé à mes comités de thèse, et Sandrine pour avoir été rapportrice de mes présentations de début et mi- thèse à l'IJPB.

Merci Katia et Olivier pour votre aide au confocal.

Je tiens également à remercier les serristes de s'être occupés de mes plantes, et plus particulièrement Sébastien, pour avoir été si arrangeant et pour ta gentillesse.

A ma famille et mes amis... Merci d'être là, de m'avoir soutenue durant ces 3 années, de m'avoir poussé, fait relativiser parfois et pour ces bons moments qui me rappelaient qu'il y a une vie à côté de la thèse.

Jérémy, je n'aurai pas assez de ces quelques lignes pour te remercier. Merci pour ton amour indéfectible, qui me donne cette force au quotidien.

Et bien évidemment, je tiens à remercier mon jury, pour avoir accepté de lire mon travail et de venir en discuter avec moi.

Table des matières

| | |
|--|----------|
| I. Introduction | 8 |
| I.A. L'auxine, une phytohormone essentielle au développement | 8 |
| I.A.1. Biosynthèse de l'auxine..... | 9 |
| I.A.2 Conjugaison et dégradation de l'auxine..... | 11 |
| I.A.3 Transport polarisé de l'auxine..... | 11 |
| I.A.4 La signalisation auxinique : mécanismes de régulation transcriptionnelle en réponse à l'auxine | 13 |
| I.A.4.a. Gènes de réponses à l'auxine..... | 14 |
| I.A.4.b. Les acteurs de la régulation transcriptionnelle..... | 15 |
| I.A.4.b.1. Les protéines à F-box TIR1/AFBs | 15 |
| I.A.4.b.2. Les répresseurs transcriptionnels AUX/IAAs..... | 16 |
| I.A.4.b.3 Les facteurs de transcription ARF | 17 |
| I.A.4.c. Mécanismes de la régulation transcriptionnelle..... | 21 |
| I.A.4.c.1. Le système ubiquitine/protéasome | 21 |
| I.A.4.c.2. Les complexes SCF ^{TIR1/AFB} et la signalisation auxinique..... | 22 |
| I.A.4.d. Complexification de la voie | 24 |
| I.A.4.d.1. Complexité des interactions entre acteurs..... | 24 |
| I.A.4.d.2. Redondances fonctionnelles | 27 |
| I.A.5. Importance des ARFs et de leurs régulations dans le développement..... | 29 |
| I.A.5.a. Profil d'expression et devenir cellulaire..... | 29 |
| I.A.5.b. Régulation post-transcriptionnelle | 30 |
| I.A.5.c. Importance des interactions ARF-AUX/IAA..... | 31 |
| I.A.5.d. Interactions protéiques..... | 33 |
| I.A.5.e. Interconnexion des voies hormonales | 34 |
| I.B. La feuille, un modèle d'étude du développement..... | 35 |
| I.B.1. Initiation des feuilles au MAC..... | 36 |
| I.B.1.a. Importance de l'auxine dans l'initiation des feuilles..... | 36 |
| I.B.1.b. Répression des gènes KNOX..... | 37 |
| I.B.1.c. L'établissement des domaines frontières | 39 |

| | |
|--|-----------|
| I.B.2. L'axe de polarité adaxiale/abaxiale | 40 |
| I.B.3. Croissance de la feuille | 42 |
| I.B.3.a. Contrôle de la prolifération cellulaire | 43 |
| I.B.3.b. Contrôle de l'expansion cellulaire..... | 44 |
| I.B.3.c. Formation des dents | 46 |
| II. Projet de thèse | 52 |
| III. Résultats | 54 |
| III. A. Méthodologie et matériels pour l'analyse des <i>ARFs</i> | 54 |
| III.A.1. Imagerie des profils d'expression | 54 |
| III.A.2. Quantification de la fluorescence. | 58 |
| III.A.3. Cartographie moyenne des profils d'expression | 63 |
| III.A.4. Analyses de la répartition de noyaux en Z | 67 |
| III.A.5. Discussion..... | 68 |
| III.B. Analyse de l'implication des <i>ARFs</i> dans la morphogénèse foliaire | 70 |
| III.B.1. Profils d'expression des <i>ARFs</i> dans la feuille..... | 70 |
| III.B.2. <i>ARF1</i> , <i>ARF3</i> et <i>ARF18</i> | 74 |
| III.B.2.a. Etude du profil d'expression de <i>ARF1</i> , <i>ARF3</i> et <i>ARF18</i> dans Col-0..... | 74 |
| III.B.2.b. Analyse du profil de <i>ARF1</i> , <i>ARF3</i> et <i>ARF18</i> dans des feuilles aux formes modifiées | 83 |
| III.B.2.b.1. <i>ARF1</i> | 83 |
| III.B.2.b.2. <i>ARF3</i> | 86 |
| III.B.2.b.3. <i>ARF18</i> | 86 |
| III.B.2.c. Analyse de l'implication de <i>ARF1</i> , <i>ARF3</i> et <i>ARF18</i> dans la formation des dents..... | 90 |
| III.B..2.c.1. <i>arf1-5 arf3-1</i> | 90 |
| III.B..2.c.2. <i>arf1-5 arf18-2</i> | 94 |
| III.B..2.c.3. <i>arf3-1 arf18-2</i> | 97 |
| III.B.2.d. Discussion..... | 99 |
| III.B.3. <i>ARF6</i> et <i>ARF8</i> | 101 |
| III.B.3.a. Etude du profil d'expression de <i>ARF6</i> et <i>ARF8</i> dans Col-0. | 101 |
| III.B.3.b. Analyse du profil de <i>ARF6</i> et <i>ARF8</i> dans les formes de feuilles modifiées..... | 108 |
| III.B.3.c. Analyse de l'implication de <i>ARF6</i> et <i>ARF8</i> dans la formation des dents | 114 |
| III.B.3.c.1. Phénotype de <i>arf6-2 arf8-3</i> | 114 |
| III.B..3.c.2. Implication de <i>ARF6</i> et <i>ARF8</i> dans l'initiation des dents..... | 115 |

| | |
|--|------------|
| III.B.3.c.3. Implication de <i>ARF6</i> et <i>ARF8</i> dans le maintien de la croissance de la feuille | 117 |
| III.B.3.d. Discussion..... | 119 |
| III.B.4. <i>ARF5</i> | 121 |
| III.B.4.a. Etude du profil d'expression de <i>ARF5</i> dans Col-0 | 121 |
| III.B.4.b. Analyse du profil de <i>ARF5</i> dans les formes de feuilles modifiées..... | 125 |
| III.B.4.c. Analyse de l'implication de <i>ARF5</i> dans la formation des dents..... | 129 |
| III.B.4.c.1. Phenotype de <i>arf5-2</i> | 129 |
| III.B.4.c.2. Implication de <i>ARF5</i> dans le maintien de la croissance de la feuille | 130 |
| III.B.4.d. Discussion..... | 133 |
| IV. Conclusion..... | 135 |
| V. Matériels et méthodes..... | 139 |
| V.A. Matériels | 139 |
| V.B. Analyse des profils d'expression | 141 |
| V.B.1. Microscopie confocale | 141 |
| V.C. Traitements d'image | 142 |
| V.C.1. Répartition des noyaux dans l'épaisseur de la feuille..... | 141 |
| V.C.2. Macro pour quantification de la fluorescence..... | 142 |
| V.C.3. Mesure du ratio de la fluorescence dans la feuille | 142 |
| V.D. Cartographie moyenne des profils d'expression | 143 |
| V.E. Analyse des mutants et des constructions 35S ::CUC2-GRxpARF5 ::GFP..... | 143 |
| V.E.1. Induction au dexaméthasone | 143 |
| V.E.2. Imagerie | 143 |
| V.E.3. Analyse des contours des feuilles | 143 |
| VI. Bibliographie..... | 145 |

Liste des abréviations

| | |
|---|--|
| ABC : ATP-binding cassette | GIFs : GRF-INTERACTING FACTORS |
| AD : domaine accessoire | GRFs : GROWTH- REGULATING FACTORS |
| AIA : acide indole-3-acétique | HD-ZIPIII : class III HOMEODOMAIN-LEUINE ZIPPER |
| AIB : acide indole-3-butyrique | HUD : Hormone Up at Dawn |
| ACI-AIA : acide 4-chloroindole-3-acétique | IAM : indole-3-acetamine |
| APA : acide phénylacétique | IAOx : indole-3-acetaldoxime |
| ANA : acide α -naphtalène acétique | InsP6 : inositol-hexakisphosphate |
| ANT : AINTEGUMENTA | IPyA : acide indole-3-pyruvique |
| ARGOS : <i>AUXIN-REGULATED GENE INVOLVED IN ORGAN SIZE</i> | JLO : JAGGED LATERAL ORGANS |
| ARF : AUXIN RESPONSE FACTORS | KAN : KANADI |
| ARR-A : ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR-A | KIP : KINASE INHIBITOR PROTEIN |
| AS1 : ASYMMETRIC LEAVES | KNAT1 : KNOTTED-LIKE FROM Arabidopsis1 |
| AUX/IAA : AUXIN/INDOL ACETIC ACID | KRP : KIP -RELATED PROTEIN |
| AUX/LAX : AUXIN PERMEASE/LIKE <i>axr</i> : <i>auxin resistente</i> | LBD : <i>LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN</i> |
| BDL : BODENLOS | LOB : LATERAL ORGAN BOUNDARIES |
| BES1 : BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE EMS SUPPRESSOR1 | LOF : LATERAL ORGAN FUSION |
| bHLH : basic Helix-loop-helix | LRR : Leucine Rich Repeat |
| BIN2 : BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE2 | MAC : méristème apicale caulinaire |
| BP : BREVIPEDICELLUS | MDR : MULTI DRUG RESISTANCE |
| BRM : BRAMA | MP : MONOPTEROS |
| BZR1 : BRASSINAZOLE-RESISTANT 1 | NAC : NAM, ATAF1,2, CUC2 |
| CDK : CYCLIN DEPENDANT KINASE | NPA : acide naphthylphthalamique |
| CIN : CINCINNATA | NPH4 : NON PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 4 |
| CLV : CLAVATA | oxIAA : acide 2-oxoindole-3-acétique |
| CO : centre organisateur | PB1 : Phox and Bem1 |
| COI1 : CORONATIVE INSENSITIVE 1 | PGP : P-GlycoProtein |
| CPD : 2-carboxyphenyl-3-phenylpropane-1,2-dione | PHAN : PHANTASTICA |
| CUC : CUP SHAPED COTYLEDONS | PIF4 : PHYTOCHROME INTERATING FACTOR 4 |
| CUL 1 : CULLIN1 | PIN : PIN-formed |
| DPA4 : DEVELOPMENT-RELATED PcG TARGET IN THE APEX 4 | PID : PINOID |
| EAR : ETHYLENE RESPONSE FACTOR ASSOCIATED AMPHILIC REPRESSION | PP2A : protéines phosphatase 2A |
| EPFL2 : EPIDERMAL PATTERNING FACTOR-LIKE 2 | RAV : Related to ABI3/VP1 |
| ER : ERECTA | RBX1 : RING BOX1 |
| ETT : ETTIN | RCO : REDUCED COMPLEXITY |
| GH3 : GRETCHEN HAGEN3 | RS2 : ROUGH SHEATH2 |
| | SAURs : small auxin-up RNAs |
| | SCF : SKP1-Cullin-F-box protein |
| | SHY : SHORT HYPOCOTYL |
| | SKP1 : SUPPRESSOR OF KINETOCHORE PROTEIN 1 |
| | SLR : SOLITARY ROOT |

SWI / SNF : SWITCHING DEFECTIVE/SUCROSE
NONFERMENTING

SYD : SPLAYED

TAS3 : TRANS-ACTING siRNA3

TCP : TEOSINTE BRANCHED1 CYCLOIDEA PCF

TIR1/AFB : TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE
1/AUXIN RELATED F-BOX

TMO7 : TARGET OF MONOPTEROS 7

TPL : TOPLESS

TRA : tryptamine

WUS : WUSCHEL

XTHs : XYLOGLUCANES ENDO-
TRANSGLYCOSYLASE/HYDROLASES

YAB : YABBY

YUC : YUCCA

ZC : zone centrale

ZM : zone médullaire

ZP : zone périphérique

2,4D : l'acide 2,4 dichlorophénoxy acétique

I. Introduction

L'introduction de cette thèse est divisée en deux parties. La première partie concerne l'auxine, les mécanismes de réponses transcriptionnelles qui en sont dépendants et surtout l'importance des ARFs, les facteurs de transcription capables d'induire la transcription des gènes de réponses à l'auxine dans le développement. La seconde partie est consacrée à la formation des feuilles, le modèle développemental de cette thèse, et notamment la mise en place des dents, ces excroissances à la marge foliaire qui permettent la formation d'une marge dentelée. Ce processus constitue à lui seul un modèle de développement. L'implication de l'auxine dans ce processus est également détaillée.

A la suite de cette introduction, les objectifs de la thèse sont exposés.

I.A. L'auxine, une phytohormone essentielle au développement

Dans les années 1880, la première idée d'un messager transporté à travers la plante pour induire une expansion cellulaire anisotrope apparaît avec les expériences sur le tropisme de Charles et Francis Darwin, où des coléoptiles éclairés latéralement s'inclinent en réponse à la lumière. L'idée d'une hormone de croissance à l'origine de ce phénomène apparaît en 1927 avec Nikolai Cholodny mais il faudra attendre 1931 pour que la structure chimique de ce messager, l'auxine, soit identifiée par Kogl et Haagen Smit. L'auxine est majoritairement présente chez *Arabidopsis* sous la forme d'acide indole-3-acétique (AIA) (Novák et al., 2012). Néanmoins, d'autres formes existent telles que l'acide indole-3-butyrique (AIB), l'acide 4-chloroindole-3-acétique (Acl-AIA) et l'acide phénylacétique (APA).

En plus de ces auxines naturelles, des auxines synthétiques existent telles que l'acide 2,4-dichlorophénoxy acétique (2,4D) ou l'acide α -naphtalène acétique (ANA). Ces molécules de synthèse sont généralement utilisées lors d'applications exogènes puisqu'elles sont plus stables. Néanmoins, elles diffèrent des auxines naturelles notamment en ce qui concerne leur transport à l'échelle cellulaire et leur métabolisation (Simon and Petrášek, 2011).

La régulation de l'homéostasie de l'auxine active AIA implique des voies de biosynthèse, de conjugaison, de dégradation et de transport polarisé qui sont présentées dans cette partie.

I.A.1. Biosynthèse de l'auxine

La biosynthèse d'auxine a été pendant longtemps localisée au niveau des organes aériens de la plantes, et plus particulièrement dans les jeunes feuilles qui sont décrites comme une source importante (Ljung et al., 2001). Bien que cette source soit majoritaire, les racines ont également été mises en évidence comme ayant la capacité de synthétiser cette hormone. L'auxine nécessaire au développement des racines peut être soit issus des parties aériennes soit des racines. (Ljung et al., 2005).

L'auxine peut être synthétisée à partir de deux voies, l'une étant dépendante du tryptophane (Figure I.A.1) et l'autre indépendante de cet acide aminé. La voie dépendante du tryptophane assure la majeure partie de la production (Ouyang et al., 2000). Le tryptophane est le produit final de la voie du shikimate. Cette voie permet également la synthèse d'autres acides aminés tels que la phénylalanine et la tyrosine nécessaires au métabolisme secondaire des plantes (Maeda and Dudareva, 2012). Parmi les intermédiaires de la voie du shikimate que sont le phosphate indole-3-glycerol, l'antranilate et le chorismate, il a été mis en évidence que le phosphate indole-3-glycerol était également un intermédiaire de la voie indépendante du tryptophane (Ouyang et al., 2000).

A partir du tryptophane, l'auxine peut être produite par quatre voies de biosynthèse différentes dans le cytosol. Ces voies sont nommées par le premier métabolite formé après cet acide aminé : les voies de l'acide indole-3-pyruvique (IPyA), de l'indole-3-acétamine (IAM), de l'indole-3-acétaldoxime (IAOx) et de la tryptamine (TRA) (Ljung, 2013).

Chez la plante modèle *Arabidopsis*, la majorité de l'auxine est synthétisée à partir de la voie de l'IPyA (Zhao, 2012). Dans cette voie, une aminotransférase TAA1 ou ses homologues TAR1 et TAR2 convertissent le tryptophane en IPyA (Stepanova et al., 2008; Tao et al., 2008) et les enzymes YUCCA (YUC) synthétisent l'auxine à partir du IPyA (Mashiguchi et al., 2011; Stepanova et al., 2011; Won et al., 2011).

La voie de l'IAOx fait intervenir les enzymes de la famille des cytochromes P450, CYP79B2 et CYP79B3, pour convertir le tryptophane en IAOx. Ces enzymes ont été identifiées uniquement chez les Brassicacées (Sugawara et al., 2009).

La voie de l'IAM a été décrite dans les bactéries mais est également présente dans de nombreuses espèces de plantes comme *Arabidopsis*, le tabac, le maïs et le riz (Sugawara et al., 2009; Novák et al., 2012). L'hydrolase IAM (ou AtIAM1 chez *Arabidopsis*) catalyse la réaction entre l'IAM et l'auxine (Pollmann et al., 2006).

La voie TRA est peu présente et peu étudiée chez *Arabidopsis* (Novák et al., 2012).

Bien que les différentes voies de la biosynthèse auxinique soient connues, il reste encore de nombreux acteurs de ces voies à identifier.

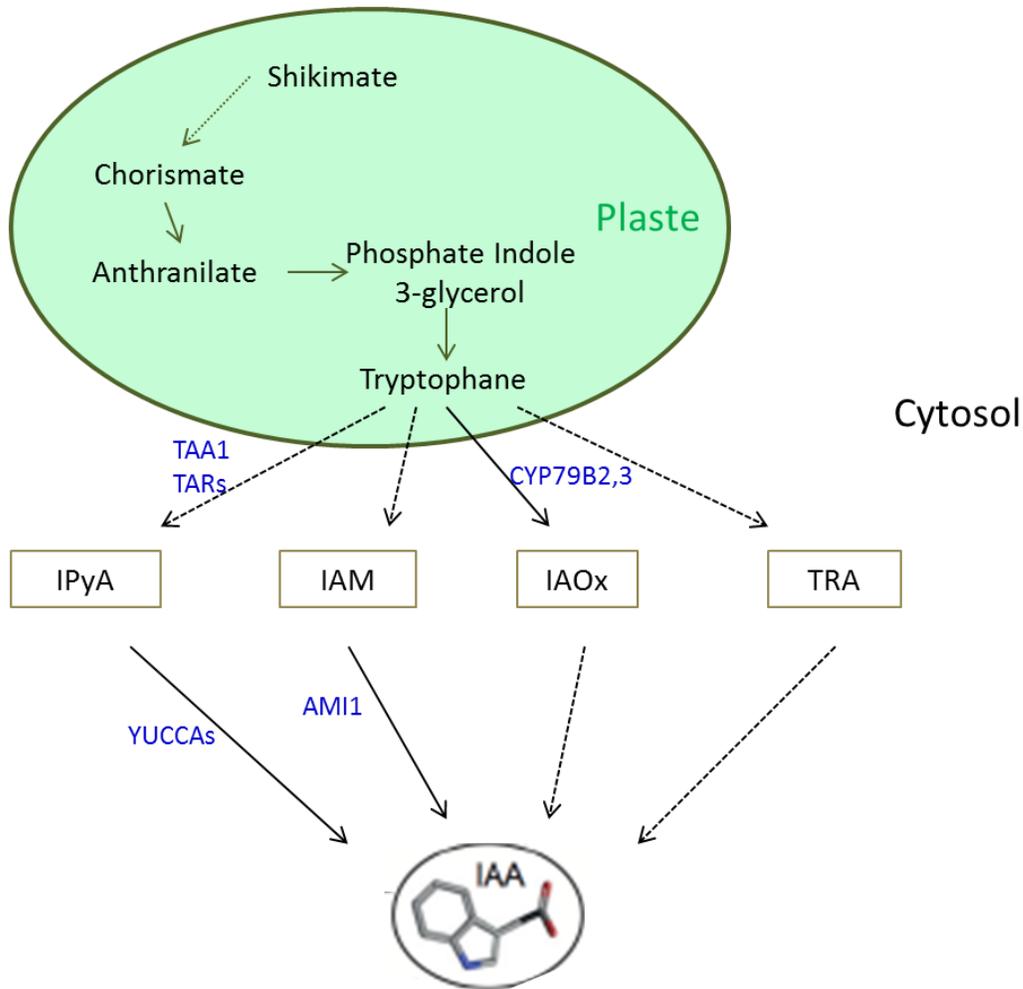


Figure I.A.1. Voies de biosynthèse de l'auxine dépendante du tryptophane.

Le tryptophane est produit dans les plastes à partir de la voie du shikimate qui produit le chorismate. Le chorismate est le précurseur de l'anthranilate, lui-même précurseur de l'indole 3-glycerol. A partir du tryptophane, 4 voies peuvent produire l'auxine (IAA) dans le cytosol. La voie de l'acide indole-3-pyruvique (IPyA), de l'indole-3-acetamine (IAM), de l'indole-3-acetaldoxime (IAOx) et de la tryptamine (TRA). Les enzymes connues de ces voies sont notées en bleues. Les flèches en traits pleins représentent les voies où tous les intermédiaires et enzymes sont connus. Les flèches en pointillés représentent les voies pour tous les intermédiaires et enzymes ne sont pas connus. (Modifié de (Ljung, 2013)).

I.A.2 Conjugaison et dégradation de l'auxine

La conjugaison de l'auxine est nécessaire pour la régulation de son homéostasie, et permet aussi de créer des réserves d'auxine. Cela est notamment retrouvé dans les graines où de nombreux conjugués auxiniques sont présents afin d'être utilisés après hydrolyse pour le développement de l'embryon (Bajguz and Piotrowska, 2009).

Les auxines conjuguées peuvent être réparties en trois groupes en fonction des molécules conjuguées : les conjugués esters qui représentent 1 à 10% de l'auxine de la plante, les amides conjugués à des acides aminés qui sont majoritaires dans la plante à 90% et les peptides et protéines. Les conjugués esters permettent de lier des sucres, tels que l'AIA-glucose et l'AIA-myo-inositol. Ces composés sont catalysés par des UDP glucose transférases qui sont retrouvés dans les monocotylédones et les dicotylédones (Jackson et al. 2001; Ludwig-Muller 2011). Les acides aminés sont conjugués à l'auxine via des enzymes acyl amino-transférases codées par des gènes de la famille des gènes *GH3* initialement identifiés comme étant des gènes induits rapidement en réponse à l'auxine. Parmi les différentes conjugaisons d'acides aminés, certaines sont réversibles et permettent la libération de l'auxine grâce à des amino-hydrolases acides (Davies et al., 1999). Cela est notamment le cas pour les conjugaisons avec la leucine, l'alanine et la phénylalanine. D'autres composés ne sont pas hydrolysables et sont considérés comme des intermédiaires de dégradation de l'auxine. C'est le cas de l'aspartate et du glutamate. Enfin, certains conjugués avec des acides aminés comme la valine et la phénylalanine peuvent être oxydés et rendent ainsi l'auxine inactive. La réaction d'oxydation ne semble pas être réversible, faisant ainsi de ces composés des produits de dégradation de l'auxine (Ostin et al., 1998; Kai et al., 2007).

De plus, l'acide 2-oxoindole-3-acétique (oxIAA) a été montré comme étant un produit de la dégradation de l'auxine puisque ce composé s'accumule rapidement en une dizaine de minutes lorsque l'on applique de l'auxine exogène (Ostin et al., 1998; Novák et al., 2012). Néanmoins, les mécanismes de dégradation sont encore assez méconnus.

I.A.3 Transport polarisé de l'auxine

L'auxine ayant un pKa de 4,8, elle est retrouvée partiellement sous forme protonée (AIAH) dans l'apoplaste (pH = 5,5) et peut ainsi diffuser au travers de la membrane plasmique. Cependant, dans les cellules où le pH cytosolique est d'environ 7, l'auxine sous sa forme anionique (AIA⁻) ne peut sortir par diffusion. Sa sortie nécessite alors des transporteurs d'efflux d'auxine (Robert and Friml, 2009). L'auxine

est transportée des parties aériennes aux racines via le phloème qui assure un transport rapide et de longue distance mais également via un transport plus lent et directionnel de cellule à cellule impliquant des transporteurs d'influx (facilitant l'entrée de l'auxine dans les cellules) et d'efflux (permettant l'exportation de l'auxine), le tout constituant le transport polarisé (Cambridge and Morris, 1996).

Plusieurs familles protéiques de transporteurs ont été identifiées grâce à l'obtention de mutants via des cribles génétiques utilisant de fortes concentrations en auxine, des inhibiteurs de transport ou encore l'observation de phénotypes particuliers tels que le phénotype d'agravitropisme du mutant *pin2/eir1* (Luschnig et al., 1998). Les transporteurs d'efflux appartiennent aux familles PIN (PIN-formed) et d'autres gènes à la famille de transporteurs ABC (pour ATP-binding cassette) (Okada et al., 1991; Noh et al., 2001).

Chez *Arabidopsis*, la famille des PIN comprend 8 membres allant de PIN1 à PIN8 (Zažímalová et al., 2007). PIN1-4 et PIN7 sont localisés à la membrane plasmique. PIN5, PIN6 et PIN8 présentent une structure légèrement différente des autres avec une boucle centrale hydrophile plus courte et pourraient réguler les échanges d'auxine entre le réticulum endoplasmique et le cytosol comme les transporteurs PILs (PIN-likes) qui sont apparentés (Petrasek et al., 2006; Mravec et al., 2008; Mravec et al., 2009; Barbez et al., 2012). Dans la racine où le transport auxinique a été étudié en détail, PIN1 est localisé sur la face apicale des cellules du cylindre central et permet le transport de l'auxine des parties aériennes jusqu'à l'apex racinaire (Gälweiler et al., 1998). Dans le centre quiescent et les cellules adjacentes, PIN4 crée un puit d'auxine alors que PIN3 et PIN7 redistribuent l'auxine dans la coiffe racinaire (Blilou et al., 2005; Vieten et al., 2005). PIN2 qui est sur la face basale des cellules de la coiffe latérale et de l'épiderme permet un transport acropète (ou rétrograde) de l'auxine (Müller et al., 1998).

L'activité des PIN est dépendante de leur localisation membranaire, mais également de leurs modifications post-transcriptionnelles et de leurs interactions avec d'autres protéines à la membrane ce qui permet de déterminer un flux orienté d'auxine et la formation de maxima d'auxine nécessaires à la formation des organes. L'absence de ces transporteurs mène à des défauts de distribution d'auxine ainsi qu'à des anomalies développementales telles que des racines très courtes, des cotylédons malformés ou une absence de primordia floraux sur l'inflorescence (Benková et al., 2003; Petrasek and Friml, 2009).

L'adressage à une face spécifique de la cellule et l'activité des PIN sont dynamiques et déterminés par leur état de phosphorylation. La phosphorylation est contrôlée par les kinases PINOID (PID) ou des protéines kinases D6 (D6PK) et la déphosphorylation par les protéines phosphatase 2A (PP2A) (Michniewicz et al., 2007). La phosphorylation est réalisée au niveau de 4 sérines S1-S4 chez *Arabidopsis*.

In vitro, PID phosphoryle PIN1 préférentiellement aux sérines S1-S3 alors que D6PK phosphoryle PIN4 sur la S4, bien qu'il puisse aussi phosphoryler les trois autres mais de manière moins efficace que ne le fait PID (Zourelidou et al., 2014). La localisation des PIN est également régulée à la membrane plasmique par des mécanismes d'endocytose impliquant des protéines CLATHRINES et des stérols de la membrane. Cela permet le recyclage des PINs lorsqu'ils ne sont plus nécessaires sur une face de la cellule (Willemsen et al., 2003; Dhonukshe et al., 2007).

Chez Arabidopsis, certaines protéines de la famille ABC/PGP (ATP BINDING CASSETTE/ P-GLYCOPROTEIN) classées parmi les MDR (MULTI DRUG RESISTANCE) peuvent transporter l'auxine AIA (Kang et al., 2011). Trois de ces protéines ont été décrites comme des transporteurs d'efflux : PGP1 qui est localisé au niveau des tissus centraux de la racine, et PGP19 est localisé dans l'épiderme et de manière uniforme à la périphérie de la cellule (Geisler et al., 2005; Wu et al., 2007). PGP4 a été décrit comme pouvant être un transporteur d'efflux ou d'influx en fonction des conditions (Terasaka et al., 2005; Kubeš et al., 2012). PGP1 et PGP19 ont également été montrés comme pouvant interagir avec les PIN, ce qui permettrait en fonction des interactions de stabiliser les PINs à la membrane plasmique (Noh et al., 2003; Blakeslee et al., 2007; Titapiwatanakun et al., 2009).

Des transporteurs d'influx ont également été identifiés : les AUX/LAX (AUXIN PERMEASE/LIKE AUX1). Cette sous-famille de perméases comprend quatre membres AUX1, LAX1, LAX2 et LAX3, qui sont également impliqués dans le développement de différents organes et tissus (Parry et al., 2001; Swarup and Péret, 2012). AUX1 régule notamment le gravitropisme des racines, le développement des poils racinaires et la phyllotaxie des feuilles (Swarup et al., 2001; Bainbridge et al., 2008; Jones et al., 2009).

I.A.4 La signalisation auxinique : mécanismes de régulation transcriptionnelle en réponse à l'auxine

L'auxine contrôle de nombreux processus développementaux notamment en jouant sur la division et l'élongation cellulaires, via la transcription de gènes de réponses à l'auxine. Cette transcription est dépendante d'un mécanisme de régulation qui implique majoritairement 3 familles d'acteurs différents : les protéines à F-box TIR1/AFBs (pour TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 et AUXIN RELATED F-BOX) qui participent à des complexes ubiquitine ligase E3 de type SCF (SKP1-Cullin-F-box protein), les répresseurs transcriptionnels AUX/IAA (pour Auxin/Indol Acetic Acid) et les facteurs de transcription de réponses à l'auxine ARFs (pour AUXIN RESPONSE FACTORS). Ces acteurs, ainsi que les mécanismes d'interaction et la

complexité de ces interactions sont présentés dans cette partie.

I.A.4.a. Gènes de réponses à l'auxine

Les gènes de réponses à l'auxine ont été mis en évidence dans les années 1980 sur la base de leur induction très rapide (5 à 15min) lors d'applications d'auxine exogène. Différents groupes de gènes ont été mis en évidence, parmi eux les gènes de la famille des *GH3* (*GRETCHEN HAGEN3*), des *SAURs* (*SMALL AUXIN-UP RNAs*) et des *AUX/IAA*. L'expression de ces gènes, dits de réponse précoce, est réprimée quand il y a peu ou pas d'auxine et rapidement déréprimée en présence d'auxine sans qu'une étape de synthèse protéique soit requise. Ces gènes codent des protéines ayant divers rôles dans la plante.

Plusieurs protéines *GH3* agissent comme des enzymes AIA-amido synthétases lors la conjugaison d'acides aminés à l'auxine et à l'acide jasmonique. Cela permet la régulation du pool d'auxine active et la modulation des réponses auxiniques.

La famille des *SAURs* comprend le plus grand nombre de gènes avec 81 membres chez *Arabidopsis*. Les *SAURs* codent des protéines ayant toutes un domaine SAUR conservé d'une soixantaine d'acides aminés dont la fonction n'est pas élucidée. Des études récentes supportent un rôle positif des *SAURs* dans l'expansion cellulaire permettant l'élongation de l'hypocotyle (Ren and Gray, 2015).

Les *AUX/IAA*, qui codent des répresseurs transcriptionnels à l'auxine sont rapidement et fortement induits par l'auxine. Ces protéines ont une durée de vie de l'ordre de quelques minutes à une dizaine de minutes et l'application d'auxine réduit de deux fois ou plus leur demi-vie (Dreher et al., 2006). L'induction rapide des *AUX/IAA* permettrait de réapprovisionner le pool d'*AUX/IAA* nécessaire à la restauration de la répression des réponses transcriptionnelles après une activation par l'auxine. Ce mécanisme sera détaillé dans le paragraphe I.A.4.c.2.

Depuis l'identification de ces gènes de réponse précoce, un grand nombre d'autres gènes ont été démontrés comme étant directement ou indirectement induits en réponse à l'auxine. Par exemple, les membres de la famille des *PINs*, sont induits par l'auxine, notamment *PIN1*, *PIN3* et *PIN7* dans les tissus racinaires (Friml et al., 2003). Des gènes intervenant dans la régulation du cycle cellulaire ou dans le remodelage de la paroi sont également induits en réponse à une augmentation de l'auxine. L'analyse de données transcriptomiques sur des échantillons traités par de l'auxine révèle aussi que l'expression de très nombreux gènes est réduite en réponse à l'auxine (Paponov et al., 2008; Gupta et al., 2013), là encore dans une fenêtre de temps de quelques minutes à dizaines de minutes. Peu d'études abordent ce sujet par conséquent seuls les mécanismes conduisant à une dé-répression transcriptionnelle sont

abordés ici.

I.A.4.b. Les acteurs de la régulation transcriptionnelle

I.A.4.b.1. Les protéines à F-box TIR1/AFBs

TIR1 appartient à un sous-clade de protéines à F-box de 7 membres (Gagne et al., 2002). AFB1 est étroitement lié à TIR1 puisqu'ils partagent 70% d'identité. AFB2 et AFB3 présentent 80% d'identité entre eux et 60% avec AFB1 et TIR1. AFB4 et AFB5 (76% d'identité) sont plus divergent puisqu'ils ne présentent que 50% d'identité avec TIR1 (Dharmasiri et al., 2005b; Parry et al., 2009), ainsi que la protéine COI1 (CORONATIVE INSENSITIVE 1) qui est nécessaire pour les réponses à l'acide jasmonique et qui présente 30% d'identité avec TIR1 (Xu et al., 2002).

TIR1 et AFB1-5 sont composées d'un domaine F-box ainsi que de 18 domaines LRR (Leucine Rich Repeat) (Figure I.A.2) (Ruegger et al., 1998). TIR1 ainsi que AFB1, AFB2 et AFB3 ont été montrés comme étant des co-récepteurs à l'auxine avec les protéines Aux/IAA (Dharmasiri et al., 2005a; Kepinski and Leyser, 2005). Des expériences de co-immunoprécipitation ont mis en évidence que TIR1 ou AFB1-3 pouvaient interagir avec les sous unités ASK1-CUL pour former un complexe SCF et également s'associer de manière dépendante à l'auxine aux protéines AUX/IAA (Dharmasiri et al., 2005b).

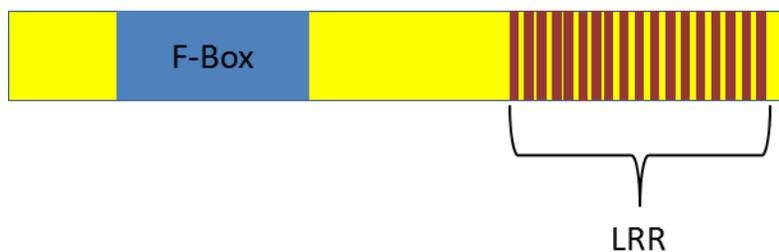


Figure I.A.2. Structure d'une protéine à F-Box TIR1/AFBs.

Les protéines TIR1/AFBs sont composées d'un domaine à F-box ainsi que de 18 domaines LRR (Leucine Rich Repeat) qui permettent l'interaction avec les AUX/IAA.

I.A.4.b.2. Les répresseurs transcriptionnels AUX/IAAs

Les AUX/IAA font partie des premiers gènes de réponses précoces à l'auxine puisqu'ils sont induits dans les 5 à 30 minutes après application exogène d'auxine (Abel and Theologis, 1996). Chez Arabidopsis, les AUX/IAA forment une famille comprenant 29 gènes numérotés de IAA1 à IAA20 et de IAA26 à IAA34, codant des protéines de 18 à 35kDa, à durée de vie très courte (Abel et al., 1994; Abel et al., 1995).

Les protéines AUX/IAA ont des séquences en acides aminés très conservées et sont pour la plupart composées de quatre domaines notés de I à IV (Figure I.A.3). Le domaine I est un domaine d'interaction protéine-protéine et participe avec des co-represseurs à l'activité de répression transcriptionnelle de ces protéines (Tiwari et al., 2004). La fonction de répression du domaine I est dominante par rapport aux domaines d'activation, et cette répression nécessite la présence de résidus leucine conservés dans ce domaine. Ce domaine contient un motif EAR (ETHYLENE RESPONSE FACTOR ASSOCIATED AMPHILIC REPRESSION) où le co-répresseur TOPLESS (TPL) se fixe. TPL permet le recrutement de l'histone déacétylase 19 qui accroît la condensation de la chromatine (Long et al., 2006; Szemenyei et al., 2008; Causier et al., 2012; Wang et al., 2013). C'est ce complexe EAR/TPL/histone déacétylase qui permet la répression transcriptionnelle.

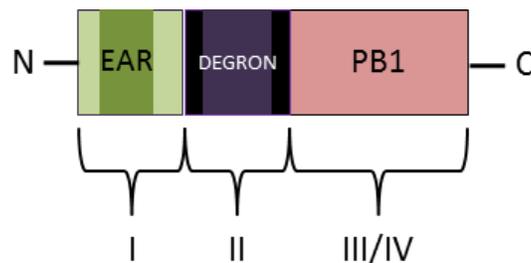


Figure I.A.3. Structure d'une protéine AUX/IAA.

Les AUX/IAA sont composées de 4 domaines. Le premier est un motif de répression. Via son motif EAR, le corécepteur TOPLESS se fixe pour permettre la répression des ARFs. Le domaine II contient un motif degron nécessaire pour l'interaction avec les protéines à F-box TIR1/AFBs. Les domaines III et IV, sont similaires à un domaine PB1 et permettent l'interaction avec les domaines III/IV des ARFs.

Le domaine II est très conservé et contient un motif degron de 13 acides aminés requis pour déstabiliser les AUX/IAA puisqu'il permet l'interaction avec les protéines à F-box TIR1/AFBs en présence d'auxine (Gray et al., 2001). Les domaines III et IV permettent l'homo- ou l'hétérodimérisation entre AUX/IAAs ou

avec les ARFs qui partagent également ces domaines (Ulmasov et al., 1997a). Parmi ces deux domaines, le domaine III apparait essentiel pour l'interaction, puisque sa mutation résulte en une incapacité à dimériser (Ouellet et al., 2001). Ces deux domaines ont été mis en évidence chez les ARFs, comme ayant une structure très similaire à celle du domaine PB1 (Phox and Bem1) (voir le paragraphe suivant sur les ARFs) (Korasick et al., 2014; Nanao et al., 2014).

La plupart des mutants AUX/IAA mis en évidence dans la littérature sont des mutants dominants dits de gain de fonctions causés par un changement d'acide aminé dans le domaine II. Ces mutations altèrent l'interaction avec la protéine à F-box des complexes SCF^{TIR1/AFB} ce qui freine leur dégradation et donc stabilise les AUX/IAA mutés. L'augmentation de la durée de vie des AUX/IAA favorise ainsi la répression transcriptionnelle (Zenser et al. 2001; Zenser et al. 2003; Tiwari et al. 2001). Ces mutants ont été identifiés par le biais de différents cribles génétiques visant soit à identifier des mutations conférant soit une résistance accrue à l'auxine comme pour les mutants *axr2/iaa7*, *axr3/iaa17* et *axr5/iaa19*, soit des altérations phénotypiques telles qu'un hypocotyle court à l'obscurité comme pour *shy1/iaa6* et *shy2/iaa3* ou un défaut d'embryogenèse comme pour *bodenlos/iaa12* qui est dépourvu de racine embryonnaire (Mockaitis, K, Estelle, 2008).

I.A.4.b.3 Les facteurs de transcription ARF

Les ARFs appartiennent à une famille multigénique de 23 membres qui peut être divisée en trois branches phylogénétiques distinctes (Figure I.A.4). La première comprenant ARF5, ARF6, ARF7, ARF8 et ARF19 se caractérise par une région centrale riche en résidus glutamine. La deuxième branche est elle-même divisée en trois sous-groupes comprenant d'une part ARF3 et ARF4, puis ARF1, ARF2, ARF9, ARF11 et ARF18, et enfin les ARF12 à 15 et ARF20 à 23. Les ARFs présents dans ce dernier sous-groupe sont localisés de manière très proche sur le chromosome 1. La dernière branche est constituée de ARF10, ARF16 et ARF17, qui sont tous les trois régulés par le microARN miR160 (Okushima et al., 2005b). Parmi ces 23 ARFs, seule l'expression de *ARF4* et *ARF19* est induite faiblement par l'auxine (Paponov et al., 2008).

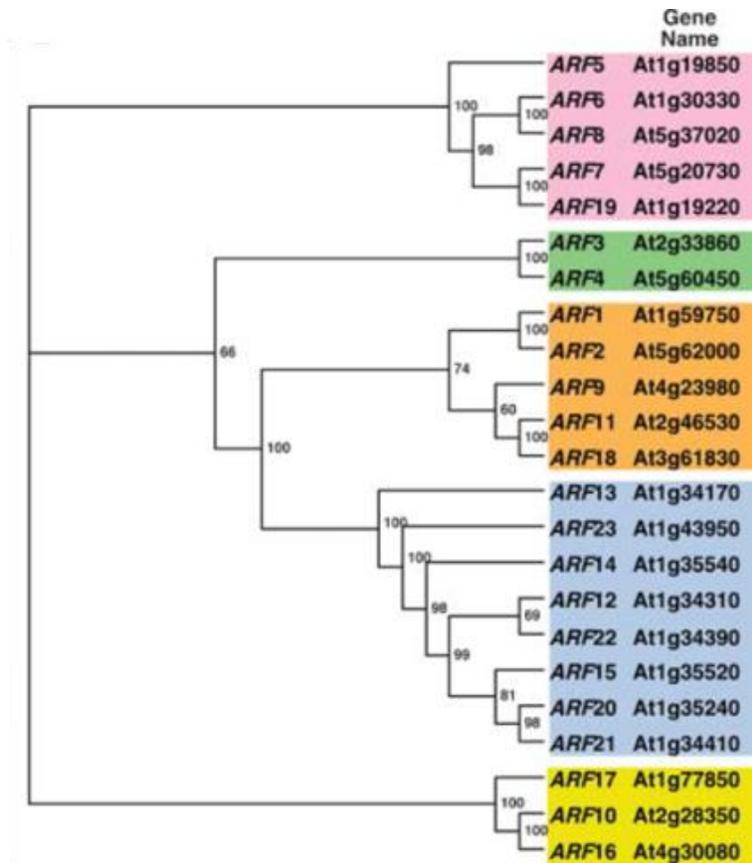


Figure I.A.4. Arbre phylogénétique des ARFs chez Arabidopsis.

Les 23 ARFs présents chez Arabidopsis peuvent être divisés en trois branches phylogénétiques distinctes. L'arbre phylogénétique a été réalisé à l'aide de TreeView (Page, 1996). Les nombres au niveau des embranchements correspondent au nombre de fois où la branche a été retrouvée au cours de l'analyse bootstrap en pourcentage (n= 1000). Les ARFs sont répartis en 5 sous-groupes. (Extrait de (Okushima et al., 2005b).

Seuls quelques simples mutants *arf* présentent des phénotypes visibles. *arf2-8* a des organes plus grands causés par une augmentation des divisions cellulaires (Schruff et al., 2005) tout comme *arf8-3* qui présente des pétales plus grands dû à une augmentation de la fréquence des divisions et de l'expansion des cellules dans cet organe (Varaud et al., 2011).

arf5/monopteros (mp) est dépourvu de racine et d'hypocotyle en raison d'un défaut précoce de divisions cellulaires dans les cellules de l'embryon et du suspenseur (Berleth and Jürgens, 1993). *arf7/nph4-1* a des feuilles épinastriques des tiges d'inflorescence plus courtes et ne présente pas de crosse apicale, ce qui résulte d'une accélération de la croissance des cellules de l'hypocotyle durant l'ouverture, (Stowe-Evans et al., 1998).

Le mutant *arf3/ettin* a des organes floraux très altérés, notamment avec des fusions des régions basale et apicale du gynécée, ainsi que le développement des tissus abaxiaux dans les tissus adaxiaux,

conduisant à une réduction de la zone des ovaires, une expansion du stigmate et du style (Sessions and Zambryski, 1995).

Un ARF « type » est composé d'un domaine de fixation à l'ADN en N terminal, d'une région centrale et de domaines d'interactions III et IV en C terminal, similaires à ceux des AUX/IAAs et qui permettent ainsi la formation d'homodimères ou d'hétérodimères entre les ARFs et les AUX/IAAs (Kim et al., 1997; Tiwari et al., 2003) et d'une région centrale (Figure I.A.5).

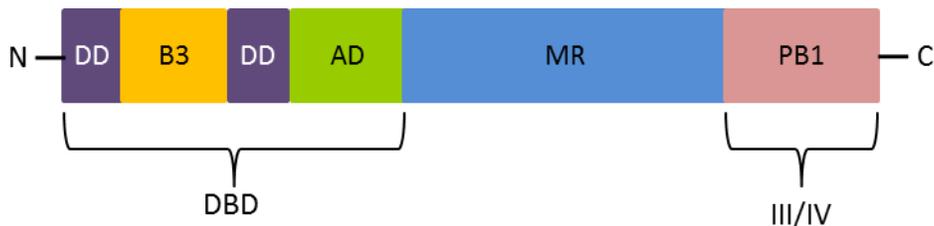


Figure I.A.5. Structure type d'une protéine ARF.

Les ARFs sont composés de 4 domaines distincts. Le premier domaine est un domaine de fixation à l'ADN. Ce domaine est lui-même composé de 3 domaines dont un domaine B3 dont les régions N et C-terminale forment le second domaine : le domaine de dimérisation (DD) qui permettent la fixation aux AuxREs. Le troisième domaine est un domaine accessoire (AD) qui interagit avec le DD. Les ARFs sont également composés d'une région centrale qui confère l'activité transcriptionnelle et d'un domaine III/IV, similaire au domaine PB1 qui permet l'interaction entre ARFs ou avec les AUX/IAA.

Le domaine de fixation à l'ADN permet et est suffisant pour la fixation aux éléments de réponses à l'auxine (AuxREs) retrouvés dans les régions promotrices des gènes de réponses à l'auxine. Le motif TGTCTC a été initialement identifié comme AuxRE et des variants ont été décrits plus récemment tels que TGTCGG qui est le site de fixation préférentiel de ARF1 et ARF5 (Abel et al., 1996; Ulmasov et al., 1997a; Ulmasov et al., 1999a; Tiwari et al., 2003; Boer et al., 2014).

La cristallisation du domaine de fixation à l'ADN a mis en évidence qu'il était composé de différents domaines (Boer et al., 2014). Le premier est le domaine B3 dont les régions N et C-terminales forment ensemble un second domaine qui constitue un domaine de dimérisation (DD), ce sont ces domaines qui se fixent aux AuxREs. Le dernier domaine, situé en C-terminal et comprenant 80 résidus, est un domaine accessoire (AD) qui interagit étroitement avec le domaine de dimérisation. L'analyse de la dimérisation d'une protéine ARF5 tronquée au niveau de ses domaines III/IV suggère que le domaine de dimérisation à l'ADN est suffisant pour la dimérisation des ARFs in vitro, bien que les domaines III et IV aident à

stabiliser des dimères. De plus, la capacité de dimérisation des ARFs dépend de leur capacité de fixation aux AuxREs. Certains résidus dans le domaine B3 confèrent la spécificité de fixation tel que les résidus R215 et P218 alors que d'autres comme H170 contribuent à l'affinité à l'ADN. De plus, en fonction de la distance séparant les deux AuxREs, les ARFs n'auront pas la même capacité à se fixer sur ces motifs. En effet, lorsque les motifs des deux AuxREs sont séparés de 5, 6 ou 9 résidus, l'affinité du domaine de fixation de ARF1 est fortement réduite contrairement à celle de ARF5 (Boer et al. 2014).

La région centrale a été montrée comme pouvant activer ou réprimer la transcription en transfection de protoplastes à l'aide du système GAL4 de levure, où le DBD de l'ARF est remplacé par celui de GAL4. Sur la base de cette expérience, ont été qualifiés d'activateurs les protéines ARF ayant une région centrale riche en résidus glutamine c'est-à-dire ARF5-8 et ARF19 alors que les autres gènes ayant une région centrale riche en proline/sérine/glycine ont été qualifiés de répresseurs (Ulmasov et al., 1999b; Tiwari et al., 2003). Cette notion, même si elle perdure à ce jour doit cependant être nuancée. En effet, en fonction du contexte développemental, un ARF activateur peut se comporter comme un répresseur. Les analyses transcriptomiques de (Simonini et al., 2017) indiquent en effet qu'ARF3 fonctionne soit comme un répresseur soit comme un activateur transcriptionnel. Le profil transcriptomique du double mutant *arf7-1 arf19-1* montre un changement d'expression de gènes induits et réprimés par l'auxine, ce qui suggère que ces deux ARFs pourraient avoir la capacité d'agir soit comme des activateurs, soit comme des répresseurs (Okushima et al., 2005b).

Tous les ARFs, à l'exception de ARF3 et ARF17 possèdent un domaine C-terminal semblable aux séquences en acides aminés des domaines III et IV des *AUX/IAA* (Guilfoyle and Hagen, 2001) permettant les homodimérisations et les hétérodimérisations avec les ARFs et les *AUX/IAA* (Kim et al., 1997; Ulmasov et al., 1997b). Ces domaines ont été montrés en transfection de protoplastes comme étant requis pour les réponses auxiniques précoces notamment pour les gènes GH3 (Ulmasov et al., 1999b; Tiwari et al., 2003). La cristallisation du domaine III/IV de ARF5 et ARF7 a mis en évidence que ce domaine présente une structure très similaire à celle du domaine PB1 (Phox and Bem1) avec une longue hélice- α en C-terminal. Les domaines III et IV forment chacun un monomère contenant 2 interfaces : l'une enrichie en lysine et l'autre présentant un motif OPCA contenant des aspartates. Les lysines et le motif OPCA rendent respectivement ces régions basiques et acides. Les deux monomères interagissent de manière inversée soit la tête avec la queue de l'autre pour former un oligomère. La mutation d'une ou des deux faces conduit à une incapacité à former un oligomère. Il a également été montré que les *AUX/IAA*

peuvent interagir avec les ARFs via l'une des faces du domaine PBI (Korasick et al., 2014; Nanao et al., 2014).

I.A.4.c. Mécanismes de la régulation transcriptionnelle

I.A.4.c.1. Le système ubiquitine/protéasome

Chez les eucaryotes, le système ubiquitine/protéasome est important dans la régulation des activités cellulaires. Ce système est dépendant de l'action de 3 enzymes: E1, E2 et E3, qui peuvent lier et transférer sur des protéines cibles une ou plusieurs molécules d'ubiquitine qui sont des protéines de 76 acides aminés à des protéines cibles spécifiques (Hershko and Ciechanover 1998).

Dans un premier temps, l'enzyme E1 hydrolyse l'ATP pour former un intermédiaire où l'enzyme est liée à une ubiquitine (E1-Ub) via une liaison thioester qui lie la partie C terminale de l'ubiquitine à E1, cette étape permet d'activer l'ubiquitine. L'enzyme E2 permet ensuite la conjugaison de l'ubiquitine activée via un résidu cysteinyl, puis grâce à l'enzyme E3, l'E2-Ub peut être conjuguée à l'ubiquitine via un résidu lysine de la protéine substrat (Hershko et al., 1983).

Ce sont les enzymes ligase-ubiquitine E3 qui permettent la spécificité d'ubiquitination en interagissant avec le substrat de façon directe. Ces enzymes E3 peuvent être réparties en plusieurs groupes basés sur leur structure et leur fonction, le groupe le plus important chez les plantes étant les E3s Cullin-RING qui comprennent les complexes SCF (Gagne et al., 2002). Ces complexes sont composés de SKP1 (SUPPRESSOR OF KINETOCHORE PROTEIN 1) ou ASK1 chez Arabidopsis, CUL 1 (CULLIN1), RBX1 (RING BOX1) et une protéine à F-box qui chez les plantes constituent une très large famille de plus de 700 gènes (Skowyra et al. 1997).

CUL1 constitue le cœur du complexe SCF, interagissant d'une part avec RBX1 qui permet de lier l'enzyme E2 conjuguée à l'ubiquitine et d'autre part avec ASK1 qui interagit avec les protéines à F-box lesquelles amènent la spécificité d'interaction avec la cible protéique. De plus, CUL1 peut être modifiée de façon réversible par une ubiquitine-like, RUB1. Ainsi le complexe SCF est dynamique et s'assemble ou se désassemble pour son activité (Zheng et al., 2002). Lorsque l'attachement de l'ubiquitine à la protéine substrat est réitéré plusieurs fois via la lysine 48, une longue chaîne d'ubiquitines est formée et permet la dégradation de cette protéine par le protéasome 26S.

I.A.4.c.2. Les complexes SCF^{TIR1/AFB} et la signalisation auxinique

Un complexe ubiquitine ligase E3 de la catégorie des SCF intervient dans la signalisation auxinique avec les protéines à F-box de la famille TIR1/AFBs.

La signalisation auxinique qui se déroule dans le noyau et qui régule l'expression des gènes en réponse à l'auxine peut être résumée par l'action et l'interaction des trois groupes d'acteurs précédemment présentés.

Lorsque les concentrations en auxine du milieu sont faibles, les AUX/IAA peuvent interagir avec les ARFs via les domaines III/IV, ce qui crée un encombrement spatial, empêchant la formation de dimères d'ARFs et donc la transcription des gènes. Outre l'inhibition des ARFs activateurs par cette interaction directe, la répression est renforcée par la déacétylation des histones résultant des interacteurs du domaine I des AUX/IAA (cf paragraphe I.A.4.b.2) (Long et al., 2006; Szemenyei et al., 2008; Causier et al., 2012; Wang et al., 2013).

Quand les concentrations en auxine deviennent plus importantes, les complexes E3-SCF^{TIR1/AFBs} recrutent les AUX/IAA en présence d'auxine. L'étude cristallographique de la structure de TIR1 a mis en évidence que les domaines LRR étaient à l'origine de l'interaction avec les AUX/IAA. En effet, l'auxine est reconnue dans la partie basale de la surface de la poche formée par les LRR. L'auxine est fixée grâce à un groupe carboxyl qui permet la formation d'un pont salin et de liaisons hydrogènes avec deux résidus : Arg403 qui est lié à InsP6 (inositol-hexakisphosphate) un cofacteur de TIR1, et Ser438 (Tan et al., 2007).

La molécule d'auxine ainsi fixée joue alors le rôle de « glue » et permet la formation d'un centre hydrophobe continu permettant ainsi la fixation des AUX/IAA. En effet, le domaine degron des AUX/IAA présente une séquence majoritairement hydrophobe et un motif central GWPPV très conservé. Dans ce motif, un tryptophane et une proline interagissent avec la surface de la poche hydrophobe de TIR1 et se collent contre l'auxine (Tan et al., 2007; Calderón Villalobos et al., 2012).

Les complexes E3-SCF^{TIR1/AFBs} assurent ensuite l'ubiquitination des AUX/IAA (Gray et al., 2001). La polyubiquitination des AUX/IAA permet leur dégradation via le protéasome 26S (Ramos et al., 2001; Dharmasiri et al., 2005a; Kepinski and Leyser, 2005). Les ARFs ainsi libérés s'associent en dimère au niveau des AuxREs et peuvent activer la transcription (Hagen and Guilfoyle, 2002) (Figure I.A.6). Ces caractéristiques ont été utilisées pour créer des constructions rapportrices des réponses précoces à l'auxine. Ce fut tout d'abord le cas du rapporteur DR5 couplé à la β -glucuronidase puis à des protéines fluorescentes dont le promoteur synthétique est composé de plusieurs AuxREs mis en tandem et qui

permet de visualiser les réponses transcriptionnelles (Ulmasov et al., 1997b). Plus récemment le rapporteur DII-VENUS, constitué du domaine DII de IAA28 sous contrôle d'un promoteur constitutif permet de visualiser très rapidement la dégradation médiée par les complexes $SCF^{TIR1/AFBs}$ en réponse à l'auxine (Brunoud et al., 2012).

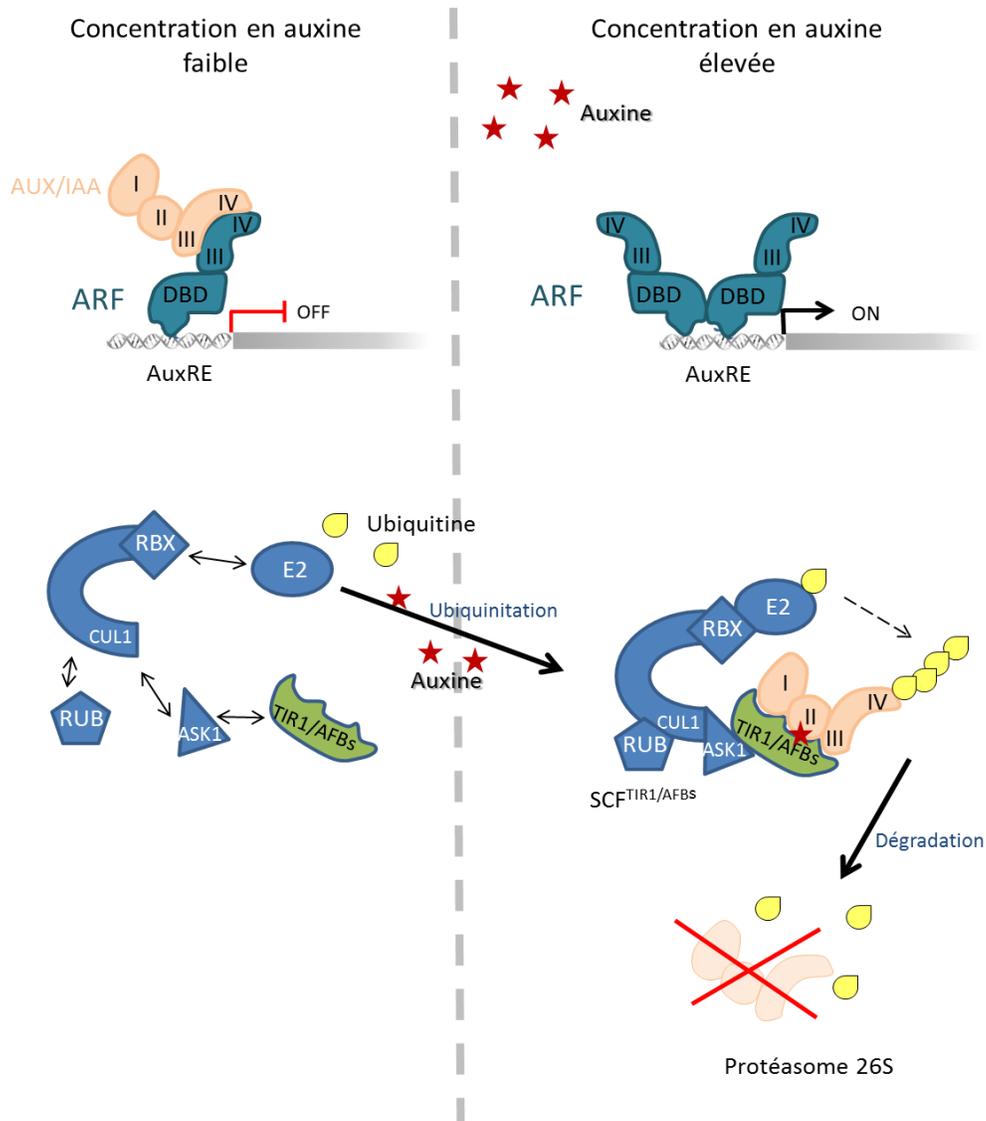


Figure I.A.6. Modèle simplifié de la signalisation auxinique.

Lorsque les concentrations en auxine sont faibles, le complexe $SCF^{TIR1/AFBs}$ n'est pas assemblé et les AUX/IAA interagissent avec les ARFs via leur domaine III et IV pour bloquer la transcription des gènes de réponses à l'auxine. Quand les concentrations en auxine deviennent plus favorables, le complexe $SCF^{TIR1/AFBs}$ s'assemble et les protéines à F-box TIR1/AFBs peuvent interagir avec les protéines AUX/IAA via l'auxine, qui deviennent ainsi le substrat du complexe SCF. Les AUX/IAA sont polyubiquitinés et dégradés via le protéasome 26S. Les ARFs sont ainsi libérés et peuvent activer la transcription des gènes de réponses à l'auxine. Cela est possible grâce à la fixation des ARFs aux AuxREs présents dans le promoteur des gènes.

Des données récentes mettent en évidence que l'état d'activation des ARFs activateurs nécessiterait un remodelage de la chromatine médié par l'ARF lui-même. ARF5 a en effet été montré comme interagissant physiquement via sa région centrale avec des sous-unités ATPase de remodelage de la chromatine du complexe SWI / SNF (SWITCHING DEFECTIVE/SUCROSE NONFERMENTING) : BRAMA (BRM) ou SPLAYED (SYD) (Bezhani et al., 2007; Clapier and Cairns, 2009). BRM et SYD ont la capacité de casser la liaison entre l'ADN et l'histone. Il est ainsi proposé que lorsque le niveau d'auxine est bas, ARF5 soit réprimé par IAA12/BDL (BODENLOS), TPL et HDA19 qui maintiennent la chromatine dans un état réprimé. La présence de ce complexe empêcherait l'association du complexe ATPase SWI/SNF avec ARF5. A niveau élevé d'auxine, IAA12/BDL est dégradé par le protéasome libérant ainsi ARF5 qui recrute les complexes de remodelage de la chromatine BRM et SYD pour déréprimer la chromatine et permettre la transcription des gènes (Wu et al., 2015). Bien que montré uniquement avec ARF5, ce mécanisme pourrait être répandu à tous les ARFs activateurs.

De plus, la signalisation auxinique a récemment été mise en évidence comme pouvant également être médiée par ARF3/ETT via une voie alternative indépendante des AUX/IAA. ARF3/ETT contrôle l'expression de gènes via son interaction avec des facteurs de transcription. Cette interaction est modulée par l'auxine, et en particulier l'AIA, facilitant ainsi les changements spatio-temporels des réponses transcriptionnelles durant la morphogénèse (Simonini et al., 2016; Simonini et al., 2017).

I.A.4.d. Complexification de la voie

De par le nombre élevé des membres de chaque famille des TIR1/AFBs, AUX/IAA et ARFs, des redondances fonctionnelles ainsi que différentes interactions entre ces acteurs modulent le mécanisme général de la régulation transcriptionnelle.

I.A.4.d.1. Complexité des interactions entre acteurs

I.A.4.d.1.1. Les co-récepteurs TIR1/AFBs-AUX/IAA

A partir du postulat que les protéines à F-box TIR1/AFBs ont des rôles similaires mais non identiques dans la signalisation auxinique, et que cela pourrait être dû à des différences d'interactions avec les AUX/IAA, des expériences de double hybride en levures ont été réalisées pour tester les différentes

combinaisons de co-récepteurs TIR1/AFB-AUX/IAA. Des relations dose-dépendante à l'auxine différentes en fonction des interactants ont ainsi été mises en évidence. Alors que IAA7 interagit avec TIR1 et AFB2 même en absence d'auxine, IAA5 ou IAA8 interagissent avec les F-box à partir de 0,1 μ M d'auxine alors que d'autres IAA comme IAA12 nécessitent une concentration en auxine près de 1000 fois plus élevée (100 μ M) pour interagir avec AFB2. Comme attendu, IAA20 qui ne possède pas de domaine II n'interagit avec aucun des TIR1/AFBs même aux fortes concentrations en auxine, soulignant ainsi l'importance de ce domaine dans l'interaction avec les protéines à F-box (Calderón Villalobos et al., 2012).

Les régions en dehors du domaine II contribuent également à l'interaction puisque le domaine II seul d'un AUX/IAA ne permet pas d'obtenir des affinités identiques à celles de la protéine entière correspondante. De plus, l'affinité pour l'auxine d'un co-récepteur donné est également déterminée par les AUX/IAA. En effet, alors que IAA14 et IAA17 présentent des séquences très proches, les interactions qu'ils forment avec TIR1 présentent des affinités pour l'auxine différentes : le couple TIR1-IAA14 fixe l'auxine avec une affinité élevée ($K_d \approx 10$ nM) alors que le couple TIR1-IAA17 fixe l'auxine avec une affinité plus faible ($K_d \approx 30$ nM)(Calderón Villalobos et al., 2012) .

Ces diverses combinaisons de TIR1/AFB-AUX/IAA de faible ou forte affinités permettent ainsi une modulation de la signalisation auxinique dans les différents tissus de la plante.

I.A.4.d.1.2. Les interactions AUX/IAA-ARFs

Des expériences de co-transformation en levure ont mis en évidence que tous les ARFs activateurs interagissent avec tous les AUX/IAA à l'exception de ARF7 avec IAA7. A l'inverse, les ARFs dits répresseurs n'interagissent qu'avec certains AUX/IAA (Vernoux et al., 2011; Piya et al., 2014) (Figure I.A.7).

Pour être pertinents *in vivo*, il est essentiel que les gènes ARF et AUX/IAA dont les protéines sont susceptibles d'interagir soient exprimés dans un même tissu à un même stade de développement donné.

Cette spécificité des couples ARF-AUX/IAA co-exprimés dans les mêmes tissus serait à l'origine des réponses spécifiques à l'auxine dans les différents tissus. Par exemple, ARF5/MP et IAA12/BDL, qui présentent respectivement un mutant nul et un mutant gain de fonction ayant un défaut de division dans l'embryon et d'initiation de méristème racinaire, sont co-exprimés dans l'embryon afin d'initier le

méristème racinaire (Weijers et al., 2005).

Les interactions ARF-AUX/IAA jouent un rôle essentiel dans les processus développementaux, en induisant ou réprimant au moment opportun la transcription des gènes en réponse à une variation des contenus en auxine.

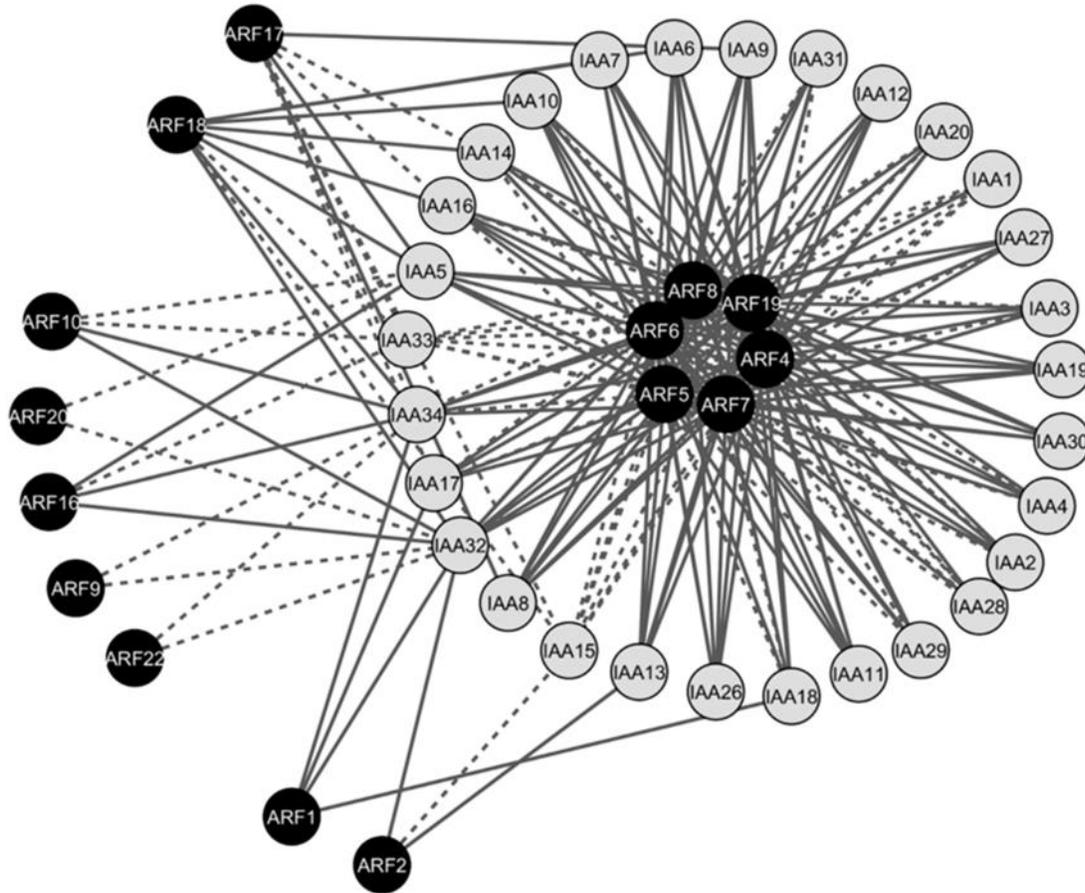


Figure I.A.7. Réseau de co-expression de gènes des protéines ARF-AUX/IAA qui interagissent.

Le réseau est composé de 15 ARFs et 29 AUX/IAAs, formant 213 combinaisons d'interactions. Les interactions sont représentés par des traits pleins qui représentent les paires dont les profils coïncident dans au moins un tissu ou des traits en pointillés dont les profils d'expression n'ont pas été corrélé dans un tissu (Piya et al., 2014).

I.A.4.d.2. Redondances fonctionnelles

I.A.4.d.2.1. Redondance des TIR1/AFBs

L'analyse des profils d'expression des promoteurs des gènes *TIR1*, *AFB1*, *AFB2* et *AFB3* a révélé qu'ils présentent tous des profils relativement similaires et très étendus dans la plante, que ce soit dans la racine primaire, les racines latérales, les vaisseaux, les cotylédons, les feuilles ainsi que dans les organes floraux matures (Dharmasiri et al., 2005b; Parry et al., 2009). A l'inverse, pour les protéines, alors que *AFB1* est présent en abondance dans l'ensemble de la plantule, les profils des protéines *TIR1*, *AFB2* et *AFB3* sont restreints aux organes en croissance (Parry et al., 2009). La différence résulte de la régulation de *TIR1*, *AFB2* et *AFB3* par le microARN, *mir393*, contrairement à *AFB1* qui n'est pas cible (Jones-rhoades and Bartel, 2004; Navarro et al., 2006; Parry et al., 2009).

TIR1 est la protéine la plus étudiée parmi ces F-Box. Le mutant nul *tir1-1* a été mis en évidence dans un criblage de mutants résistants aux inhibiteurs de transport auxinique que sont l'acide naphthylphthalamique (NPA) et le 2-carboxyphenyl-3-phenylpropane-1,2-dione (CPD) (Ruegger et al., 1997). Ce mutant présente de légers défauts dans les processus développementaux dépendant de l'auxine tels que la croissance racinaire, l'initiation des racines latérales, et l'élongation de l'hypocotyle (Ruegger et al. 1998). *ABF2* a également été montré comme contribuant aux réponses à l'auxine dans la racine en amplifiant les phénotypes observés dans le mutant *tir1-1*, alors que les mutations de *AFB1* et *AFB3* ne montrent pas d'aggravation des réponses à l'auxine lorsque *TIR1* est déjà muté. Cependant, la formation d'un triple mutant *tir1afb2afb3* présente une résistance accrue au 2,4D, contrairement au triple *tir1afb1afb2* (Parry et al., 2009) ce qui suggère une contribution plus importante de *AFB3* que de *AFB1* dans la signalisation de l'auxine dans ces conditions .

Les simples mutants *tir1* ou *afb* sont donc peu affectés du fait de la redondance fonctionnelle et les défauts de réponse à l'auxine sont d'autant plus importants que le nombre de gènes mutés est important. *AFB1* contribue de manière moindre que *TIR1*, *AFB2* et *AFB3* aux réponses auxiniques. Les phénotypes observés dans les triples ou quadruples mutants peuvent être répartis en trois classes en fonction de la gravité de leur phénotype, la classe I présentant les phénotypes les plus sévères avec une absence de racine, un seul cotylédon formé et un hypocotyle absent ou rudimentaire comme pour le mutant nul *mp/arf5* ou le mutant de gain de fonction *bd1/IAA12*. Les phénotypes les moins affectés de la classe III présentent des défauts de gravitropisme, peu de poils racinaires et une croissance réduite (Dharmasiri et al., 2005b; Parry et al., 2009). Ces différences de phénotypes sont interprétées comme

résultant de phénomènes de compensation impliquant potentiellement d'autres gènes de la famille tels que *AFB4* et *AFB5* qui sont plus distants et dont les mutants sont fortement résistants au piclorame, qui est un désherbant ayant une activité auxinique (Calderón Villalobos et al., 2012).

I.A.4.d.2.2. Redondance des AUX/IAA et des ARFs

Contrairement aux TIR1/AFBs, les profils d'expression de tous les membres des familles des AUX/IAA et des ARFs ne sont pas connus en détail. Cela peut être en partie expliquée par la durée de vie courte des protéines AUX/IAA ainsi que par la faible détection de certains ARFs avec les constructions disponibles (Abel and Theologis, 1996; Rademacher et al., 2011). De plus, la plupart des gènes étudiés le sont dans un premier temps parce que leur mutant présente un phénotype remarquable. Or, chez les AUX/IAA, aucun mutant d'insertion T-DNA n'aboutit à un phénotype significatif, et même la combinaison de plusieurs mutations nulles dans des triples, voire quadruples mutants peut résulter dans une absence de phénotypes (Overvoorde et al., 2005). Compte tenu de la durée de vie très courte des AUX/IAA, les protéines n'ont pu être visualisées *in vivo*.

La plupart des ARFs semblent également être impliqués à plusieurs dans les mêmes processus développementaux, puisqu'il faut généralement générer des doubles mutants pour observer une altération phénotypique. Cela est par exemple observé pour le double mutant *arf10-2 arf16-2* qui présente des défauts de croissance dans la partie distale de la racine avec des divisions cellulaires excessives et une absence de différenciation, ainsi que des défauts de gravitropisme. ARF10 et ARF16 apparaissent donc comme nécessaire au développement de l'apex racinaire (Wang, 2005). La formation de certains doubles mutants permet d'accroître la sévérité des phénotypes de simples mutants comme le double mutant *arf7/nph4-1 arf19-1* amplifie les défauts du simple mutant *arf7/nph4-1* (Okushima et al., 2005b).

Les différents acteurs des familles de protéines impliquées dans la transcription des réponses à l'auxine présentent donc une forte redondance fonctionnelle.

La régulation de processus développementaux dépendant de l'auxine nécessite l'intervention de nombreux acteurs de la signalisation auxinique. Les interactions entre les différents acteurs, et notamment les TIR1/AFBs-AUX/IAA, sont dépendantes de la concentration en auxine du milieu, ainsi que l'abondance relative d'une protéine par rapport à une autre à un instant T. En effet, l'abondance relative

d'un ARF répresseur par rapport à un ARF activateur, en compétition pour le même AuxRE, permet la modulation des réponses transcriptionnelles.

I.A.5. Importance des ARFs et de leurs régulations dans le développement

I.A.5.a. Profil d'expression et devenir cellulaire

Les profils d'expression des *ARFs* ont été mis en évidence dans l'embryon et la racine à l'aide de constructions rapportrices transcriptionnelles pARF::GFP (Rademacher et al., 2011). Deux groupes d'ARFs ont ainsi été mis en évidence comme étant associés respectivement aux activités de divisions cellulaires autour et dans le centre quiescent ou dans les activités d'élongation cellulaire plus distale de l'apex racinaire. Cela révèle alors que ce n'est pas seulement l'activité d'un ARF qui est importante mais plutôt la combinaison de plusieurs ARF à un instant T dans une cellule donnée pour définir des réponses cellulaires robustes. Ces cartographies permettent également de guider les combinaisons de mutants pertinentes et de révéler des fonctions masquées par la redondance fonctionnelle. Par exemple, ARF6 agit de manière redondante avec ARF5 dans l'initiation de la racine embryonnaire, ou encore de ARF9 et ARF13, qui avec le répresseur IAA10, interviennent dans les cellules du suspenseur pour contribuer à l'acquisition des caractéristiques de l'hypophyse (Rademacher et al., 2012). De plus, dans la majorité des types cellulaires, des ARFs activateurs et répresseurs sont co-exprimés à l'exemple de l'activateur ARF6 et des répresseurs ARF1 et ARF2 dans le contrôle des divisions cellulaires de l'embryon (Rademacher et al., 2011). L'équilibre des actions de ces ARFs sur les gènes cibles pourraient être plus robustes que celle d'un simple ARF activateur ou répresseur.

Des hybridations *in situ* au niveau du méristème apicale caulinaire (MAC), ont également révélé que 13 ARFs sont exprimés dans cette zone, et que certains ARFs sont co-exprimés. Par exemple, ARF3 colocalise avec ARF5 entre la zone centrale et la zone périphérique.

A l'aide de ces analyses de profil d'expression, de données de modélisation et de doubles hybride en levure, un interactome ARF-AUX/IAA a également été proposé dans le méristème (Vernoux et al., 2011). La résolution spatiale est moins précise que dans le cas de l'embryogénèse, permettant seulement de définir deux zones distinctes ayant des sensibilités à l'auxine différentes. Les prédictions de modélisation mettent en évidence une faible sensibilité à l'auxine dans la zone centrale alors que la zone périphérique

a une sensibilité plus importante, notamment au niveau des primordia latéraux qui présentent un fort niveau d'expression des ARFs ARF3, ARF4 et ARF6.

Ainsi, les diverses associations des profils d'expression des acteurs de la signalisation de l'auxine forment une combinaison complexe impliquant des réseaux des gènes permettant des réponses à l'auxine robustes.

I.A.5.b. Régulation post-transcriptionnelle

Trois groupes d'ARFs sont régulés post-transcriptionnellement via l'action de microARN ou de tasiARN. miR167 a été mis en évidence comme pouvant contrôler ARF6 et son orthologue ARF8 (Rhoades et al., 2002; Bartel and Bartel, 2003). Ces deux ARFs coordonnent le développement des pétales, ainsi que des organes mâle et femelle à la transition entre le bourgeon fermé et la fleur fertile, contribuant ainsi à une fertilisation efficace. La mutation de ces deux ARFs entraîne un phénotype nain et stérile, avec des défauts de développement des organes floraux (Nagpal et al., 2005). La mutation de miR167 cause une expression ectopique de ARF6 et ARF8 dans les ovules et les anthères, là où est normalement présent le miARN, entraînant ainsi un arrêt de croissance des téguments de l'ovule et une croissance anormale des anthères qui deviennent incapables de libérer le pollen (Wu et al., 2006). Ainsi, le contrôle des transcrits de *ARF6* et *ARF8* par miR167 est essentiel pour le développement des ovules et des anthères.

miR160 a été mis en évidence comme étant complémentaire des ARFs répresseurs ARF10, ARF16 et ARF17 (Rhoades et al., 2002). Ces trois ARFs partagent une forte similarité de séquence en acides aminés, certainement à l'origine de l'absence de phénotype dans les simples mutants *arf10-1* et *arf16-1* (Okushima et al., 2005b). Le double mutant *arf10 arf16* a été rapporté comme ayant un défaut de pointe racinaire, de croissance dans la partie distale de la racine avec une division cellulaire excessive et une absence de différenciation, ainsi que des défauts de gravitropisme, indiquant ainsi que ARF10 et ARF16 sont nécessaires au développement de la pointe racinaire, plus particulièrement en restreignant la niche de cellules souches et en promouvant la différenciation des cellules de la columelle. La surexpression de miR160 entraîne un phénotype similaire à celui du double mutant *arf10 arf16*, indiquant ainsi que miR160 contrôle bien l'expression de ces ARFs pour un développement normal de la coiffe (Wang, 2005).

L'importance de la régulation négative de *ARF10* par miR160 a également été mise en évidence dans la germination et la post-germination des graines. Des plantes transgéniques exprimant une forme de

ARF10 résistante à miR160 présentent des défauts développementaux tels que des feuilles plus découpées, des siliques enroulées, ainsi que des tiges et fleurs tordues. Durant la germination, ces plantes transgéniques présentent également une hypersensibilité à l'acide abscissique de manière dose-dépendante mettant en évidence que la régulation de *ARF10* par miR160 permet de contrôler les mécanismes impliquant les interactions des voies hormonales de l'auxine et de l'acide abscissique (Liu et al., 2007).

Le phénotype des plantes transgéniques *ARF10* résistant à miR160 est également retrouvé dans les plantes transgéniques *ARF17* résistante à ce miARN. Ces anomalies phénotypiques ont été montrées comme étant causées par un défaut d'accumulation des gènes inductibles par l'auxine GH3 (Mallory et al., 2005). De plus, le mutant *foc (floral organs in carpels)* qui a un transposon inséré dans la région de régulation 3' de *MIR160a* présente également de nombreux défauts, incluant des organes floraux dans les siliques, des feuilles de rosettes découpées, des fleurs irrégulières ou encore une réduction de la fertilité (Liu et al., 2010).

miR160 est donc essentiel pour la formation correcte des organes via la régulation des gènes de réponses primaires à l'auxine.

Le dernier groupe d'ARFs régulés de manière post-transcriptionnelle par TAS3 inclus ARF2, ARF3 et ARF4. Le miR390 guide le processing en phase des transcrits primaires TAS3 (TRANS-ACTING siRNA3) qui génèrent des tasiARNs. Ce sont ces tasiARNs qui ciblent ARF2, ARF3 et ARF4 (Allen et al., 2005; Williams et al., 2005; Marin et al., 2010). L'importance du contrôle des transcrits de ARF3 et ARF4 a été mis en évidence dans la feuille, lors de la formation des faces abaxiale et adaxiale (voir partie I.B.2) (Pekker et al., 2005).

Ainsi, le contrôle post-transcriptionnel des ARFs par des miARN ou des tasiARNs est essentiel pour une régulation fine des réponses à l'auxine dans le développement.

I.A.5.c. Importance des interactions ARF-AUX/IAA

L'interaction entre les ARFs et les AUX/IAA lorsque les concentrations en auxine sont faibles permet de bloquer la transcription des gènes de réponse à l'auxine. L'une des interactions les plus étudiées est celle de ARF5/MP avec IAA12/BDL dans l'initiation de la racine embryonnaire.

Les mutants *arf5/mp* et *iaa12/bdl* présentent un embryon incapable de former une racine embryonnaire. Les protéines ARF5 et BDL agissent via le recrutement d'un co-represseur de BDL : TPL, et

agissent de manière transitoire dans un sous-domaine du pro-embryon qui est adjacent à la future hypophyse où ils conduisent la spécification de l'hypophyse en promouvant le transport de l'auxine (Weijers et al., 2006; Szemenyei et al., 2008). ARF5 induit notamment l'expression de PIN1, AUX1 et LAX2. En effet, il a été démontré que l'ajout d'un simple, double ou triple mutants *aux1*, *lax1* ou *lax2* à la mutation de *arf5/mp^{B4149}* accroît le phénotype de ce dernier. De plus, dans l'embryon *arf5/mp*, l'expression de *AUX1*, *LAX2* ou *PIN1* dans le domaine provasculaire où est normalement exprimé *ARF5*, ne permet pas de restaurer l'absence de racine de ce mutant (Robert et al., 2015).

ARF5 cible également le gène *TMO7 (TARGET OF MP 7)*, qui code un facteur de transcription de type bHLH (basic Helix-loop-helix) qui est exprimé dans les cellules adjacentes à l'hypophyse dans l'embryon. Ce facteur de transcription est requis pour la formation de la racine et son expression est suffisante pour supprimer partiellement le phénotype d'absence de racine de l'allèle faible du mutant *arf5* (Schlereth et al., 2010) (Figure I.A.8).

Les interactions ARF-AUX/IAA sont donc indispensables pour un développement correct, et le module ARF5-IAA12 joue un rôle majeur lors de l'embryogénèse.

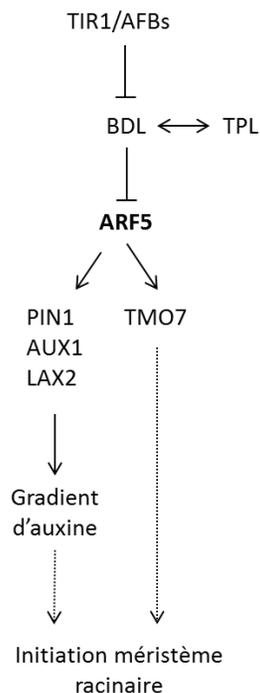


Figure I.A.8. Implication de la signalisation auxinique dans l'initiation du méristème racinaire lors de l'embryogénèse.

Les protéines à F-box TIR1/AFBs peuvent réprimer l'IAA12/BDL. BDL interagit avec un co-récepteur TPL pour contrôler l'expression de ARF5. ARF5 peut à son tour contrôler les transporteurs d'auxine PIN1, AUX1 et LAX2 ainsi qu'un gène cible TMO5 afin d'initier le méristème racinaire lors de l'embryogénèse.

I.A.5.d. Interactions protéiques

Certains ARFs ont également été mis en évidence comme étant impliqués dans des interactions protéine-protéine autre que celles existantes avec les ARFs et les AUX/IAA, afin de réguler des réponses développementales.

ARF3/ETTIN (ETT), interagit notamment avec deux facteurs de transcription KANADI (KAN) qui sont connus pour promouvoir le devenir abaxial des cellules à savoir KAN4 dans les téguments d'ovules pour maintenir les frontières entre les deux téguments d'ovules et KAN1 dans les primordia de feuilles pour déterminer la face abaxiale de celle-ci (Kelley et al., 2012).

Dans la racine, il a été montré que ARF5/MP interagit physiquement avec BREVIX RADIX (BRX) pour participer au contrôle de la balance division/différenciation cellulaire, via l'expression du transporteur d'efflux PIN3 qui est induit par ARF5, lui-même étant contrôlé par SHY2/IAA3 (Scacchi et al., 2010). BRX a également été mis en évidence comme étant une cible de ARF5, mais également comme étant nécessaire pour l'expression de SHY2/IAA3, créant ainsi des boucles de rétrocontrôles qui permettent une régulation fine de la transcription. Le passage de la division à la différenciation cellulaire est permis par les cytokinines, qui induisent l'expression de SHY2, entraînant ainsi la répression de ARF5 et donc du transport d'auxine via PIN3.

Toujours dans la racine, ARF7 interagit avec un facteur de transcription de la famille MYB : MYB77 pour promouvoir la transcription des gènes de réponses à l'auxine qui régule la croissance des racines latérales. Les gènes de réponses primaires à l'auxine tel que IAA19 présentent des motifs de fixation des facteurs MYB dans leurs promoteurs à proximité des AuxREs, indiquant ainsi que MYB77 peut interagir directement avec ces gènes et que ARF7 et MYB77 pourraient interagir pour exercer ensemble un contrôle sur ces gènes (Shin et al., 2007).

Au niveau des pétales, le contrôle des divisions et de l'expansion cellulaire est permis grâce à l'interaction de ARF8 avec un facteur de transcription de type bHLH : BIGPETA1p. Ces deux protéines interagissent par leur domaine C-terminal, pour limiter les divisions lors des stades précoces et pour contrôler l'expansion durant les stades tardifs (Varaud et al., 2011).

I.A.5.e. Interconnexion des voies hormonales

Les ARFs peuvent constituer des nœuds connectant les différentes voies de signalisation hormonales. Des interconnexions existent au niveau des promoteurs de gènes comme celui de *SAUR15*. Ce promoteur contient des motifs similaires aux AuxREs qui lient ARF5 ainsi que des motifs E-box de type HUD (Hormone Up at Dawn) capables de lier BES1 (BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE EMS SUPPRESSOR1), un facteur de transcription se fixant aux gènes de réponse aux brassinostéroïdes. La fixation de ces facteurs de transcription au promoteur est induite par l'auxine ou les brassinostéroïdes (Walcher and Nemhauser, 2012).

ARF6 a également été mis en évidence comme pouvant interagir avec des facteurs de transcription de plusieurs voies de signalisations hormonales. ARF6 a été mis en évidence comme interagissant directement avec BZR1 (BRASSINAZOLE-RESISTANT 1), un régulateur positif de la signalisation des brassinostéroïdes par son domaine C-terminal mais également avec le facteur de transcription régulé par la lumière et la température PIF4 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4) au niveau de son domaine bHLH. Ces trois facteurs de transcription ont été montrés comme induisant l'élongation de l'hypocotyle de manière interdépendante. BZR1 et PIF4 peuvent également interagir physiquement avec ARF8.

Des protéines DELLA, qui sont des régulateurs négatifs de la signalisation des gibbérellines, peuvent également se fixer dans la région centrale et le domaine de fixation à l'ADN de ARF6 pour inhiber sa capacité de fixation à l'ADN et ainsi moduler l'expression des gènes cibles. Cette inhibition de ARF6 par les DELLA laisse penser que les gibbérellines permettent d'induire l'élongation cellulaire en induisant les réponses à l'auxine. Cela est appuyé par le fait que dans les mutants *iaa3* et *arf6* l'élongation de l'hypocotyle par les gibbérellines est réduite (Oh et al., 2014).

Certains ARFs peuvent également contrôler la biosynthèse d'hormones. C'est notamment le cas de ARF6 et ARF8 qui induisent la production d'acide jasmonique dans les fleurs, qui à son tour induit l'expression des facteurs de transcription MYB21 et MYB24, nécessaires à la croissance des organes floraux (Nagpal et al., 2005; Tabata et al., 2010; Reeves et al., 2012).

Des interconnexions des signalisations hormonales peuvent également se produire au niveau post-traductionnel. BIN2 (BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE2), une kinase régulée par les brassinostéroïdes, a la capacité de phosphoryler ARF2, bloquant ainsi sa capacité de fixation à l'ADN (Vert et al., 2008) et réduisant sa capacité de répression (Zhao et al., 2016). Cet effet a été en particulier démontré dans le cas de la régulation de l'expression du transporteur de potassium HAK5 en réponse à une carence en

potassium, illustrant ainsi un effet direct sur une cible réprimée par ARF2 (Zhao et al., 2016).

ARF7 et ARF19 sont connus pour contrôler l'organogénèse des racines latérales avec leurs gènes cibles *LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN* (LOB) 16 et 29 via la dégradation de IAA14/SLR (SOLITARY ROOT) et IAA19 (Tatematsu et al., 2004; Okushima et al., 2005b). Il a été mis en évidence que BIN2 est responsable de la suppression de la capacité d'interaction de ARF7 et ARF19 avec les AUX/IAA suite à leur phosphorylation (Cho et al., 2014).

Ainsi les ARFs et leurs régulations à divers niveaux semblent essentiels pour la régulation de divers processus développementaux, et notamment pour la mise en place de nouveaux organes.

I.B. La feuille, un modèle d'étude du développement

Les feuilles sont les organes photosynthétiques majoritaires des plantes. Leur surface permet de capter la lumière ainsi que les échanges gazeux avec l'extérieur. L'équilibre entre forme et taille des feuilles est subtil et dépendant de lois physiques, puisque des feuilles à grandes surfaces seront plus coûteuses en termes d'investissement de la biomasse de soutien, alors que des feuilles fines seront plus sensibles aux pertes d'eau et à la chaleur lorsqu'elles sont exposées au soleil (Niinemets et al., 2007). Les feuilles plus découpées ont la capacité de refroidir plus rapidement grâce à leurs lobes mais sont moins efficaces dans la captation de la lumière et les échanges de par la réduction de leur surface. Cependant, à l'échelle de la plante entière, la forme découpée des feuilles permet à un plus grand nombre de feuilles de pouvoir être exposées au soleil (Vogel, 2009).

Une telle complexité entre forme de feuille et contrainte conduit à une multitude de formes et de tailles possibles de feuilles, allant de la feuille simple lisse à dentée aux feuilles simples lobées et aux feuilles composées avec des folioles (Champagne and Sinha, 2004). L'initiation de ces différentes feuilles se fait de la même manière au niveau du méristème apical caulinaire (MAC).

I.B.1. Initiation des feuilles au MAC

L'initiation des primordia au MAC nécessite la formation d'un maximum d'auxine et la répression des gènes KNOX, permettant de modifier l'orientation des divisions cellulaires durant les phases précoces d'excroissance puis la prolifération des cellules et l'établissement des frontières du futur organe grâce à une diminution des divisions et de l'expansion cellulaire (Figure I.B.2 (1)) (Breuil-Broyer et al., 2004; Reddy et al., 2004).

I.B.1.a.Importance de l'auxine dans l'initiation des feuilles

Les transporteurs d'efflux d'auxine PIN1 semblent être indispensables à la mise en place des primordia car la mutation ou l'inhibition de ce gène ne permet plus l'organogénèse au MAC (Okada et al., 1991; Gälweiler et al., 1998) et abolit le maximum d'auxine (Schuetz et al., 2008).

En effet, les cellules qui initient les primordia se caractérisent par une activité auxinique élevée (Heisler et al., 2005).

L'activité auxinique élevée est principalement due à PIN1 qui permet de générer un gradient d'auxine. PIN1 est localisé de manière latérale au niveau des cellules épidermiques du MAC, dirigeant le flux d'auxine vers les zones périphériques (Reinhardt et al., 2000; Benková et al., 2003; Reinhardt et al., 2003; Heisler et al., 2005). Les flux d'auxine sont convergents et permettent ainsi la création transitoire d'un maximum d'activité auxinique dans la zone périphérique du MAC, marquant les sites d'initiation des primordia foliaires. Grâce à la polarité basale de PIN1 dans les cellules sous-épidermiques du primordium émergent, les flux d'auxine peuvent être dirigés vers le centre du primordium pour permettre ainsi de définir la position des futures veines (Reinhardt et al., 2003; Heisler et al., 2005).

Le maximum d'auxine nécessaire lors de la formation d'un primordium, entraîne une déplétion en auxine autour de ce primordium. La création de nouveaux primordia est possible grâce à une nouvelle accumulation d'auxine dans le jeune primordium, que PIN1 transporte vers de nouveaux sites d'initiation des primordia (Ljung et al., 2001; Heisler et al., 2005).

Le positionnement des primordia est dépendant de l'auxine et de ses transporteurs. Lorsque de grandes quantités d'auxine exogène sont appliquées au MAC, les primordia se forment successivement de manière plus rapprochée (Okada et al., 1991; Reinhardt et al., 2000). De plus, la mutation de *PIN1* perturbe la distribution de l'auxine ce qui mène à un défaut de phyllotaxie (Reinhardt et al., 2003). La mutation des transporteurs d'influx AUX/LAX conduit également à une altération des points de

convergence résultant en une initiation irrégulière des primordia causant des différences d'angles entre deux primordia successifs (Bainbridge et al., 2008).

ARF5 est aussi impliqué dans l'initiation des primordia. En effet, le mutant *mp^{G12}* présente un défaut d'initiation similaire à *pin1* (Hardtke and Berleth, 1998) De plus dans ce mutant, l'expression de PIN1 est dérégulée à l'épiderme, empêchant ainsi la formation d'un maximum d'auxine. ARF5 est donc nécessaire à l'orientation de PIN1 pour promouvoir une accumulation locale d'auxine (Schuetz et al., 2008)(Bhatia et al., 2016).

I.B.1.b. Répression des gènes KNOX

La perte de l'identité méristématique est possible via l'inactivation de l'expression des gènes *KNOX1* dans les cellules fondatrices du nouvel organe à partir du moment où elle quitte le méristème. Cette répression est nécessaire car l'expression de *KNOX1* durant le développement de feuilles simples entraîne de nombreux défauts tels que la formation de lobes et de méristèmes ectopiques (Sinha et al., 1993; Lincoln et al., 1994; Ori et al., 2000).

Plusieurs voies permettent la répression de l'expression des gènes *KNOX1*. La première fait intervenir la famille de gènes *ARP* (pour les gènes *ASYMMETRIC LEAVES (AS1)* chez *Arabidopsis*, *ROUGH SHEATH2 (RS2)* chez le maïs et *PHANTASTICA (PHAN)* chez *Antirrhinum*) qui codent des facteurs de transcription à domaine MYB (Timmermans 1999; Waites et al. 1998; Byrne et al. 2000). L'expression de ces gènes est localisée dans les cellules fondatrices des organes latéraux et permet de réprimer les gènes *KNOX1*.

Il a été mis en évidence que *AS1* forme un complexe répresseur en s'associant avec *AS2* et la protéine de remodelage de la chromatine HIRA, qui se fixe au promoteur de *KNOX1* via des motifs de régulation afin de réprimer leur expression lors des stades précoces d'initiation des primordia. Cette répression est possible grâce à des modifications d'état de la chromatine, la forme répressive permettant de réprimer l'activité de *KNOX1* durant l'organogénèse (Guo et al., 2008; Lodha et al., 2013).

Alors que *AS1* réprime *KNOX1* dans les cellules fondatrices d'un nouvel organe, les gènes *KNOX1* répriment l'expression de *AS1* dans le MAC créant ainsi une boucle de rétrocontrôle (Byrne et al., 2000).

La répression de l'expression des *KNOX1* peut également être causée par l'auxine. En effet, le maximum d'auxine créé par PIN1 réprime les gènes *KNOX1* (Reinhardt et al., 2003; Heisler et al., 2005; Hay et al., 2006).

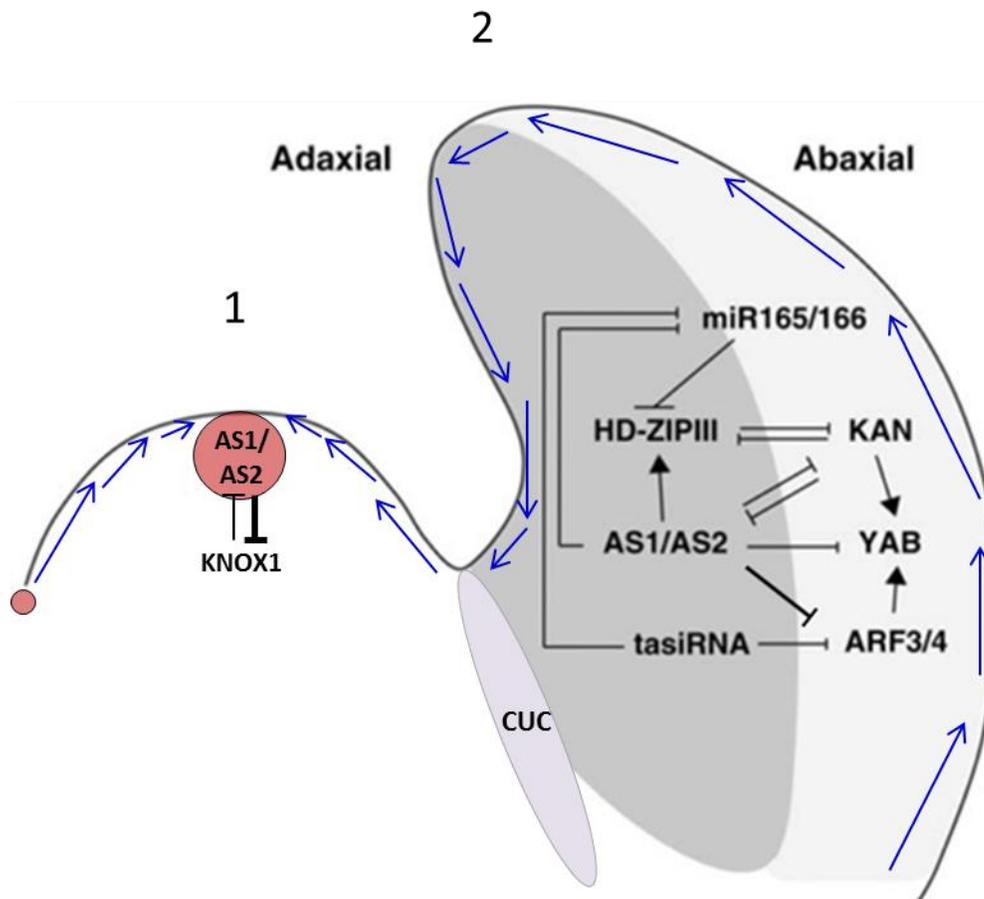


Figure I.B.1. Formation des primordia au MAC et mise en place de la polarité adaxiale-abaxiale.

L'initiation des primordia au MAC est possible grâce au transport convergent d'auxine par les transporteurs PIN1 qui permet la formation d'un maximum d'auxine, ainsi qu'à la répression des KNOX1 via le complexe protéique AS1/AS2 (1). La concentration de l'auxine dans le primordia en cours d'initiation se traduit par un minimum d'auxine à la périphérie de ce nouvel organe. La mise en place des frontières qui permet la séparation entre le MAC et les primordia est réalisée entre autres par les gènes *CUCs*. Le contrôle de l'axe adaxial-abaxial est possible grâce à un réseau de régulation complexe faisant intervenir deux antagonistes majeurs: les gènes *HD-ZIP III* (pour *class III HOMEODOMAIN-LEUINE ZIPPER*) exprimé sur la face adaxiale, ainsi que les gènes *KANADI (KAN)* et *YABBY (YAB)* exprimés sur la face abaxiale. Les miR165/166 régulent négativement l'expression de *HD-ZIP III* pour limiter son expression à la face adaxiale. A l'inverse, le complexe AS1/AS2 promeut l'expression de *HD-ZIP III* et réprime l'expression de miR165/166 ainsi que celle de *YAB*, *ARF3/4* et *KAN*. En retour, *KAN* réprime le complexe AS1/AS2. Les *ARF3/4* induisent l'expression de *YAB* et sont réprimés par des tasiRNAs (2). Les flèches bleues indiquent le transport de l'auxine via PIN1. Les cercles rouges indiquent les minima et maxima d'auxine. (Adapté de(Moon and Hake, 2011)).

I.B.1.c. L'établissement des domaines frontières

Les domaines frontières s'initient entre le MAC et les primordia, et permettent la séparation des primordia afin qu'ils puissent se développer.

La mise en place des frontières nécessite les gènes *CUC1*, *CUC2* et *CUC3* (*CUP-SHAPED COTYLEDON*), qui codent des facteurs de transcription de la famille des NAC. Ces facteurs de transcription sont composés d'un domaine NAC en N-terminal, qui est un domaine de fixation à l'ADN et confère la spécificité de chaque membre de cette famille et en C-terminal d'un domaine de trans-activation (Duval et al., 2002; Taoka et al., 2004). Les CUCs sont répartis en deux clades, en fonction de la séquence de leur domaine CUC. *CUC1* et *CUC2* font partie du clade NAM, qui est un orthologue de *CUC* dans le pétunia, alors que *CUC3* appartient à un clade regroupant tous ses orthologues (Ooka et al., 2003; Zimmermann and Werr, 2005). Tous les membres du clade NAM sont contrôlés de manière post-transcriptionnelle par un microARN, le miR164. Trois gènes codent ce microARN : *MIR164A*, *MIR164B* et *MIR164C* (Mallory et al., 2004).

Les gènes *CUCs* sont exprimés dans un petit nombre de cellules marquant la frontière entre le MAC et le primordium. La mutation d'un ou de plusieurs gènes *CUCs* conduit à un phénotype d'organes fusionnés tels que les cotylédons, les sépales et les étamines ainsi qu'à une absence de méristème (Aida et al., 1997; Takada et al., 2001; Vroemen et al., 2003). Les gènes *CUCs*, en plus de leur rôle dans la mise en place des frontières sont donc également importants pour la formation du méristème.

La surexpression de *MIR164A* ou *MIR164B* conduit à un phénotype semblable à celui du double mutant *cuc1cuc2* alors que leur mutation entraîne un élargissement des frontières, indiquant ainsi que la régulation de *CUC2* et *CUC3* par miR164 est essentielle pour l'établissement des domaines frontières (Laufs et al., 2004; Mallory et al., 2004; Baker et al., 2005; Peaucelle et al., 2007).

L'expression de *CUC1* et *CUC2* a également été montrée comme étant importante pour l'expression de *STM* et en retour *STM* est requis pour l'expression spatiale de *CUC2* durant l'embryogénèse (Aida et al., 1999). L'expression de *CUC2* est également dépendante de l'auxine. En effet, le profil d'expression de *CUC2* est perturbé dans un mutant *pin1*, s'étendant au-delà des domaines frontières, entraînant des défauts de séparation des organes (Vernoux et al., 2000; Furutani et al., 2004). De plus, il a été montré que l'auxine peut réprimer *CUC2* en dehors des domaines frontières (Heisler et al., 2005). PIN1 est donc nécessaire pour une séparation correcte des organes via le contrôle du profil d'expression de *CUC2*.

D'autres gènes sont également exprimés aux frontières et permettent la séparation entre les primordia et le MAC. Parmi ces gènes, *LATERAL ORGAN FUSION1 et 2 (LOF1 et LOF2)* qui codent des facteurs de transcription à domaine Myb, *LATERAL ORGAN BOUNDARIES (LOB)* et *JAGGED LATERAL ORGANS (JLO)* qui appartiennent à la famille des gènes à domaine LOB (Shuai et al., 2002; Borghi et al., 2007; Lee et al., 2009b).

I.B.2. L'axe de polarité adaxiale/abaxiale

Les feuilles sont définies par trois axes différents : le proximo-distal, le medio-latéral et l'adaxial-abaxial qui s'établissent rapidement dans les primordia (Figure I.B.2).

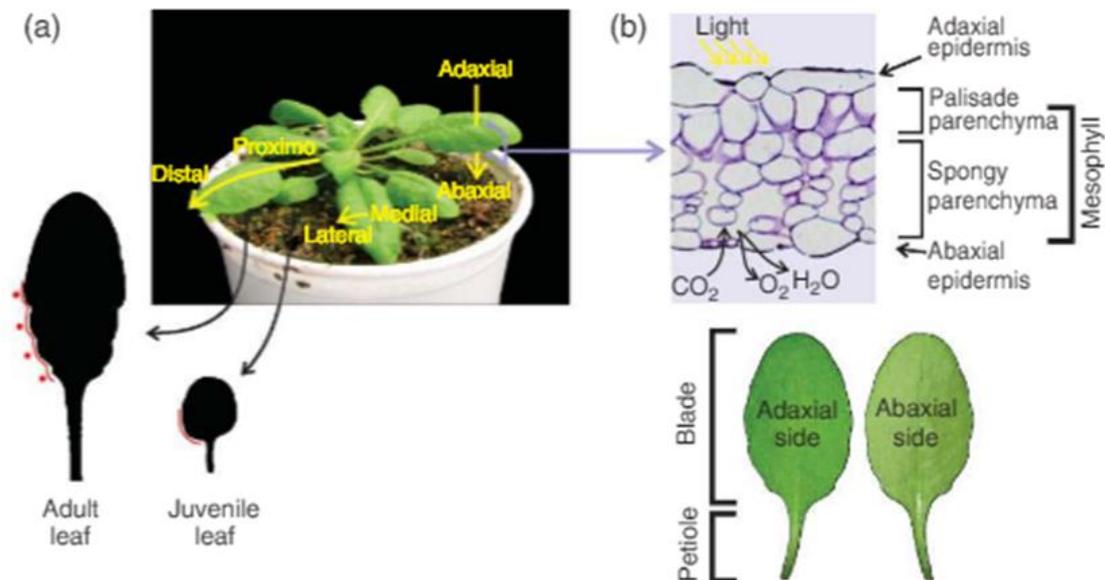


Figure I.B.2. Généralités sur les feuilles.

Les feuilles d'une même rosette peuvent présenter des stades différents et donc des formes différentes car la formation des feuilles est un processus itératif et continu. Une feuille est définie selon 3 axes : l'axe proximo-distal, l'axe adaxial/abaxial et l'axe médio-latéral (a) et sont composées de différentes assises cellulaires. L'épiderme est localisé sur les faces adaxiale et abaxiale de la feuille et sont séparés par un parenchyme palissadique et un parenchyme lacuneux (b) (Rodriguez et al., 2014).

L'axe proximo-distal définit la feuille dans sa longueur, du pétiole à la pointe de la feuille alors que l'axe médio-latéral définit la feuille dans sa largeur de part et d'autre de la veine centrale. La mise en place de l'axe adaxial/abaxial, qui définit les faces ventrale et dorsale de la feuille, permet une différenciation cellulaire différente dans ces deux parties dans les feuilles matures, du fait des différentes contraintes des deux faces. La face adaxiale étant notamment plus exposée à la lumière alors que la face abaxiale favorise les échanges gazeux. Les stomates sont donc préférentiellement retrouvés sur la face abaxiale alors que la face adaxiale inclut le parenchyme palissadique qui renferme de nombreux chloroplastes et joue un rôle majeur dans la captation de la lumière (Moon and Hake, 2011) et porte de nombreux trichomes. La mise en place de l'axe adaxial-abaxial est concomitant à la formation du primordium comme le montre l'imagerie en temps réel (Heisler et al., 2005). La mise en place de l'axe adaxial-abaxial est possible grâce à un réseau de régulation complexe faisant intervenir deux antagonistes majeurs: les gènes *HD-ZIPIII* (pour class III *HOMEODOMAIN-LEUINE ZIPPER*; incluant les gènes *REVOLUTA*, *PHABULOSA* et *PHAVOLUTA*) ainsi que les gènes *KANADI (KAN)* et *YABBY (YAB)*. *KAN* et *HD-ZIPIII* déterminent la polarité de la face où ils s'expriment, c'est-à-dire la face adaxiale pour les gènes *HD-ZIPIII* et la face abaxiale pour les gènes *KAN* et *YAB*. Ils se répriment mutuellement pour limiter leur expression à un seul côté de la feuille (Figure I.B.1)

Les mutants de perte-de-fonction des gènes *HD-ZIPIII* présentent une abaxialisation et une absence de formation du MAC. Ces gènes sont contrôlés par deux microARN : miR165 et miR166, qui sont exprimés dans la partie abaxiale de la feuille afin de limiter l'expression de *HD-ZIPIII* à la partie adaxiale (McConnell et al., 2001; Emery et al., 2003; Kidner and Martienssen, 2004).

A l'inverse, les mutants *kan* ont des feuilles adaxialisées avec une expression de *HD-ZIPIII* étendue à la feuille entière (Kerstetter et al., 2001; Eshed et al., 2002). Les gènes *YAB* interviennent plus tardivement dans le développement et en aval de *KAN* dans la partie abaxiale de la feuille. Leur mutation entraîne également une adaxialisation (Eshed et al., 2004; Stahle et al., 2009).

Les gènes *ARP* sont également impliqués dans la polarité adaxiale-abaxiale. Chez *Antirrhinum*, il a été montré que la mutation de *PHAN* entraîne une abaxialisation (Waites and Hudson, 1995; Waites et al., 1998). Chez *Arabidopsis*, le complexe *AS1/AS2* joue un rôle dans la formation de l'axe adaxial/abaxial en induisant l'expression des *HD-ZIPIII*, en inhibant l'expression des *KAN* et *YAB* ainsi qu'en réduisant celle de *MIR165/166* (Lin et al., 2003; Li et al., 2005; Fu et al., 2007). A l'inverse, *KAN* est capable de réprimer directement *AS2* dans le domaine adaxial (Wu et al., 2008)

Deux acteurs de la signalisation auxinique, *ARF3* et *ARF4*, jouent également un rôle dans le contrôle de cette polarité. Ces deux gènes sont exprimés très précocement dans la face abaxiale (Pekker et al., 2005). *ARF3* et *ARF4* semblent agir avec *KAN* pour promouvoir la formation de la face abaxiale. Il a en effet été mis en évidence que la mutation de *ARF3* diminue le phénotype des plantes présentant une expression ectopique de *KAN*. De plus, dans les ovules *ARF3* et *KAN* peuvent interagir, formant ainsi un complexe fonctionnel nécessaire au développement du tégument (Pekker et al., 2005; Kelley et al., 2012).

Ces deux *ARFs* sont régulés par des ta-siRNAs produits par le gène *TAS3* (Fahlgren et al., 2006; Garcia et al., 2006; Hunter et al., 2006). Ces ta-siRNAs sont produits dans la face adaxiale et limitent ainsi l'expression de *ARF3* et *ARF4* à la face abaxiale.

ARF3 a également été montré comme étant réprimé par *AS2*, et cette répression est indispensable pour induire l'identité adaxiale (Ishibashi et al., 2012).

La polarité abaxiale/adaxiale des primordia foliaires résulte par conséquent d'équilibres subtils entre territoires d'expression et de répression dépendant d'interactions complexes entre différents facteurs de transcription et modulation de ces régulateurs par des micro-ARNs.

I.B.3. Croissance de la feuille

La croissance de la feuille est dépendante de deux processus cellulaires distincts : la prolifération et l'expansion. Dans un premier temps, la prolifération est présente dans tout le limbe, jusqu'à l'apparition d'un front d'arrêt de la prolifération dans la partie la plus distale de la feuille qui progresse ensuite de manière basipète au fur et à mesure du développement de la feuille. La prolifération cellulaire à la partie proximale se poursuit plusieurs jours avant d'être abolie de manière abrupte à 13 jours post-émergence, lorsque les feuilles mesurent environ 1cm. L'expansion cellulaire prend progressivement le relai pour permettre d'atteindre la taille finale de la feuille (Donnelly et al., 1999; Andriankaja et al., 2012).

Dans la feuille, des régions nommées blastozones sont responsables de l'initiation et la croissance du limbe ainsi que de l'organogénèse des structures de la marge. La durée, ainsi que leur zone d'activité, déterminent l'étendue de la phase indéterminée des feuilles et par conséquent le niveau de complexité des feuilles (Hagemann and Gleissberg, 1996). Les feuilles composées ont notamment été mises en évidence comme ayant une activité prolongée du blastozone durant la morphogénèse primaire (Brand et al., 2007).

Lorsque le limbe commence à croître, l'auxine peut être produite à la marge (Mattsson et al., 1999; Aloni et al., 2003; Zgurski et al., 2005). Cela permet de générer des gradients qui coordonnent certains processus de développement de la feuille comme la différenciation des veines et la formation d'excroissances à la marge appelées dents (Mattsson et al., 1999; Hay et al., 2006). Ces deux processus semblent tous deux dépendants de PIN1, car sa mutation conduit à une marge lisse et des défauts de profils des veines (Aida et al., 2002; Hay et al., 2006). L'expression de PIN1 à l'épiderme sous le contrôle d'un promoteur *AtML1* a été montrée comme étant suffisante pour restaurer la formation des dents (Bilsborough et al., 2011). De plus, il a été mis en évidence que l'expression de PIN1 dans les cellules sous-épidermiques précède et converge vers les sites de formations de vaisseaux du préprocambium (Scarpella et al., 2006).

Dans cette partie, certains acteurs de la prolifération et de l'expansion cellulaire seront présentés, suivi du processus détaillé de la formation des dents à la marge foliaire.

I.B.3.a. Contrôle de la prolifération cellulaire

Parmi les phénotypes foliaires de mutants ayant une prolifération cellulaire réduite, certains présentent des tailles de feuilles réduites.

Cela est retrouvé lors de la mutation de facteurs de transcription régulant la croissance appartenant à la famille des *GRFs* (*GROWTH- REGULATING FACTORS*), qui conduit donc à une réduction de la taille des feuilles (Kim and Kende, 2004; Horiguchi et al., 2005). Les *GRFs* ont été mis en évidence comme formant un complexe avec les *GIFs* (*GRF-INTERACTING FACTORS*), la mutation des *GIFs* entraînant également un phénotype aux feuilles plus petites causé par une diminution de la prolifération cellulaire et un ralentissement du cycle cellulaire (Kim and Kende, 2004; Horiguchi et al., 2005; Lee et al., 2009a). Chez *Arabidopsis*, 9 de ces *GRFs* possèdent un site de fixation pour le microARN miR396 (Jones-rhoades and Bartel, 2004), sa surexpression entraînant la formation de petites feuilles ayant un nombre de cellules réduit (Liu et al., 2009; Rodriguez et al., 2010; Wang et al., 2011a).

AINTEGUMENTA (*ANT*) a également été mis en évidence comme contrôlant la taille des feuilles en prolongeant les capacités de prolifération des cellules. Le mutant nul *ant-1* possède en effet un nombre de cellules moindre causé par une sortie prématurée de mitose de ces cellules alors que sa surexpression conduit à une phase de prolifération plus étendue (Mizukami and Fischer, 2000). Il a également été

montré que *ANT* était activé par *ARGOS* (*AUXIN-REGULATED GENE INVOLVED IN ORGAN SIZE*), dont le mutant présente également de petites feuilles résultant de défauts de prolifération cellulaire (Hu et al., 2006; Feng et al., 2011). L'activation de *ANT* par *ARGOS* permet l'activation de l'expression de la *CYCLINE D3* (Hu et al., 2003). *ARF2* semble également contrôler l'expression de *ANT* puisque *ANT* et *CYCD3* sont exprimés de manière ectopique dans le mutant *arf2-8* (Schruff et al., 2005).

D'autres gènes ont été mis en évidence car leur mutation entraîne des feuilles plissées. C'est notamment le cas du gène *CINCINNATA* (*CIN*) chez le mufler (Nath et al., 2003), qui appartient à la famille TCP (pour *TEOSINTE BRANCHED1* du maïs, *CYCLOIDEA* du mufler et *PCF* du riz)(Martín-Trillo and Cubas, 2010), et qui contrôle l'arrêt de la prolifération cellulaire. La forme plissée des feuilles de ces mutants s'explique par une augmentation de la prolifération cellulaire en particulier à la marge, causée par un retard du front d'arrêt mitotique. Chez *Arabidopsis*, les mutants dominant *jaw-D* présentent également un phénotype de feuilles plissées (Weigel et al., 2000), causé par une surexpression du gène *MIR319a* qui cible des TCP (Palatnik et al., 2003).

La sur-expression de gènes de la famille des *KRP* (*KIP*(*KINASE INHIBITOR PROTEIN*) -*RELATED PROTEIN*), un inhibiteur de CDK (*CYCLIN DEPENDENT KINASE*), entraîne la formation de feuilles petites et très découpées, avec des cellules plus grandes. Cette augmentation de l'expansion cellulaire a été mise en évidence comme résultant partiellement du court-circuit du cycle cellulaire en faveur de l'endoréplication mais d'autres mécanismes de compensation suivant l'arrêt de prolifération cellulaire ont également été proposés (Ferjani et al., 2007; Vieira et al., 2014).

De plus, des défauts de prolifération ont été mis en évidence comme pouvant être corrigés par plus d'expansion. Cela est par exemple observé dans le mutant *cycd3;1-3* qui présente un nombre de cellules réduit causé par un défaut de prolifération compensé par la taille des cellules qui sont plus grandes (Dewitte et al., 2003; Dewitte et al., 2007; Tsukaya, 2008).

Ainsi, la prolifération et l'expansion cellulaire sont deux processus étroitement liés.

I.B.3.b. Contrôle de l'expansion cellulaire.

L'expansion cellulaire coïncide avec la transition mitose/endoréplication (Beemster et al., 2005). L'endoréplication permet d'accroître la ploïdie des cellules et est souvent corrélée positivement avec leur taille (Sugimoto-Shirasu and Roberts, 2003). L'auxine joue un rôle majeur dans la régulation de

l'endoréplication en modulant des régulateurs du cycle cellulaire. L'auxine module par exemple la stabilité de E2Fc, un régulateur négatif de la division cellulaire qui est également nécessaire pour l'endoréplication, permettant ainsi de contrôler l'équilibre entre prolifération et endoréplication (Del Pozo et al., 2006)

L'expansion est également permise par la combinaison du maintien de la pression de turgescence et les propriétés biomécaniques de la paroi. La paroi primaire est formée de microfibrilles de cellulose interconnectés avec des hémicelluloses, le tout intégré dans une matrice de pectines (Braidwood et al., 2014). L'application d'auxine exogène sur des segments de tiges, d'hypocotyles ou de coléoptiles induit en quelques minutes leur élongation (Rayle and Cleland, 1992). Cette élongation résulte de l'activation à la membrane plasmique d'une pompe à proton ATPase H⁺ qui acidifie le milieu extracellulaire. Cette acidification active des protéines localisées dans la paroi, les EXPANSINES. Ces protéines ont un rôle majeur dans le relâchement de la paroi en perturbant les liaisons non covalentes entre la cellulose et l'hémicellulose (Sampedro and Cosgrove, 2005). Plusieurs enzymes, comme les XYLOGLYCANES ENDO-TRANSGLYCOSYLASE/HYDROLASES (XTHs) peuvent également contribuer au relâchement en modifiant les propriétés de la paroi et en facilitant l'intégration de nouveaux matériels pariétaux (Eklöf and Brumer, 2010). L'activation de la pompe à proton ATPase H⁺ entraîne une hyperpolarisation du potentiel membranaire et active des canaux potassiques rentrants, qui contribuent à l'entrée d'eau dans les cellules nécessaire à l'expansion et au maintien de la pression de turgescence (Philippar et al., 1999).

Plusieurs mutants de gain de fonctions *AUX/IAA* comme *shy2/iaa3*, *axr2/iaa7*, *axr3/iaa17* ou de mutants nul d'*ARFs* tels que *arf2* ou le double mutant *arf6 arf8* présentent des défauts de croissance de l'hypocotyle ou des feuilles enroulées, associables à une croissance différentielle des faces abaxiale et adaxiale qui lorsqu'elle est tardive provient de défauts d'expansion cellulaire. Cela indique alors que la combinaison de certains acteurs du complexe de régulation de la transcription en réponse à l'auxine doit être importante pour l'expression de gènes impliqués dans l'expansion (Nagpal et al., 2005; Okushima et al., 2005a; Mockaitis, K, Estelle, 2008).

Ainsi, la croissance de la feuille résulte d'une coordination entre la prolifération et l'expansion cellulaire, dépendante de régulations fines de l'expression de nombreux acteurs impliqués dans ces processus.

I.B.3.c. Formation des dents

La marge de certaines feuilles, comme celle d'*Arabidopsis* présente une dentelure qui se caractérise par des pointes et des creux le long de la marge appelés respectivement dents et sinus. La forme simple des feuilles d'*Arabidopsis* par rapport à d'autres Brassicacées comme la Cardamine est expliquée par l'absence du gène *RCO* (*REDUCED COMPLEXITY*). Ce gène est présent et a évolué chez la famille des Brassicacées par duplication de gènes, mais a été perdu chez *Arabidopsis*. *RCO* est important pour la formation des folioles, car chez la Cardamine sa mutation conduit à un phénotype foliaire à lobe unique causé par une prolifération cellulaire et une croissance plus rapide qui comble l'espace entre les folioles (Vlad et al., 2014).

La formation des dents est un processus itératif, une même feuille présente ainsi différents stades de dents avec des formes différentes puisqu'elles s'émousent avec la croissance (Figure I.B.3). L'initiation de la première dent apparaît très tôt au cours du développement de la feuille, quelques jours seulement après son initiation alors qu'elle mesure seulement environ 200 micromètres (Biot et al., 2016).

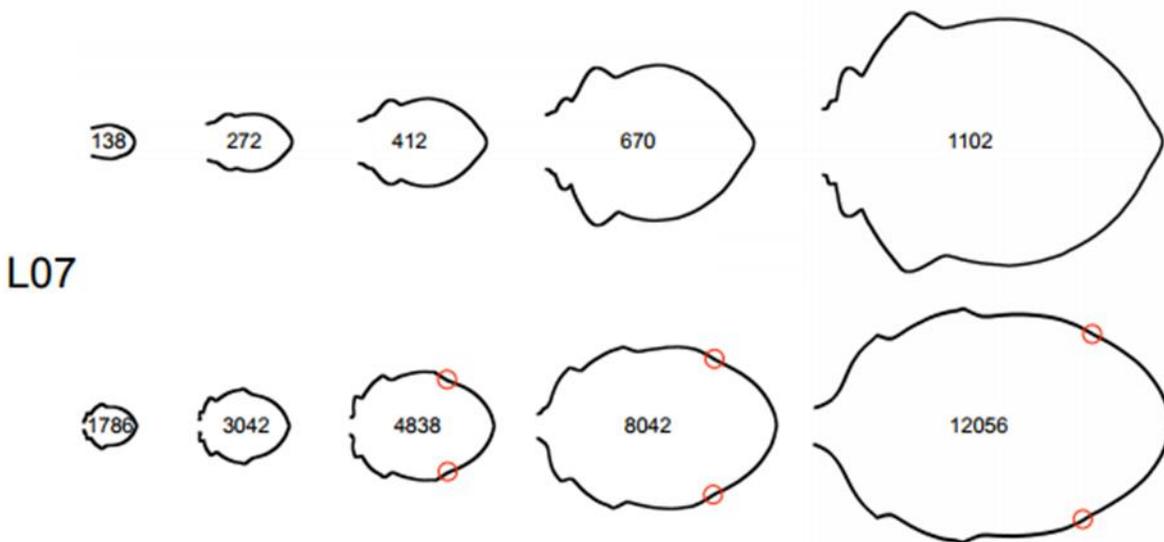


Figure I.B.3. Trajectoire développementale de la feuille de rang 7 d'*Arabidopsis*.

Au cours du développement de la feuille, la marge devient plus lisse car les dents s'émousent avec la croissance. Chaque contour moyen est réalisé à partir de 10 feuilles. Les cinq premières feuilles puis les cinq dernières sont à différentes échelles mais identiques pour chaque série de 5. Les nombres inscrits dans les limbes indiquent la longueur du limbe en µm (Biot et al. 2016). Les marques rouges indiquent la position du sinus distal de la première dent dans les feuilles développées.

L'initiation de chaque dent est possible grâce à la formation d'un maximum d'auxine créé par la convergence des transporteurs PIN1. Ce maximum d'auxine semble être essentiel à la formation de dents, puisque le mutant *pin1* présente une marge lisse. Plus que le maximum d'auxine, c'est le différentiel maximum/minimum qui semble être important puisque lorsque l'auxine est apportée de manière exogène pour créer une distribution continue de l'auxine dans la feuille les dents ne se forment pas (Hay et al., 2006; Kawamura et al., 2010; Bilsborough et al., 2011).

CUC2 semble également indispensable à l'initiation de la dent puisque sa mutation conduit également à une marge lisse (Figure I.B.5). Comme dans le méristème, l'expression de *CUC2* est localisée aux domaines frontières (sinus) potentiellement pour permettre une répression locale de la croissance à cet endroit ainsi que l'émergence de la dent. La superposition de contour de feuilles de Col-0 et *cuc2-1* montre en effet que le sinus de Col-0 est à l'intérieur du contour de *cuc2-1* alors que la dent dépasse ce contour. Les mécanismes cellulaires de la formation des dents restent encore à être élucidés (Nikovics et al., 2006; Biot et al., 2016). L'expression de *CUC2* restreinte aux sinus apparait comme essentielle pour la formation des dents. En effet, lorsque *CUC2* est exprimé dans toute la marge, les dents ne sont pas formées ou alors à des positions aberrantes (Bilsborough et al., 2011).

Le contrôle de *CUC2* par miR164, qui est exprimé aux sinus, est également essentiel afin de maintenir une forme de dent normale, puisque le mutant *mir164a* présente une marge très découpée (Figure I.B.5) (Nikovics et al., 2006). De plus, *CUC2* est responsable de l'orientation inversée de la polarité du transporteur PIN1, permettant ainsi la création du maximum d'auxine. En retour, l'auxine contrôle négativement l'expression de *CUC2* la contraignant aux sinus (Figure I.B.4) (Bilsborough et al., 2011).

Des plantes transgéniques *CUC2g-m4* où *CUC2* est résistant au miR164 ont également été créées en introduisant 4 changements de nucléotides dans *CUC2* ce qui mènent à l'abolition des fonctions de miR164 (Nikovics et al., 2006). Ces plantes présentent des feuilles très découpées (Figure I.B.5).

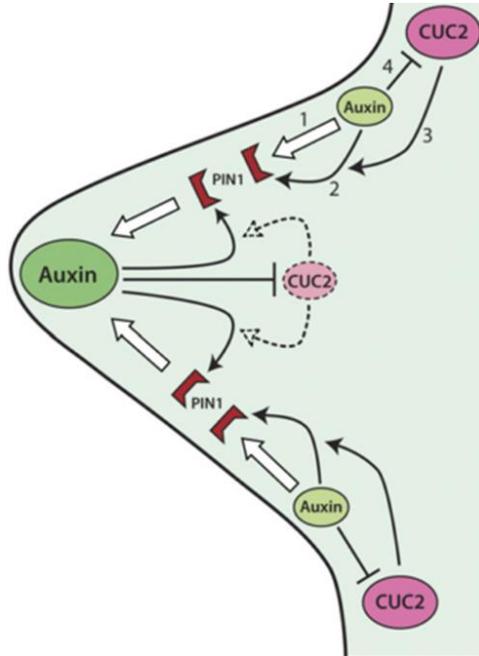


Figure I.B.4. Rôle de l’auxine et CUC2 dans la formation de la dent.

Le transporteur d’efflux d’auxine PIN1 permet la formation d’un gradient d’auxine, créant ainsi un maxima à la pointe de la feuille. Ce mécanisme nécessite la présence de CUC2 qui permet la réorientation de PIN1. En retour, l’auxine réprime CUC2, permettant ainsi de maintenir son expression au sinus ainsi que le maxima d’auxine. (Bilsborough et al., 2011)

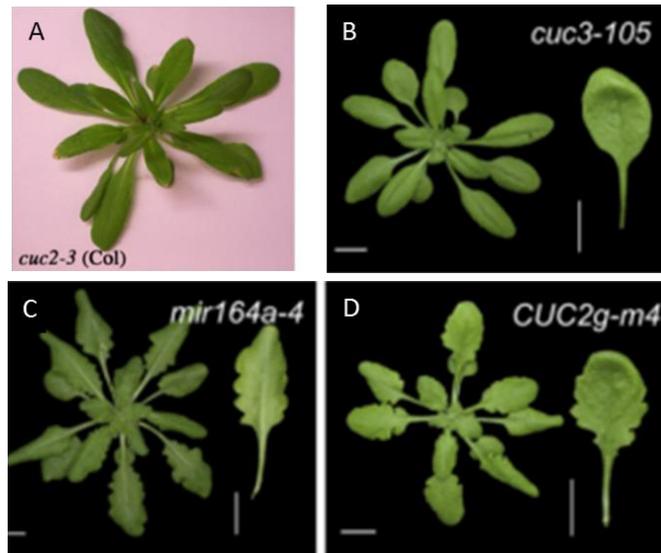


Figure I.B.5. Phénotype des feuilles de rosettes des mutants *cuc2-3*, *cuc3-105*, *mir164a-4* et de la plante transgénique CUC2g-m4.

Le mutant *cuc2-3* présente des feuilles lisses, sans dent à la marge (A) tout comme le mutant *cuc3-105*, dont les dents s’émoussent avec la croissance (B). Le mutant *mir164a-4* (C) et les plantes CUC2g-m4 (D) présentent des feuilles très découpées, dû à une sur-expression de CUC2. (Extrait (Nikovics et al., 2006; Hasson et al., 2011)).

Dans la feuille, une biosynthèse locale d'auxine a été mise en évidence au niveau d'excroissances (appelées hydathodes dans une plante sauvage ou protrusions dans un mutant *kan1kan2*), via les gènes YUCs et permet de proposer un modèle de convergence pour la polarité des PINs. (Wang et al., 2011b; Abley et al., 2016). Les excroissances du mutant *kan1kan2* peuvent être considérées comme des intermédiaires entre les feuilles et les dents car elles émergent de manière perpendiculaire à l'organe comme les feuilles et elles dérivent des feuilles comme les dents. Ces excroissances sont formées grâce à des sites de convergence de PIN1 dans un champ de polarité proximo-distal via l'activité de CUC2. La mutation de *CUC2* dans les mutants *kan1kan2* réduit très fortement la formation d'excroissance. Les transporteurs d'influx d'auxine AUX/LAX ont également été mis en évidence comme ayant une expression importante à la pointe de ces excroissances et comme étant nécessaires à leur développement. En effet, le mutant *kan1kan2aux1lax1lax2lax3* développe très peu d'excroissances. L'expression des transporteurs AUX/LAX à la pointe est contrôlée par CUC2, leurs expressions étant réprimées dans les zones de forte expression de CUC2. L'expression des gènes YUCs étant localisée à la base des nouveaux organes, la polarité des PINs est donc orientée de cette région vers la pointe de l'organe où il y a une forte activité des transporteurs AUX/LAX (Abley et al., 2016).

CUC3, qui est exprimé comme CUC2 aux domaines frontières, est aussi impliqué dans la formation des dents, mais agirait à un stade tardif de leur développement pour maintenir la répression de croissance dans les sinus ou la croissance des dents. En effet, la mutation de *CUC3*, conduit également à une marge plus lisse indiquant qu'il pourrait aussi être impliqué dans la formation des dents (Figure I.B.5). Une analyse fine du mutant nul *cuc3-105* a révélé que les dents de ce mutant sont initiées correctement, mais qu'elles s'émousent rapidement lorsque la feuille mesure environ 2 mm (Hasson et al., 2011).

Un couple ligand-récepteur EPFL2 (EPIDERMAL PATTERNING FACTOR-LIKE 2) -ER (ERECTA) participe également à la croissance des dents. La mutation du gène *EPFL2*, qui code des peptides sécrétés et celles des gènes *ER* qui codent des récepteurs-kinases conduit à une marge lisse. Ce couple EPFL2-ER interagit à la dent à l'exception de la pointe où EPFL2 n'est pas présent. Ce profil est dépendant des réponses auxiniques. En effet alors que EPFL2-ER restreignent les réponses à l'auxine à la pointe de la dent, les réponses à l'auxine à la pointe organisent l'expression de ER et EPFL2 en induisant l'expression de ER à la pointe et en réprimant EPFL2 (Tameshige et al., 2016).

Le gène *DPA4* (*DEVELOPMENT-RELATED PcG TARGET IN THE APEX 4*) codant un répresseur transcriptionnel putatif RAV (Related to ABI3/VP1), a également été mis en évidence comme étant exprimé aux sinus et contribuant aux stades tardifs de la formation des dents en contrôlant l'expression

de *CUC2*. En effet, le mutant *dpa4* est très denté et ce défaut apparaît durant la croissance des dents et non à leur initiation. De plus, dans les lignées sur-exprimant *DPA4* qui présentent des feuilles aux marges lisses, l'expression de *CUC2* est fortement diminuée (Engelhorn et al., 2012).

En plus de PIN1, d'autres acteurs du transport et de la signalisation auxinique semblent avoir un rôle sur la formation des dents. En effet, certains ARFs semblent être impliqués dans ce processus. C'est notamment le cas de ARF5 car son mutant *arf5-2*, un allèle faible de *arf5*, a une marge plus lisse et présente une forte diminution de l'expression de *CUC2*. *ARF5* pourrait donc être impliqué dans la formation des dents via le contrôle de *CUC2* (Galbiati et al. 2013). La régulation de *ARF17* par miR160 apparaît également comme étant importante pour une forme de feuille normale. Les plantes transgéniques *ARF17* résistantes à miR160 présentent de petites feuilles aux dents très découpées et pointues (Mallory et al., 2005).

Les transporteurs d'influx d'auxine AUX1, LAX1 et LAX2 modulent également la dentelure de la marge puisque le triple mutant *aux1 lax1 lax2* ne présente pas de dent au stade précoce. Les dents apparaissent néanmoins au stade plus tardif, mais restent moins prononcées que celle de Col-0. (Kasprzewska et al., 2015).

Le maintien des dents semble impliquer l'action de IAA8 et IAA9 puisque le double mutant *iaa8iaa9* initie des dents qui s'émousent et disparaissent avec la croissance (Koenig et al., 2009).

Ainsi, l'initiation et le maintien des dents sont dépendants de nombreux acteurs et de leurs interactions, ainsi que de leur modulation via des répresseurs transcriptionnels ou des micro-ARNs. De plus, l'initiation d'une dent peut être comparée à celle d'un primordium, puisque leur émergence nécessite la convergence des transporteurs PIN1 afin de créer un maximum d'auxine, ainsi que de l'action des gènes *CUCs* pour permettre la formation de domaines frontières. La formation des dents foliaires peut donc être considérée comme un modèle développemental à part entière.

II. Projet de thèse

Mon projet de thèse s'inscrit dans un programme visant à comprendre comment les mécanismes de la signalisation de l'auxine interviennent dans la morphogénèse foliaire et en particulier dans la formation des dents à la marge de la feuille. La formation de la dent implique *CUC2* qui permet d'établir les domaines frontières à la marge de la feuille entre la future dent et le futur sinus ainsi que de modifier l'orientation des transporteurs d'efflux d'auxine PIN1 afin de créer un maximum d'auxine à la marge du limbe qui sera à l'origine de l'initiation de la dent. L'auxine permet également de limiter l'expression de *CUC2* au sinus (Nikovics et al., 2006; Bilsborough et al., 2011).

Néanmoins, chez *Arabidopsis* les acteurs de la signalisation auxinique qui pourraient être impliqués dans ce processus ne sont pas connus. Ma thèse se focalise donc sur la recherche des facteurs de transcription de la famille des *ARFs* qui pourraient être impliqués dans la morphogénèse foliaire et plus spécifiquement dans la formation des dents.

Le premier objectif de ma thèse a été de mettre en évidence les *ARFs* exprimés dans les très jeunes feuilles, aux stades de formation des dents et de préciser leurs profils. Pour cela, les 23 *ARFs* ont été observés dans les feuilles grâce à des constructions transcriptionnelles rapportrices (Rademacher et al., 2011) par microscopie confocale. Les *ARFs* dont le profil est présent précocément dans la zone dent/sinus ont été plus finement analysés. Le traitement des données a nécessité le développement d'un pipeline permettant l'intégration des données, leur quantification et l'établissement de cartographies moyennes en collaboration avec l'équipe MIN (IJPB, Versailles). Ce travail préalable constitue un premier chapitre de résultats.

Le second objectif a été de déterminer si les profils d'expression de ces *ARFs* sont modifiés dans des feuilles aux formes altérées. Pour cela, les marqueurs *pARF::GFP* ont été introgrésés dans des mutants présentant des formes de feuilles modifiées tels que *cuc2-3* et *cuc3-105* qui présentent des feuilles plus lisses ou *mir164a-4* et les plantes transgéniques *CUC2gm4* qui ont une marge très découpée. Cela permet également de mettre en évidence si la variation de l'abondance de *CUC2* impacte le profil d'expression des *ARFs*.

Enfin, le troisième objectif a été de tester si certains de ces *ARFs* sont bien impliqués dans la morphogénèse foliaire, en analysant et en quantifiant les morphologies foliaires des simples et doubles mutants *arf*. Ces analyses sont réalisées à l'aide de l'outil Morpholeaf (Biot et al., 2016).

III. Résultats

III. A. Méthodologie et matériels pour l'analyse des ARFs

Dans le but de mettre en évidence l'implication d'un ou plusieurs ARFs dans la croissance des feuilles et plus particulièrement dans la mise en place des dents, la première étape de la thèse a été d'identifier les ARFs exprimés dans la feuille et de déterminer ceux qui sont exprimés dans les mêmes zones. Pour cela, une analyse sans à priori a été réalisée par microscopie confocale à l'aide de plantes exprimant chacune une construction transcriptionnelle (*pARF::GFP*) rapportrice de l'expression d'un gène ARF et où la GFP est adressée aux noyaux (Rademacher et al., 2011).

A partir de ces acquisitions en microscopie confocale, l'objectif a ensuite été d'étudier précisément les profils d'expression des différents gènes au moment de la formation des dents et de chercher à établir une carte moyenne des ARFs exprimés dans la feuille. Un ensemble de questions concernant le choix et la calibration des échantillons puis le traitement des images et la représentation des données a rapidement été soulevé. Le présent chapitre expose la démarche, les étapes et les raisons ayant conduit à mettre en œuvre différents traitements des données et adopter différents modes de représentations des résultats.

III.A.1. Imagerie des profils d'expression

Au départ de la thèse, le premier objectif a été de savoir quels étaient les ARFs exprimés dans la feuille, plus particulièrement quels étaient ceux présents au niveau des dents et sinus et qui auraient donc potentiellement un rôle dans cette zone et dans le processus d'initiation ou de croissance des dents. En terme d'expression dans la feuille, les données de transcriptomique disponibles donnaient un premier aperçu (Figure III.A.0), toutefois le plus souvent elles concernent des stades de développement de feuilles plus avancés et surtout sans information spatiale quant aux territoires d'expression. Les profils d'expression des différents ARFs ont pu être mis en évidence à l'aide de constructions *pARFx::GFP*. Celles-ci ont précédemment été utilisées pour étudier les profils d'expression des ARFs dans la racine primaire et dans l'embryon à différents stades de l'embryogénèse (Rademacher et al., 2011) où ils ont permis de générer des cartes d'expression ou plutôt de co-expressions qui ont été validées à l'aide d'hybridation in situ et d'approches génétiques, notamment grâce à l'utilisation de mutants (Rademacher et al., 2011; Vernoux et al., 2011; Rademacher et al., 2012).

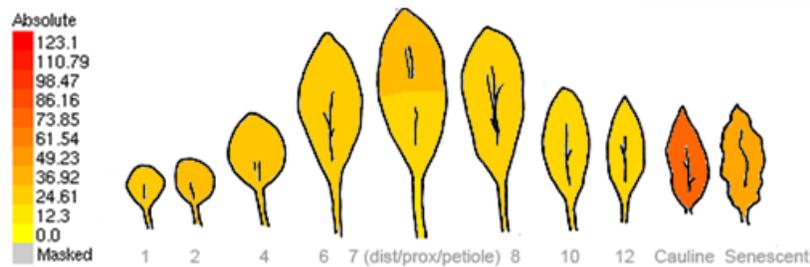


Figure III.A.0. Exemple de profil d'expression observables dans la feuille à l'aide de données de transcriptomique.

Le profil d'expression de ARF11 est observé dans les feuilles matures d'Arabidopsis. La variation du profil est représentée par une échelle de couleur où l'expression la plus importante est représentée en rouge et la plus faible en jaune. Les données sont extraites de Arabidopsis eFP Browser (Winter et al., 2007).

La validation des profils d'expression des *ARFs* par ces différentes approches dans d'autres organes permet de rendre légitime leur étude dans la feuille. Des approches d'hybridation in situ en whole mount pour confirmer les profils d'expression observés dans la feuille ont également été entreprises sans parvenir à obtenir un signal sur ces organes.

Des constructions traductionnelles *pARF-ARF::GFP* (Rademacher et al. 2011) ont aussi été observées en microscopie confocale pour un petit nombre de gènes sans toutefois parvenir à visualiser un signal fluorescent dans les jeunes feuilles, vraisemblablement dû à un trop faible niveau d'accumulation des protéines. Nos analyses se sont donc limitées à l'étude des profils d'expression des gènes via les rapporteurs transcriptionnels (Rademacher et al. 2011).

Pour étudier l'évolution des profils d'expression des *ARFs* au cours de la formation des dents, des feuilles avec une ou deux dents (soit respectivement des longueurs moyennes de feuilles de 350µm et de 550µm) issues de plantules ayant poussées 3 semaines en jours courts en terreau, ont été imagées avec les mêmes paramètres d'acquisitions pour tous les rapporteurs afin de comparer les profils et dans une certaine mesure les variations d'intensité de la fluorescence. Chaque feuille a été imagée dans son entier à l'aide d'un canal GFP et d'un canal de la chlorophylle (cf matériel et méthodes). Le canal GFP permet de mettre en évidence la fluorescence présente dans les noyaux correspondant à la protéine rapportrice. Le canal de la chlorophylle est quant à lui utilisé pour visualiser la feuille dans son entier, à l'exclusion des cellules de l'épiderme qui ne sont pas chlorophylliennes. Cela permet ainsi de pouvoir repositionner les profils d'expression dans la feuille ce qui est critique en particulier pour les gènes exprimés dans des domaines restreints.

Les acquisitions peuvent présenter des atténuations de fluorescence en fonction des assises cellulaires, en particulier dans les parties les plus basales de l'échantillon du fait de la densité et de l'épaisseur de la feuille qui est en moyenne de 60 μ m. Cette épaisseur empêche ainsi le laser d'atteindre avec la même puissance les assises les plus basales. Pour corriger ce défaut, les feuilles ont été imagées sur les faces abaxiale et adaxiale, et les analyses de la répartition des noyaux ont été réalisées dans les deux orientations. Sur la face adaxiale des feuilles, l'abondance des trichomes au moins dans la zone distale des jeunes feuilles complique les observations.

Les feuilles étant souvent considérées comme des objets plans en 2-Dimensions, les profils d'expression ont dans un premier temps été étudiés à l'aide de projections maximales réalisées sous ImageJ. Cela permet de visualiser des objets 3D en 2D, en regroupant toutes les images d'une même pile réalisée lors de l'acquisition d'une feuille en une seule image. Grâce à cette méthode, les profils d'expression sont observables dans leur totalité sur un seul plan. A titre d'exemple, la figure III.1 illustre plusieurs images de la pile qui en comprend au total 88, à différents plans focaux d'une même feuille imagée par la face adaxiale : au niveau de l'épiderme supérieur (image 13/88 ; figure III.A.1a), plus profondément dans la feuille (image 30/88 ; figure III.A.1b) et dans les dernières assises de la feuille (image 58/88 ; Figure III.A.1.c) ainsi que la projection maximale rassemblant l'ensemble des acquisitions (1-88/88 ; Figure III.A.1.d).

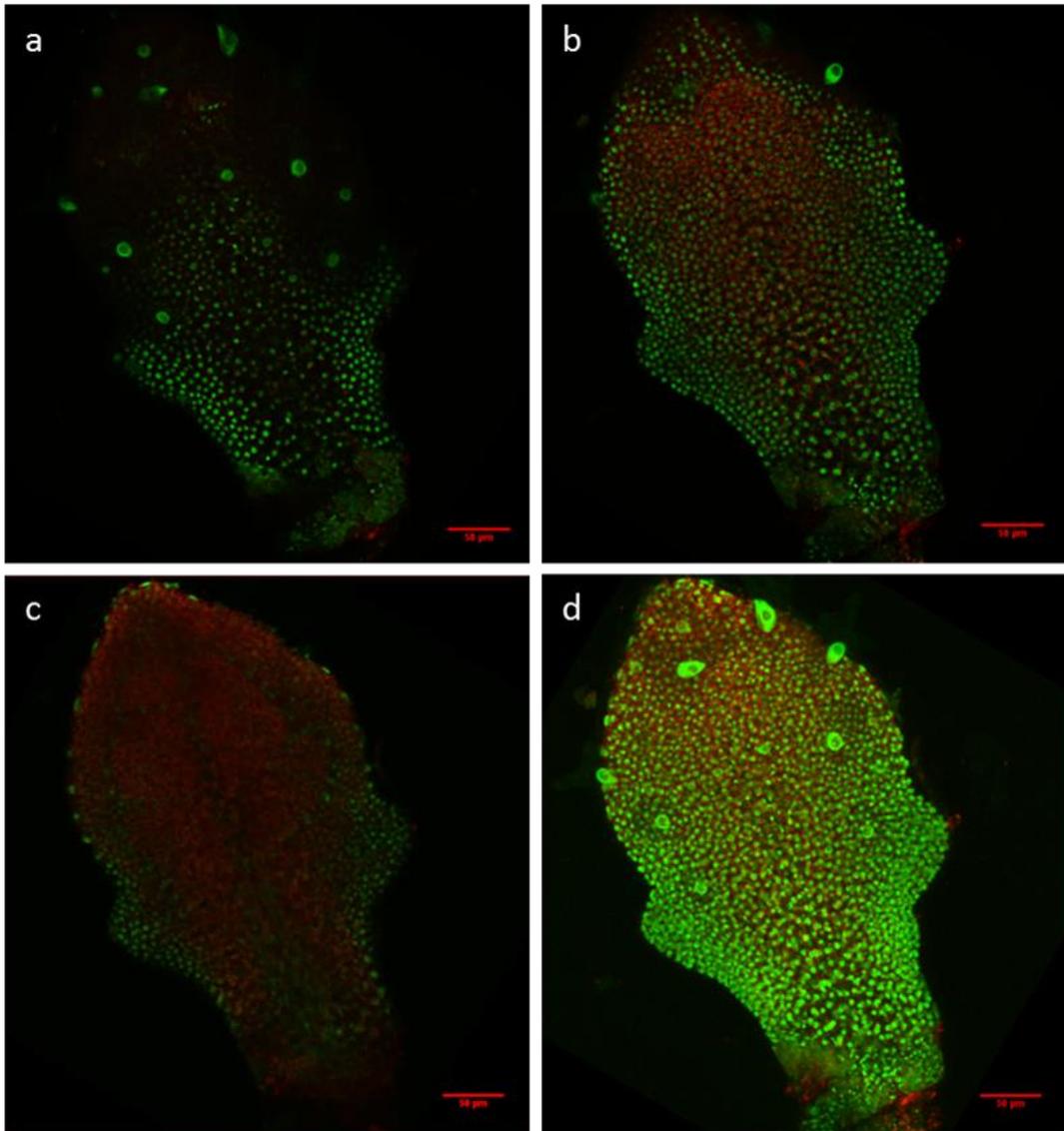


Figure III.A.1. Création de projection maximale pour visualiser les profils d'expression. La feuille est imagée en entier sur la face adaxiale, soit 88 images avec un pas d'acquisition en z de 0,5 μ m. Les acquisitions (a, b, c) représentent respectivement les images 13, 30 et 58. Celles-ci sont ensuite compilées en une image (d) en 2D grâce à la projection maximale d'imageJ. La barre d'échelle représente 50 μ m.

Ces variations de profils en fonction du plan focal peuvent résulter de l'évolution du profil d'expression ou de sa détection en fonction des assises de la feuille mais il est essentiel de souligner que les jeunes feuilles ne sont pas totalement planes et qu'un même plan focal ne permet pas d'imager simultanément toutes les cellules d'une même assise. Les feuilles qui ont été utilisées présentent une forme légèrement concave sur la face adaxiale.

La projection maximale peut induire une déformation relative de la feuille en particulier à la marge lorsque la feuille est incurvée. En effet, comme illustré dans la figure III.A.2, la fluorescence au niveau

des bords de la feuille apparaît plus importante par la superposition de plusieurs noyaux que dans le reste de la feuille lorsqu'on réalise une projection maximale, bien que l'intensité de chaque noyau reste inchangée.

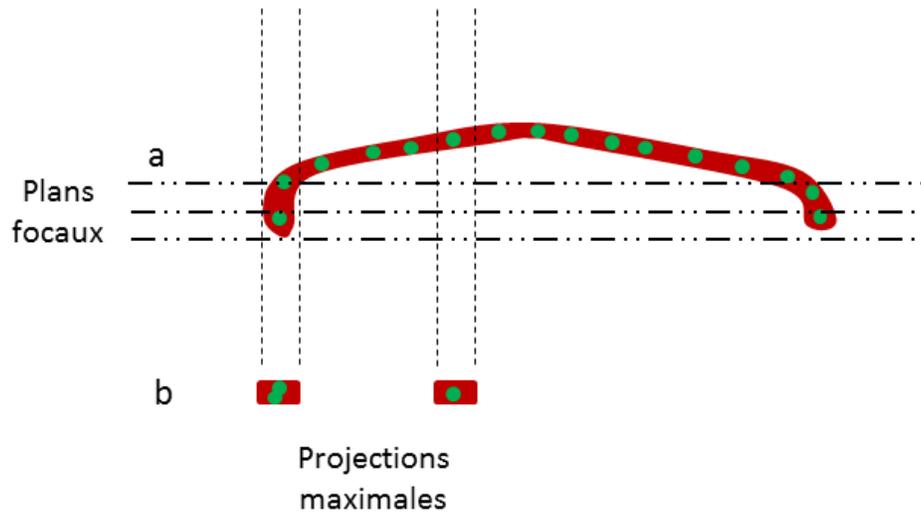


Figure III.A.2. Artéfact de la projection maximale lorsque le bord de la feuille n'est pas dans le même plan. Si le bord des feuilles est replié, alors celui-ci n'apparaîtra pas sur le même plan focal lors de l'acquisition (a). Lors de la projection maximale (b), cela se traduit par un artéfact où la fluorescence apparaît plus importante dû à la suraccumulation de tissus et donc de noyaux au même endroit. En rouge : contour de la feuille, en vert : noyaux fluorescents.

On peut également noter sur la projection maximale (figure III.A.1.d), que la fluorescence semble être plus importante au niveau de la partie proximale de la feuille. Cela pourrait-être dû à un nombre de noyaux plus élevé dans cette zone de la feuille en raison de cellules plus petites menant à une impression d'intensité de la fluorescence plus importante même si le signal individuel par noyau n'est pas plus élevé. Pour évaluer si les variations d'intensité de la fluorescence visibles à l'œil reflètent une réalité ou s'il s'agit d'un biais visuel, il a été nécessaire de quantifier la fluorescence.

III.A.2. Quantification de la fluorescence.

Afin d'étudier si des variations d'intensité existent au sein d'un profil d'expression, une macro a été créée sous imageJ (L. Serra). En travaillant à partir du canal GFP (figure III.A.3.b) les noyaux fluorescents de chaque image de la pile d'images sont mis en évidence à l'aide d'outils imageJ. Tout d'abord le seuillage, qui permet de définir les intensités minimale et maximale de l'image afin de supprimer le bruit de fond et de ne garder visible que la fluorescence des noyaux. Les noyaux sont ensuite détectés grâce à l'outil d'analyse de particules qui permet de choisir la gamme de taille des objets circulaires à détecter et de les dénombrer. Les noyaux sont ensuite positionnés dans le plan, c'est à dire qu'un numéro de positionnement est attribué à chaque noyau (figure III.A.3 c, d, e) puis la fluorescence est récupérée et mesurée en chaque noyau sur toutes les images de la pile.

Afin de pouvoir apprécier les différences d'intensité de fluorescence plusieurs LUT (LookUp Table), c'est-à-dire des palettes de couleurs, ont été testés sur les quantifications de fluorescence grâce aux palettes que propose imageJ.

Tout d'abord des LUT continus à couleur unique dont l'intensité varie en fonction de la fluorescence ont été testés, à l'exemple du LUT Cyan (figure III.A.4.a) qui est bleu foncé à noir aux intensités les plus faibles et bleu clair aux intensités les plus fortes. Lorsque l'on applique ce LUT, les variations d'intensité peuvent être difficiles à distinguer du fait que la couleur soit la même et évolue en un dégradé continu. Un LUT continu à différentes couleurs a ensuite été testé (Figure III.A.4.b). Grâce à celui-ci, les variations d'intensité apparaissent plus clairement, puisque représentées par un nuancier de différentes couleurs. Le relatif continuum de couleurs ne permet néanmoins pas facilement de faire ressortir des domaines d'expression de façon très contrastée.

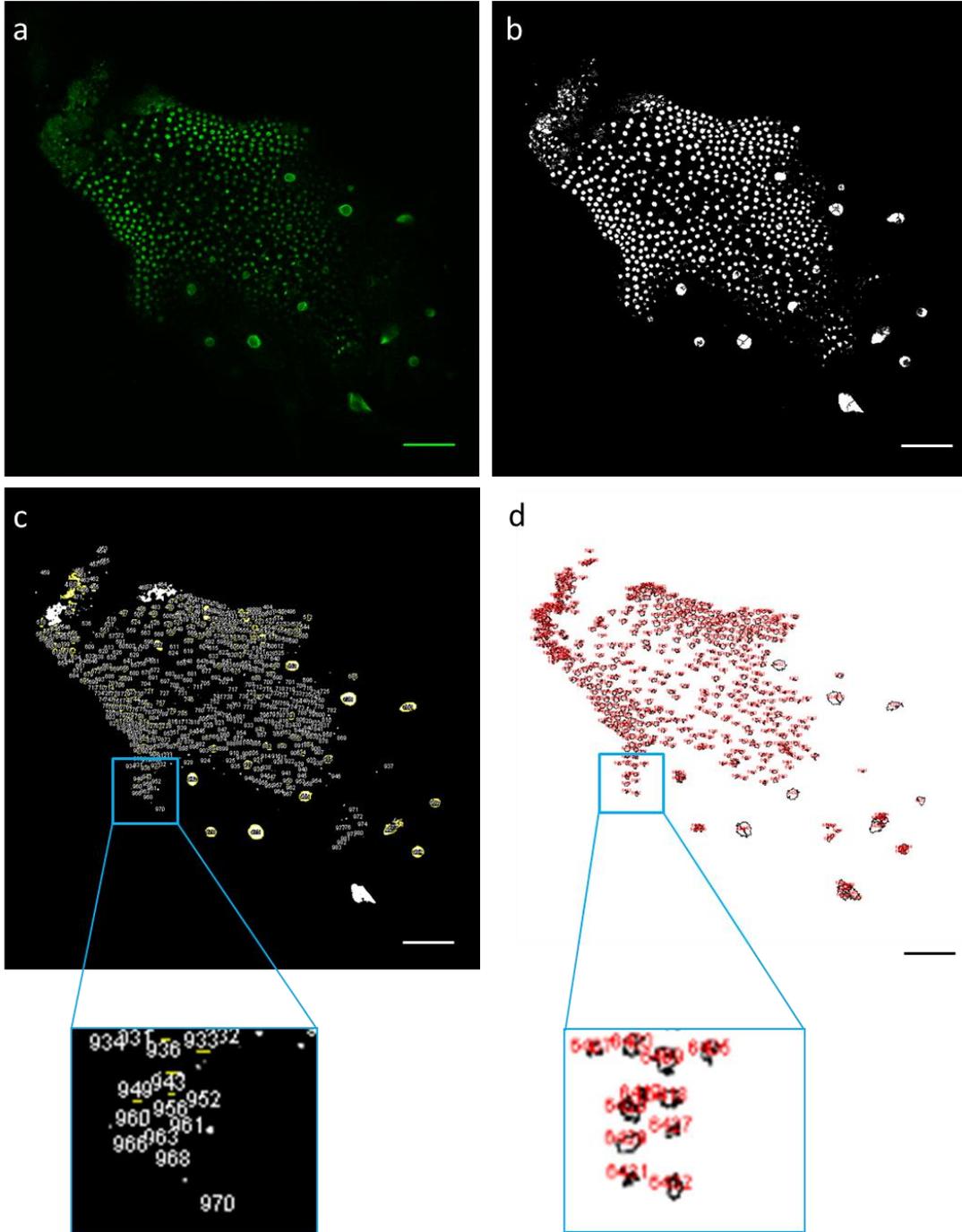


Figure III.A.3. Quantification de la fluorescence.

Pour chaque image d'un empilement, le canal GFP est séparé du canal de la chlorophylle (a). Tous les noyaux du canal GFP sont ensuite seuillés (b), détectés (c) et positionnés dans le repère du plan (d). La fluorescence est récupérée et quantifiée en chaque point. La barre d'échelle représente 50µm.

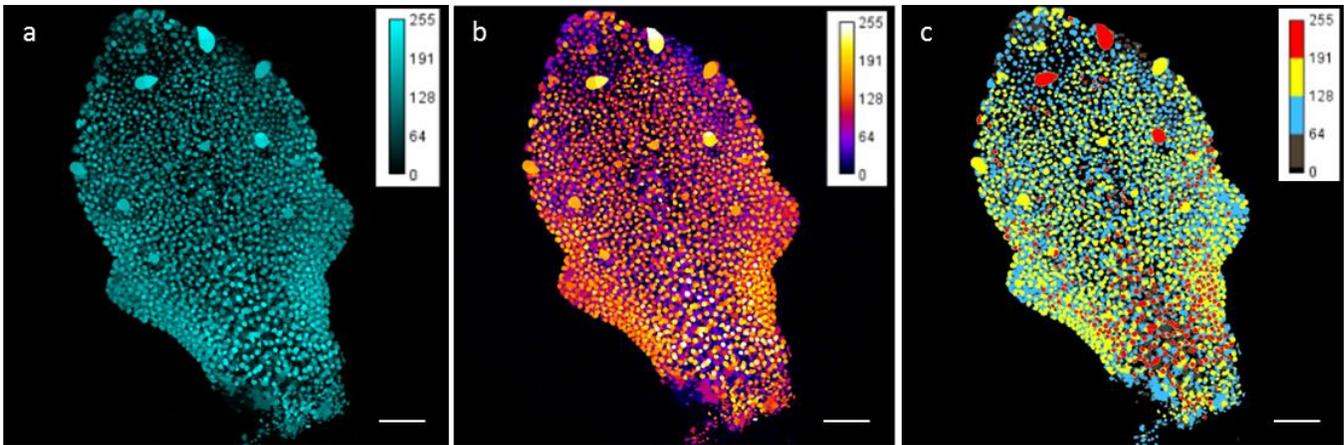


Figure III.A.4. Visualisation de la quantification de fluorescence à l'aide de LUT (LookUp Table).

Les LUTs appliqués aux images peuvent être soit continus avec un dégradé de la même couleur (a) ou de couleurs différentes (b) soit réalisés à partir de plusieurs couleurs dont les intervalles sont définis (c). Le LUT (a) est le Cyan, le LUT (b) le Fire, et le LUT (c) a été défini manuellement à l'aide du LUT Editor d'imageJ. La barre d'échelle représente 50µm. Les intensités de la fluorescence sont représentées par une échelle de couleur répartie en 256 niveaux de gris.

Dans la perspective d'une cartographie par domaines, l'histogramme de répartition de l'intensité de la fluorescence des noyaux dans la feuille a été observé mais ne permet pas de mettre en évidence des classes franches (figure III.A.5). Un LUT a donc été créé à l'aide de l'outil « LUT Editor ». Ce dernier a été établi à l'aide de 5 couleurs différentes: noir, gris, bleu, jaune et rouge, définies en répartissant les 256 niveaux de gris de manière équitable en 4 classes, puis la première classe a été redivisée en deux sous-classes inégales (le noir et le gris) afin d'extraire le bruit de fond de cette première classe (Figure III.A.4.c).

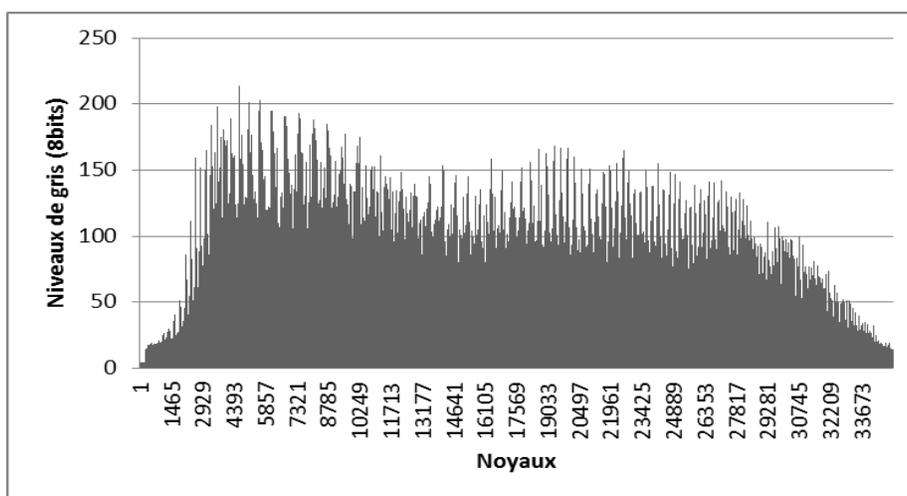


Figure III.A.5. Histogramme de la répartition de l'intensité de la fluorescence des noyaux dans une feuille. L'intensité de la fluorescence est mesurée en 256 niveaux de gris (8bits).

La quantification de la fluorescence et la création du LUT permettent ainsi de définir des profils d'expression simplifiés pour chaque ARF car les zones de fortes et faibles intensités de la fluorescence sont directement visualisables. Cependant, ces quantifications ne sont que relatives puisqu'il n'y a pas de contrôle interne et ubiquitaire de fluorescence permettant un marquage homogène de tous les noyaux dans les feuilles et une véritable calibration.

Afin d'étudier plus finement les différences d'intensité entre les dents et les sinus, des mesures de ratios de la fluorescence ont été réalisées entre les dents et les sinus, entre les dents 1 et 2 ou entre sinus. Pour cela, 10 noyaux par zones ont été sélectionnés : pour la dent, les noyaux sont sélectionnés dans une zone partant de la pointe et qui rentre vers l'intérieur de la feuille selon l'axe médian et pour les sinus ceux qui sont les plus proches du creux (Figure III. 6). La moyenne de l'intensité des 10 noyaux est ensuite réalisée avant de réaliser les ratios entre zones pour s'affranchir de possibles variations d'intensité entre échantillons ou séries expérimentales.

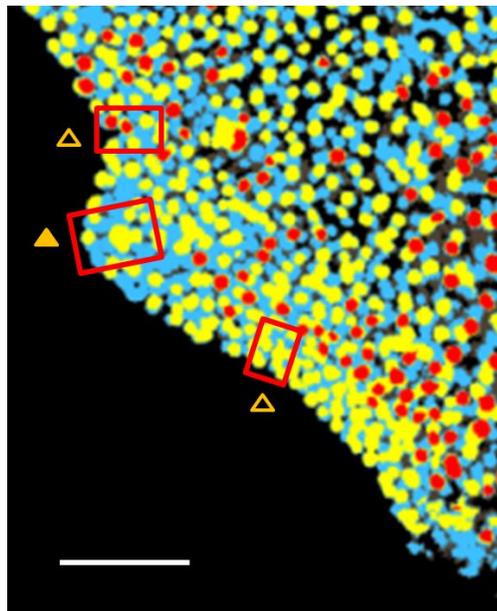


Figure III.A.6 Sélection des noyaux pour la mesure des ratios de la fluorescence.

Dix noyaux de chaque zone encadrée en rouge sont sélectionnés. Le triangle plein indique le positionnement de la dent, et les triangles vides indiquent les sinus. La barre d'échelle représente 50 μ m.

III.A.3. Cartographie moyenne des profils d'expression

Les profils d'expression sont observés dans les feuilles individuelles. Or, à l'inverse de la racine ou de l'embryon, dont la forme et l'organisation cellulaire sont extrêmement constantes, les feuilles présentent une variabilité beaucoup plus importante et des stades de développement relativement mal définis. La Figure III.A.7 illustre que des feuilles de longueurs similaires ne présentent pas strictement la même forme, notamment au niveau de leur symétrie : celle de la feuille (a) est déviée vers la gauche alors que celles de la feuille (b) est vers la droite. De plus, l'émergence des deuxième dents est plus marquée dans la feuille (a) que la feuille (b). Ces variations empêchent ainsi la superposition immédiate des feuilles et donc des profils d'expression pour un même *ARF* en tenant compte des différents échantillons et entre les différents *ARFs*.

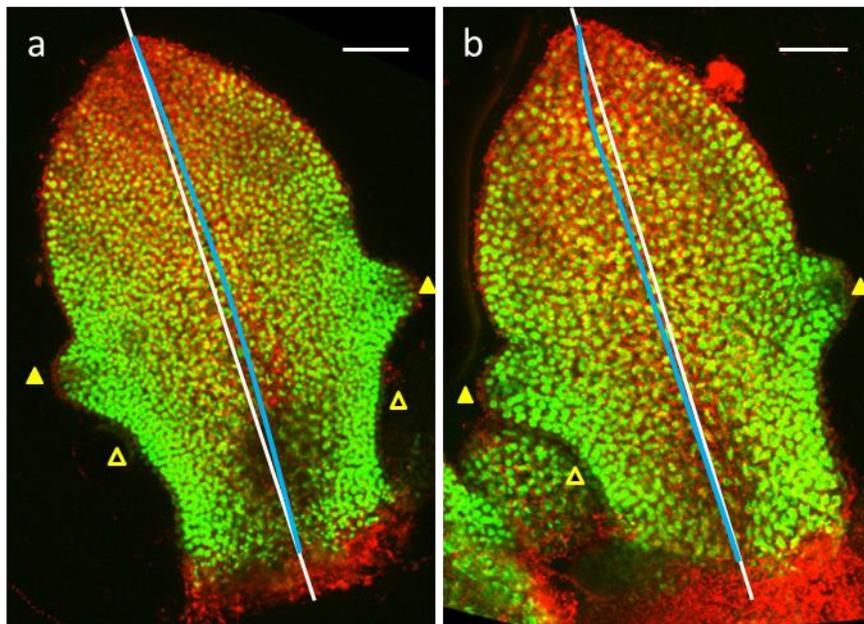


Figure III.A.7. Variation de la forme de la feuille et du profil d'expression. Les feuilles de tailles similaires peuvent présenter des formes diverses et de légères variations de profils d'expression. (a) La feuille présente deux dents en croissance et deux dents émergentes ; (b) la feuille a deux dents en croissance et une dent émergente. Avec les mêmes paramètres d'acquisitions la fluorescence de la feuille (a) semble moins importante que celle de la (b) au niveau de la pointe de la feuille. La barre d'échelle représente 50 μ m. Les triangles pleins représentent les dents en croissance et les triangles vides les dents émergentes. L'axe blanc représente l'axe de symétrie de la feuille qui passe par la pointe de la feuille et au centre du pétiole. L'axe bleu représente la déformation de l'axe des feuilles.

La question se pose donc de comparer de manière objective les acquisitions réalisées avec un même rapporteur sur les différentes feuilles (N =18-20) puis de comparer les profils des différents *ARFs* qui pourraient être co-exprimés.

Comment obtenir une forme de feuille standardisée à partir de feuilles individuelles et comment projeter dans cette feuille moyenne les différents profils d'expression des *ARFs*. Pour un même *ARF*, en fonction de la feuille imagée, bien que les acquisitions aient été réalisées avec les mêmes paramètres, le profil peut varier légèrement en termes d'intensité ou de noyaux fluorescents. Cela est par exemple visible sur la Figure III.A.7, où la feuille (a) semble présenter une zone dépourvue de fluorescence plus large au niveau de la pointe de la feuille comparée à la feuille (b).

Ces variations peuvent d'une part être dues à la variabilité entre les échantillons et d'autre part dépendre du moment où les acquisitions ont été réalisées puisque le laser argon utilisé pour exciter la GFP oscille au cours de la journée et son intensité diminue avec le temps. De plus, l'expression de certains *ARFs* varie très légèrement au cours de la journée (Figure III.A.8) sans pour autant que l'on observe des modifications des profils d'expression. Ainsi des acquisitions réalisées à deux moments différents de la journée ou espacées de plusieurs mois peuvent présenter des variations.

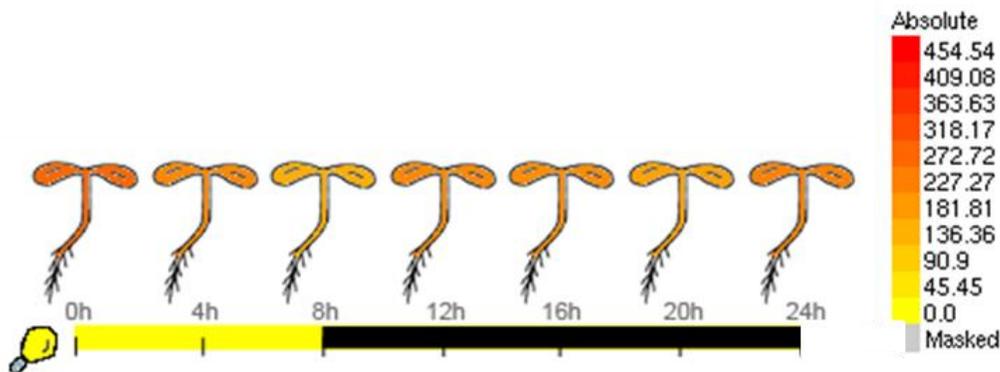


Figure III.A.8. Exemple de variation du niveau d'expression de ARF1 sur 24h en jours courts.

Les plantules de 7 jours sont éclairées durant 8h puis passées à l'obscurité.

La barre de calibration représente en absolu le niveau l'expression du gène *ARF1* (At1G59750).

D'après (Michael et al., 2008), illustration tirée de eFP Browser.

Par ailleurs, la formation des dents étant un processus continu et itératif, les profils d'expression de certains *ARFs* pourraient évoluer en fonction du stade de développement de la feuille. Ainsi, la cartographie des *ARFs* doit être réalisée à plusieurs stades de développement de la feuille, c'est pourquoi lors des acquisitions, il a été décidé d'imager des feuilles ayant des stades de développement

différents.

En se basant sur le logiciel Morpholeaf (Biot et al., 2016) qui a été développé pour permettre une étude quantitative de la forme des feuilles, une méthodologie a été mise en place afin d'utiliser des formes de feuilles moyennes précédemment générées sur lesquelles les profils d'expression pourront être projetés (Figure III.A.9) (Oughou *et al.*, 2017; soumis). Ce travail a été réalisé par Jasmine Burguet de l'équipe modélisation et imagerie numérique (IJPB Versailles) avec laquelle notre équipe collabore. Pour les acquisitions correspondant à un *ARF* donné, les contours de chaque feuille individuelle sont réalisés à l'aide de Morpholeaf en utilisant la projection maximale obtenue avec le canal de la chlorophylle.

La chlorophylle n'étant pas très présente dans les jeunes organes du fait de la faible différenciation cellulaire à ce stade, une augmentation de contraste est parfois nécessaire pour réussir à visualiser les dents émergentes. De même, les cellules de la marge n'étant pas chlorophylliennes, les contours de feuilles ainsi réalisés présentent une légère sous-estimation du contour réel.

Les contours détournés sont ensuite séparés selon l'axe médian de la feuille en deux demi-feuilles pour être traités séparément puisque chaque demi-feuille peut être à un stade de développement légèrement différent (Figure III.A.7). Les feuilles, issues des plantules de 3 semaines en jours courts, ayant été choisies pour leur nombre de dents et non en fonction de leurs rangs, une méthode de détection automatique de l'âge des feuilles reposant sur le calcul de la médiane de la longueur de la feuille, de la hauteur et la largeur de la dent a été mise en place (Oughou et al., 2017, soumis). Chaque demi-feuille subit une déformation permettant d'ajuster sa forme au contour moyen choisit dans la base de données Morpholeaf et qui correspond à un âge de feuille donné (en heures après initiation de l'organe). Ces déformations sont contrôlées par la mise en place de repères placés au niveau de la pointe de la feuille, de la base du pétiole, des sinus, des pointes de dents et également d'une droite passant au milieu de la feuille. Cela permet de ne pas déformer de manière anarchique la feuille et le profil d'expression étudié. La demi-feuille ainsi modifiée est projetée en miroir selon l'axe médian pour obtenir à nouveau le contour d'une feuille entière parfaitement symétrique.

L'acquisition correspondant au canal fluorescent de la GFP du promoteur *ARF* étudié est ensuite projetée sur ce contour modifié et tous les profils des différentes feuilles peuvent être moyennés pour obtenir un profil d'expression moyen. Le moyennage est réalisé à partir d'une moyenne pondérée, c'est-à-dire que le poids de chaque feuille dans la moyenne dépend de la distance de celle-ci à l'âge de la feuille de référence (Figure III.A.9). Cette méthode, réalisée à partir de projections maximales, permet ainsi d'observer comment se répartissent les différents *ARFs* sur la feuille. Cependant, considérer les feuilles comme des objets en 2 dimensions ne permet pas de mettre en évidence si certains *ARFs* sont

véritablement co-exprimés, du fait de l'absence de résolution en Z. En effet même s'ils sont présents dans une même zone de la feuille, ils pourraient être exprimés dans des assises cellulaires différentes, il est donc essentiel de décomposer le signal selon l'axe Z.

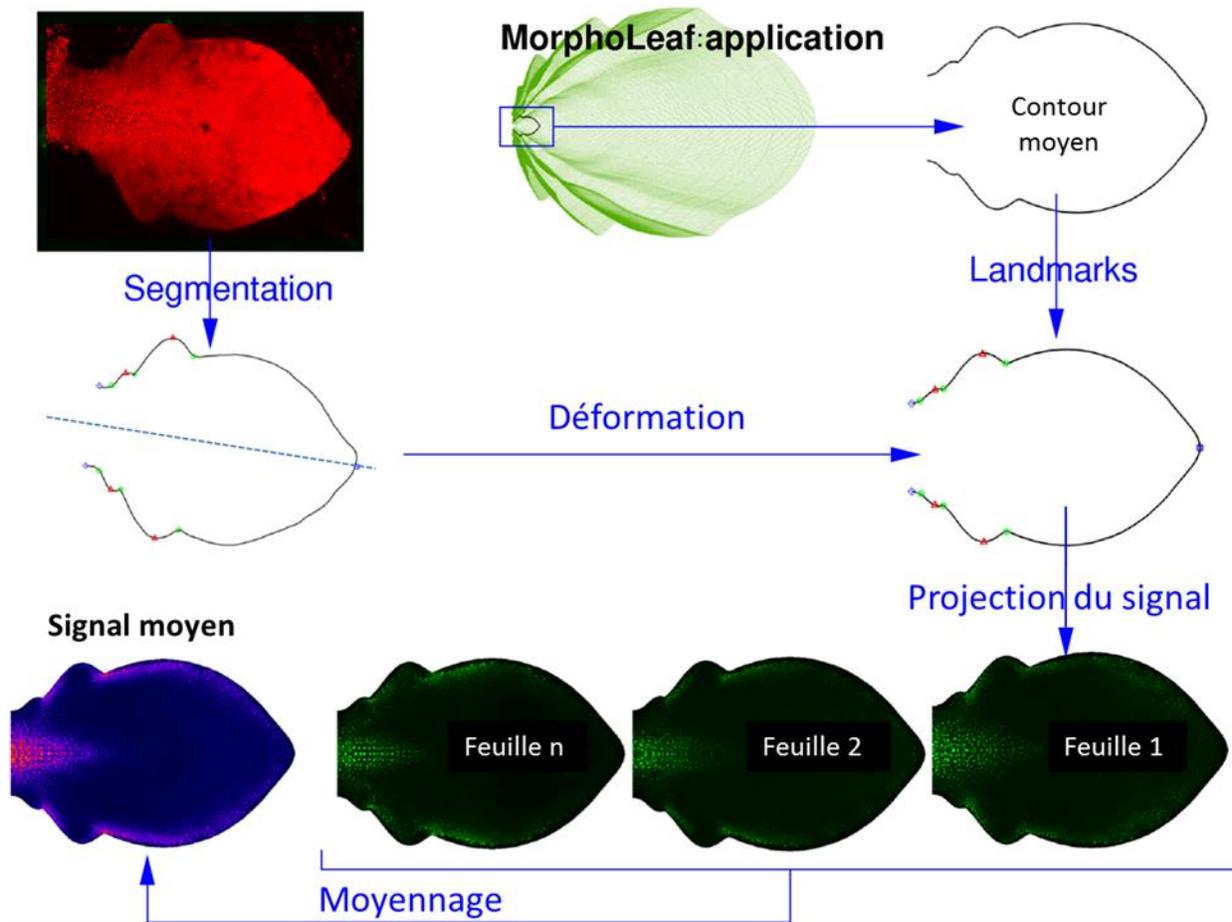


Figure III.A.9. Méthode de cartographie des profils d'expression à l'aide de Morpholeaf.

Le contour de la feuille est segmenté à partir du canal de la chlorophylle. Ce contour est séparé en deux pour permettre le travail sur des demi-feuilles. Chaque demi-feuille est projetée pour reformer une feuille entière puis cette feuille est déformée pour rentrer dans le contour moyen associé au rang de notre feuille. Cela est possible grâce à des points de repères (Landmarks) positionnés au niveau de la pointe de la feuille, des dents, des sinus et du pétiole. Le signal fluorescent peut ensuite être projeté dans le contour modifié, et cela pour toutes les feuilles d'un même rang. Ces différents profils peuvent être moyennés pour obtenir un signal moyen.

III.A.4. Analyses de la répartition de noyaux en Z

Afin de gagner en résolution et connaître la répartition des noyaux en 3D, une analyse de la répartition des noyaux fluorescents dans l'épaisseur de la feuille a été réalisée au niveau des zones dents/sinus.

A l'aide de l'outil Orthogonal Views d'ImageJ, des sections virtuelles horizontales et verticales ont été réalisées.

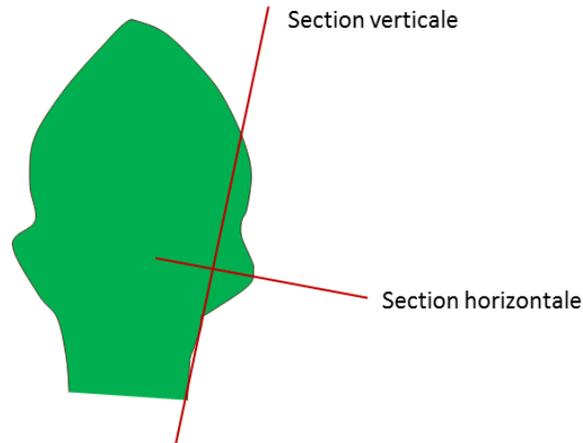


Figure III.A.10. Positionnement type des sections horizontale et verticale dans la feuille.

La section horizontale est positionnée de façon médiane à la dent. La section verticale, perpendiculaire à la section horizontale passe par l'un des sinus.

Pour faire des coupes dans les sinus et les dents de façon médiane, chaque image est réorientée en conséquence en fonction de la forme propre à chaque dent (Figure III.A.10). Les sections horizontales sont réalisées dans les sinus et les dents, et dans la mesure du possible, les sections verticales passent également dans un autre sinus ou dent. Dans l'exemple présenté en figure III.A.11, les sections horizontales passent par le sinus distal de la dent en croissance et la coupe verticale au niveau du sinus basal de la dent en croissance (Figure III.A.11.a), au niveau de la dent en croissance et de son sinus basal (Figure III.A.11.b) et au niveau du sinus basal de la dent en croissance et celui de la dent émergente (Figure III.A.11.c).

En raison du pas en Z de $0.5\mu\text{m}$ utilisé lors des acquisitions et qui permet d'avoir une bonne résolution de la feuille dans toute son épaisseur, les coupes font apparaître des noyaux plus ovales que circulaires suggérant une déformation liée au chevauchement des différentes acquisitions. Néanmoins, ces coupes permettent d'apprécier la répartition du signal GFP en fonction des assises cellulaires. Les feuilles ayant été imagées sur les faces abaxiale et adaxiale pour limiter la perte d'information causée par l'atténuation

de la fluorescence dans l'épaisseur de la feuille, et les analyses de la répartition des noyaux ont été réalisées dans les deux sens.

Ces analyses permettent ainsi d'étudier finement si la répartition des noyaux fluorescents diffère entre les sinus et les dents pour les différents *ARFs*.

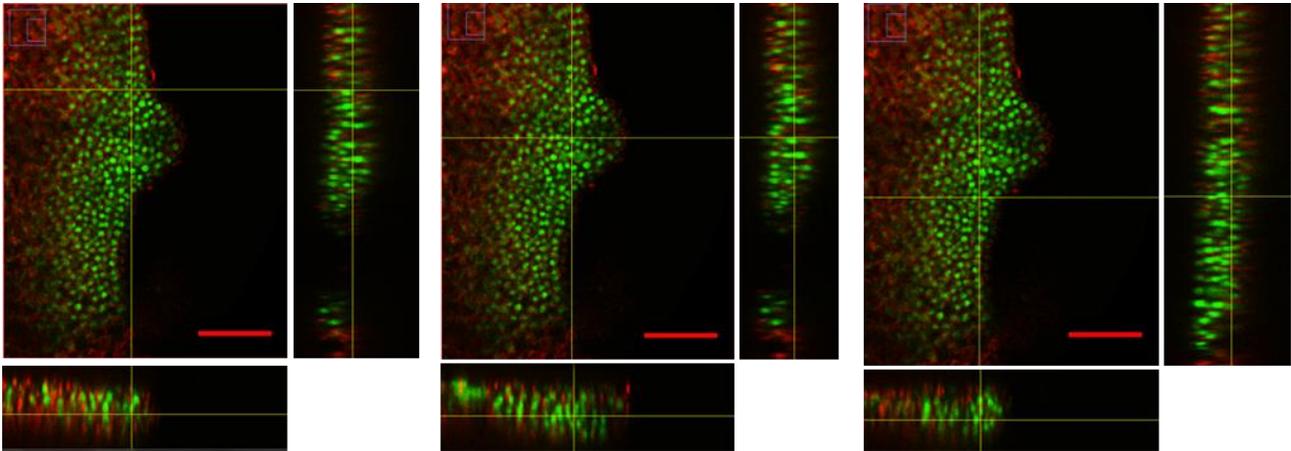


Figure III.A.11. Analyse de la répartition des noyaux fluorescents dans l'épaisseur de la feuille.

A l'aide de la fonction Orthogonal Views d'ImageJ, la répartition des noyaux dans l'épaisseur de la feuille peut être visualisée en réalisant des sections verticales et horizontales de feuilles. Les coupes horizontales sont réalisées soit en passant dans le sinus (a et c), soit en passant dans l'axe médian de la dent (b). La barre d'échelle représente 50 μ m.

III.A.5. Discussion

Les profils d'expression des *ARFs* dans la feuille sont mis en évidence grâce aux constructions transcriptionnelles *pARFx::GFP* (Rademacher et al., 2011), réalisées en amplifiant environ 2kb des promoteurs de chaque *ARFs*. L'activité du rapporteur étant dépendante de la région promotrice qui a été clonée, les profils d'expression mis en évidence à l'aide de ces constructions ne peuvent refléter que partiellement l'expression des *ARFs*.

De plus, la régulation de certains *ARFs* par des microARNs n'est également pas prise en compte avec ces constructions, rendant d'autant plus relatif les profils d'expression observés. La régulation post-transcriptionnelle de *ARF10*, *ARF16* et *ARF17* par miR160 a par exemple été mis en évidence comme étant essentielle pour une forme de feuille normale, les plantes résistantes à ce microARN présentant

des formes de feuilles très petites et dentelées (Mallory et al., 2005).

Cependant, ces profils d'expression ont précédemment été validés par des approches génétiques notamment en mettant en évidence que les *ARFs* qui sont co-exprimés agissent dans les mêmes processus développementaux durant le développement de l'embryon (Rademacher et al., 2012). Ainsi, même si les profils observés dans les feuilles ne sont peut-être pas totalement exactes, ils reflètent une réalité fonctionnelle, qui sera étudiée plus loin dans cette thèse.

Une analyse plus fine des profils d'expression a dans un premier temps été permise par la quantification de la fluorescence, laissant ainsi apparaître plus clairement les domaines d'expression.

Les acquisitions étant réalisées avec un pas en Z de 0.5 μ m, chaque noyau est présent sur plusieurs images de la pile. Il en résulte une minime déformation de la forme circulaire des noyaux, mais également une sur-évaluation de la quantification puisque la quantification de la fluorescence d'un noyau est réalisée sur plusieurs acquisitions confocales. Néanmoins, les acquisitions sont réalisées de manière identique, ainsi ce biais est constant et ne change donc pas le comparatif entre échantillons.

L'absence de contrôle interne permettant de marquer tous les noyaux de la feuille ne permet pas de réaliser des mesures ratiométriques de la fluorescence.

De plus, la quantification des noyaux n'est possible que si le profil d'expression à observer est étendu sur une zone importante puisque seul le canal GFP apparaît lors de ces quantifications. Ainsi, un profil très restreint ne pourra pas être localisé dans la feuille en l'absence du canal de la chlorophylle.

L'objectif initial de la première partie de la thèse était d'identifier les *ARFs* co-exprimés dans les zones d'intérêts. Pour cela, afin de distinguer les différentes assises de la feuille, des tentatives de colorations à l'iodure de propidium et au calcofluor des parois ont été réalisées, sans résultats, et par manque de temps aucun marqueur n'a pu être introgressé dans les constructions *pARF::GFP*.

Cette absence de contour cellulaire et de contrôle interne ne permet pas de distinguer et de séparer les différentes assises cellulaires, et en particulier l'épiderme. La solution a donc été d'utiliser l'outil orthogonal views d'imageJ pour discriminer les *ARFs* exprimés ou non dans l'épiderme, mais ce niveau d'analyse ne permet pas d'affirmer si certains *ARFs* sont réellement co-exprimés dans les mêmes cellules.

Enfin, la création de cartes moyennes se base sur la déformation de feuilles individuelles dans une feuille moyenne en utilisant des points remarquables tels que les sinus, des pointes de dents, de feuilles et les pétioles. Par conséquent, les profils d'expression sont légèrement déformés pour rentrer dans le nouveau contour et sont moyennés pour obtenir une carte représentative du profil d'expression de

l'ARF. Cependant, cela suppose que les profils d'expression soient très robustes dans les feuilles individuelles pour que le profil moyenné soit semblable aux profils individuels au risque de créer des artefacts visuels et donc des cartes qui ne seraient pas représentatives. Cet outil est par conséquent à utiliser avec précautions.

III.B. Analyse de l'implication des ARFs dans la morphogénèse foliaire

Afin de mettre en évidence quels sont les ARFs impliqués dans la morphogénèse foliaire et en particulier dans la formation des dents, la première étape a consisté à mettre en évidence les profils d'expression des ARFs dans la feuille. Dans un second temps, les ARFs présentant des profils localisés dans la zone dent/sinus ont été étudiés plus finement dans les plantes de génotype sauvage Col-0, puis également dans des feuilles présentant des formes particulières causées par les modifications d'expression des gènes CUCs. Les rapporteurs *pARF::GFP* ont notamment été introgressés dans le mutant hypomorphe *cuc2-3* qui présente une marge quasiment lisse, le mutant *cuc3-105* qui initie des dents mais qui s'émoussent au fur et à mesure de la croissance foliaire ainsi que dans le mutant *mir164a-4* et la plante transgénique CUC2g-m4 qui tous deux sur-expriment CUC2 et présentent des feuilles très dentées, avec la formation de dents distales à la première dent formée. Finalement, afin de déterminer le rôle de ces ARFs dans le développement des dents, une analyse morphologique des feuilles de simples et doubles mutants a été réalisée.

III.B.1. Profils d'expression des ARFs dans la feuille

A l'aide de microscopie confocale, j'ai observé les 23 constructions rapportrices transcriptionnelles *pARF::GFP* adressées aux noyaux (Rademacher et al., 2011) sur des jeunes feuilles (150-600µM) de plantules de 3 semaines en jours courts. Ces observations ont permis de détecter 13 *ARFs* dans les jeunes feuilles d'*Arabidopsis* sur les 23 gènes de la famille.

Parmi ces *ARFs*, 4 des 5 gènes définis comme activateurs ont pu être observés : *ARF5*, *ARF6*, *ARF8* et *ARF19*, ainsi que 9 *ARFs* considérés comme répresseurs : *ARF1*, *ARF3*, *ARF9*, *ARF10*, *ARF11*, *ARF13*, *ARF15*, *ARF18* et *ARF20*.

Les projections maximales permettent une première analyse des profils d'expression des différents *ARFs*. Certains *ARFs* ne présentent pas de profils d'expression d'intérêt au regard des objectifs fixés et sont présentés seulement brièvement dans cette partie. Parmi ces *ARFs*, certains ne sont localisés que dans quelques cellules. C'est le cas pour *pARF15::GFP* (Figure III.B.1.c) et *pARF20::GFP* (Figure III.B.1.e) dont l'expression est respectivement observée dans les cellules méristémoides ou les stomates et dans les trichomes dont les noyaux de grande taille sont aisément reconnaissables. *pARF10::GFP* est détecté dans quelques cellules de l'épiderme et de la marge dans la partie distale de la feuille (Figure III.B.1.a) donc au-delà de la zone d'initiation et de croissance des dents. *pARF13::GFP* est aussi observable dans quelques cellules de la marge au niveau de la partie distale de la feuille et dans la partie proximale des dents, ainsi que dans quelques noyaux de la nervure centrale (Figure III.B.1.b). *pARF19::GFP* présente un profil très caractéristique qui souligne la vasculature primaire de la feuille (Figure III.B.1.d).

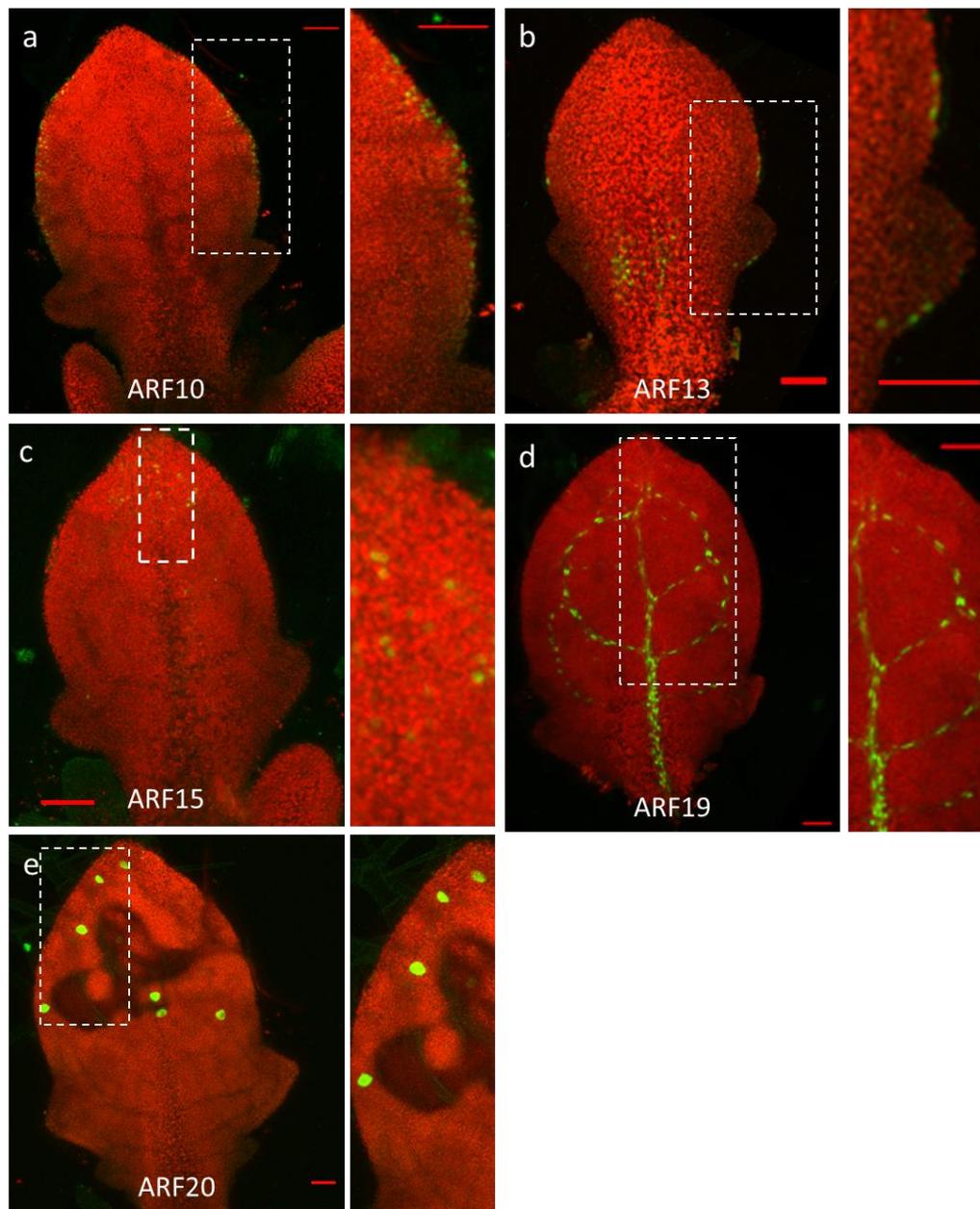


Figure III.B.1. Projection maximale des profils d'expression de constructions rapportrices *pARF::GFP* dans les jeunes feuilles d'*Arabidopsis thaliana*.

Les ARFs présentent des profils d'expression divers dans la feuille. *pARF10* (a) est localisé au bord de la feuille dans la partie distale. *pARF13* (b) est exprimé dans quelques noyaux à la marge de la feuille ainsi que dans quelques noyaux de la nervure centrale. *pARF15* est dans la partie distale de la feuille, certainement au niveau des cellules méristémoides (c). Le profil de *pARF19* est localisé au niveau des vaisseaux primaires (d) et *pARF20* au niveau des trichomes (e). Les barres d'échelles représentent 50µm. Les images sont des projections maximales. La fluorescence de la GFP est représentée en vert et celle de la chlorophylle en rouge.

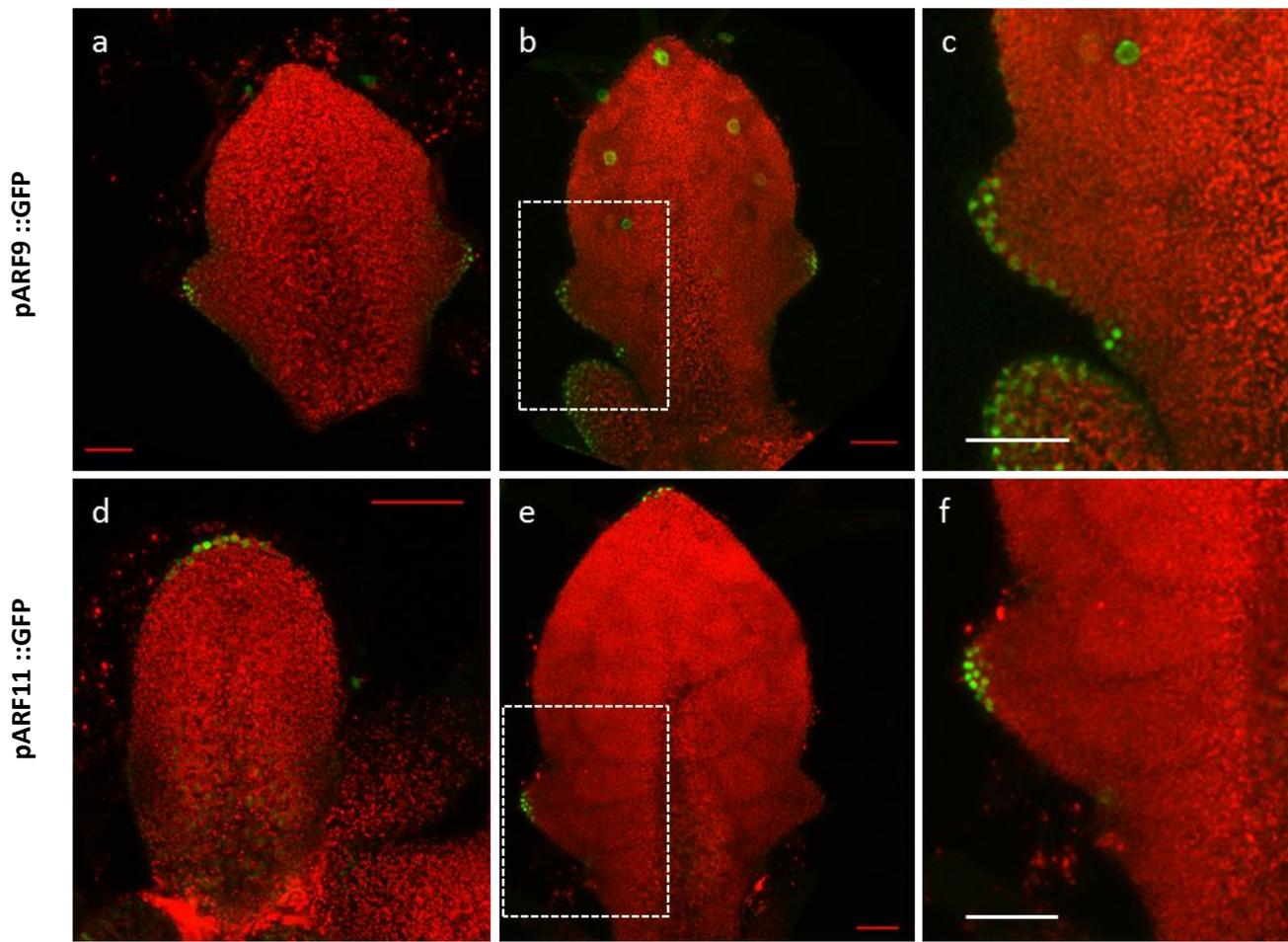


Figure III.B.2. Projection maximale des profils d'expression de constructions rapportrices *pARF9::GFP* et *pARF11::GFP* dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana*.

pARF9 est localisé à la pointe des dents émergentes et en croissance ainsi que dans les trichomes (a, b et c). *pARF11* est au niveau de la pointe de la feuille au stade une dent (d), puis également à la pointe des dents quand celles-ci sont plus grandes et en croissance (e et f).

Les barres d'échelles représentent 50µm. Les images sont des projections maximales. La fluorescence de la GFP est représentée en vert et celle de la chlorophylle en rouge.

ARF9 est exprimé dans les trichomes et également à la pointe des dents en croissance, dans quelques noyaux aux dents émergentes ainsi que dans les primordia (figure III.B.2.a). *ARF11* est également présent dans une dizaine de noyaux à la pointe des dents en croissance, mais à un stade relativement tardif où la dent suivante est déjà formée (Figure III.B.2.e et f). De plus, *pARF11::GFP* est également présent de façon persistante à la pointe de la feuille au stade précoce à une dent ainsi qu'au stade 2 dents (Figure III.B.2.d et e).

Bien que ces deux *ARFs* soient détectés dans les cellules de la marge au niveau des dents, leur étude n'a pas été poursuivie. En effet, le profil d'expression de *ARF11* n'apparaît que tardivement à la pointe de la

dent, suggérant qu'il ne joue pas de rôle dans l'initiation des dents ou les premières étapes de croissance mais peut-être davantage dans leur maintien ou dans la différenciation cellulaire à la pointe des dents et de la feuille. Pour *ARF9*, bien qu'il soit localisé aux dents émergentes ainsi qu'en croissance, seuls quelques noyaux sont marqués dans les dents émergentes, et le marquage des noyaux semble s'accroître avec la taille de la dent, suggérant plutôt un rôle dans la croissance que pour l'initiation. De plus, l'observation à l'œil nu des mutants homozygotes *arf9-1* pour ce gène n'a pas révélé de phénotype foliaire différent de Col-0.

III.B.2. *ARF1*, *ARF3* et *ARF18*

Trois *ARFs* répresseurs ont été sélectionnés à partir de leur profil d'expression pour étudier leur possible implication dans l'initiation ou la croissance des dents. Il s'agit de *ARF1*, *ARF3* et *ARF18*. Dans cette partie, je présente les profils d'expression des rapporteurs transcriptionnels correspondants dans Col-0 et dans des lignées avec une expression des gènes *CUC* perturbée, ainsi que l'étude morphologique des différentes combinaisons de doubles mutants réalisées.

III.B.2.a. Etude du profil d'expression de *ARF1*, *ARF3* et *ARF18* dans Col-0

ARF1 est exprimé dans tout le limbe, à la marge et également dans les trichomes des feuilles aux stades une dent (Figure III.B.3.a) mais également deux dents (Figure III.B.3.b). La fluorescence semble être plus importante au niveau des trichomes et dans la partie proximale de la feuille (Figure III.B.3.a-b).

Les cartes moyennes de *pARF1::GFP* à une et deux dents confirment une répartition des noyaux fluorescents plus importante dans la partie proximale de la feuille (Figure III.B.3.c-d).

La quantification de la fluorescence met en évidence une fluorescence assez homogène dans la feuille et quelques soient les stades de croissance. Néanmoins, *ARF1* est plus fortement exprimé au niveau de la nervure centrale (figure III.B.4).

Les mesures de ratio de la fluorescence entre les sinus distal et proximal et entre le sinus distal et la dent confirment la constance du profil d'expression de *ARF1* dans ces zones, ces ratios étant proches de 1 (Figure III.B.4.e).

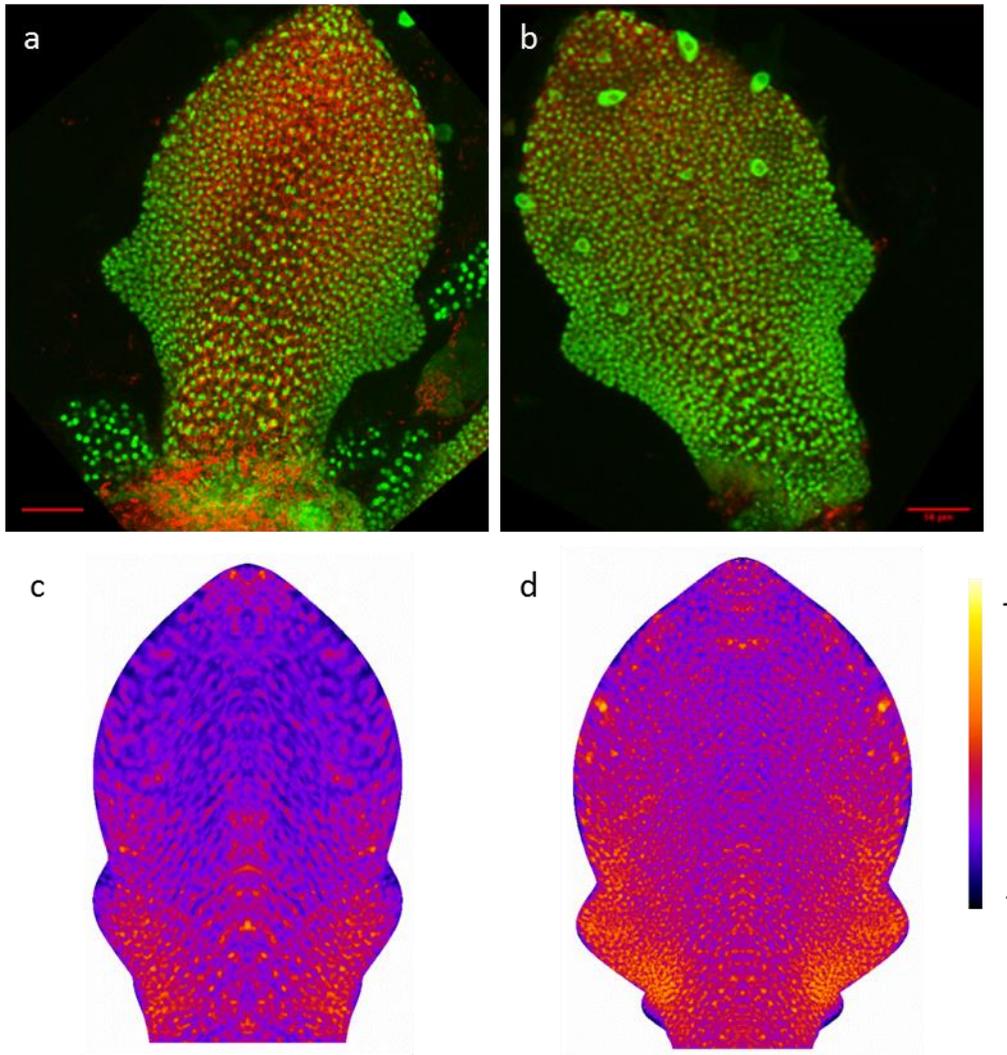


Figure III.B.3. Profil d'expression et quantification de la fluorescence de *pARF1::GFP* .

L'expression de *ARF1* est présente sur l'ensemble du limbe lorsque les feuilles ont une (a) et deux dents (b). L'intensité de la fluorescence est constante dans une grande partie du limbe à l'exception de la base de la feuille pour les stades à une dent (a) et deux dents (b) qui présentent une intensité plus forte. Les cartes moyennes à 125h (c) et 170h (d) montrent que la répartition de la fluorescence de *pARF1* est assez constante dans la partie distale du limbe. La fluorescence apparaît plus importante au niveau de la dent en croissance au stade 170h. Les barres d'échelles représentent 50µm (a-b). Les images sont des projections maximales. La fluorescence de la GFP est représentée en vert et celle de la chlorophylle en rouge. La barre de calibration représente en bleu foncé les zones où il y a peu de fluorescence et en jaune là où la fluorescence est la plus forte. N=20.

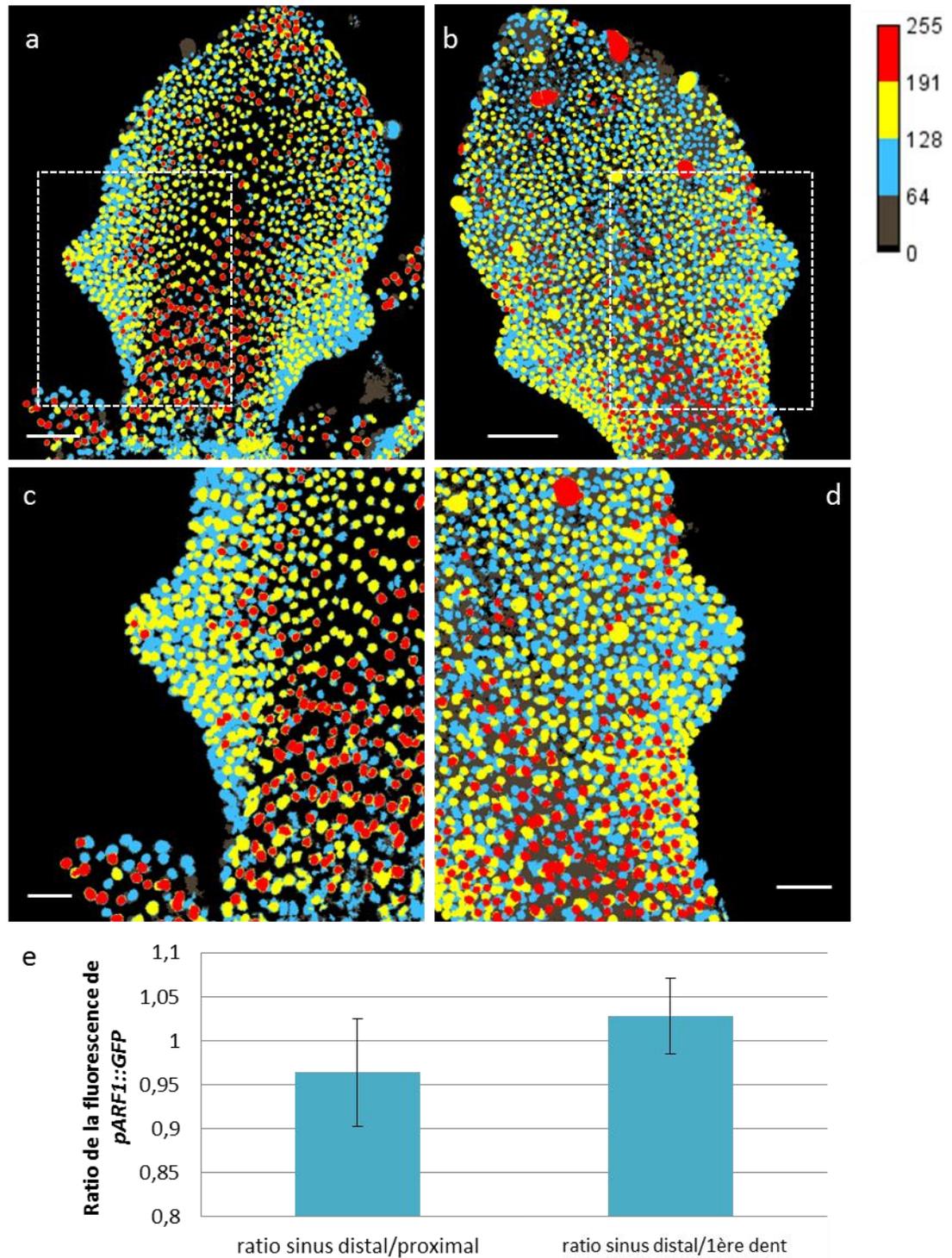


Figure III.B.4. Quantification de la fluorescence de *pARF1::GFP*.

La quantification de la fluorescence révèle que le profil d'expression de *ARF1* est présent sur l'ensemble du limbe lorsque les feuilles ont une (a et c) et deux dents (b et d). L'intensité de la fluorescence est quasi-constante le long du limbe bien que l'intensité soit plus forte au niveau de la nervure centrale pour les feuilles à une dent (a) et deux dents (b). Les ratios de fluorescences réalisés entre les sinus et/ou la première dent de feuilles d'environ 350 μ m indique que la l'intensité de la fluorescence est assez constante dans ces zones. Les images sont des projections maximales. Les barres d'échelles représentent 50 μ m (a-b) et 25 μ m (c-d). N= 5. Les barres sur les histogrammes représentent les écarts types.

ARF3 est également exprimé dans une grande partie du limbe, à l'exception des pointes de la feuille et des dents, et des cellules de la marge puisque la partie la plus externe des feuilles ne présente pas de fluorescence. La fluorescence semble également être moins importante au niveau de la nervure centrale (Figure III.B.5.a-b). La zone dépourvue de fluorescence à la pointe des dents devient plus importante avec l'augmentation de la taille de la feuille. En effet, alors que pour des jeunes dents la fluorescence semble être absente uniquement à la marge (Figure III.B.5.a), dans des dents à un stade de croissance plus avancé la fluorescence disparaît également vers l'intérieur de la dent (Figure III.B.5.b).

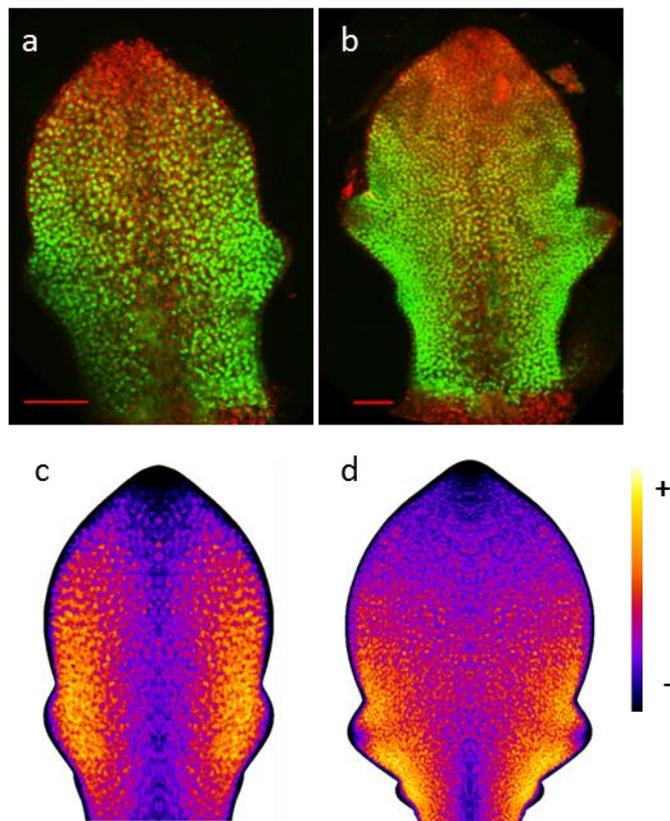


Figure III.B.5. Profil d'expression de *pARF3::GFP*.

ARF3 est exprimé dans tout le limbe, à l'exclusion et de la pointe de la feuille (a-b). La fluorescence à la pointe des dents semble être moins importante lorsque la dent croît (b) et elle apparaît plus importante à la périphérie de la feuille (a et b). Les cartes moyennes à 125h (1 dent) et 170h (2 dents) confirment que la répartition de la fluorescence de *ARF3* est plus importante sur les bords de la feuille (c et d). Les images sont des projections maximales. La fluorescence de la GFP est représentée en vert et celle de la chlorophylle en rouge. La barre de calibration représente en bleu foncé les zones où il y a peu de fluorescence et en jaune là où la fluorescence est la plus présente. N=18.

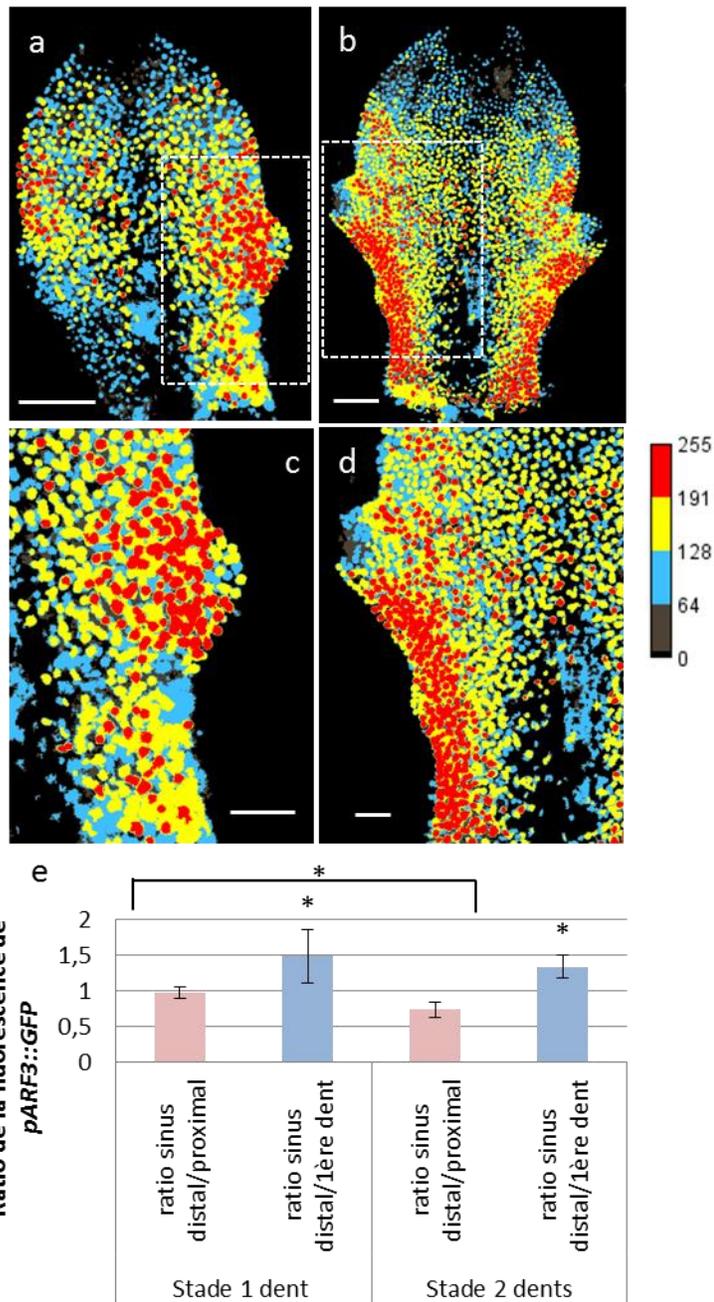


Figure III.B.6. Quantification de la fluorescence de *pARF3::GFP*.

La fluorescence de *pARF3::GFP* est plus importante sur les bords de la feuille au niveau de la partie proximale de la feuille (a-b). La fluorescence au niveau des pointes des dents décroît avec leur croissance (c-d). Les ratios de la fluorescence réalisés sur des feuilles à une dent ($\approx 350\mu\text{m}$) et deux dents ($\approx 550\mu\text{m}$) mettent en évidence une fluorescence plus importante au sinus distal qu'à la dent. Les images sont des projections maximales. Les barres d'échelles représentent $50\mu\text{m}$ (a-b) et $25\mu\text{m}$ (c-d). $N=5$. Les barres sur les histogrammes représentent les écarts types. Les astérisques représentent les différences significatives entre les ratios sinus distal/proximal et sinus distal/dent ou entre le stade 1 et 2 dents. $P = 0,05$. Test de Mann-Whitney.

Les cartes moyennes de *ARF3* à 125h (1 dent) et 170h (2 dents) confirment que la répartition de la fluorescence de *pARF3::GFP* est plus importante sur les bords de la feuille à l'exception des cellules de la marge alors qu'elle est quasiment absente de la pointe de la feuille et des dents en croissance (Figure III.B.5.c-d). Ces cartes moyennes attestent ainsi de la robustesse des profils observés dans les feuilles individuelles.

La quantification de la fluorescence de *pARF3* met en évidence une évolution du profil d'expression avec la croissance de la feuille. Dans les feuilles à une dent, la fluorescence est très forte aux sinus et à la dent, à l'exclusion de la pointe de la dent qui présente une intensité moindre (Figure III.B.6.a et c). La fluorescence décroît avec la croissance de la dent jusqu'à disparaître de la pointe. Seules les parties proximales des feuilles et les sinus présentent toujours une forte intensité de la fluorescence (Figure III.B.6.b et d).

Les mesures de ratio de la fluorescence au stade une dent ($\approx 350\mu\text{m}$) montrent en effet que la fluorescence est 1.5 fois plus importante dans le sinus distal que dans la dent alors que la fluorescence des deux sinus est comparable. Au stade deux dents ($\approx 550\mu\text{m}$) le ratio de la fluorescence devient 0,7 fois moins important au sinus distal qu'au sinus proximal et 1,4 fois comparé à la première dent (Figure III.B.6.e). De plus, le ratio entre les sinus distal et proximal de la dent 1 au stade 2 dents apparaît moins important comparée au stade 1 dent. Le profil d'expression de *ARF3* évolue donc avec la croissance de la feuille et devient moins important dans la dent et le sinus distal. Cette évolution est corrélée avec celle de la croissance de la dent ce qui fait de ce gène un candidat potentiellement impliqué dans les réponses différentielles de croissance entre dent et sinus.

Les projections maximales de *ARF18* mettent en évidence que cet *ARF* est exprimé au niveau de la partie proximale de la feuille à l'exclusion de la nervure. Comparativement à *ARF1* et même *ARF3*, *ARF18* présente un profil d'expression beaucoup plus restreint. Au stade feuille à une dent, *ARF18* est également présent à la marge de la feuille et l'intensité de la fluorescence apparaît comme étant plus forte à la marge entre le sinus proximal et la base de la feuille. A l'inverse, elle apparaît moins élevée dans les dents (Figure III.B.7.a). Au stade deux dents, les cellules de la marge au niveau de la partie distale présentent une fluorescence réduite, tout comme dans les dents où la fluorescence est moins intense que dans les feuilles à une dent (Figure III.B.7.b). Les cartes moyennes à 125 et 170h confirment que la répartition de la fluorescence est plus importante à un stade précoce au niveau des dents émergentes (Figure III.B.7.c-d).

L'intensité de la fluorescence de *ARF18* est plus forte à la marge au niveau du sinus et à la base de la feuille dans les feuilles à une dent (Figure III.B.8.a et c). Cette expression décroît avec la croissance des dents (Figure III.B.8.b et d). La mesure de la fluorescence des noyaux aux sinus et à la dent révèle que la fluorescence au sinus distal est 0.7 fois moins importante qu'au sinus proximal et que celle du sinus distal est 1.15 fois plus intense que dans la dent (Figure III.B.8.e).

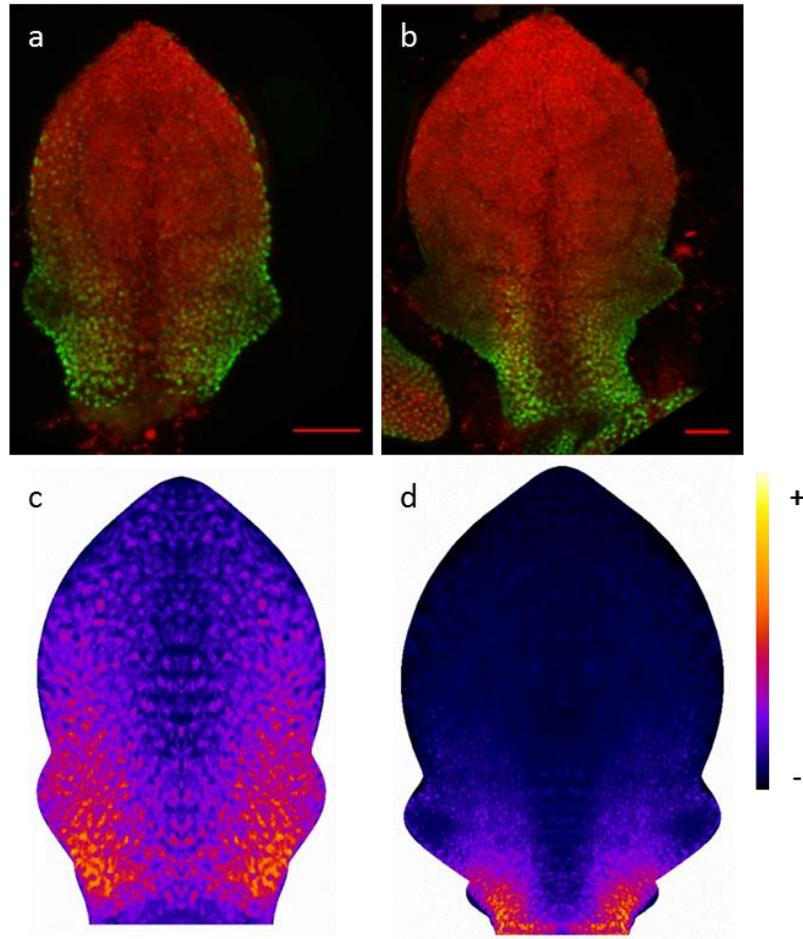


Figure III.B.7. Profil d'expression de *pARF18::GFP*.

L'expression de *ARF18* est localisée dans la partie proximale de la feuille, à l'exclusion de la nervure centrale (a et b). La fluorescence semble être plus intense dans les cellules de la marge. La fluorescence semble diminuer avec la croissance des dents. Les cartes moyennes à 125h (c) et 170h (d) confirment le marquage localisé à la partie proximale de la feuille, et en particulier au niveau de la jeune dent en émergence. Les barres d'échelles représentent 50 μ m. Les images sont des projections maximales. La fluorescence de la GFP est représentée en vert et celle de la chlorophylle en rouge. La barre de calibration représente en bleu foncé les zones où il y a peu de fluorescence et en jaune là où la fluorescence est la plus présente. N=19.

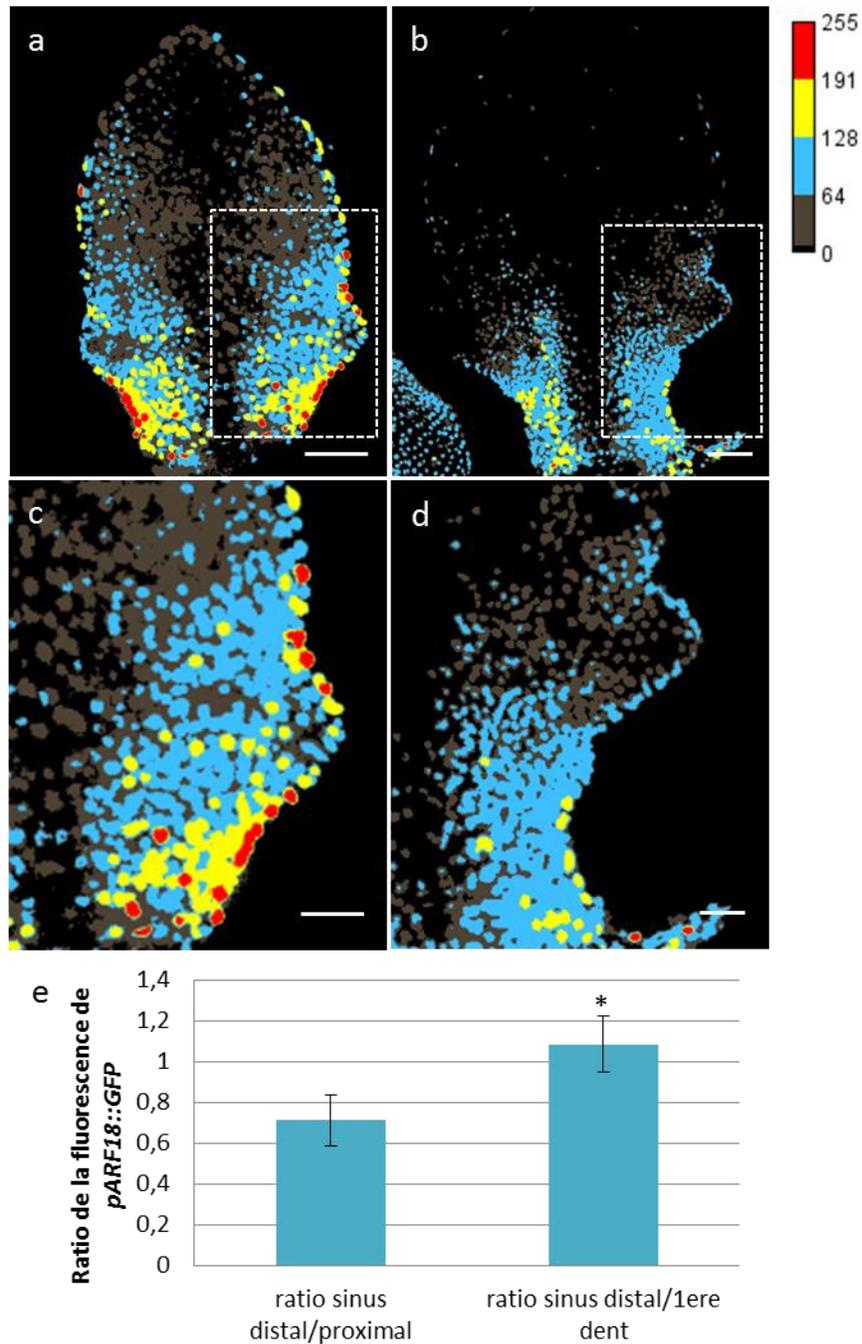


Figure III.B.8. Quantification de la fluorescence de *pARF18::GFP*.

ARF18 présente une forte intensité de la fluorescence à la marge de la jeune feuille (c) et de manière moins importante lorsque la feuille est plus âgée (d). Les ratios réalisées entre les sinus et/ou avec la première dent montrent que la fluorescence dans le sinus distal est 0,7 fois moins importante que dans le sinus proximal et 1,15 fois plus importante que dans la dent. N= 5 feuilles de 450µm. Les images sont des projections maximales. Les barres d'échelles représentent 50µm (a-b) et 25µm (c-d). Les barres sur les histogrammes représentent les écarts types et l'astérisque une différence significative entre les ratios. P = 0,05. Test de Mann et Whitney.

Pour déterminer si ces trois *ARFs* répresseurs sont localisés dans les mêmes assises cellulaires, leur profil a été étudié dans l'épaisseur de la feuille.

ARF1 est exprimé sur les deux épidermes ainsi que dans toutes les autres assises (Figure III.B.9.a et b). *ARF3* n'est exprimé que dans les assises sub-épidermiques de la feuille, à l'exception de la partie la plus jeune de la feuille, soit la base et la dent émergente, où la fluorescence est également retrouvée dans l'épiderme (Figure III.B.9. c et d).

Le profil d'expression de *ARF18* dans l'épaisseur de la feuille est étendu à toutes les assises dans la partie proximale de la feuille jusqu'à la dent émergente, puis uniquement à l'épiderme dans la dent en croissance (Figure III.B.9.e et f).

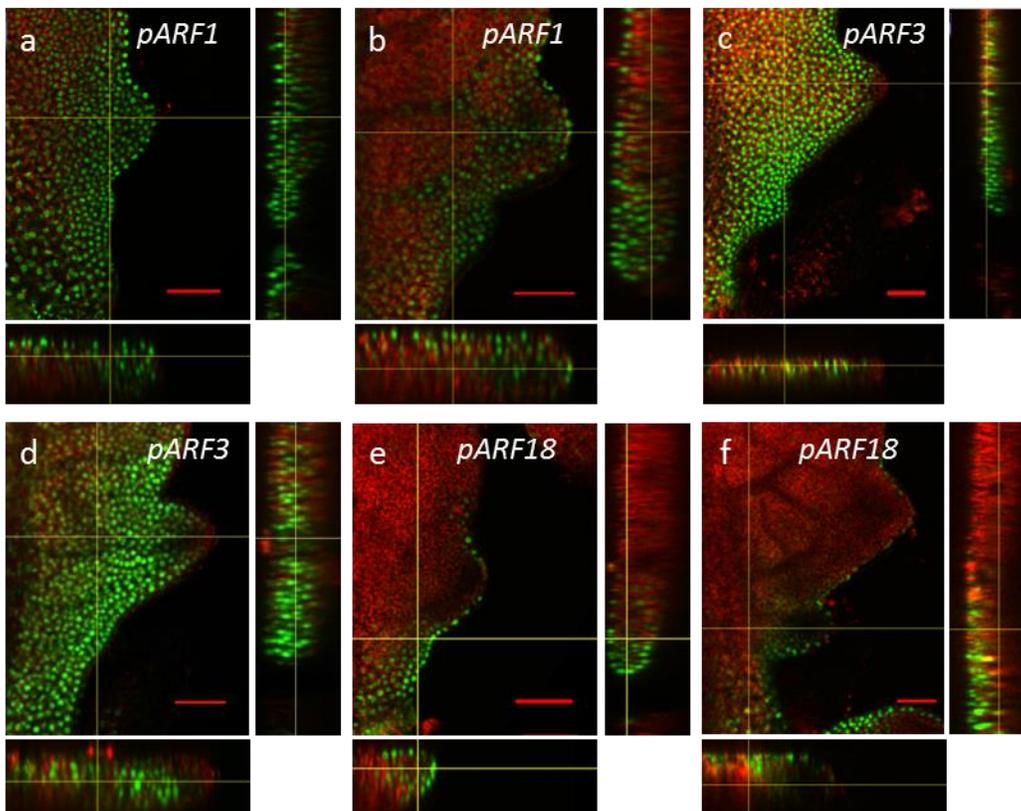


Figure III.B.9. Répartition de *ARF1*, *ARF3* et *ARF18* dans l'épaisseur de la feuille.

Les feuilles ont été imagées sur les faces adaxiale (a,c,e) et abaxiale (b,d,f). *ARF1* est exprimé dans l'épiderme dans toute l'épaisseur de la feuille (a et b). *ARF3* est exprimé au niveau de toutes les assises dans la partie la plus proximale de la feuille et uniquement dans les assises sub-épidermiques à partir de la dent en croissance (c et d). *ARF18* est présent dans toutes les assises cellulaires de la base de la feuille à la dent émergente puis uniquement à la marge au niveau de la dent en croissance (e et f). Les barres d'échelle représentent 50μm. La fluorescence de la GFP est représentée en vert et celle de la chlorophylle en rouge.

Même si les profils de *ARF1*, *ARF3* et *ARF18* diffèrent les uns des autres y compris dans la répartition spatiale entre les assises cellulaires de la feuille, ils sont tous les trois co-exprimés dans l'épiderme de la partie proximale de la feuille jusqu'à la dent en croissance et sont donc susceptibles d'intervenir conjointement dans la modulation des réponses à l'auxine dans ces cellules. Ces *ARFs* pourraient également avoir des rôles qui leur sont propres dans chacune des assises où ils sont exprimés.

III.B.2.b. Analyse du profil de *ARF1*, *ARF3* et *ARF18* dans des feuilles aux formes modifiées

Pour explorer davantage la relation entre l'expression des gènes *ARF1*, *ARF3* et *ARF18* et l'initiation ou la croissance des dents foliaires, le profil d'expression de ces *ARFs* répresseurs a été étudié dans les fonds génétiques *cuc2-3*, *cuc3-105*, *mir164a* et *CUC2gm4*.

III.B.2.b.1. *ARF1*

Les observations du profil d'expression de *ARF1* en microscopie confocale dans les feuilles de Col-0 ont révélé un profil d'expression homogène et réparti dans l'ensemble de la feuille (Figure III.B.10.e). S'il est impliqué dans la mise place des dents, alors son profil d'expression pourrait être modifié dans les feuilles aux formes atypiques.

Dans le mutant *cuc2-3* qui présente une marge quasiment lisse, le profil d'expression de *ARF1* est présent dans toute la feuille et dans les noyaux des trichomes. La projection maximale fait apparaître la fluorescence plus importante dans la partie proximale de la feuille (figure III.B.10.a) mais cela n'est pas retrouvé dans la quantification de la fluorescence où le profil apparaît comme constant le long du limbe à l'exception de quelques noyaux plus fort au niveau de la nervure centrale (Figure III.B.11.a).

Dans le mutant *cuc3-105* qui forme des dents qui s'émoussent avec la croissance, *ARF1* est exprimé de façon ubiquitaire (Figure III.B.10.b). D'après la quantification de la fluorescence, son expression est uniforme dans le limbe (Figure III.B.11.b) et identique à celle de Col-0 (Figure III.B.11.e). Les mesures de ratio de la fluorescence entre les sinus de la première dent et entre le sinus distal et la première dent sont de 1, confirmant ainsi la constante de l'intensité de la fluorescence dans ces feuilles. Le ratio de la fluorescence dans le mutant *cuc3-105* est identique à celui de Col-0, signifiant ainsi que la fluorescence se répartit de manière identique dans le sauvage et ce mutant (Figure III.B.11.f).

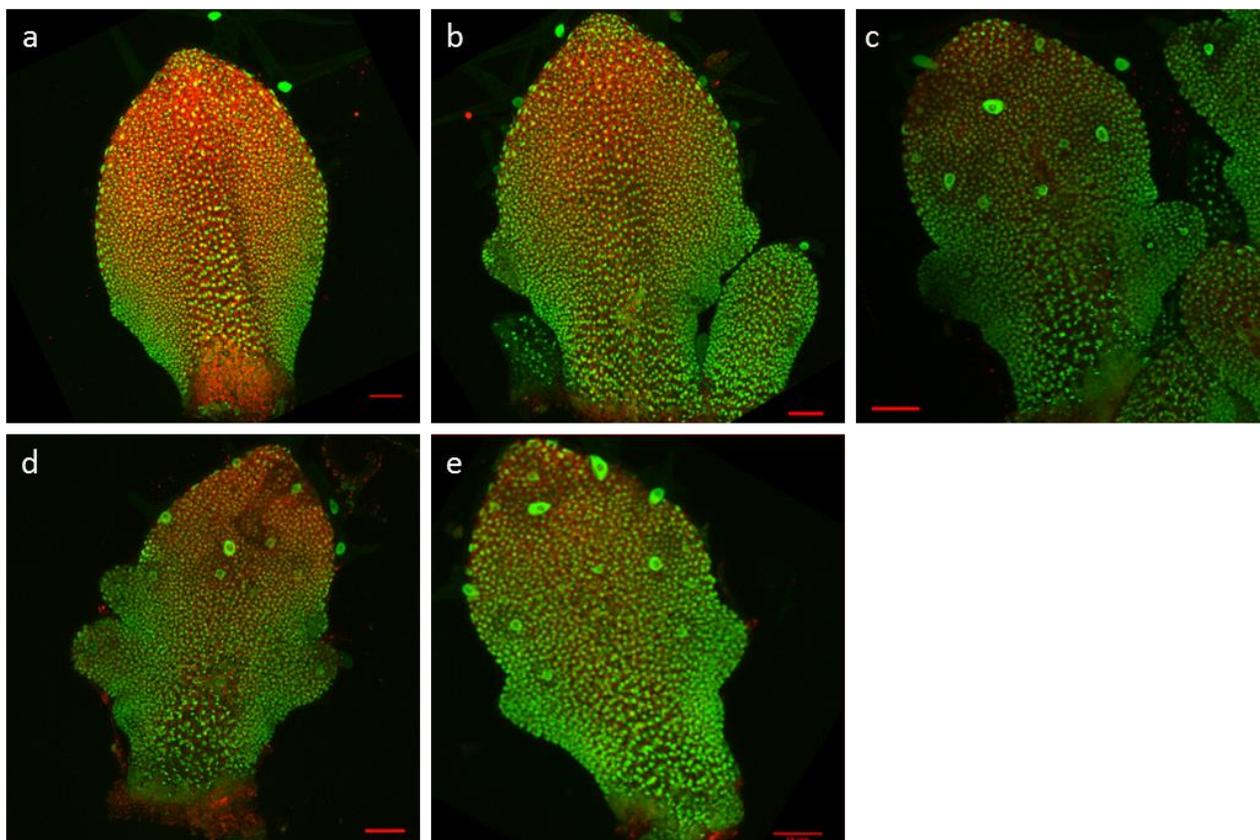


Figure III.B.10. Projection maximale du profil d'expression de *pARF1::GFP* dans les mutants *cuc2-3*, *cuc3-105*, *mir164a-4* et les plantes transgéniques CUC2g-m4.

ARF1 est exprimé dans toute la feuille dans les mutants *cuc2-3* (a), *cuc3-105* (b), *mir164a-4* (c) et la plante transgénique CUC2g-m4 (d), comme dans Col-0 (e). Les barres d'échelles représentent 50µm. Les profils sont représentés à l'aide de projections maximales. La fluorescence de la GFP est représentée en vert et celle de la chlorophylle en rouge.

Dans les feuilles très découpées du mutant *mir164a-4* et des plantes CUC2g-m4, le profil d'expression de *ARF1* est également réparti dans toute la feuille (Figure III.B.10.c et III.B.10.d). La quantification de la fluorescence des noyaux met en évidence une fluorescence assez linéaire dans le mutant *mir164a-4*, bien que la fluorescence de certains noyaux à la base de la nervure centrale soit plus intense (Figure III.B.11.c). Au niveau des zones d'intérêt dents/sinus les mesures de la fluorescence révèlent une intensité identique entre les sinus et la première dent. Ces ratios sont analogues à ceux de Col-0, la répartition de la fluorescence suit donc le même schéma dans *mir164a-4* que dans le sauvage (Figure III.B.11.f). L'intensité de la fluorescence est également identique dans les deux cas. L'intensité de la fluorescence de *ARF1* dans CUC2g-m4 apparaît plus faible au niveau de la partie distale de la feuille et

dans les dents (Figure III.B.10.d). Cette différence apparente d'intensité aux dents n'est pas confirmée par les quantifications, en effet les ratios d'intensité de fluorescence entre les sinus et la dent sont égaux à 1 (Figure III.B.11.f). Le profil de *pARF1* dans CUC2g-m4 suit donc celui observé dans Col-0 et les intensités de fluorescence sont similaires.

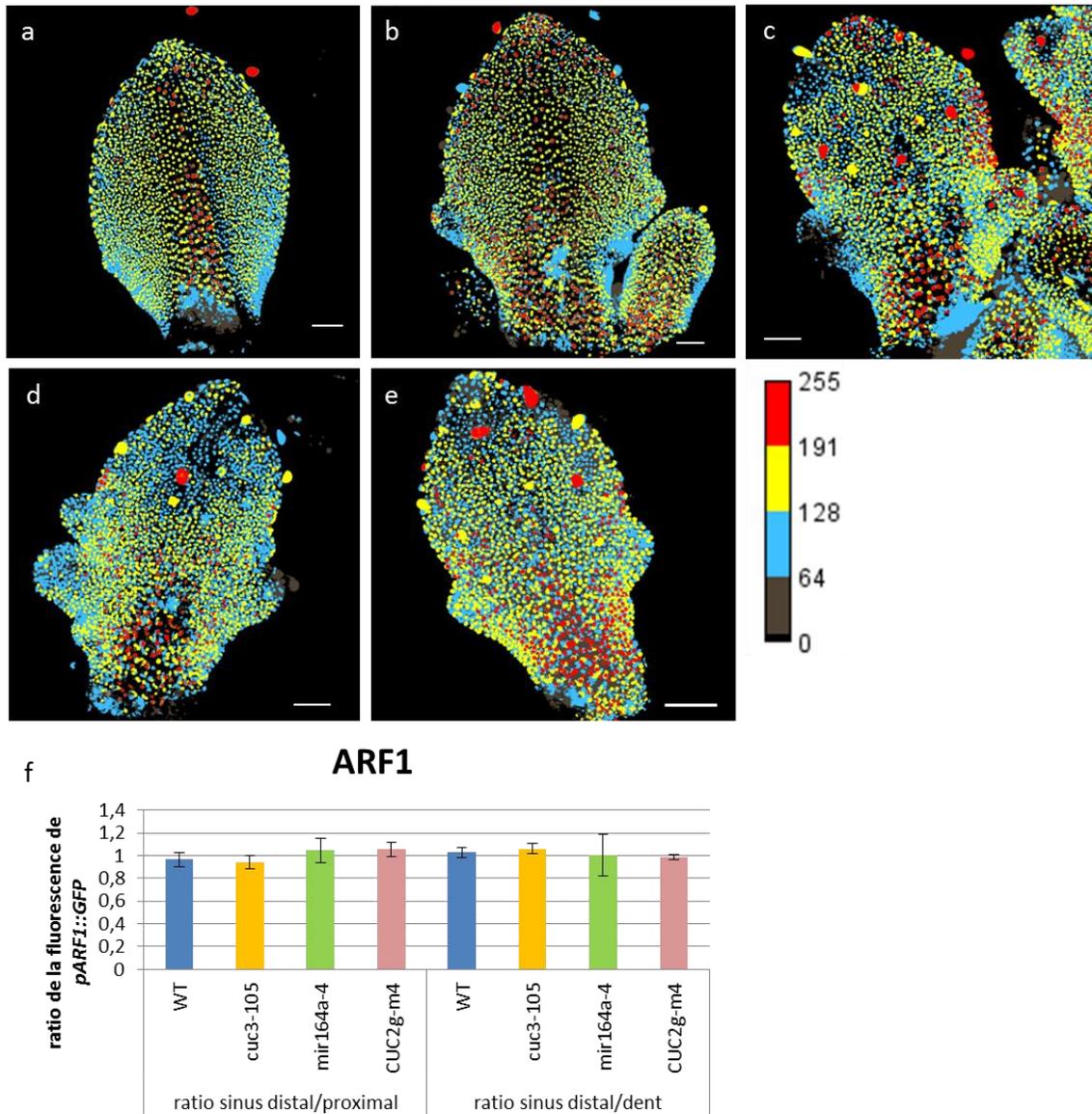


Figure III.B.11. Quantification de la fluorescence de *pARF1::GFP* dans les mutants *cuc2-3*, *cuc3-105*, *mir164a-4* et les plantes transgéniques CUC2g-m4.

La fluorescence du mutant *cuc2-3* (a), *cuc3-105* (b), *mir164a-4* et de la plante CUC2g-m4 (d) est similaire à celle de Col0 (e). Les mesures des ratios de la fluorescence entre les sinus ou le sinus distal et la dent 1 confirment que la fluorescence est identique dans ces zones (f). La fluorescence est quantifiée à l'aide de la macro ImageJ (a-e) et les ratios de la fluorescence entre les sinus de la première dent et entre le sinus distal et la dent sont réalisés (f). La calibration de la fluorescence est réalisée en 256 niveaux de gris. Les images sont des projections maximales. Les barres d'échelles représentent 50µm. N=5. Les barres sur les histogrammes représentent les écarts types. Les échantillons ont été comparés statistiquement à l'aide d'un test de Mann et Whitney.

Le profil d'expression de *ARF1* dans les mutants et plantes transgéniques présentant des formes de feuilles modifiées reste inchangé par rapport à celui observé dans Col-0. La modification des niveaux d'expression des gènes *CUC2* et *CUC3* ne semble donc pas influencer sur l'expression de *ARF1*.

III.B.2.b.2. *ARF3*

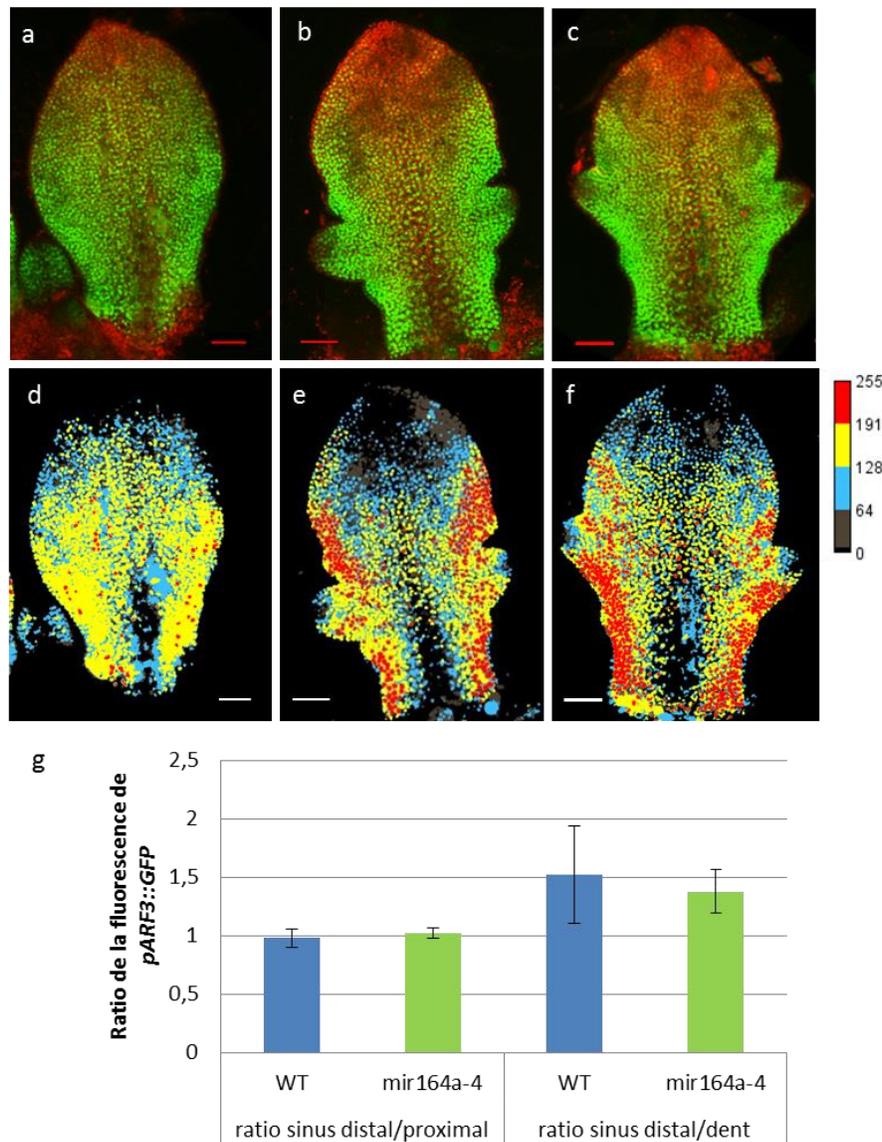


Figure III.B.12. Profil d'expression et quantification de la fluorescence de *pARF3::GFP* dans *cuc2-3* et *mir164a-4*. *ARF3* est exprimé dans la partie proximale de manière homogène dans le mutant *cuc2-3* (a et d). Dans *mir164a-4*, *ARF3* est fortement exprimé aux sinus et dans les dents émergentes (b, e). Les ratios de la fluorescence de *mir164a-4* suivent ceux de Col-0 (g). Les images sont des projections maximales. La fluorescence de la GFP est représentée en vert et celle de la chlorophylle en rouge. La barre d'échelle représente 50µm. N = 5. Les barres sur les histogrammes représentent les écarts types. Les échantillons ont été comparés statistiquement à l'aide d'un test de Mann et Whitney.

Le profil de *ARF3* dans *cuc2-3* est étendu dans une grande partie de la feuille à l'exclusion de la nervure centrale dans la partie proximale, ainsi que dans la partie distale de la feuille, principalement à la pointe de la feuille et à la marge (Figure III.B.12.a). D'après la quantification de la fluorescence, l'intensité de la fluorescence est assez homogène dans quasiment toute la feuille à l'exception de la partie la plus distale, où l'intensité est moins importante (Figure III.B.12.d). Dans ce mutant quasi lisse, l'intensité de la fluorescence de *ARF3* semble être moins importante sur les bords de la feuille que dans Col-0 (Figure III.B.12.f), qui présente une forte expression de *pARF3* dans cette zone et en fonction de l'alternance dent/sinus. Cette différence suggère que l'expression de *ARF3* pourrait être modulée par celle de *CUC2*. Il faut néanmoins rester prudent dans la mesure où la quantification d'un génotype à l'autre est délicate, même si tous les paramètres d'acquisition sont identiques.

Dans le mutant *mir164a-4*, le profil d'expression de *ARF3* est localisé dans toute la feuille mis à part dans la pointe des dents, la pointe de la feuille ainsi que dans la nervure centrale (Figure III.B.12.b). L'intensité de la fluorescence est plus importante sur les bords de la feuille de part et d'autre de la dent en croissance (dent 1). La fluorescence au niveau des extrémités des dents émergentes est moins importante que dans le reste de la dent (Figure III.B.12.e). Lorsque l'on quantifie plus précisément la fluorescence dans les sinus et la dent 1, on observe qu'elle est équivalente dans les deux sinus et identique à Col-0 (Figure III.B.12.g). En revanche, la fluorescence est environ 1,4 fois plus importante dans les sinus que dans la dent (Figure III.B.14), cet écart est comparable à celui observé précédemment dans Col-0 néanmoins l'expression de *ARF3* reste plus forte plus longtemps dans le sinus distal de la dent 1 suggérant que l'augmentation d'expression de *CUC2* dans ces feuilles prolonge le maintien de l'expression d'*ARF3* ce qui renforce l'hypothèse d'une influence de *CUC2* sur l'expression d'*ARF3*.

Le profil de *ARF3* au niveau du sinus et la diminution de l'intensité de la fluorescence dans le mutant *cuc2-3* laisse donc supposer un rôle de *ARF3* dans la formation des dents via *CUC2*.

III.B.2.b.3. *ARF18*

Le profil d'expression de *ARF18* dans Col-0 a été précédemment montré comme étant dans la partie proximale de la feuille, avec une fluorescence plus importante au niveau de l'épiderme de la dent émergente (Figure III.B.13.e). Dans *cuc2-3*, le profil d'expression de *ARF18* est localisé dans la partie proximale de la feuille à l'exclusion de la nervure centrale (Figure III.B.13.a). Contrairement à son profil dans les feuilles à une dent de Col-0 (Figure III.B.14.e), l'intensité de la fluorescence n'est pas plus

importante au niveau de la périphérie de la feuille, mis à part dans quelques noyaux au niveau du sinus proximal (Figure III.B.14.a).

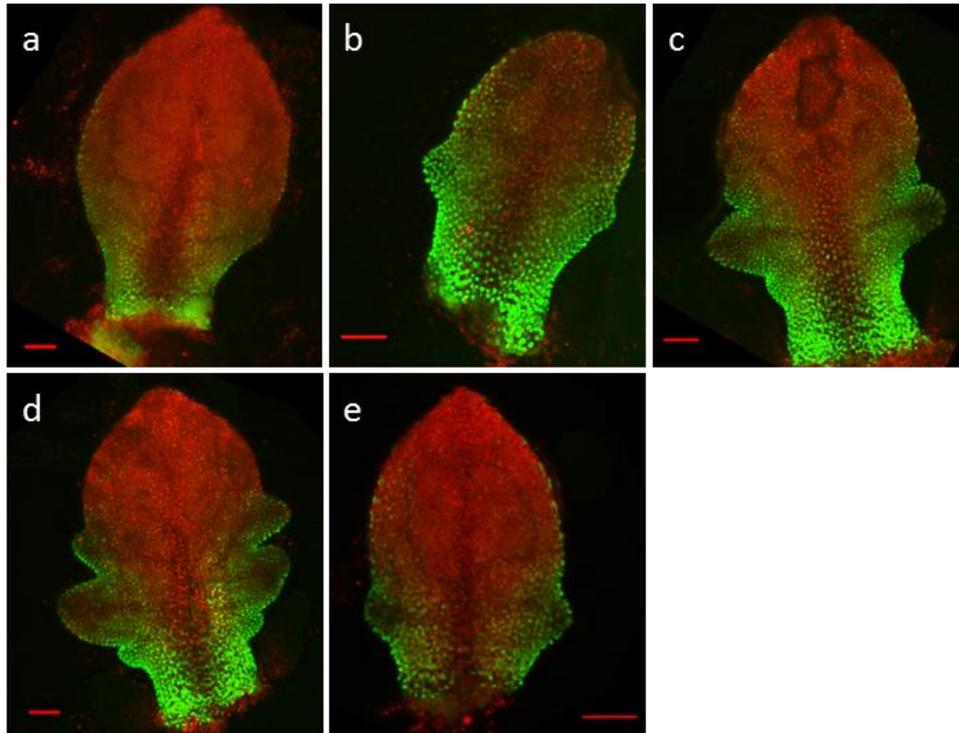


Figure III.B.13. Projection maximale du profil d'expression de *pARF18::GFP* dans les mutants *cuc2-3*, *cuc3-105*, *mir164a-4* et les plantes transgéniques CUC2g-m4.

Le profil d'expression de *ARF18* est présent de la base de la feuille à la dent la plus distale dans les mutants *cuc2-3* (a), *cuc3-105* (b) et *mir164a-4* (c) ainsi que dans les plantes CUC2g-m4 (d) et pour comparaison dans Col-0 (e). Les barres d'échelles représentent 50µm. Les images sont des projections maximales. La fluorescence de la GFP est représentée en vert et celle de la chlorophylle en rouge.

Dans le mutant *cuc3-105*, *ARF18* est exprimé dans une grande partie de la feuille à l'exclusion de son centre et de la pointe (Figure III.B.13.b). La fluorescence est plus forte à l'épiderme de la base de la feuille jusqu'à la face proximale de la dent (Figure III.B.14.b). Une quantification plus précise des noyaux à la première dent et aux sinus met en évidence une intensité de fluorescence 0,7 fois moins importante dans le sinus distal par rapport au sinus proximal et l'intensité à la dent est similaire à celle du sinus distal (Figure III.B.14.f). Ce profil de fluorescence suit celui observé dans Col-0.

Dans le mutant *mir164a-4* et les plantes CUC2g-m4, le profil de *ARF18* est observé majoritairement de la base de la feuille jusqu'au sinus distal de la dent la plus haute. La fluorescence est peu présente à la nervure centrale (Figure III.B.13.c-d). La quantification permet de mettre en évidence une forte intensité

de cette dernière à la base de la feuille et aux sinus (Figure III.B.14.c-d). Dans la zone d'intérêt dent/sinus, la fluorescence du sinus distal est 1,7 fois plus importante que dans la dent pour *mir164a-4* et CUC2gm4 (Figure III.B.14.f). Cette différence d'intensité est plus marquée que dans Col-0, et semble être due au fait que la fluorescence dans les dents de *mir164a-4* et CUC2gm4 décroît plus rapidement que dans Col-0 de par leur croissance plus rapide et non pas à cause d'une modification de l'intensité de la fluorescence aux sinus.

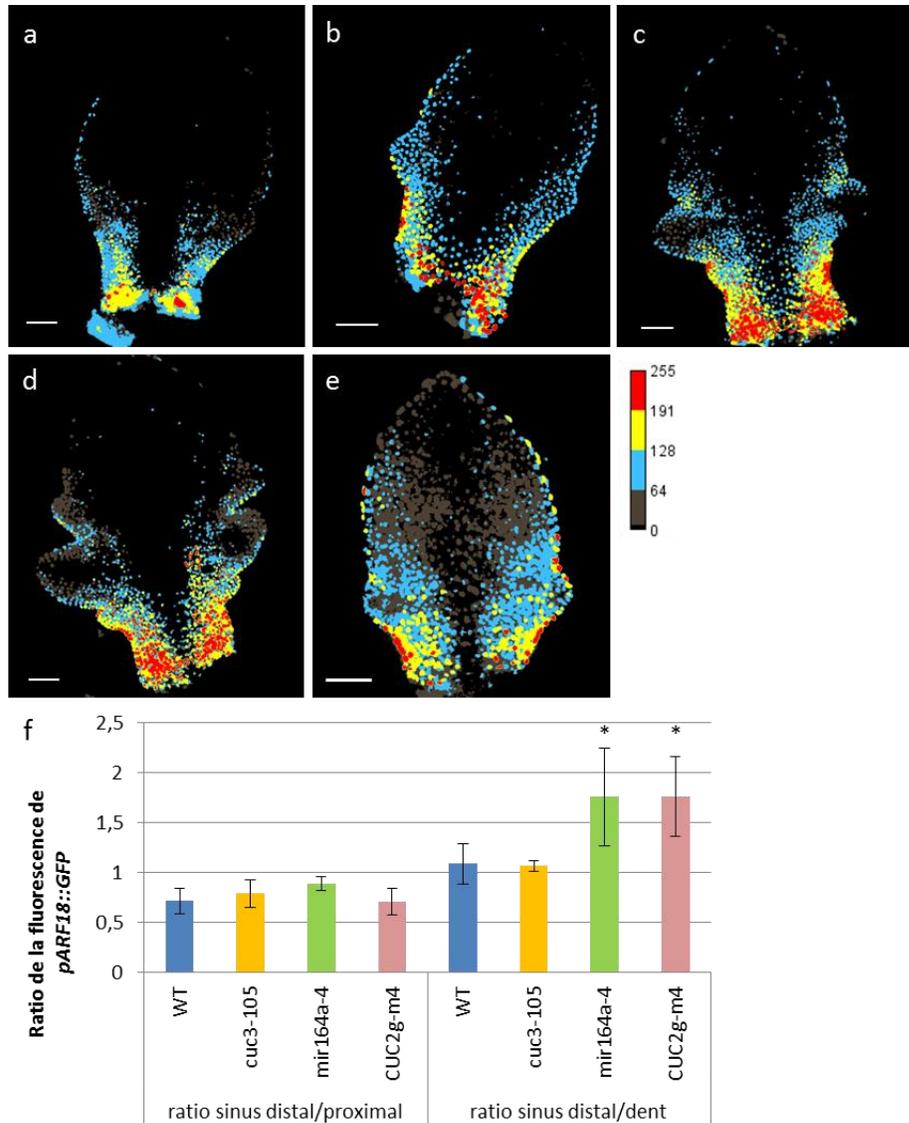


Figure III.B.14. Quantification de la fluorescence de *pARF18::GFP* dans les mutants *cuc2-3*, *cuc3-105*, *mir164a-4* et les plantes transgéniques CUC2g-m4.

La fluorescence est plus intense à l'épiderme de la partie proximale et aux sinus dans Col-0 (e), *cuc2-3* (a), *cuc3-105* (b) *mir164a-4* (c) et CUC2gm4 (d). Les images sont des projections maximales. Les barres d'échelles représentent 50µm. N = 5. Les barres sur les histogrammes représentent les écarts types. La fluorescence de Col-0 a été comparée à celles des mutants et CUC2gm4 à l'aide d'un test de Mann et Whitney. P = 0,05. Les astérisques représentent les différences significatives comparées à Col-0.

III.B.2.c. Analyse de l'implication de *ARF1*, *ARF3* et *ARF18* dans la formation des dents

Les analyses des profils d'expression de *ARF1*, *ARF3* et *ARF18* ont montré qu'ils étaient très étendus dans la feuille avec une expression évoluant dans le temps au moins pour *ARF3* et *ARF18* au fur et à mesure de la croissance des dents. Afin de mettre en évidence un rôle présumé de ces *ARFs* dans la formation des dents des doubles mutants *arf1-5 arf3-1*, *arf1-5 arf18-2* et *arf3-1 arf18-2* ont été réalisés, les simples mutants nuls ne présentant pas de phénotypes foliaires certainement dû à la redondance fonctionnelle. Le triple mutant est en cours de construction mais n'a pu être analysé.

III.B.2.c.1. *arf1-5 arf3-1*

III.B.2.c.1.1. Phénotype du mutant *arf1-5 arf3-1*

Le simple mutant *arf3* a été décrit comme présentant des déformations des organes floraux menant à une forte réduction de la fertilité (Sessions and Zambryski, 1995). Le double mutant nul *arf1-5 arf3-1* présente également ces défauts de fertilité visibles aux niveaux des fleurs et des siliques qui sont courtes avec un renflement à leurs extrémités (Figure III.B.15.a). Les feuilles matures de la rosette cultivée en jours longs 4 semaines de *arf1-5 arf3-1* sont assez semblables à celles de Col-0 (Figure III.B.15.c) tout comme les feuilles de la rosette des plantules de 4 semaines poussées en jours courts (Figure III.B.15.b). Les stades 4 semaines en jours longs seront utilisés pour les analyses des feuilles matures alors que les stades de 4 semaines en jours courts seront utilisés pour analyser les jeunes feuilles présentes au niveau du cœur de la rosette.

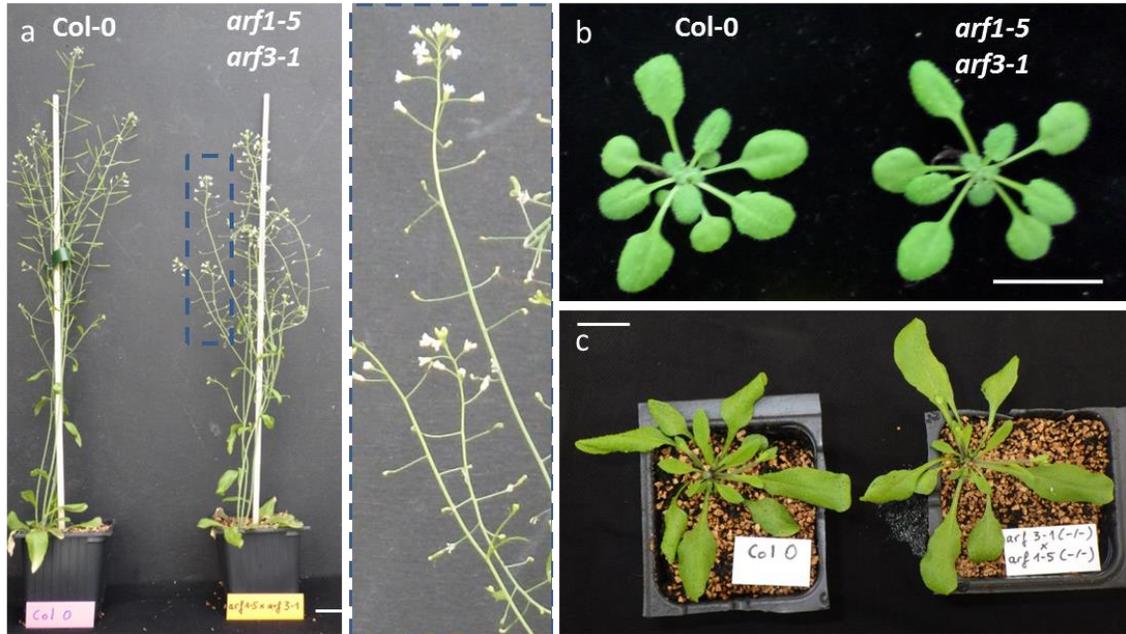


Figure III.B.15. Phénotype du double mutant *arf1-5 arf3-1*.

Le double mutant *arf1-5 arf3-1* présente les défauts de fertilité du simple mutant *arf3*. Ses siliques sont courtes et présentent un renflement à leur extrémité (a). Au niveau des rosettes, le double mutant *arf1-5 arf3-1* n'est pas significativement différent de Col-0 à 4 semaines en jours courts (b) ou en jours longs (c). Les barres d'échelles représentent 2cm.

III.B..2.c.1.2. Analyse de la forme de la feuille de *arf1-5 arf3-1*

Les analyses de formes de feuilles sont réalisées sur des feuilles de 4 semaines en jours courts, ayant le même nombre de feuilles totales.

Les jeunes feuilles de rang 13 de rosettes sont utilisées pour l'analyse et celles du double mutant *arf1-5 arf3-1* sont phénotypiquement semblables à celles de Col-0. Pour vérifier si ces feuilles sont vraiment identiques, des analyses quantitatives ont été réalisées à l'aide de MorphoLeaf.

Les feuilles de Col-0 ont un limbe d'environ 900µm de long et 650µm de large. Les feuilles du double mutant *arf1-5 arf3-1* ont également une longueur de limbe de 900µm et une largeur d'environ 630µm. La forme générale du limbe de Col-0 et de *arf1-5 arf3-1* est donc identique (Figure III.B.16).

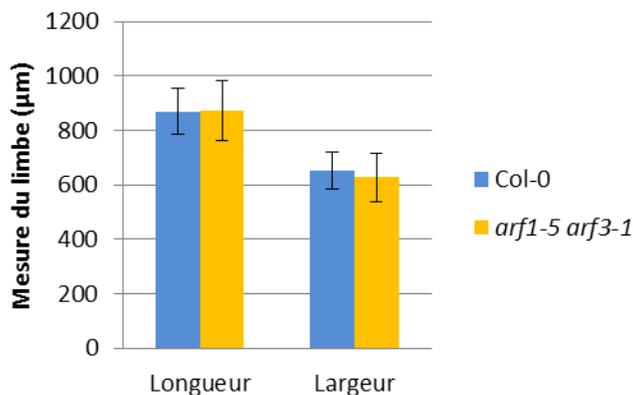


Figure III.B.16. Quantification de la forme des feuilles du double mutant *arf1-5 arf3-1*.

Les mesures ont été réalisées sur des feuilles de rang 13 issus de plantules de 4 semaines en jours courts. Les feuilles du double mutant *arf1-5 arf3-1* ne sont pas significativement différentes de Col-0. N=10 feuilles. Les barres représentent les écarts types. Les mesures ont été comparées à l'aide d'un test statistique de Mann et Whitney.

Les dents 1 et 3 de ces feuilles 13 ont également été quantifiées afin de confirmer ou non les observations phénotypiques.

La dent 1 de Col-0 est à 50µm de la jonction limbe-pétiole selon l'axe proximo-distal, et présente une largeur et une hauteur respectivement de 220µm et 110µm. Pour *arf1-5 arf3-1*, la première dent a une largeur de 200µm, une hauteur de 110µm et est positionnée à 50µm de la base de la feuille (Figure III.B.17).

La dent 1 n'est donc pas significativement différente entre Col-0 et le double mutant.

Au niveau de la dent la plus jeune, on observe qu'elle est positionnée à 15µm du pétiole que ce soit pour Col-0 ou pour *arf1-5 arf3-1*. La largeur de la dent 3 de Col-0 est d'environ 57µm et celle de *arf1-5 arf3-1* n'est pas significativement différente puisqu'elle mesure environ 59µm. Enfin, la hauteur de la dent mesure environ 17µm pour Col-0 et 20 µm pour *arf1-5 arf3-1*, la différence n'étant pas significative entre les deux.

Les quantifications réalisées dans les feuilles confirment donc les observations phénotypiques. Les jeunes feuilles du double mutant *arf1-5arf3-1* ne sont pas différentes de celles de Col-0.

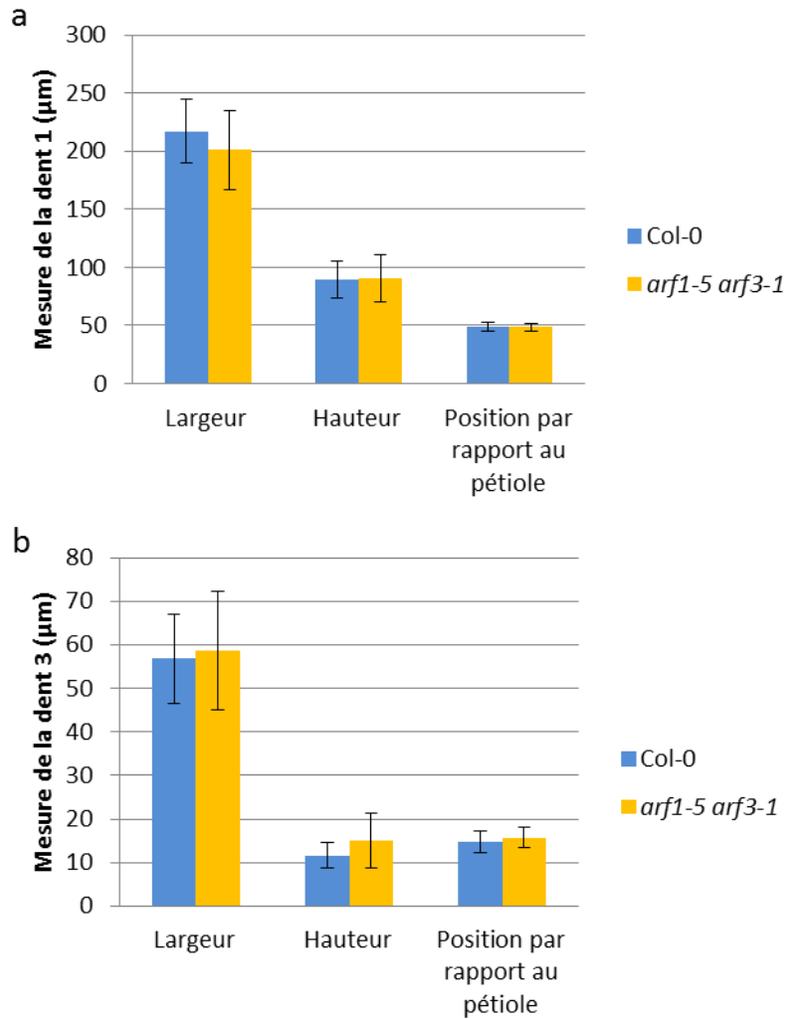


Figure III.B.17. Analyses de la forme des dents 1 et 3 du double mutant *arf1-5 arf3-1*.

Les mesures ont été réalisées sur des feuilles de rang 13, de plantules de 4 semaines de jours courts. Les dents du double mutant *arf1-5arf3-1* sont identiques à celles de Col-0. N=20. Les barres représentent les écarts types. Les mesures ont été comparées à l'aide d'un test statistique de Mann et Whitney.

III.B..2.c.2. *arf1-5 arf18-2*

III.B..2.c.2.1. Phénotype du mutant *arf1-5 arf18-2*

Le double mutant *arf1-5 arf18-2* ne présente pas un phénotype différent de celui de Col-0. La taille de la plante mature (Figure III.B.18.a), des feuilles matures (Figure III.B.18.c) et des feuilles de plantules de 4 semaines en jours courts (Figure III.B.18.c) sont similaires à celles de Col-0. La fertilité n'est pas impactée dans ce mutant.

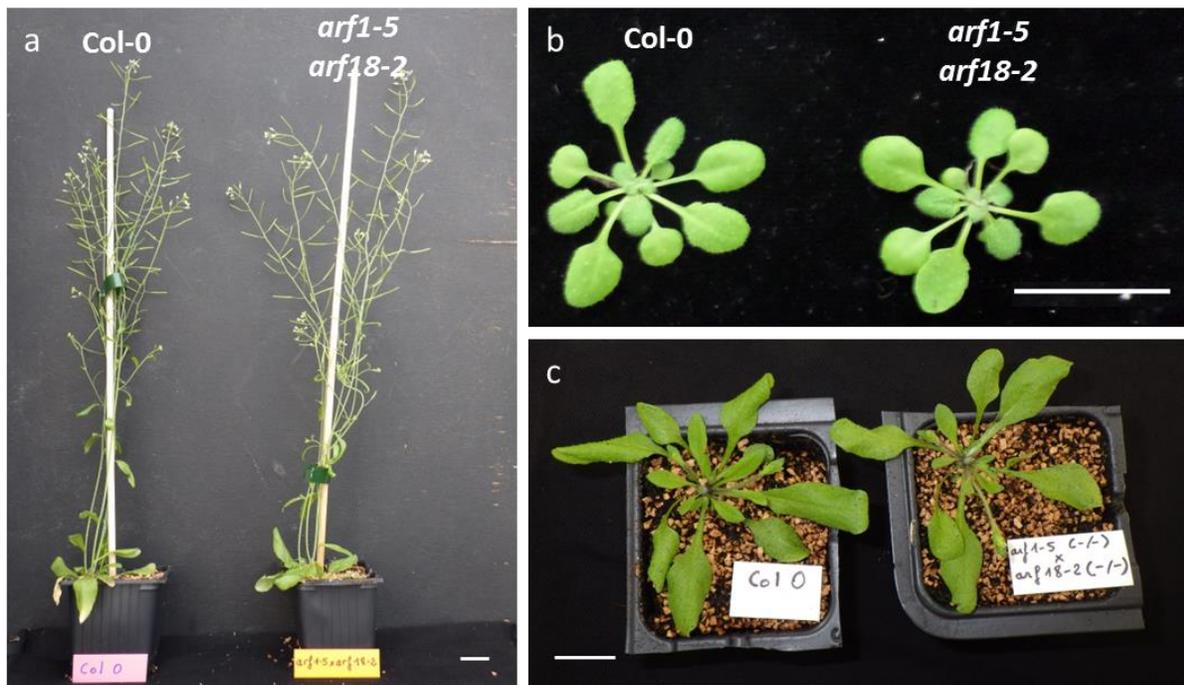


Figure III.B.18. Phénotype du double mutant *arf1-5 arf18-2*.

Le double mutant *arf1-5 arf18-2* ne présente pas un phénotype différent de Col-0 en terme de longueur de tige (a) de rosette de 4 semaines en jours courts (b) ou en jours longs (c). Les barres d'échelles représentent 2cm.

III.B..2.c.2.2. Analyse de la forme de la feuille de *arf1-5 arf18-2*

L'observation phénotypique des feuilles en jours courts du double mutant *arf1-5 arf18-2* ne semble pas montrer de différences comparées à celle de Col-0.

Les quantifications de la forme globale du limbe confirment ces observations puisque le limbe de Col-0 est long de 790µm et large de 570µm et celui de *arf1-5 arf18-2* a une longueur de 780µm et une largeur de 570µm (Figure III.B.19).

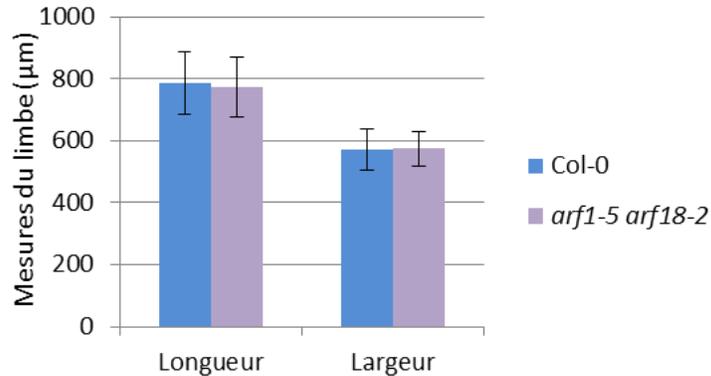


Figure III.B.19. Quantification de la forme des feuilles du double mutant *arf1-5 arf18-2*.

Les mesures ont été réalisées sur des feuilles de rang 13 issus de plantules de 4 semaines de jours courts. N=10 feuilles. Les barres représentent les écarts types. Les mesures ont été comparées à l'aide d'un test statistique de Mann et Whitney.

Les quantifications au niveau des dents 1 et 3 vont également dans le sens des observations phénotypiques. La dent 1 mesure environ 200µm de large, 100µm de haut et est située à 50µm du pétiole pour Col-0 et pour le double mutant *arf1-5 arf18-2* (Figure III.B.20.a). Les mesures de la dent 3 montrent que celles de Col-0 ont une largeur égale à 50µm, une hauteur de 12µm et sont situées à 15µm de la base. Pour *arf1-5 arf18-2*, cette dent présente une largeur de 53µm, une hauteur de 12µm et une distance au pétiole de 17µm (Figure III.B.20.b).

Les dents de *arf1-5 arf18-2* ne sont donc pas significativement différentes de celles de Col-0.

La perte de fonction conjointe d'*ARF1* et d'*ARF18* ne permet pas de mettre en évidence de phénotype modifié des dents, ni pour leur taille ni pour leur positionnement par rapport à l'axe pointe/pétiole. Ces deux *ARFs* ne semblent donc pas être conjointement impliqués dans la formation des dents et l'initiation de la feuille. Cependant, il n'y pas exclu que leurs fonctions soient redondantes avec d'autres *ARFs*.

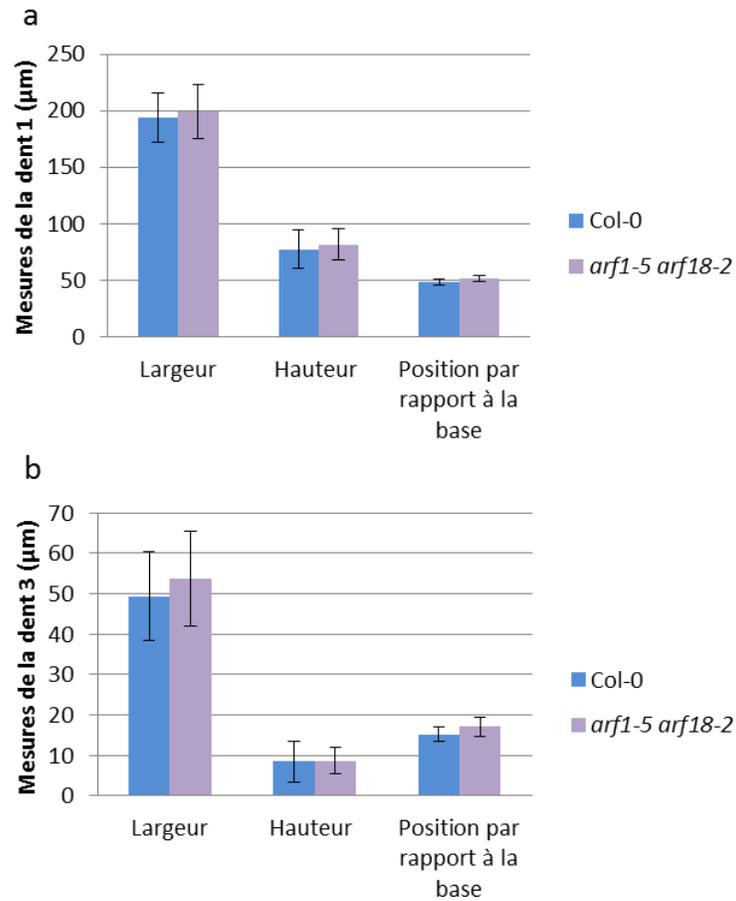


Figure III.B.20. Analyses de la forme des dents 1 et 3 du double mutant *arf1-5 arf18-2*.

Les mesures ont été réalisées sur des feuilles de rang 13, de plantules de 4 semaines de jours courts. N=20. Les barres représentent les écarts types. Les mesures ont été comparées à l'aide d'un test statistique de Mann et Whitney.

III.B..2.c.3. *arf3-1 arf18-2*

III.B..2.c.3.1. Phénotype du mutant *arf3-1 arf18-2*

Le double mutant *arf3-1 arf18-2* présente le même phénotype que *arf3* et le double mutant *arf1-5 arf3-1* au niveau des fleurs et des siliques (Figure III.B.21.a). La rosette ne semble pas être impactée par cette double mutation (Figure III.B.21 b-c). La taille de la plante est similaire à celle de Col-0, ainsi que les feuilles de rosettes matures et celles des plantules de 4 semaines cultivées en jours courts.

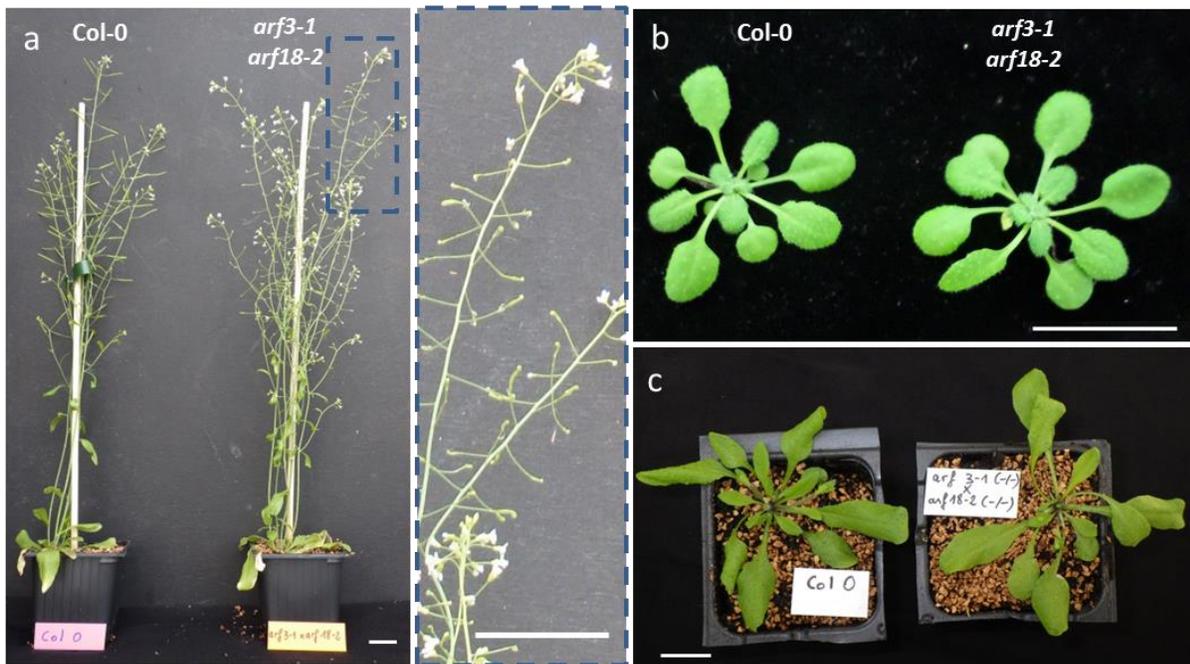


Figure III.B.21. Phénotype du double mutant *arf3-1 arf18-2*.

Le double mutant *arf3-1 arf18-2* a des siliques très courtes et renflées aux extrémités (a) comme on le retrouve chez le simple mutant nul *arf3*. La rosette du double mutant n'est pas différente de celle de Col-0 à 4 semaines en jours courts (b) ou en jours longs (c). Les barres d'échelles représentent 2cm.

III.B..2.c.3.2. Analyse de la forme de la feuille *arf3-1 arf18-2*

Afin de rechercher si *ARF3* et *ARF18* sont impliqués conjointement dans la mise en place des dents, les feuilles 13 du double mutant correspondant ont été analysées et comparées à celles de Col-0. Les mesures du limbe révèlent que la longueur et la largeur de celui du double mutant *arf3-1 arf18-2* ne sont pas significativement différentes de celles de Col-0 (Figure III.B.22).

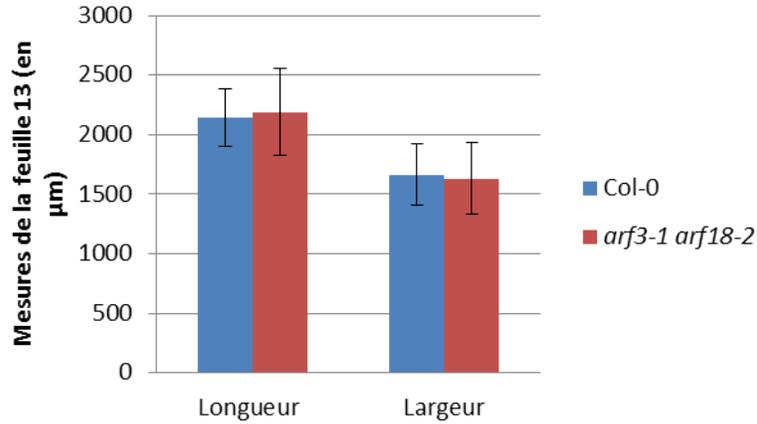


Figure III.B.22. Quantification de la forme des feuilles du double mutant *arf3-1 arf18-2*.

Le limbe de *arf3-1 arf18-2* n'est pas différent de celui de Col-0. Les mesures ont été réalisées sur des feuilles de rang 13 issues de plantules de 4 semaines en jours courts. N=9. Les barres représentent les écarts types. Les mesures ont été comparées à l'aide d'un test statistique de Mann et Whitney.

Au niveau des dents, la quantification de la dent 1 et de la dent 3 ne montrent pas non plus de différences entre le double mutant et le sauvage que ce soient en largeur, hauteur ou position par rapport au pétiole (Figure III.B.23).

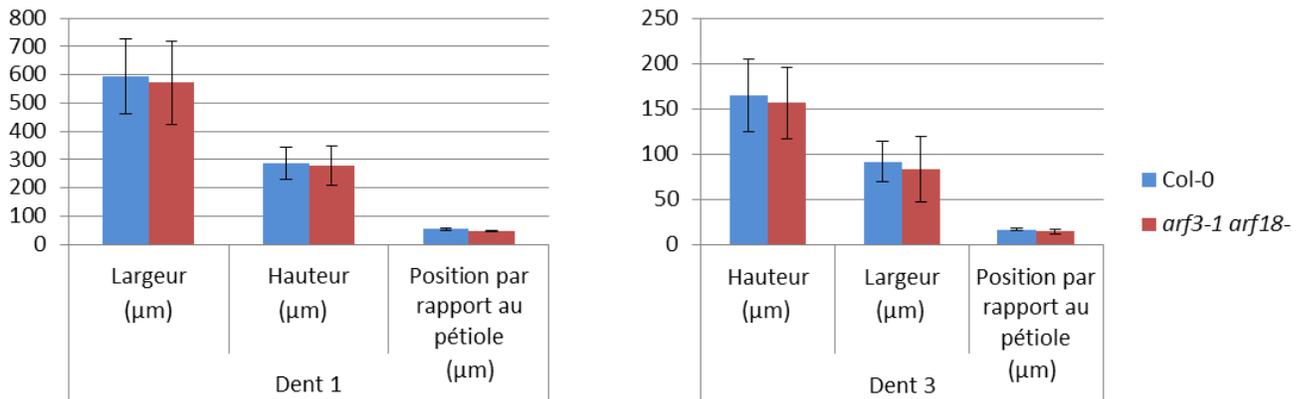


Figure III.B.23. Analyses de la forme des dents 1 et 3 du double mutant *arf3-1 arf18-2*.

Les dents 1 et 3 du mutant *arf3-1 arf18-2* ne sont pas significativement différentes de celles de Col-0. Les mesures ont été réalisées sur des feuilles de rang 13, de plantules de 4 semaines de jours courts. N=18. Les barres représentent les écarts types. Les mesures ont été comparées à l'aide d'un test statistique de Mann et Whitney.

III.B.2.d. Discussion

ARF1, *ARF3* et dans une moindre mesure *ARF18* sont les trois *ARFs* répresseurs dont les profils d'expression, visualisés par l'intermédiaire des constructions rapportrices *pARF::GFP* correspondantes sont les plus répandus dans la feuille et présents dans la zone de formation des dents.

ARF1 présente un profil d'expression assez constant le long du limbe que ce soit dans Col-0 ou dans les mutants aux formes de feuilles modifiées *cuc2-3*, *cuc3-105*, *mir164a-4* ou les plantes transgéniques CUC2g-m4. *ARF1* est donc très largement exprimé aussi bien selon l'axe apico-basal de la feuille que dorso-ventral puisqu'il semble être présent dans toutes les cellules de toutes les assises cellulaires. Cette répartition ubiquitaire a déjà été rapportée aussi bien dans l'embryon que dans la racine (Rademacher et al., 2011). Le profil d'*ARF1* n'est donc pas discriminant d'un type cellulaire ou d'un stade développemental particulier. Son ubiquité suggère un rôle potentiel non pas dans le contrôle d'une réponse spécifique mais plutôt dans un ensemble de réponses à l'auxine et/ou en combinaison avec d'autres gènes. *ARF1* pourrait jouer une sorte de rôle tampon avec d'autres membres de la famille assurant ou renforçant le maintien de la répression des gènes ce qui nécessite d'identifier la combinaison des autres gènes pour éventuellement révéler sa contribution (Ulmasov et al., 1999b; Ellis et al., 2005; Rademacher et al., 2011). Il a par exemple été montré que la perte de fonction de *arf1* amplifiait certains phénotypes du mutant nul *arf2* tels que le retard de floraison, l'abscission des organes floraux ou la formation de la crosse apicale (Li et al., 2004) alors qu'aucun de ces phénotypes ne sont observables dans le simple mutant *arf1* ce qui suggère qu'*ARF1* agit de façon partiellement redondante avec le gène *ARF2* (Ellis et al., 2005). L'absence de variation dans l'intensité de la fluorescence de *pARF1::GFP* dans les différents mutants *CUCs* indique que l'expression de *ARF1* n'est pas dépendante de celle de *CUC2* et que *ARF1* ne semble pas être un acteur majeur de la formation des dents.

Compte tenu des profils d'expression observés, *ARF3* et *ARF18* étaient des candidats possibles pour agir de concert avec *ARF1*. Le profil d'expression de *ARF3* présente des zonations avec des intensités de fluorescence plus forte au niveau des sinus. De plus, la fluorescence qui est présente au niveau des dents émergentes disparaît de la pointe au fur et à mesure de la croissance. De ce profil, il semblait possible d'émettre l'hypothèse qu'*ARF3* pourrait agir précocement dans le processus d'initiation de la dent et maintenir une croissance normale dans le reste de la feuille. Dans les racines latérales la répression de *ARF3* par *TAS3* permet de déréprimer l'inhibition de la croissance causée par *ARF3* (Marin et al., 2010). Ainsi dans la feuille, *ARF3* pourrait également jouer un rôle inhibiteur sur la croissance au sinus lors de l'initiation des dents permettant le différentiel de croissance entre la dent et le sinus. L'analyse du profil

d'expression de *ARF3* dans le mutant lisse *cuc2-3* montre un profil étendu le long du limbe et une fluorescence moins importante que dans Col-0, renforçant encore la corrélation entre expression de *ARF3* et l'initiation des dents. De plus, cela indique également que l'expression de *ARF3* pourrait être en partie dépendante de celle de *CUC2*. Néanmoins, l'intensité de la fluorescence de *ARF3* dans *mir164a-4* n'est pas différente de celle de Col-0 mais l'expression de *ARF3* semble perdurer plus longtemps au sinus distal.

ARF18 a également été mis en évidence dans Col-0 comme étant exprimé plus fortement au niveau des sinus et en particulier au niveau du sinus proximal de la dent émergente. Ce profil d'expression se répète dans les mutants *cuc3-105*, *mir164a-4* et les plantes *CUC2gm4*, alors que dans le mutant lisse *cuc2-3*, l'intensité de la fluorescence à l'extrémité de la feuille est moins importante. *ARF18* pourrait donc être également impliqué dans l'initiation des dents mais de manière indépendante de *CUC2*.

Afin de confirmer que ces *ARFs* sont impliqués dans la formation des dents, des doubles mutants ont été générés. Bien que *ARF1* ne présente pas un profil particulier, son expression constante dans la feuille laisse penser qu'il pourrait participer avec *ARF3* et *ARF18* à la formation des dents. Néanmoins, les trois combinaisons de doubles mutants analysées (*arf1arf3*, *arf3arf18* et *arf1arf18*) n'ont pas révélé de défauts d'initiation des dents. A ce stade il n'est donc pas possible de conclure quant au rôle possible de ces 3 *ARFs* dans la formation des dents si ce n'est qu'aucun d'eux ne semble jouer seul un rôle déterminant. De par la redondance fonctionnelle au sein de cette famille, il est possible que la génération d'un triple, d'un quadruple voire d'un quintuple mutant soit nécessaire afin d'observer une modification du phénotype foliaire. Dans ce cas quels seraient les candidats ? *ARF4* est phylogénétiquement très proche de *ARF3*, et ces deux *ARFs* ont déjà été mis en évidence comme agissant de concert dans la feuille pour permettre la mise en place de l'axe de polarité dorso-ventrale (Pekker et al., 2005). Bien que *ARF4* n'ait pas été détecté dans la feuille à l'aide des constructions *pARF::GFP*, il n'est pas exclu qu'il soit toujours exprimé au stade de développement où l'on observe les feuilles et participe à la formation des dents avec *ARF3* et d'autres. *ARF9* et *ARF11* sont phylogénétiquement très proches de *ARF18* et tous deux ont été détectés soit à la marge foliaire soit à la pointe de la dent formée.

De plus, d'autres *ARFs* répresseurs, non détectés à l'aide de nos rapporteurs, pourraient être impliqués dans la morphogénèse foliaire, notamment le trio *ARF10*, *ARF16* et *ARF17* contrôlé par miR160. Chez *Arabidopsis*, les plantes transgéniques *ARF17* résistantes à miR160 présentent de petites feuilles aux dents très découpées (Mallory et al., 2005). De plus, chez la tomate, *ARF10* et *ARF17* ont été mis en

évidence comme étant exprimé dans les folioles (Ben-Gera et al., 2016). La surexpression de ces *ARFs* mène à une réduction du limbe et à une augmentation de la complexité de la feuille alors que la surexpression du miR160 conduit à des feuilles simplifiées causées par une croissance plus importante du limbe entre les folioles. Ainsi un équilibre fin entre l'expression de ces *ARFs* et leur contrôle par le microARN est nécessaire pour mener à une forme de feuille normale. D'après ces résultats, on peut s'attendre à observer des formes de feuilles plus simples dans un triple mutant *arf10 arf16 arf17* ou dans un sur-expresseur de miR160.

III.B.3. ARF6 et ARF8

ARF6 et *ARF8* sont des *ARFs* activateurs connus pour agir sur la croissance de nombreux organes tels que l'hypocotyle (Nagpal et al., 2005) et les pétales (Varaud et al., 2011). Ces deux *ARFs* sont donc de bons candidats pour agir dans la formation ou la croissance des dents. L'étude de leur profil d'expression dans Col-0 et dans les mutants *CUCs*, ainsi que l'analyse morphologique des mutants a été menée de façon à rechercher leur implication dans ce processus.

III.B.3.a. Etude du profil d'expression de *ARF6* et *ARF8* dans Col-0.

Le profil d'expression de *ARF6* révèle une répartition sur l'ensemble du limbe (Figure III.B.24.a,b) bien que la fluorescence apparaisse plus intense dans la partie proximale de la feuille, notamment au niveau des sinus et de la dent comparé à la nervure centrale et à la partie distale de la feuille. La fluorescence est également présente à la marge dans les feuilles au stade une dent. Lorsque la feuille est à un stade plus avancé, l'expression de *ARF6* se révèle moins importante qu'au stade une dent dans la partie distale de la feuille ainsi que dans la dent en croissance (Figure III.B.24.e,f). La fluorescence semble être moins importante au sinus distal de la première dent qu'aux sinus de la dent émergente (Figure III.B.24.g).

Les cartes moyennes de *ARF6* réalisées sur des feuilles de 125 et 170 heures confirment les profils d'expression observés dans les feuilles individuelles (Figure III.B.24.d et h).

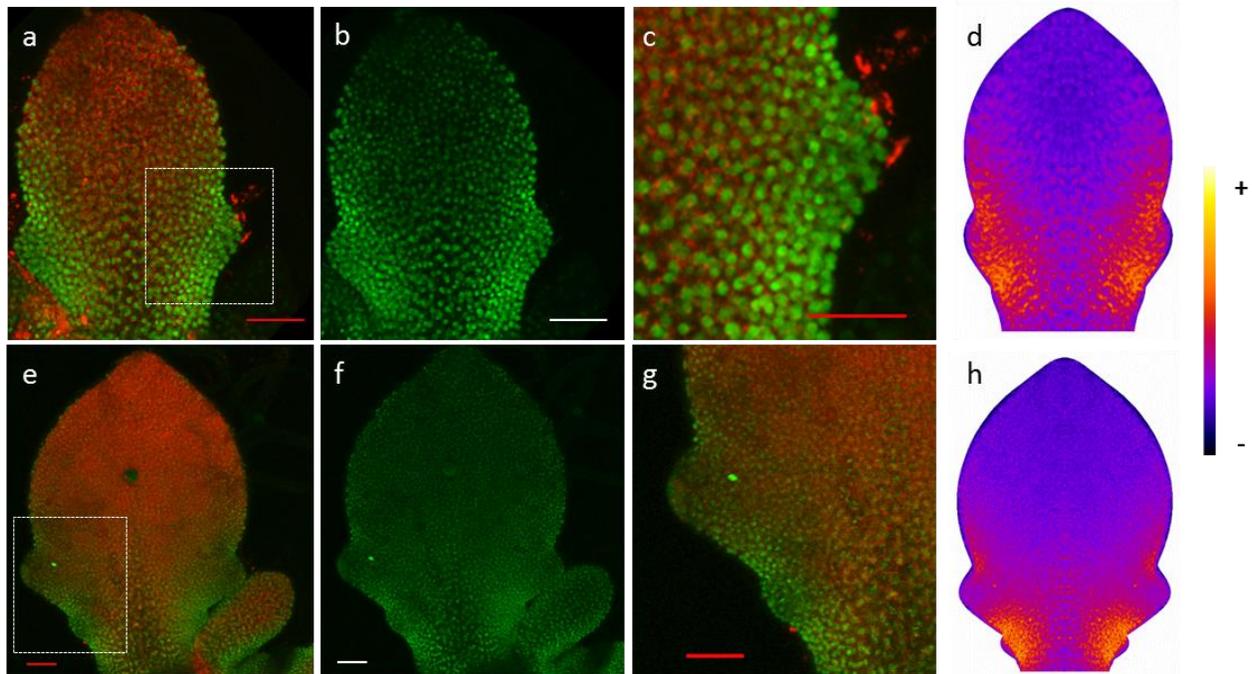


Figure III.B.24 Profil d'expression de *ARF6*.

Le profil d'expression de *pARF6* est étendu à la feuille entière lors du stade 1 dent, avec une intensité de la fluorescence qui semble plus importante aux sinus (a,b,c). A un stade plus avancé, la fluorescence est également retrouvée dans toute la feuille et la fluorescence apparaît plus intense aux sinus, et en particulier à ceux qui encadre la dent la plus jeune (d,e,f). Les cartes moyennes réalisées sur des feuilles de 125h et 170h confirment la robustesse des profils observés dans les feuilles individuelles. Les barres d'échelles représentent 50 μ m. Les images sont des projections maximales où la fluorescence de la GFP est représentée en vert et celle de la chlorophylle en rouge. La barre de calibration des cartes moyennes représente en bleu foncé les zones où il y a peu de fluorescence et en jaune là où la fluorescence est la plus présente. N = 19.

La quantification de la fluorescence permet de mettre en évidence une évolution du profil d'expression de *ARF6* lors de la croissance de la dent. Au stade une dent, la fluorescence est d'intensité moyenne dans toute la feuille, mais une intensité de la fluorescence plus forte est observée au niveau de la zone dent émergente/sinus et notamment aux sinus (Figure III.B.25. a, b). Lors de la croissance de la dent, l'intensité de la fluorescence devient moins importante dans la zone médiane de la dent, se concentrant ainsi aux sinus et autour de la dent (Figure III.B.25.c, d). Une quantification plus précise de 10 noyaux aux sinus et à la première dent aux stades 1 et 2 dents révèle que la fluorescence au sinus distal est respectivement 1,4 fois et 1,2 fois plus importante qu'à la dent. Au stade une dent, la fluorescence entre les deux sinus est équivalente, alors qu'elle devient 0,7 fois moins importante au sinus distal au stade deux dents (Figure III.B.25. e). De plus, le ratio de la fluorescence des sinus décroît avec la croissance de la dent. L'intensité de la fluorescence décroît donc avec la croissance de la feuille, et de manière importante au sinus distal.

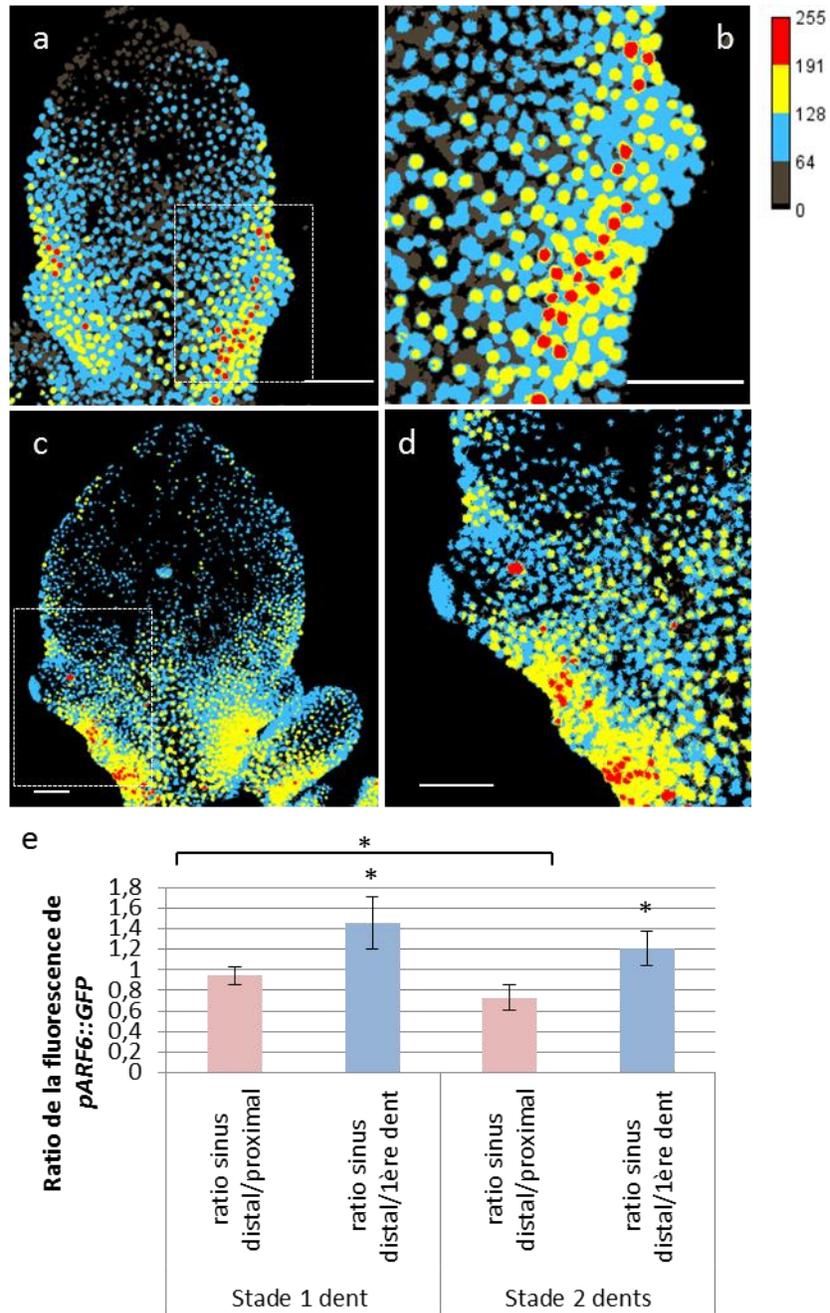


Figure III.B.25 Quantification de la fluorescence de *pARF6::GFP*.

La quantification de la fluorescence de *pARF6::GFP* met en évidence une fluorescence plus importante au niveau des sinus de la dent émergente, au stade de feuille à une dent (a, b) ou deux dents (c, d). Une quantification plus précise de 10 noyaux dans la première dent et dans ses sinus au stade 1 et 2 dents révèle une fluorescence équivalente aux sinus au stade 1 dent, alors qu'au stade 2 dents la fluorescence au sinus distal est 0,7 fois moins important qu'au sinus proximal. Aux deux stades de croissance, la fluorescence au sinus proximal est 1,5 fois plus élevée qu'à la dent (e) Les barres d'échelles représentent 50µm (a-b) et 25µm (c-d). Les quantifications de la fluorescence sont représentées en 256 niveaux de gris représenté par l'échelle de calibration. Les images sont des projections maximales. Les barres représentent les écarts types. Les astérisques représentent les différences significatives entre les ratios sinus distal/proximal et sinus distal/dent ou entre le stade 1 et 2 dents. N=5. Les mesures ont été comparées à l'aide d'un test statistique de Mann et Whitney, P = 0,05.

Le profil d'expression de *ARF8* est plus restreint que celui de *ARF6*. Au stade où une seule dent est présente, *pARF8::GFP* est localisé dans les cellules de la nervure centrale ainsi qu'aux sinus à la périphérie de la feuille, (Figure III.B.26.a). A un stade plus avancé, *ARF8* est exprimé à la nervure centrale et à la périphérie, aux niveaux des sinus et dents en croissance, ainsi qu'aux deuxièmes dents émergentes (Figure III.B.26.b).

Les cartes moyennes faites au stade 1 et 2 dents, soit respectivement à 125 et 170 heures, permettent de confirmer les profils d'expression des feuilles individuelles. La fluorescence est répartie à la nervure centrale et à la périphérie de la feuille (Figure III.B.26. c et d).

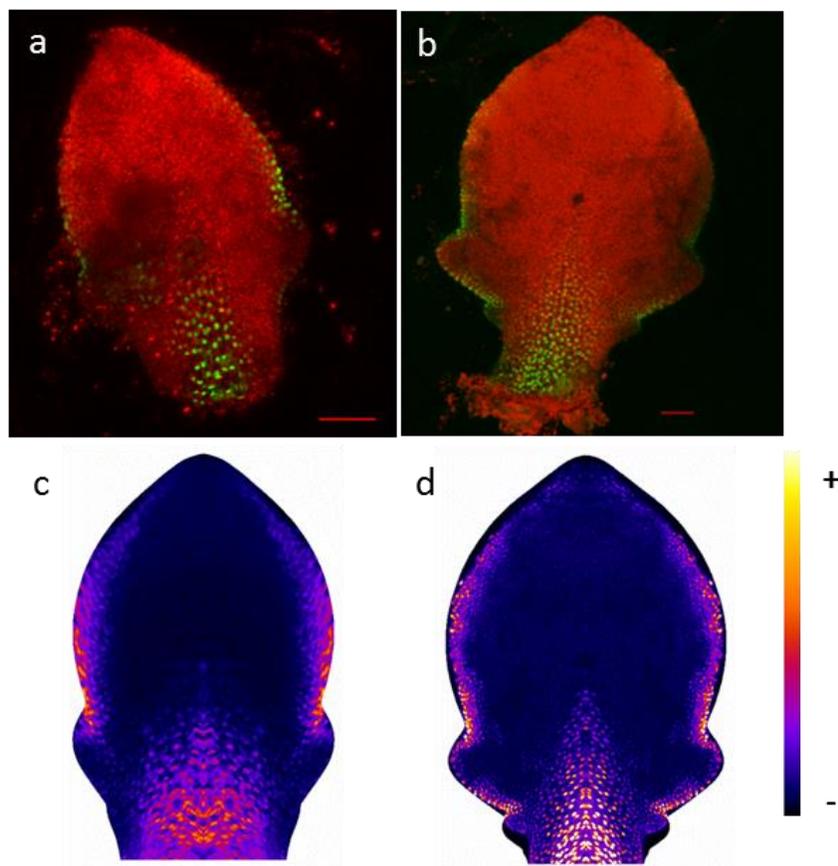


Figure III.B.26 Profil d'expression de *pARF8::GFP*.

Au stade précoce à une dent, *pARF8::GFP* est exprimé au niveau du sinus distal et à la nervure centrale (a). Au stade deux dents, *pARF8::GFP* est présent aux sinus, à la nervure centrale (a) et également au niveau des dents émergentes (b). Les cartes moyennes réalisées sur des feuilles de 125h (c) et 170h (d) confirment les profils observés dans les feuilles individuelles puisque la fluorescence est localisée à la nervure centrale et à la périphérie de la feuille, en particulier aux sinus. La barre de calibration représente en bleu foncé les zones où il y a peu de fluorescence et en jaune là où la fluorescence est la plus présente. N = 18. Les barres d'échelles représentent 50µm. La fluorescence de la GFP est représentée en vert et celle de la chlorophylle en rouge. Les images sont des projections maximales.

La quantification de la fluorescence des noyaux met en évidence une fluorescence plus importante à la base de la feuille ainsi que dans quelques noyaux aux sinus distaux et à la périphérie de la feuille (Figure III.B.27). La fluorescence est plus importante dans les feuilles à deux dents au niveau de la nervure centrale (Figure III.B.27. b et d).

L'absence de noyaux fluorescents dans la première dent ne permet pas d'établir des ratios dent/sinus, et le faible nombre de noyaux fluorescents au sinus proximal de la première dent ne permet également pas de réaliser une quantification dans cette zone.

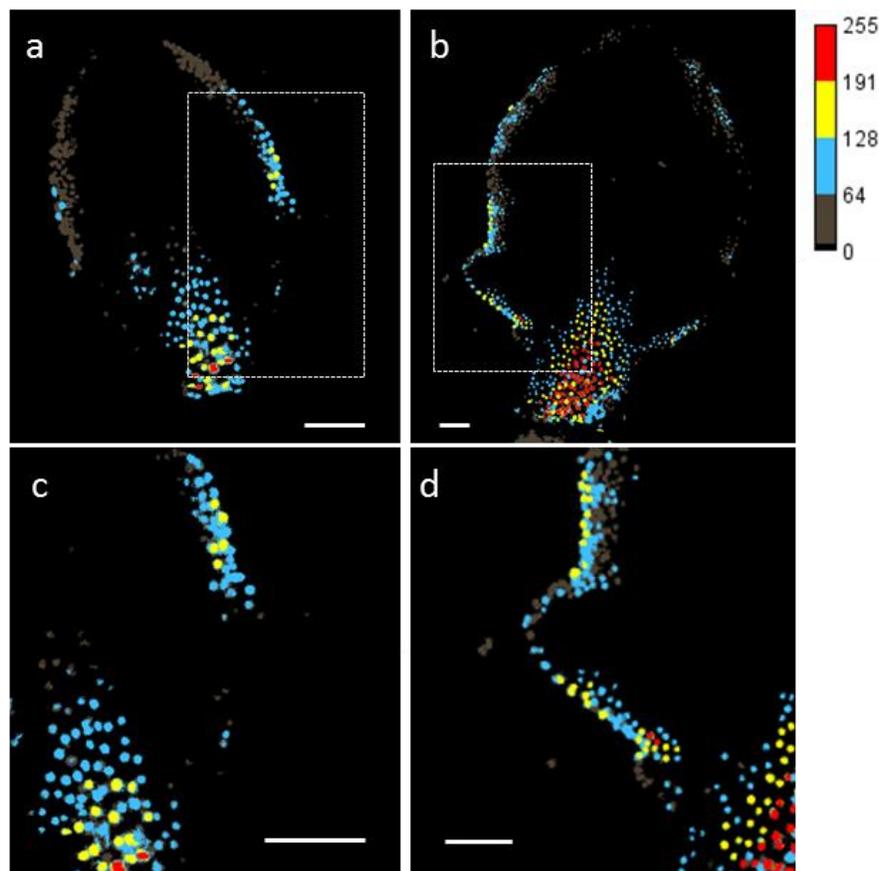


Figure III.B.27. Quantification de *pARF8::GFP*.

La quantification révèle une intensité de la fluorescence plus importante dans la nervure centrale et dans quelques noyaux aux sinus (a-d). La fluorescence est plus importante dans les feuilles à deux dents (b et d).

Les quantifications de la fluorescence sont représentées en 256 niveaux de gris représenté par l'échelle de calibration. Les images sont des projections maximales. Les barres d'échelles représentent 50 μ m (a-b) et 25 μ m (c-d).

Ainsi, *ARF6* et *ARF8* sont tous deux exprimés au niveau des sinus, ainsi que dans les dents émergentes. Afin d'étudier s'ils sont également exprimés dans les mêmes assises, des coupes en Z ont été réalisées grâce à Orthogonal Views d'imageJ. Dans l'épaisseur de la feuille, *ARF6* est exprimé sur toutes les assises de la base de la feuille jusqu'à la dent émergente incluse puis son expression se restreint à l'épiderme et aux premières cellules du parenchyme palissadique (Figure III.B.28.a et b).

ARF8, dont le profil est très restreint, est présent dans les cellules de la marge foliaire et aux sinus dans un faible nombre de cellules épidermiques et parenchymateuses (Figure IV.B.28.c et d).

ARF6 et *ARF8* présentent donc des profils d'expression chevauchants au niveau des sinus. Ces deux *ARFs* pourraient donc agir de concert dans l'initiation des dents et ou la croissance différentielle entre dent et sinus.

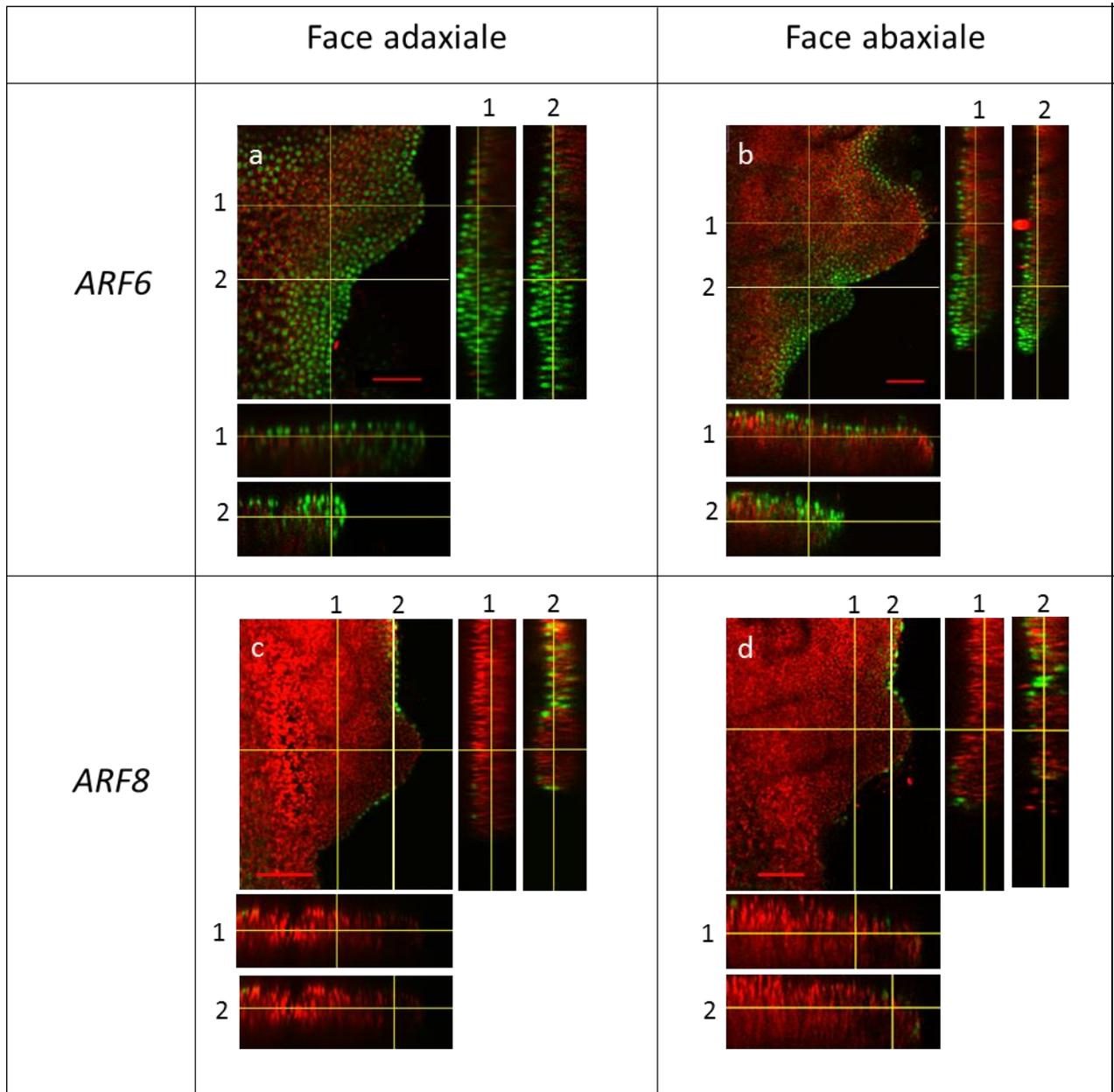


Figure III.B.28. Répartition de *ARF6* et *ARF8* dans l'épaisseur de la feuille.

Les acquisitions a et c ont été imagées à partir de la face adaxiale de la feuille et les acquisitions b et d à partir de la face abaxiale. *pARF6::GFP* est exprimé dans toute l'épaisseur de la feuille au niveau de la dent émergente (a) puis uniquement à l'épiderme et dans les premières cellules sub-épidermiques de la dent en croissance (a et b). Le profil d'expression de *ARF8* qui est restreint au sinus se localise à la périphérie de la feuille (c et d).

La fluorescence de la GFP est représentée en vert et celle de la chlorophylle en rouge. Les barres d'échelles représentent 50µm.

III.B.3.b. Analyse du profil de *ARF6* et *ARF8* dans les formes de feuilles modifiées

L'analyse des profils d'expression de *ARF6* et *ARF8* a révélé qu'il étaient présents dans les mêmes assises cellulaires aux sinus. D'après le modèle de Bilsborough et collaborateurs, *CUC2* qui est exprimé dans les sinus réorienterait PIN1 pour créer un maximum d'auxine à la dent, qui en retour réprimerait *CUC2* pour limiter son expression aux sinus (Bilsborough et al., 2011). Afin de mettre en évidence si ces *ARFs* sont importants pour la formation des dents leurs profils d'expression ont été étudiés dans les géotypes où l'expression de *CUC2* est altérée et dont les feuilles ont des formes modifiées.

Dans le mutant presque lisse *cuc2-3*, *ARF6* est fortement exprimé dans la partie proximale de la feuille aux extrémités du limbe et de manière moindre dans le reste de la feuille (Figure III.B.29.a). L'intensité de la fluorescence est très forte dans la zone où se positionnent normalement dents et sinus dans le géotype sauvage (Figure III.B.30.a).

Dans des feuilles ayant une expression de *CUC2* accrue, le profil de *ARF6* est présent au niveau de la zone dent/sinus et particulièrement dans les sinus et les plus jeunes dents qui sont en cours d'émergence (Figure III.B.29.c et d). La quantification de la fluorescence met en évidence une intensité de fluorescence similaire entre les dents et la partie distale de la feuille, ainsi qu'une plus forte intensité de la fluorescence dans les sinus d'environ 1,6 fois par rapport au reste de la feuille (Figure III.B.30.c, d et e). Ce profil est également observé dans le mutant *cuc3-105* (Figure III.B.29.b), où la fluorescence est plus intense dans la partie proximale, et notamment aux sinus (Figure III.B.30.b). Les mesures de la fluorescence dans la première dent et ses sinus révèlent que les niveaux d'intensité de la fluorescence sont similaires entre les sinus mais 1,2 fois plus importants que dans la dent (Figure III.B.30.e). Ces résultats ne sont pas significativement différents des ratios obtenus dans Col-0 au niveau de la première dent ainsi que ses sinus. Ces observations sont réalisées sur des feuilles de mêmes tailles ($\approx 400\mu\text{m}$), néanmoins, les mutants *mir164a-4* et les plantes transgéniques *CUC2g-m4* ont des dents beaucoup plus marquées et présentent des dents distales. Cependant, le profil d'expression de *ARF6* dans des feuilles à un stade plus précoce ($\approx 250\mu\text{m}$) et donc avec des formes de feuilles plus semblables à celles de Col-0 n'est pas différent de celui des stades plus tardif (Figure III.B.31).

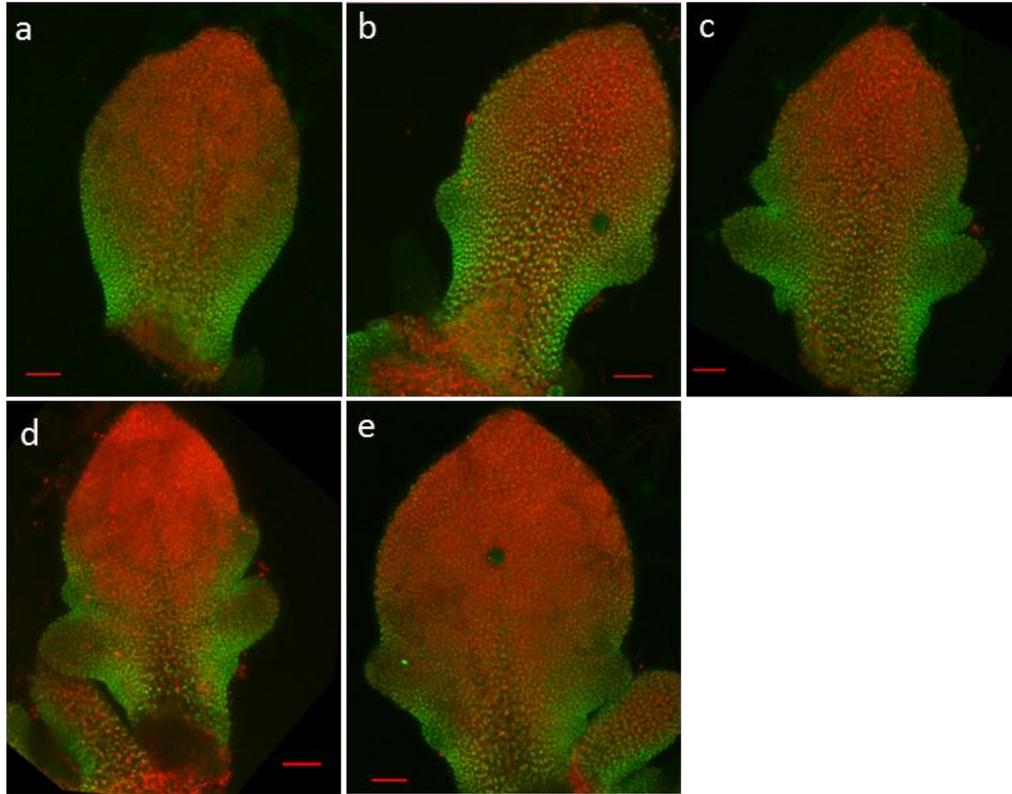


Figure III.B.29. Projection maximale du profil d'expression de *pARF6::GFP* dans les mutants *cuc2-3*, *cuc3-105*, *mir164a-4* et les plantes transgéniques CUC2g-m4.

pARF6::GFP est fortement exprimé dans la partie proximale dans les feuilles des mutants *cuc2-3* (a), *cuc3-105* (b), *mir164a-4* (c) et les plantes CUC2g-m4 (d) comme cela est observé chez Col-0 (e). Les barres d'échelles représentent 50μm. Les barres d'échelles représentent 50μm. Les profils sont représentés à l'aide de projection maximales. Les images sont des projections maximales. La fluorescence de la GFP est représentée en vert et celle de la chlorophylle en rouge.

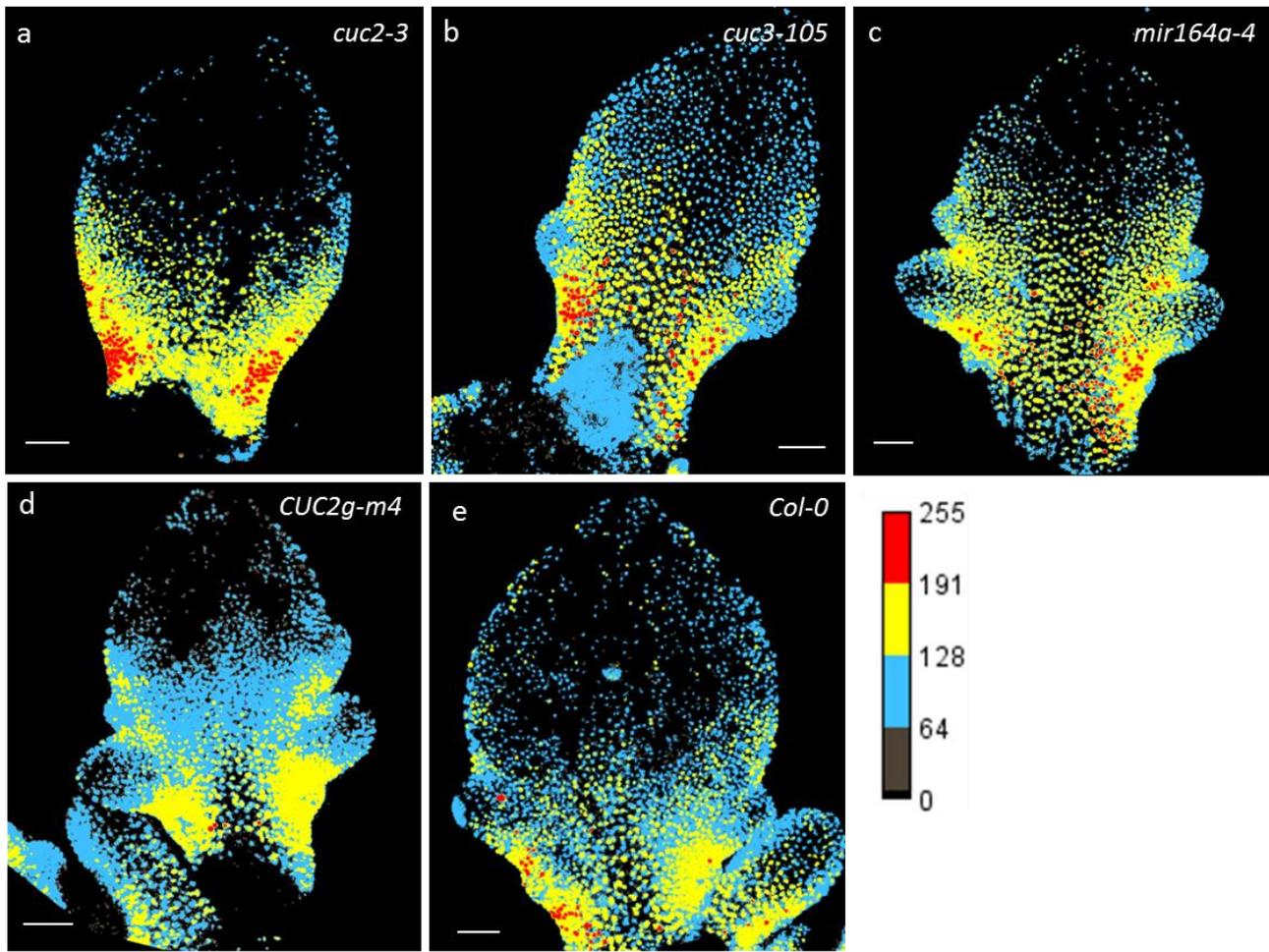


Figure III.B.30. Quantification de la fluorescence de pARF6::GFP dans les mutants *cuc2-3*, *cuc3-105*, *mir164a-4* et les plantes transgéniques CUC2g-m4.

La fluorescence est quantifiée à l'aide de la macro imageJ (a-e) et les ratios de la fluorescence entre les sinus de la première dent et entre le sinus distal et la dent sont réalisés (f). N=5. Les barres d'échelles représentent 50µm. Les images sont des projections maximales. Les barres représentent les écarts types. Les quantifications de la fluorescence sont représentées en 256 niveaux de gris représenté par l'échelle de calibration.

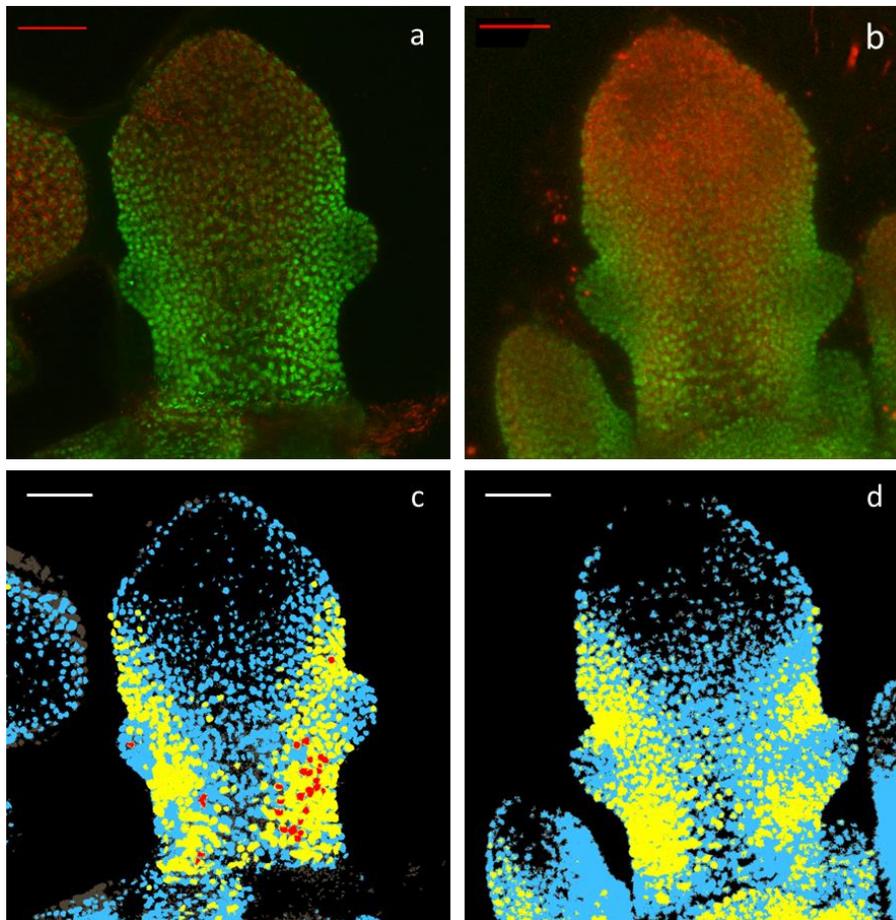


Figure III.B.31. Profil d'expression de pARF6::GFP dans des feuilles sur-exprimant CUC2.

Le profil d'expression de pARF6::GFP dans *mir164a-4* (a,c) est majoritairement présent aux sinus et à la dent distale. Dans CUC2gm4 (b,d), ARF6 est exprimé également dans ces mêmes zones. Les barres d'échelle représentent 50µm. Les profils sont représentés à l'aide de projections maximales. La fluorescence de la GFP est représentée en vert et celle de la chlorophylle en rouge (a, b). Les quantifications de la fluorescence sont représentées en 256 niveaux de gris représenté par l'échelle de calibration.

Ainsi, le profil d'expression de ARF6 dans ces mutants semble toujours suivre le même modèle que celui observé dans Col-0 (Figure III.B.30.e), avec une très forte fluorescence à la marge de la feuille où émergent des dents. Cette fluorescence décroît au fur et à mesure de la croissance de la dent. Le niveau d'expression de ARF6 ne semble donc pas être impacté par les variations de l'expression de CUC2.

Dans un écotype sauvage, ARF8 a été démontré comme étant localisé au niveau de la nervure centrale, et dans les premières assises cellulaires au niveau des sinus, avec une intensité de fluorescence plus importante au niveau des sinus distaux.

Dans les mutants *cuc2-3*, *cuc3-105*, *mir164a-4* et les plantes transgéniques CUC2gm4, le profil

d'expression de *ARF8* suit également ce modèle (Figure III.B.32. a-d). En effet, on le retrouve à la nervure centrale et au niveau des premières assises de la feuille dans les dents émergentes et particulièrement aux sinus. Le profil semble plus étendu dans ces mutants que dans Col-0 au niveau des projections maximales, néanmoins les quantifications de la fluorescence montrent des intensités relativement similaires, bien que l'intensité de la fluorescence dans les mutants et CUC2g-m4 apparaisse plus importante dans la nervure centrale ainsi que le long de la marge foliaire dans les sinus des dents les plus jeunes (Figure III.B.33. a-d).

Le profil d'expression de *ARF8* ne semble donc pas être impacté par des modifications de la forme des feuilles.

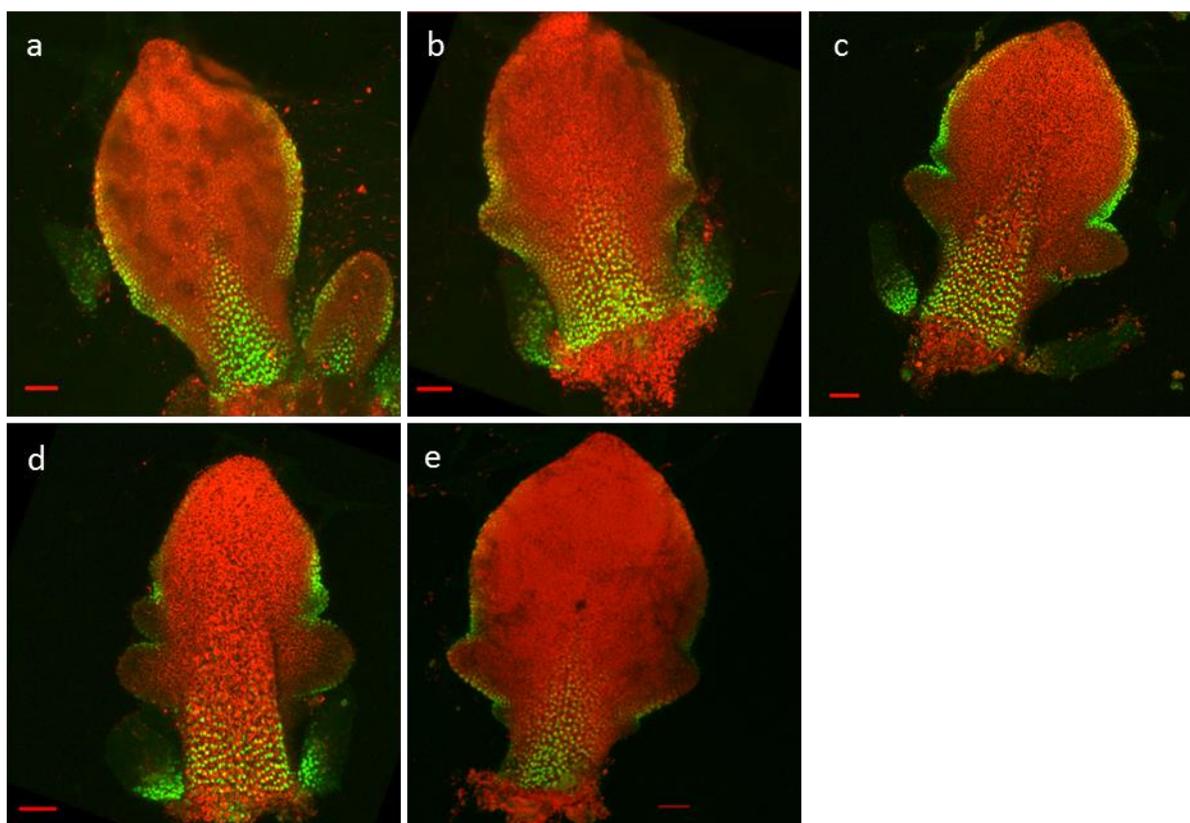


Figure III.B.32. Projection maximale du profil d'expression de *pARF8::GFP* dans les mutants *cuc2-3*, *cuc3-105*, *mir164a-4* et les plantes transgéniques CUC2g-m4.

Comme dans Col-0 (e), le profil d'expression de *ARF8* est situé à la nervure centrale et sur les premières assises cellulaires aux sinus et aux dents distales dans les mutants *cuc2-3* (a), *cuc3-105* (b) et *mir164a-4* (c) ainsi que dans les plantes CUC2g-m4 (d).

Les barres d'échelles représentent 50μm. Les profils sont représentés à l'aide de projections maximales. La fluorescence de la GFP est représentée en vert et celle de la chlorophylle en rouge.

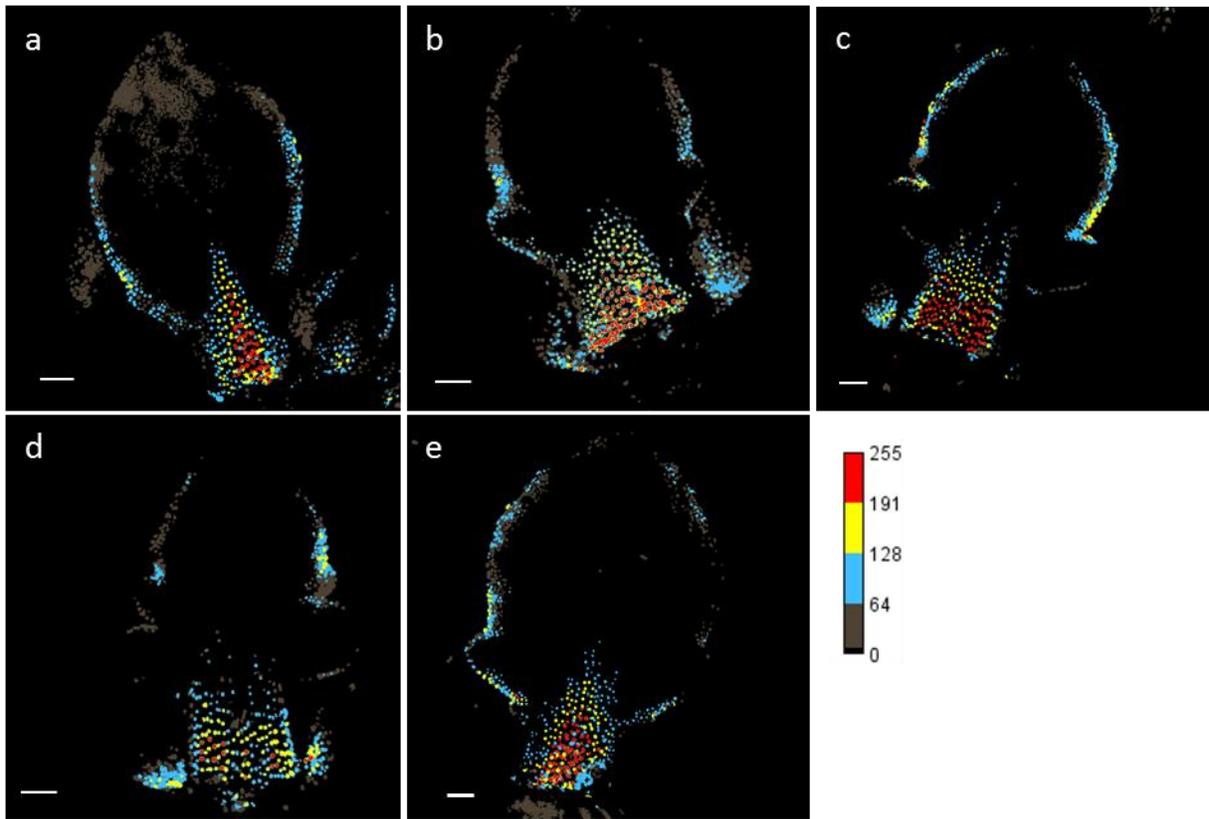


Figure III.B.33. Quantification de la fluorescence de *pARF8::GFP* dans les mutants *cuc2-3*, *cuc3-105*, *mir164a-4* et plantes transgéniques *CUC2g-m4*.
 La fluorescence est très forte au niveau de la nervure centrale dans *cuc2-3* (a), *cuc3-105* (b), *mir164a-4* et *CUC2g-m4* ainsi que dans *Col-0* (e). La calibration de la fluorescence est réalisée en 256 niveaux de gris. Les images sont projections maximales. Les barres d'échelles représentent 50µm.

III.B.3.c. Analyse de l'implication de *ARF6* et *ARF8* dans la formation des dents

Les profils d'expression de *ARF6* et *ARF8* au niveau des dents émergentes et des sinus ainsi que leur rôle déjà connu notamment dans la fleur amène à l'hypothèse d'un rôle de ces *ARFs* dans la formation des dents. Les feuilles des doubles mutants homozygotes *ARF6-2/ARF8-3* et des sesquimutants *ARF6-2(-/-)/ARF8-3(+/-)* sont analysées à l'aide du software MorphoLeaf.

III.B.3.c.1. Phénotype de *arf6-2 arf8-3*

Le double mutant *arf6-2 arf8-3* a précédemment été décrit (Nagpal et al., 2005). Lorsque les plantes sont en jours longs, les feuilles matures du sesquimutant et du double homozygote sont épínastiques et la sévérité du phénotype va de pair avec le nombre d'allèles mutés.

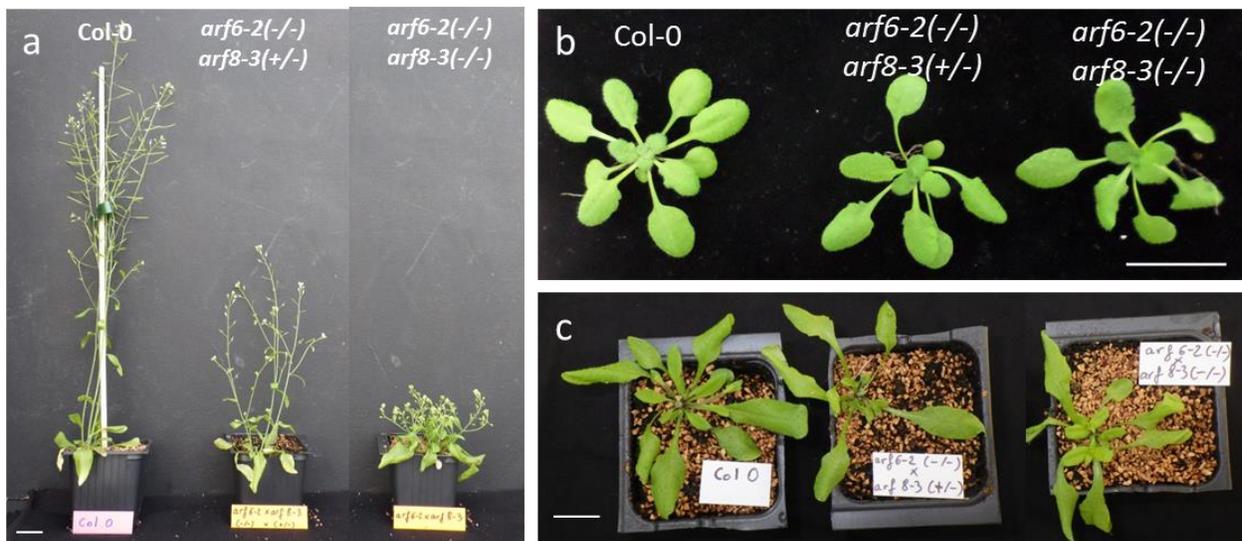


Figure III.B.34. Phénotype du mutant *arf6-2arf8-3*.

Le sesquimutant *arf6-2(-/-)arf8-3(+/-)* présente des tiges plus courtes que celle de Col-0 alors que le double mutant homozygote *arf6-2arf8-3* est nain, ses tiges ne dépassant pas quelques centimètres (a). Au niveau de la rosette, lorsque les plantules sont semées en jours courts durant 4 semaines (b) le sesquimutant ainsi que le double homozygote *arf6-2arf8-3* ont leurs feuilles les plus matures qui deviennent épínastiques. Cette épínastie est également retrouvée sur les plantules de 4 semaines en jours longs, avec un degré plus fort chez le double homozygote mutant (c). Les barres d'échelles représentent 2 cm.

Les hampes florales du sesquimutant sont environ deux fois plus courtes que celles de Col-0 et les fleurs sont partiellement stériles. Celles du double homozygote présentent un phénotype nain et les fleurs sont

stériles. Les plantes sont donc maintenues à l'état sesquimutant pour leur étude et les doubles homozygotes mutants sont génotypés individuellement à chaque mise en culture. En jours courts, les feuilles de la rosette de 4 semaines du sesquimutant et du double homozygote mutant semblent avoir des pétioles plus longs que Col-0. Les feuilles les plus âgées présentent une épinastie plus ou moins prononcée.

III.B.3.c.2. Implication de *ARF6* et *ARF8* dans l'initiation des dents

Afin d'analyser si le double mutant *arf6-2 arf8-3* présente un défaut dans la mise en place des dents, des feuilles de rangs 13 issues de plantules de 4 semaines ayant poussé en jours courts sont analysées. Le double mutant présentant un phénotype nain avec des feuilles épinastiques au stade mature, les observations ont également été réalisées sur des sesquimutants *arf6-2(-/-)arf8-3(+/-)*.

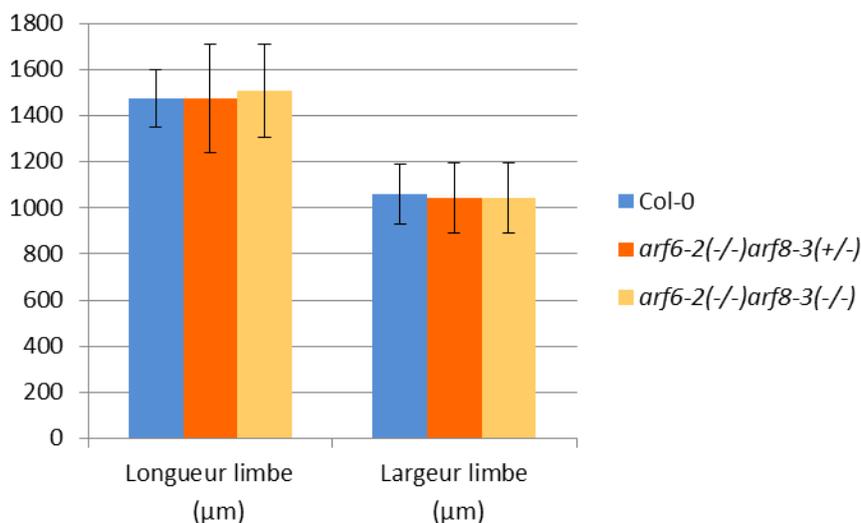


Figure III.B.35. Quantification de la forme des feuilles du sesquimutant *arf6-2(-/-)arf8-3(+/-)* et du double homozygote *arf6-2 arf8-3*.

Les mesures ont été réalisées sur des feuilles de rang 13, de plantules de 4 semaines cultivées en jours courts. N= 10 feuilles. Les barres représentent les écarts types. Les mesures ont été comparées à l'aide d'un test statistique de Mann et Whitney.

Les analyses réalisées à l'aide de MorphoLeaf, mettent ainsi en évidence que la feuille 13 du sesquimutant *arf6-2(-/-)arf8-3(+/-)* ainsi que du double homozygote *arf6-2 arf8-3* ont une longueur et

une largeur de limbe identiques à celles de Col-0. En effet, les limbes ont une longueur d'environ 1470µm et une largeur de 1050µm (Figure III.B.35).

Bien que la forme globale de la feuille ne varie pas chez le double mutant, l'influence d'*ARF6* et d'*ARF8* a été recherchée au stade de l'initiation des dents. Pour cela, les dents 1 et 3 ont été analysées chez le double homozygote, le sesquimutant et Col-0.

Ces dents ont été choisies car elles correspondent respectivement à la plus âgée et à la plus jeune présentes dans ces feuilles permettant ainsi d'étudier l'initiation de la dent ainsi que le début de la croissance. Ces dents sont comparées par rapport à leur largeur qui est prise entre les deux sinus, la hauteur qui correspond aussi à la médiane et qui passe donc à la pointe de la dent et au centre de la largeur, ainsi qu'à la position par rapport à la base de la feuille.

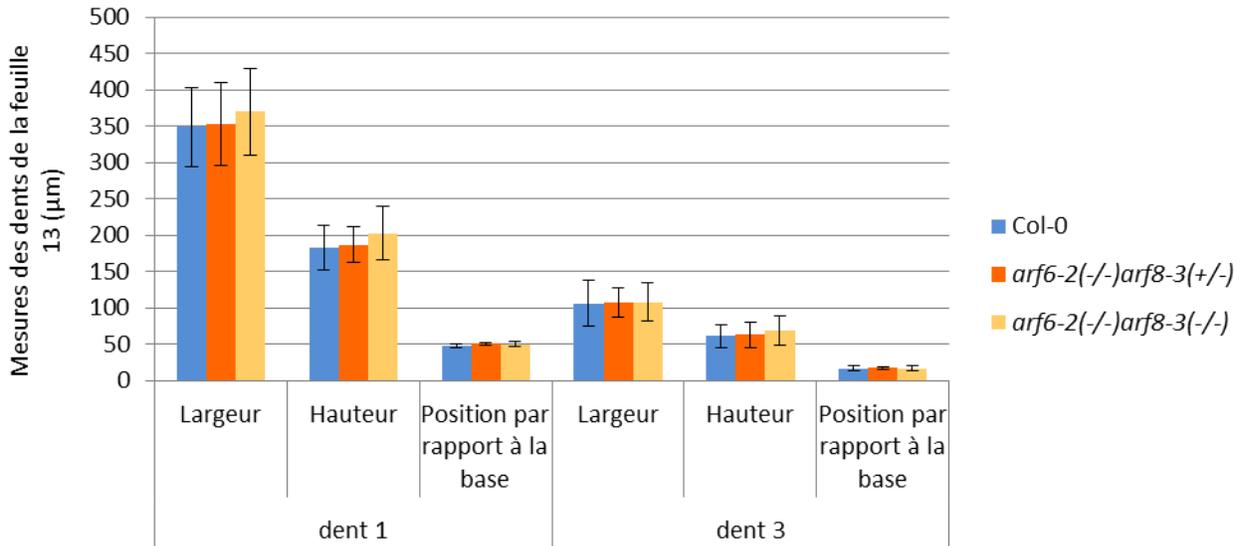


Figure III.B.36. Analyses de la forme des dents 1 et 3 du sesquimutant *arf6-2(-/-)arf8-3(+/-)* et du double homozygote *arf6-2 arf8-3*.

Les mesures ont été réalisées sur des feuilles de rang 13, de plantules de 4 semaines de jours courts. N = 20. Les barres représentent les écarts types. Les mesures ont été comparées à l'aide d'un test statistique de Mann et Whitney.

Pour Col-0, la dent 1 présente une largeur de 350µm, une hauteur de 190µm et est positionnée à 50µm de la base de la feuille. Le sesquimutant *arf6-2(-/-)arf8-3(+/-)* a également une largeur de première dent de 350µm, une hauteur égale à 190µm ainsi qu'une distance à la base de 50µm. La dent 1 du sesquimutant est donc identique à celle de Col-0 (Figure III.B.36).

Pour le double homozygote mutant, la dent 1 présente une largeur de 370µm, une hauteur d'environ 200µm et une distance par rapport à la base de 50µm. Ces mesures ne sont pas significativement

différentes de Col-0 (Figure III.B.36).

Les mesures réalisées au niveau de la dent 3 montrent que pour Col-0 la largeur de cette dent est équivalente à 100µm, la hauteur à 60µm et elle est positionnée à environ 20µm de la base de la feuille. Les quantifications réalisées dans le sesquimutant et dans le double homozygote mutant montrent des largeurs, hauteurs et un positionnement par rapport à la base similaire aux mesures dans Col-0 (Figure III.B.36).

L'initiation ainsi que le début de la croissance des dents ne sont donc pas impactées dans le sesquimutant *arf6-2(-/-)arf8-3(+/-)* ni dans le double mutant homozygote *arf6-2 arf8-3*.

III.B.3.c.3. Implication de *ARF6* et *ARF8* dans le maintien de la croissance de la feuille

Les feuilles épinastriques du double mutant *arf6-2 arf8-3* à maturité indiquent une différence de croissance des faces adaxiale et abaxiale. De plus, *ARF6* et *ARF8* ont été montrés comme jouant un rôle dans la croissance dans l'hypocotyle et les pétales (Nagpal et al., 2005; Varaud et al., 2011). Ainsi, dans la feuille, *ARF6* et *ARF8* pourraient également être impliquées dans la modulation des réponses cellulaires qui soutiennent la croissance de la feuille plutôt que dans l'initiation des dents. Pour étudier cela, des feuilles de plantules matures de 4 semaines en jours longs ont été analysées.

Le contour moyen de la feuille 6 du double mutant *arf6-2 arf8-3* apparaît plus long que celui de Col-0 mais d'une largeur similaire. Les dents semblent également plus marquées que celles de Col-0 (Figure III.B.37.a). Lorsque l'on quantifie ces différences, la largeur du limbe de *arf6-2 arf8-3* et celle de Col-0 sont de 1,4cm. Pour la longueur, celle de Col-0 est de 2,7cm alors que celle de *arf6-2 arf8-3* est de 3cm. Cependant avec un nombre de feuilles analysées de seulement 7, cette différence n'est pas statistiquement significative (Figure III.B.37.b).

Au niveau de la dentelure, les quatre dents ont été analysées. La dent 1 correspond à la dent la plus âgée et la dent 4 à la plus jeune.

Les dents 1,2 et 3 de *arf6-2 arf8-3* ne sont pas significativement différentes de celles de Col-0. Pour la dent 4, les différences de largeur observées entre le double mutant (0,4cm) et Col-0 (0,5cm) et de la hauteur moyenne qui est de 0,16cm pour le double mutant et de 0,11cm pour Col-0

(Figure III.B.37.c) ne sont également pas significatives. Là encore le nombre restreint d'échantillons analysés mais aussi la relativement forte variabilité intra-génotype ne permettent pas de conclure.

Des colorations à l'iodure de propidium sur des feuilles du double mutant *arf6-2arf8-3* ainsi que de Col-0 ont été réalisées afin de mettre en évidence s'il existe une différence de taille ou de nombre de cellules entre ces deux génotypes. Cependant, le faible nombre d'acquisitions exploitables en termes de coloration, de forme de feuille et d'analyse MorphographX, n'a pas permis de réaliser une analyse pertinente. Un marqueur membranaire permettant une visualisation des cellules sur du matériel non fixé pourrait être introgressé dans ces génotypes pour une meilleure qualité du signal lors de l'acquisition.

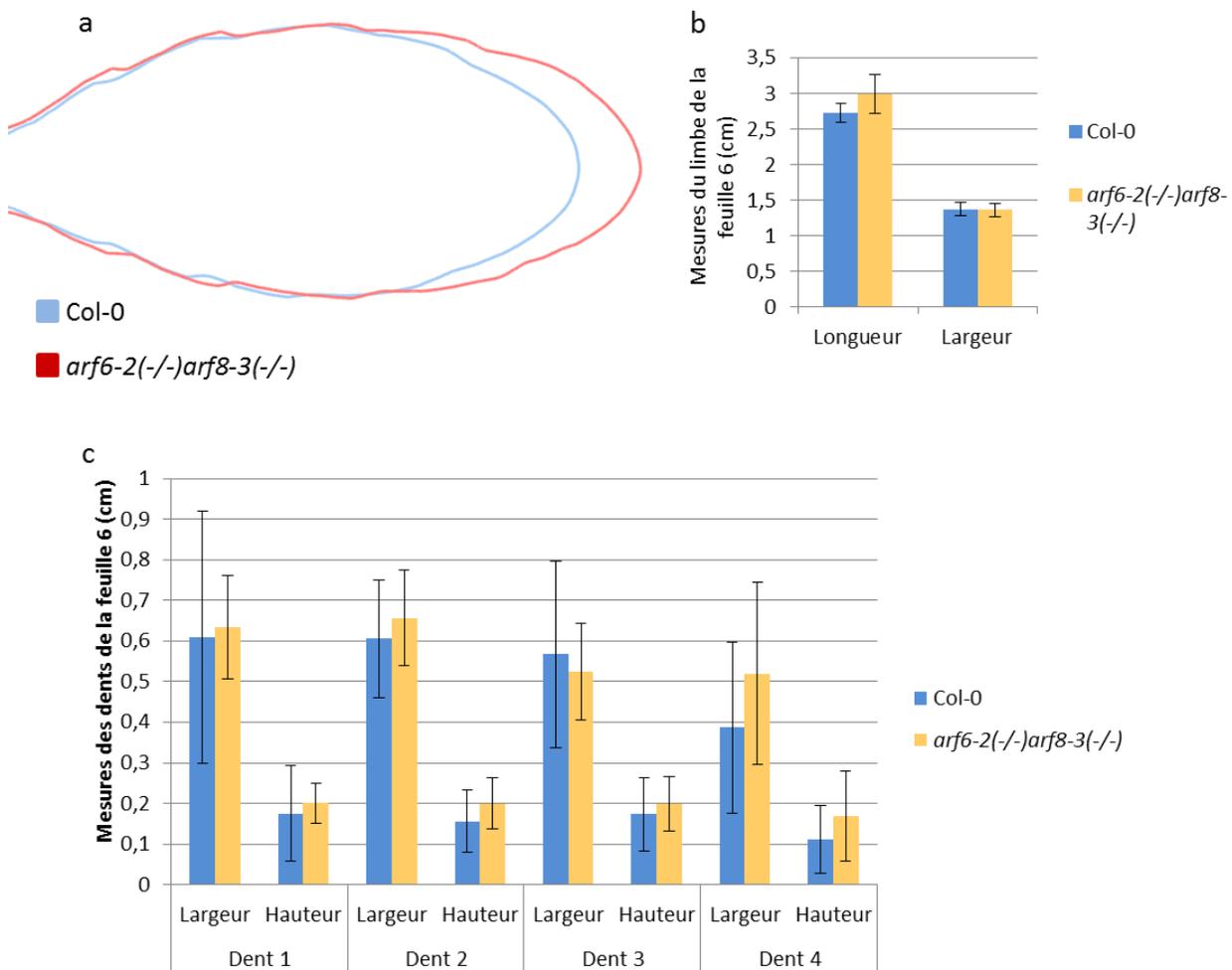


Figure III.B.37. Analyse de la feuille 6 mature du double mutant *arf6-2arf8-3*.

Les feuilles 6 de plantules matures de 4 semaines en jours longs sont utilisées pour l'analyse. Le contour moyen (a) ainsi que les mesures du limbe (b) et des dents sont réalisés à l'aide de MorphoLeaf. n = 7 feuilles. Les barres des histogrammes représentent les écarts types. Les mesures ont été comparées à l'aide d'un test statistique de Mann et Whitney.

III.B.3.d. Discussion

L'analyse des profils d'expression de *ARF6* et *ARF8* dans la feuille a révélé que ces deux *ARFs* sont exprimés dans les sinus, notamment ceux qui encadrent la dent émergente pour *ARF6*, et les sinus distaux pour *ARF8*. Des études phylogénétiques ont montré que *ARF6* et *ARF8* appartiennent au même clade (Remington et al., 2004) et ont des fonctions partiellement redondantes dans d'autres organes comme cela a été montré dans la fleur, où ils promeuvent la maturation des fleurs (Nagpal et al., 2005). Le rôle de *ARF6* et *ARF8* pourraient donc être complémentaire dans la feuille au niveau du sinus, peut-être pour initier la mise en place des dents. Cela est également appuyé par le fait que le profil d'expression de *ARF6* évolue avec la croissance de la feuille pour diminuer progressivement dans les dents en croissance.

La présence de ces *ARFs* aux sinus, là où l'on retrouve également *CUC2*, laisse penser que *ARF6* et *ARF8* pourraient être les intermédiaires entre l'auxine et *CUC2*, dans le processus de formation des dents (Bilsborough et al., 2011) pour permettre de limiter l'expression de *CUC2* aux sinus.

Afin de mettre en évidence si *ARF6* et *ARF8* sont impactés par des variations du niveau d'expression de *CUC2* et *CUC3*, les profils de ces *ARFs* ont été étudiés dans les mutants *cuc2-3*, *cuc3-105*, *mir164a-4* et les plantes transgéniques *CUC2g-m4* qui présentent des formes de feuilles modifiées. L'étude du profil d'expression de *ARF6* et de *ARF8* dans les différents mutants n'a pas révélé de modifications de profil et peu de variation de l'intensité de la fluorescence. En effet, la fluorescence est toujours la plus forte au niveau des sinus des dents émergentes pour *ARF6* et au niveau des sinus distaux pour *ARF8*, et les ratios de la fluorescence ne sont pas modifiés par rapport à ceux de Col-0. Cela semble donc indiquer que la modification du niveau d'expression de *CUC2* n'impacte pas celles de *ARF6* et *ARF8*. La répétition des profils au niveau des dents distales du mutant *mir164a-4* ou des plantes *CUC2g-m4* conforte d'avantage le possible rôle de ces deux *ARFs* dans la mise en place des dents.

Pour tester le rôle de ces *ARFs* dans la mise en place des dents, les feuilles précoces du double mutant *arf6-2 arf8-3* ont été analysées, néanmoins, aucune altération de la marge foliaire n'a été observée et d'une manière générale il n'a pas été possible de mettre en évidence de différence significative de croissance foliaire. Les tentatives visant à analyser les génotypes à l'échelle cellulaire pour évaluer une possible différence dans la balance prolifération/expansion des cellules n'ont pu aboutir dans le temps imparti de la thèse.

L'absence de phénotype foliaire dans le double mutant laisse penser que du fait du grand nombre d'*ARF* présents dans la feuille, un ou plusieurs autres *ARF* pourraient prendre le relais en absence de *ARF6* et

ARF8, ou encore que *ARF6* et *ARF8* participeraient avec d'autres *ARFs* à la mise en place des dents mais ne seraient pas essentiels et ne permettraient que d'amplifier l'action d'autres *ARFs*. Ce mode d'action a déjà été rapporté pour les répresseurs (Ellis et al., 2005), on ne peut exclure qu'il en soit de même pour les activateurs si toutefois ces *ARF* jouent bien un tel rôle dans la feuille. On peut en effet soulever la question dans la mesure où ils sont surtout exprimés dans les sinus, là même où se crée un minimum d'auxine et une absence de croissance.

ARF6 et *ARF8* ont précédemment été mis en évidence pour avoir un rôle durant la croissance de l'hypocotyle (Nagpal et al., 2005), ainsi que sur celle des pétales pour *ARF8* (Varaud et al., 2011). Ainsi, dans la feuille, ces deux *ARFs* pourraient être impliqués dans la croissance plutôt que le processus d'initiation des dents.

Pour vérifier cela, les feuilles matures du double mutant *arf6-2 arf8-3* ont été analysées et les résultats ont montré que le double mutant présente une longueur de limbe légèrement plus grande mais non significativement différente de Col-0. Les résultats au niveau des dents vont dans le même sens que ceux du limbe.

CUC2 qui est exprimé dans les sinus réoriente PIN1 pour créer un maxima d'auxine à la pointe de la dent qui participe à sa formation (Bilsborough et al., 2011). Si on suppose que *ARF6* et *ARF8* contrôlent l'expression de *CUC2*, alors en l'absence de ces deux *ARFs*, *CUC2* serait moins contraint, ce qui pourrait modifier la croissance de la dent, puisqu'il est déjà connu que la sur-expression de *CUC2* entraîne la formation de feuille très découpée, comme on peut le retrouver dans le mutant *mir164a-4* (Nikovics et al., 2006). Cependant, *mir164a* étant encore actif dans le double mutant *arf6-2 arf8-3*, l'expression de *CUC2* est donc toujours sous contrôle de son microARN, c'est peut-être pourquoi la différence de croissance n'est pas très marquée entre Col-0 et le double mutant *arf6-2 arf8-3* au stade mature, et imperceptible au stade précoce. Pour vérifier cela, un triple mutant *arf6-2 arf8-3 mir164a-4* pourrait être généré afin de vérifier si ses feuilles présentent une marge plus découpée que celle du mutant *mir164a-4*. De plus, la présence d'autres *ARFs* aux sinus pourrait prendre en partie le relais de *ARF6* et *ARF8* en leur absence.

III.B.4. ARF5

Les résultats obtenus pour le double mutant *arf6arf8* ne permettent pas de confirmer leur rôle dans l'initiation des dents. L'une des hypothèses est que *ARF5* soit impliqué et puisse être suffisant pour ce processus développemental, même en absence de *ARF6* et *ARF8*. Les travaux de Galbiani et al (2013) semblent aller dans ce sens, puisqu'ils mettent en évidence que le mutant hypomorphe *arf5-2/mp*⁵³¹⁹ présente une marge plus lisse.

III.B.4.a. Etude du profil d'expression de *ARF5* dans Col-0

Les observations des constructions *pARF5::GFP* dans les très jeunes feuilles en microscopie confocale révèlent un profil réticulé qui semble suivre la répartition des veines primaires et secondaires (Figure III.B.38. a-b). La fluorescence est également retrouvée sur les bords de la feuille, de la base de la feuille jusqu'au premier sinus, ainsi qu'au niveau des autres sinus. Au stade une dent, la fluorescence semble être plus importante aux sinus et dans la zone qui les entourent (Figure III.B.38.a) alors qu'au stade deux dents la plus forte intensité de la fluorescence semble se concentrer au cœur des sinus (Figure III.B.38.b). Dans les feuilles aux stades 2 dents, la fluorescence est également retrouvée dans les très jeunes dents en cours d'émergence. La fluorescence n'est pas présente à l'extrémité de la dent en croissance, ainsi qu'au bord de la feuille dans la partie distale et à la pointe. Des coupes en Z passant dans les vaisseaux ont été réalisées. Cela permet d'observer que les noyaux fluorescents forment des îlots répétés le long de la feuille, qui correspondent aux coupes transversales des vaisseaux ou des cellules compagnes des vaisseaux (Figure IV.B.39.a). D'autres coupes dans l'épaisseur de la feuille ont été réalisées au niveau des dents et des sinus. Au stade une et deux dents, le profil d'expression est retrouvé au milieu de l'épaisseur de la feuille, là où se situent les vaisseaux. Au niveau des sinus, le profil d'expression de *ARF5* est observé jusque dans l'épiderme, cela représente une dizaine de noyaux (Figure III.B.39.b et c).

Les cartes moyennes réalisées pour le profil d'expression de cet *ARF* à une et deux dents mettent en évidence que dans chaque feuille individuelle, *ARF5* est présent aux sinus. Les vaisseaux secondaires n'étant pas positionnés de manière strictement identique dans les feuilles, le profil moyen de *ARF5* dans le reste de la feuille ne reflète pas le marquage des vaisseaux observés dans les feuilles individuelles, le marquage se trouve artéfactuellement lissé (Figure III.B.38.c-d).

La quantification de la fluorescence révèle une très forte fluorescence aux sinus alors que le reste de la feuille présente des intensités de fluorescence variable (Figure III.B.40). Cette forte intensité est similaire

dans les deux sinus de la première dent, et est 1,4 fois plus importante que dans la dent (Figure III.B.40.e). Il faut néanmoins tenir compte du fait qu'au niveau des sinus une partie au moins de la fluorescence provient des noyaux des cellules épidermiques donc de la surface alors que la fluorescence des autres noyaux provient de tissus profonds où le signal peut être partiellement atténué.

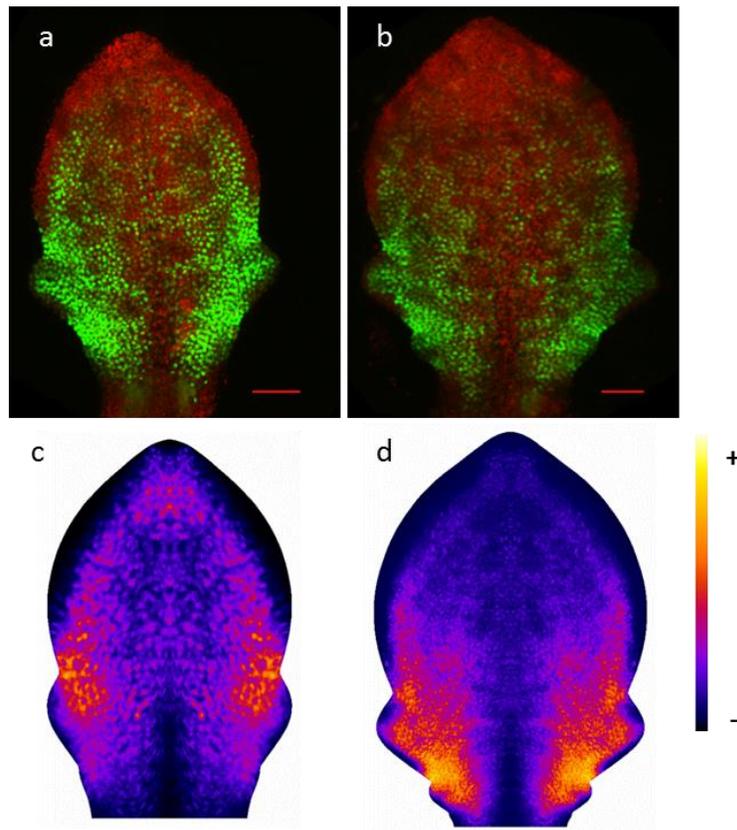


Figure III.B.38. Profil d'expression de *pARF5::GFP*.

ARF5 présente le même profil d'expression réticulé qui suit les vaisseaux primaires et secondaires dans des feuilles de différents stades. Au niveau des sinus, l'intensité de la fluorescence apparaît plus importante que dans le reste de la feuille (a et b). Les cartes moyennes du profil à une (c) et deux dents (d) mettent en évidence que la fluorescence est systématiquement au niveau des sinus. Les barres d'échelles représentent 50 μ m. Les images sont des projections maximales. La fluorescence de la GFP est représentée en vert et celle de la chlorophylle en rouge. La barre de calibration représente en bleu foncé les zones où il y a peu de fluorescence et en jaune là où la fluorescence est la plus présente. N = 20.

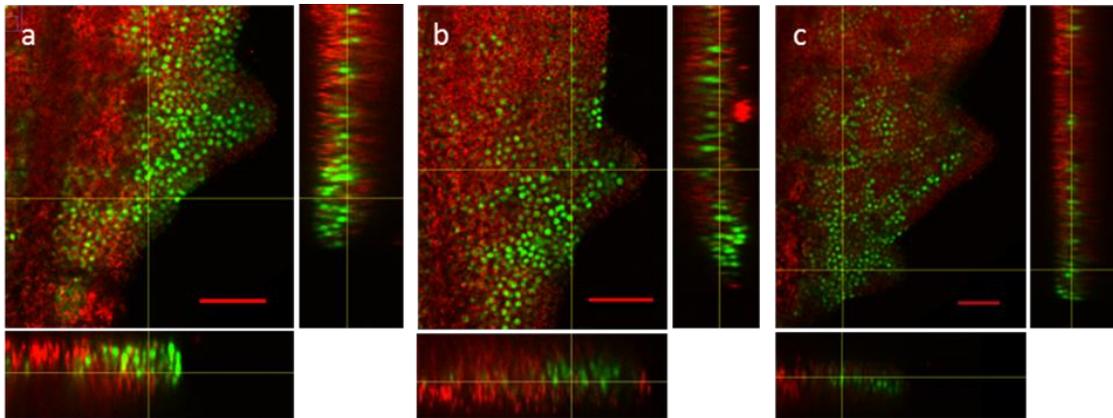


Figure III.B.39. Répartition de *ARF5* dans l'épaisseur de la feuille.

Les feuilles ont été imagées sur la face adaxiale (a et b) et abaxiale (c). Le profil d'expression de *ARF5* est retrouvé dans les assises sub-épidermiques autour des vaisseaux et au niveau de l'épiderme aux sinus. Les barres d'échelle représentent 50µm. La fluorescence de la GFP est représentée en vert et celle de la chlorophylle en rouge. Les feuilles imagées possèdent deux dents.

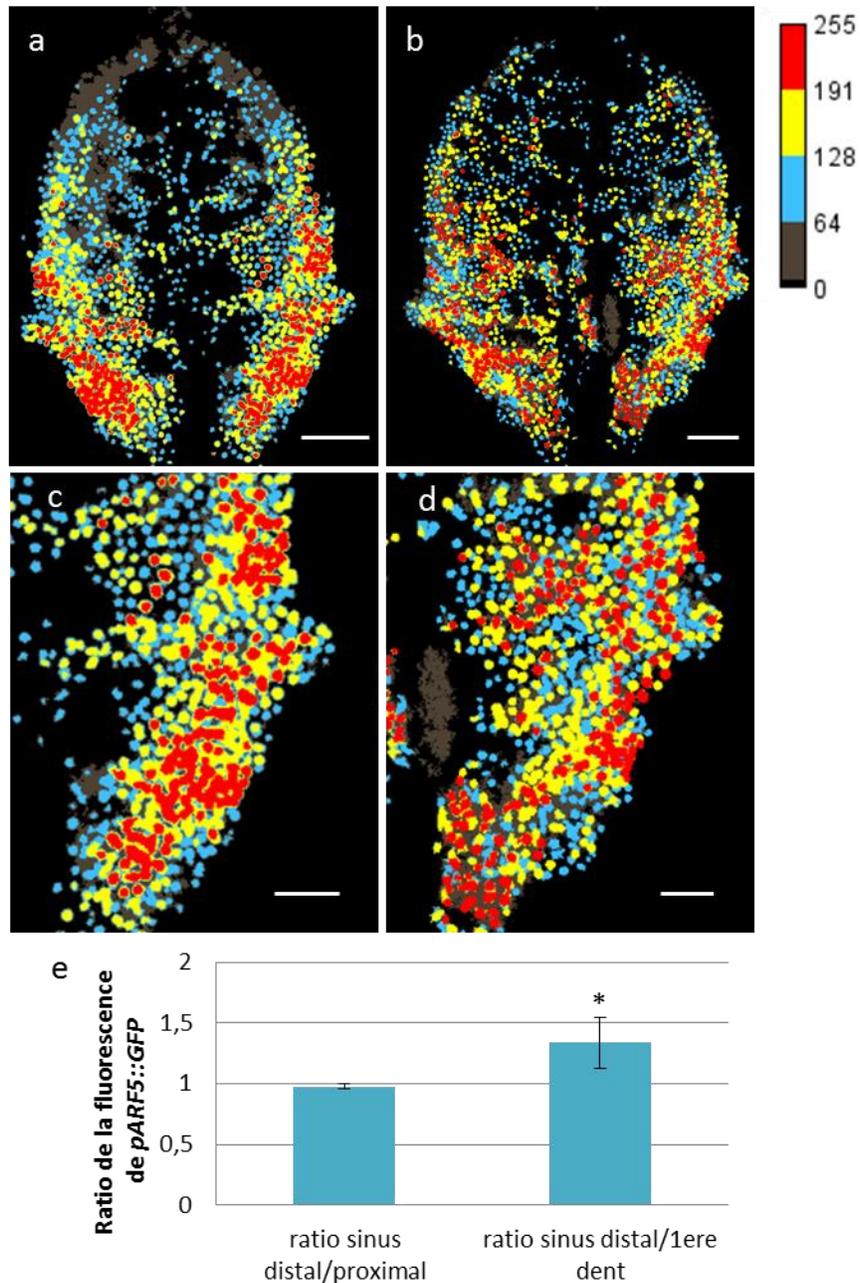


Figure III.B.40. Quantification de la fluorescence de *pARF5::GFP*.

La quantification de la fluorescence met évidence un intensité de la fluorescence de *pARF5* plus forte au niveau des sinus des feuilles à une (a et c) et deux dents (b et d). Les mesures de ratios de la fluorescence entre la dent 1 et ses sinus montrent que la fluorescence des sinus est 1,4 fois plus importante que dans la dent (e). Les barres d'échelles représentent 50 μ m (a-b) et 25 μ m (c-d). Les quantifications de la fluorescence sont représentées en 256 niveaux de gris représenté par l'échelle de calibration. Les images sont des projections maximales. Les barres représentent les écarts types. Les ratios ont été comparés à l'aide d'un test statistique de Mann et Whitney $p=0,05$.

III.B.4.b. Analyse du profil de *ARF5* dans les formes de feuilles modifiées

D'après le modèle proposé par Bilsborough pour la mise en place des dents (Bilsborough et al., 2011), l'auxine réprime *CUC2* pour limiter son expression aux sinus, certainement via un intermédiaire de la signalisation auxinique. Des expériences réalisées dans les ovules ont révélées que *ARF5* pourrait jouer ce rôle car le niveau d'expression de *CUC2* est fortement diminué dans les mutants *arf5-2/mp*^{S319} (Galbiati et al., 2013). Afin de mettre en évidence si une boucle de régulation existe et que *CUC2* affecte aussi le profil de *ARF5*, le profil de *pARF5::GFP* est étudié dans des feuilles présentant des modulations de l'expression de *CUC2*.

Dans une feuille Col-0, le profil d'expression de *pARF5* est retrouvé le long des vaisseaux secondaires ainsi qu'à l'épiderme dans les sinus (Figure III.B.41.e). Dans le mutant *cuc2-3*, le profil d'expression de *ARF5* est également autour de ces vaisseaux. La fluorescence est également présente au bord de la feuille de sa base jusqu'au sinus proximal, ainsi qu'au niveau du sinus distal de l'unique dent formée. La fluorescence est également à la pointe de la dent émergente. Lorsqu'aucune dent n'est formée, la fluorescence est présente sur le bord de la feuille jusqu'à hauteur de la dent formée sur l'autre côté du limbe (Figure III.B.41.a ; III.B.42.a). La quantification de la fluorescence permet de confirmer que la fluorescence est moins intense au bord de la feuille qu'au niveau des vaisseaux (Figure III.B.43.a).

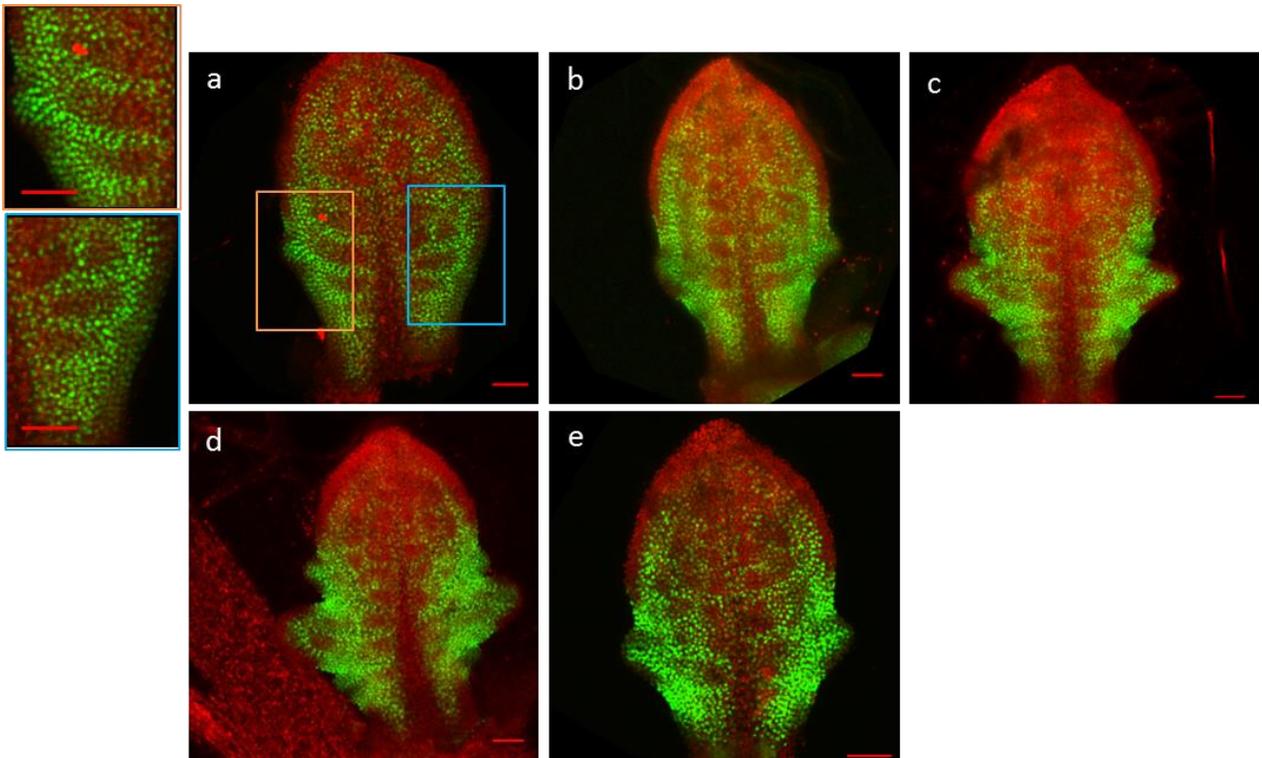


Figure III.B.41. Projection maximale du profil d'expression de *pARF5::GFP* dans les mutants *cuc2-3*, *cuc3-105*, *mir164a-4* et les plantes transgéniques *CUC2g-m4*.

Le profil d'expression de *ARF5* est autour des vaisseaux secondaires et à l'épiderme aux sinus. Les barres d'échelles représentent 50μm. Les profils sont représentés à l'aide de projection maximales. La fluorescence de la GFP est représentée en vert et celle de la chlorophylle en rouge.

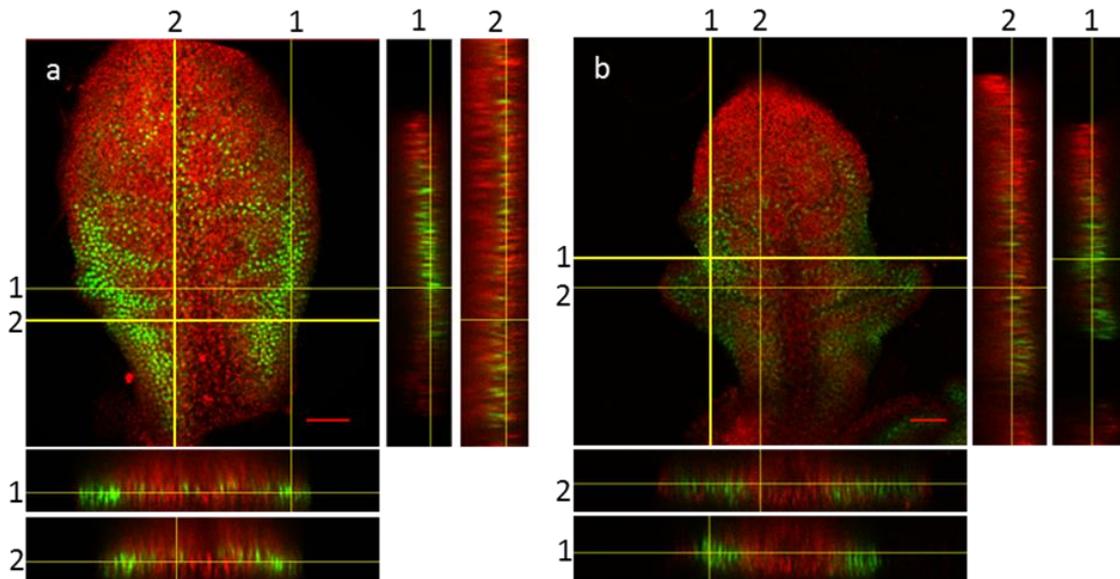


Figure III.B.42. Profil d'expression de *pARF5::GFP* dans l'épaisseur de la feuille dans des feuilles aux formes altérées.

Dans l'épaisseur de la feuille du mutant *cuc2-3* (a), *pARF5* est au niveau des vaisseaux, soit dans le parenchyme de la feuille, ainsi qu'au bord de la feuille au sinus à la dent en cours d'initiation, mais également dans la partie proximale lorsque le côté de présente pas de dent. Dans la plante transgénique *CUC2g-m4* la fluorescence est également retrouvée dans le parenchyme, ainsi qu'au bord de la feuille au niveau des sinus (b). Les barres d'échelles représentent 50μm.

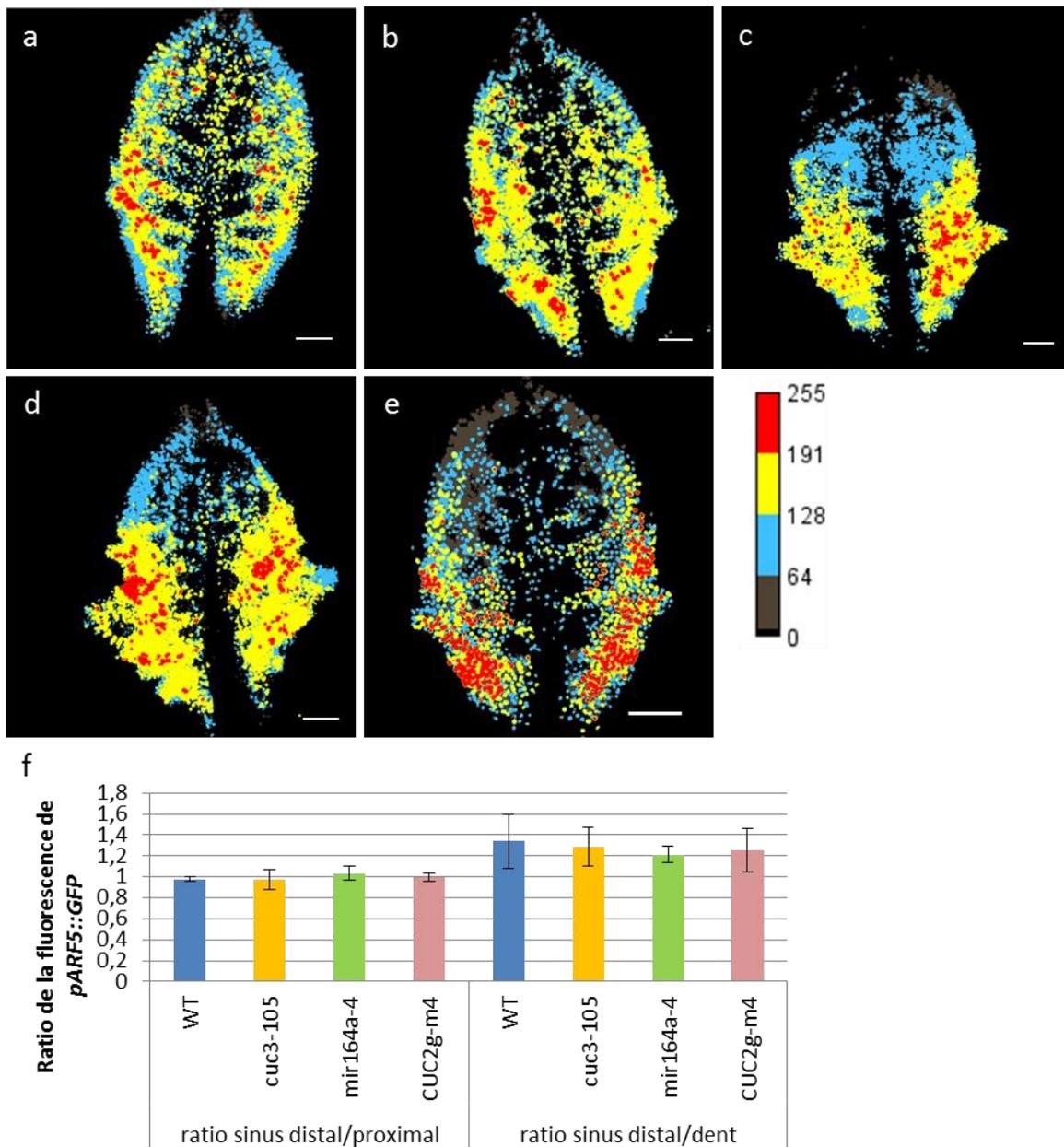


Figure III.B.43. Quantification de la fluorescence de *pARF5::GFP* dans les mutants *cuc2-3*, *cuc3-105*, *mir164a-4* et les plantes transgéniques *CUC2g-m4*.

La fluorescence est quantifiée à l'aide de la macro imageJ (a-d) et les ratios de la fluorescence entre les sinus de la première dent et entre le sinus proximal et la dent sont réalisés (e). Les images sont des projections maximales. Les barres d'échelles représentent 50 μ m. Les barres sur les histogrammes représentent les écarts types. Les ratios de la fluorescence des mutants a été comparés au sauvage à l'aide d'un test de Mann et Whitney.

Dans le mutant *cuc3-105*, le profil d'expression de *ARF5* est semblable à celui de Col-0. En effet, *ARF5* longe les vaisseaux et est également retrouvé à l'épiderme des sinus (Figure III.B.41.b). L'intensité de la fluorescence est constante autour des vaisseaux et comme dans Col-0, la fluorescence est plus importante d'environ 1,4 fois au niveau des sinus que dans la dent (Figure III.B.43.e).

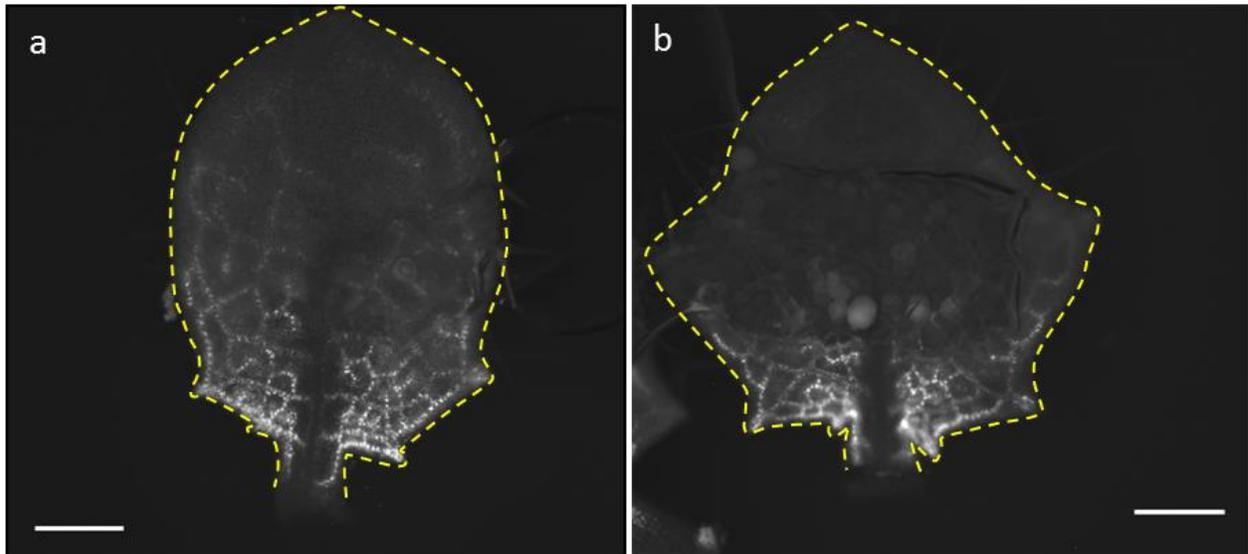


Figure III.B.44. Profil de *pARF5::GFP* dans des plantes sur-exprimant CUC2.

Pour tester si *pARF5* est modifié par CUC2, son profil est observé dans des plantes inductibles au dexaméthosone sur-exprimant CUC2 à l'aide de la construction 35S:CUC2-GR introduite dans un mutant *cuc2-3*. Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope stéréoscopique (Axiozoom) sur des plantes F1. En absence de dexaméthosone, le niveau de CUC2 est basal et le profil d'expression de *ARF5* est identique à celui observé en microscopie confocale dans les Col-0 (a). L'activation de la construction sur-exprimant CUC2 par le dexaméthosone ne modifie pas le profil de *ARF5* (b). La barre d'échelle représente 200µm.

Dans le mutant *mir164a-4* et les plantes CUC2g-m4 le profil de *ARF5* suit aussi les vaisseaux secondaires. Il est également retrouvé sur le bord de la feuille au niveau des sinus dans la partie la plus proximale de la feuille (Figure III.B.41. c et d). La fluorescence est présente dans les très jeunes dents, puis disparaît de leur bord avec la croissance. Les dents secondaires présentes dans ces feuilles répètent le profil observé dans les dents primaires. La répartition des noyaux fluorescents dans l'épaisseur de la feuille est similaire à celle de Col-0 (III.B.42.b). Dans ces feuilles, la densité de noyaux fluorescents apparaît plus importante que dans Col-0 ou les mutants *cuc2-3* et *cuc3-105*. Cela se traduit lors de la quantification de la fluorescence par l'impossibilité de discerner les vaisseaux (Figure III.B.43. c et d). La sur-expression de CUC2 pourrait donc accroître le domaine d'expression de *pARF5*. Néanmoins les ratios de l'intensité de la

fluorescence suivent celui de Col-0, avec une intensité plus faible de 1,3 fois dans les dents que dans les sinus (Figure III.B.43.e).

D'après les observations confocales, le profil d'expression de *pARF5* semble être modulé par *CUC2*.

La construction transcriptionnelle *pARF5::GFP* a également été introgressée par croisement dans des plantes conditionnelles sur-exprimant *CUC2* grâce à une construction *35S::CUC2-GR*. Par manque de temps, les observations ont été réalisées sur des plantes F1, et les feuilles utilisées dans cette expérience ont une taille plus importante que celles des autres observations. En absence de dexaméthasone, la construction n'est pas active, et le profil d'expression de *ARF5* est retrouvé autour des vaisseaux secondaires. Contrairement aux observations réalisées en microscopie confocale dans les jeunes feuilles de plantes homozygotes pour la construction *pARF5::GFP*, le profil d'expression de *ARF5* n'est pas retrouvé dans les sinus (Figure III.B.44.a). L'implication de *ARF5* au sinus pourrait soit être transitoire à un stade précoce d'initiation ou de croissance de la dent soit l'expression dans les sinus est trop faible pour être détectée quand la construction est hétérozygote. En présence de dexaméthasone qui induit la sur-expression de *CUC2* et modifie ainsi la forme des feuilles (Figure III.B.44.b), le profil de *ARF5* reste localisé autour des vaisseaux secondaires et l'intensité de la fluorescence est similaire à celle des plantes sans DEX. Ces observations ne permettent donc pas de conclure quant à une implication de *CUC2* sur l'expression de *ARF5*. Néanmoins, ces résultats sont à temporer comme les observations ne sont réalisées que sur des plantes F1.

III.B.4.c. Analyse de l'implication de *ARF5* dans la formation des dents

Afin de confirmer si *ARF5* est impliqué dans la formation des dents, un allèle faible, *arf5-2*, qui présente un phénotype beaucoup moins altéré, a été utilisé.

III.B.4.c.1. Phénotype de *arf5-2*

Le mutant *arf5-2* présente des tiges de longueurs similaires à celles de Col-0 mais dépourvues d'inflorescences et de siliques (Figure III.B.45.a). Les rosettes de 4 semaines en jours courts présentent une taille semblable à celle de Col-0 bien que les feuilles soient moins nombreuses et épínastiques (Figure III.B.45.b). Les feuilles matures de rosettes de 4 semaines présentent également un nombre de

feuilles réduites comparé à Col-0, et ces feuilles semblent plus fines et plus lisses que celles de Col-0 (Figure III.B.45.c).



Figure III.B.45. Phénotype du mutant *arf5-2*

Le mutant *arf5-2* a des tiges dépourvues d'inflorescences et de siliques (a). Les feuilles de 4 semaines en jours courts sont moins nombreuses que dans Col-0 et sont épinastiques (b). La rosette mature a également un nombre plus réduit de feuilles et les feuilles semblent être plus fines et plus lisses (c). Les barres d'échelles représentent 2cm.

III.B.4.c.2. Implication de *ARF5* dans le maintien de la croissance de la feuille

Les feuilles matures du mutant *arf5-2* ont déjà été mises en évidence comme étant plus lisses que celles de Col-0 (Galbiati et al., 2013).

Afin de confirmer ces observations et pour quantifier les différences rapportées antérieurement, les feuilles 7 de plantules de 4 semaines en jours longs de *arf5-2* et Col-0 ont été analysées à l'aide de

MorphoLeaf.

Le contour moyen de Col-0 et *arf5-2* à ce stade permet de mettre en évidence que la feuille mature de *arf5-2* est plus longue et plus lisse que celle de Col-0 (Figure III.B.47.a). La quantification du limbe permet de confirmer que celui de *arf5-2* (3,5cm) est significativement plus grand que celui de Col-0 (3cm), contrairement à la largeur qui est semblable (Figure III.B.46.b).

Au niveau des dents, la longueur de la dent 1 de *arf5-2* est significativement plus large que celle de Col-0. La dent 2 semble également plus large chez le mutant comparé à Col-0, bien que la différence ne soit pas significative. Les hauteurs des dents ne sont pas différentes entre *arf5-2* et Col-0, tout comme la largeur de la dent 3 (Figure III.B.46.c). Il ne semble pas y avoir de différence notable au stade de l'initiation et de l'émergence des nouvelles dents en revanche la mutation de *ARF5* modifie la croissance globale du limbe, notamment au niveau de la partie distale, où les cellules sont en expansion, entraînant des dents plus larges donnant l'impression d'être émoussées.

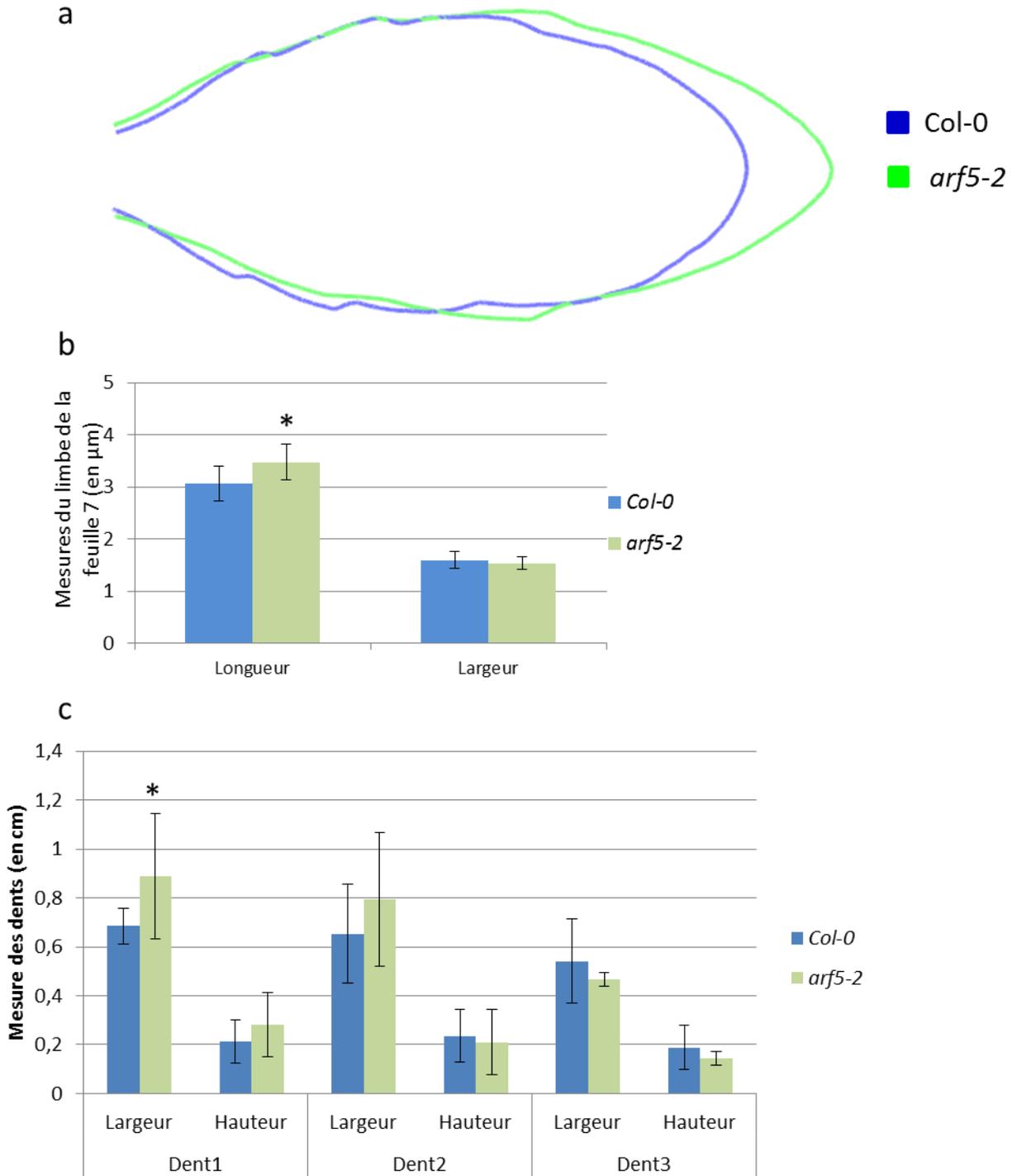


Figure III.B.46. Analyse de la feuille 7 mature du mutant *arf5-2*.

Le contour moyen du limbe de la feuille 7 de *arf5-2* semble plus long et plus lisse que celui de Col-0 (a). Les quantifications révèlent que le limbe est significativement plus long que celui de Col-0 alors que les largeurs de limbes sont similaires (b). Au niveau des dents, la dent 1 de *arf5-2* est plus large de manière significative comparé à Col-0. Les feuilles sont issues de plantules de 4 semaines ayant poussées en jours longs. n = 6 feuilles. Test de Mann-Whitney, p=0.05.

III.B.4.d. Discussion

Le profil d'expression de *pARF5* dans les feuilles de Col-0 a révélé qu'il été localisé au niveau des veines et des sinus. Alors que *pARF5* est toujours localisé aux veines dans le mutant *cuc2-3*, son profil au niveau des sinus est modifié, pour laisser place à un profil continu de long de la marge en absence de dent. A l'inverse, dans les plantes sur-exprimant *CUC2*, l'intensité de la fluorescence de *pARF5* est plus importante. Ces observations suggèrent que *CUC2* pourrait induire l'expression de *ARF5* soit globalement soit spécifiquement au sinus. Dans la dent, le pic d'auxine localisé à la pointe est permis par le transport polarisé de l'auxine via *PIN1*. L'orientation convergente de ces transporteurs pour former la dent est contrôlée par *CUC2*. De plus, il a précédemment été mis en évidence dans la racine embryonnaire que *ARF5* permet d'induire l'expression de *PIN1* (Weijers et al., 2006). Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que *CUC2* pourrait induire l'expression de *ARF5*, qui à son tour permettrait l'expression de *PIN1* pour initier la formation des dents.

L'absence de modification du profil d'expression de *pARF5* aux vaisseaux indique que la modification de la forme des feuilles n'impacte pas le profil des veines. Or, l'initiation des veines a été mise en évidence comme étant concomitante avec l'initiation des dents grâce aux maxima d'auxine (Mattsson et al., 1999; Hay et al., 2006). Ainsi, bien que le maximum d'auxine soit très atténué dans un mutant *cuc2-3*, la quantité d'auxine doit être suffisante à la marge pour que *ARF5* induise l'expression des transporteurs *PIN1* intervenant dans la formation des vaisseaux.

Dans les ovules, *ARF5* semble induire l'expression de *CUC2* puisque son expression est fortement réduite dans le mutant *arf5-2* (Galbiati et al., 2013). Si cela est aussi valable dans la feuille, alors il existerait une boucle de contrôle entre *ARF5* et *CUC2*. Pour vérifier si *ARF5* contrôle l'expression de *CUC2* dans la feuille, le profil d'expression de *CUC2* pourrait être analysé dans un mutant *arf5-2* et des q-PCR pourraient être réalisées pour étudier le niveau d'expression de *CUC2* dans les feuilles de ce mutant.

De plus, le mutant *arf5-2* présente des feuilles matures plus longues que Col-0, indiquant que l'expansion cellulaire pourrait-être plus importante dans ce mutant. Certains mutants comme le mutant *cyd3* qui présentent une expansion cellulaire importante présentent également un défaut de division cellulaire, l'expansion permettant de compenser le faible nombre de divisions (Dewitte et al., 2003; Tsukaya, 2008). Des défauts de divisions ayant déjà été mis en évidence dans l'embryon chez *arf5/mp* (Berleth and Jürgens, 1993), on peut supposer que les feuilles pourraient également présenter des défauts de divisions cellulaires au stade précoce.

ARF5 pourrait induire l'expression de *PIN1* nécessaire à la formation des vaisseaux même en absence de maxima d'auxine localisés, bien que *CUC2* soit nécessaire pour que les dents soient initiées.

Au sinus, une boucle de contrôle pourrait exister entre *ARF5* et *CUC2*, permettant ainsi la formation de la dent.

Les *ARFs* interagissant avec les *AUX/IAA*, on peut imaginer que l'un d'entre eux pourrait contrôler l'activité de *ARF5* dans la feuille pour moduler son expression au moment opportun, notamment *IAA12/BDL* qui a déjà été mis en évidence comme contrôlant l'expression de *ARF5* au cours de l'embryogenèse et dont le mutant présente des feuilles plus dentées en raison d'une augmentation de l'expression de *CUC2* (Weijers et al., 2006; Szemenyei et al., 2008; Bilsborough et al., 2011). Des quantifications par RT-qPCR pourraient être réalisées pour analyser le niveau d'expression de *ARF5* et *CUC2* dans un mutant et/ou un sur-expresser *IAA12/BDL*.

IV. Conclusion

Lors de cette thèse, les profils d'expression des *ARFs* ont pu être mis en évidence dans les jeunes feuilles d'*Arabidopsis* à l'aide des constructions rapportrices *pARF::GFP* (Rademacher et al 2011). Parmi les différents *ARFs* observés, 6 d'entre eux sont exprimés dans la zone dent émergente/sinus et ont donc été sélectionnés pour analyser plus finement leur rôle potentiel dans la feuille. Alors que les trois répresseurs *ARF1*, *ARF3* et *ARF18* présentent des profils assez étendus dans la feuille, les différentes combinaisons de doubles mutants générés avec ces *ARFs* ne présentent pas de phénotypes foliaires différents de Col-0, indiquant ainsi que ces trois *ARFs* ne jouent pas de rôle prépondérant dans l'initiation des dents ou la morphogénèse foliaire en générale. Le couple d'*ARFs* activateurs *ARF6* *ARF8*, respectivement localisés majoritairement aux sinus proximaux des dents émergentes et aux sinus distaux, ne semble pas être impacté par des variations d'expression de *CUC2*. Seules les feuilles matures du double mutant *arf6-2 arf8-3* sont légèrement plus grandes que celle de Col-0, bien que cela ne soit pas statistiquement significatif sur la base des échantillons analysés à ce jour. Alors, si *ARF6* et *ARF8* ont un rôle dans la feuille, cela ne concernerait que les stades assez tardifs, lors de l'élongation cellulaire. Cela devra être vérifié grâce à l'introgession d'un marqueur membranaire dans le double mutant permettant de matérialiser les contours de cellules et de suivre l'évolution et la répartition des réponses cellulaires.

Seule la diminution fonctionnelle d'*ARF5* a révélé un rôle dans la croissance de la feuille, où il pourrait contrôler l'expansion cellulaire. Au sinus, il pourrait être induit par *CUC2* pour permettre la formation d'un maximum d'auxine via *PIN1* qui est nécessaire à l'initiation de la dent, mais également pour la formation des vaisseaux. Néanmoins, il apparait qu'un maximum d'auxine à la marge ne soit pas essentiel pour former les vaisseaux, puisque le mutant *cuc2-3* présente un réseau vasculaire apparemment normal.

Néanmoins, *ARF5* ne semble pas être un acteur majeur dans la mise en place des dents à la marge de la feuille puisque les feuilles les plus impactées du mutant hypomorphe *arf5-2* présente des dents.

Bien que les *ARFs* étudiés ne semblent pas avoir un rôle majeur dans ce processus, il n'est pas exclu qu'ils interviennent de façon combinée. D'autres *ARFs* non détectés à l'aide des constructions rapportrices peuvent intervenir, soit en complément des *ARFs* que j'ai étudié, soit en modulant leur expression par compétition pour se fixer sur les mêmes AuxREs des gènes à activer.

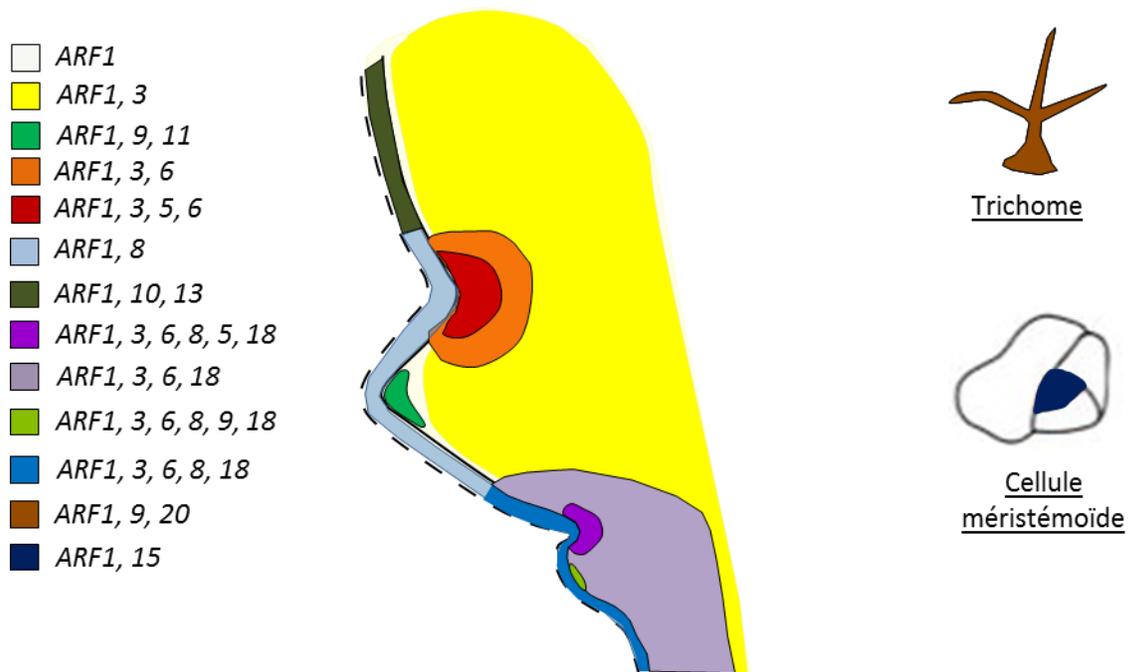


Figure IV. Carte des profils d'expressions des *pARF*.

La carte représente les zones où les *ARFs* sont les plus fortement exprimés. *ARF1* est ubiquitaire. Des combinaisons d'*ARFs* répresseurs et activateurs sont retrouvés dans les sinus et la partie la plus jeune de la feuille où la dent s'initie. Dans la dent en croissance et dans le reste du limbe, les combinaisons regroupent des *ARFs* répresseurs.

De plus, l'observation des différents profils d'expression des *ARFs* dans la zone dent/sinus montre que plusieurs répresseurs et activateurs sont exprimés dans les mêmes zones, notamment aux sinus et dans la partie la plus jeune de la feuille (Figure IV). Comme dans l'embryon (Rademacher et al., 2011) ces différentes combinaisons pourraient définir des réponses cellulaires robustes et distinctes les unes des autres. La génération de quadruples voire quintuples mutants regroupant ces différents *ARFs* répresseurs et activateurs pourraient mettre en évidence des phénotypes remarquables. De manière intéressante, dans la pointe de la dent en croissance, seule l'expression d'*ARFs* répresseurs a été retrouvée, alors que c'est à cet endroit que le rapporteur de réponse auxinique DR5 est visualisé (Bilsborough et al, 2011). Le rôle des *ARFs* pourrait être modulable pour agir en tant qu'activateur ou répresseur en fonction du contexte développemental, comme cela a déjà été retrouvé dans différents transcriptomes (Okushima et al., 2005b; Simonini et al., 2017). Une autre hypothèse serait que ces *ARFs* agissent uniquement comme des activateurs à la pointe, remettant en cause leur qualification de répresseur.

De plus, la régulation de processus développementaux faisant intervenir des couples *ARFs*-AUX/IAA, des

AUX/IAA pourraient également être impliqués dans la formation des dents.

Enfin, ce qu'il se passe au niveau cellulaire lors de la formation des dents est encore très peu étudié. Cela fait actuellement l'objet d'une autre thèse dans l'équipe.

Ainsi, la compréhension mécanistique et cellulaire de l'initiation des dents reste encore à être affinée dans les prochaines années.

V. Matériels et méthodes

V.A. Matériels

Toutes les lignées d'*Arabidopsis thaliana* sont dans l'écotype Columbia (Col-0). Les lignées exprimant chacune l'une des constructions pARFx::GFP ont été décrites précédemment (Rademacher et al., 2011). Le mutant hypomorphe *cuc2-3*, le mutant nul *mir164a-4* et la lignée transgénique CUC2g-m4 qui exprime un gène *CUC2* résistant à *mir164a* ont été décrits antérieurement (Nikovics et al., 2006), tout comme le mutant nul *cuc3-105* (Hibara et al., 2006).

Les mutants nuls *arf1-5* (Ellis et al., 2005), *arf3-1* (Okushima et al., 2005b), *arf6-2* et *arf8-3* (Nagpal et al., 2005), et *arf18-2* (GK-513E07) proviennent du NASC. L'allèle faible *arf5-2/mp⁵³¹⁹* du mutant *arf5* (Cole et al., 2009) nous a été envoyé par D.Weijers. Ces mutants ont été confirmés par génotypage.

Les lignées exprimant les constructions pARFx::GFP ont été introgressées par croisement dans les mutants *cuc2-3*, *cuc3-105*, *mir164a-4* et la lignée transgénique CUC2g-m4. Les plantes ont été sélectionnées en F2 pour leur fluorescence et par génotypage pour sélectionner les homozygotes *cuc2-3*, *cuc3-105*, *mir164a-4* et CUC2g-m4. La fluorescence a été confirmée en F3.

Taille des promoteurs des constructions pARFx::n3GFP (selon Rademacher et al.,2011)

| pARFx::n3GFP | Taille promoteur (en pb) | pARFx::n3GFP | Taille promoteur |
|--------------|-----------------------------|--------------|------------------|
| ARF1 | 2088 | ARF13 | 1802 |
| ARF2 | 2084 | ARF14 | 2017 |
| ARF3 | 2056 | ARF15 | 1744 |
| ARF4 | 2099 | ARF16 | 2045 |
| ARF5 | 2071 | ARF17 | 1795 |
| ARF6 | 2132 | ARF18 | 2265 |
| ARF7 | 2044 | ARF19 | 2063 |
| ARF8 | 2084 | ARF20 | 2004 |
| ARF9 | 2295 | ARF21 | 2006 |
| ARF10 | 2078 | ARF22 | 1711 |
| ARF11 | 2075 | ARF23 | 805 |
| ARF12 | 2012 | | |

Les plantes sont semées en terre et mises en culture en jours longs (16 h de jour à 23°C et 8 h d'obscurité à 15°C) pour sélection et amplification des graines. Les plantes sélectionnées pour leur fluorescence sont semées sur milieu de culture « arabidopsis » (KNO₃ 5mM, KH₂PO₄ 2.5mM, MgSO₄(7 H₂O) 2mM, Ca(NO₃)₂ 2mM, H₃BO₃ 70mM, MnCl₂ (4H₂O) 14mM, CuSO₄ (4H₂O) 0,5mM, Na₂MoO₄ (2H₂O) 1mM, CoCl₂ (6 H₂O) 0,01mM, vitamines selon Morel et Wetmore 1X) durant une semaine (16H, 18°C, 60% d'humidité), avant d'être transférées en terre en jours longs.

Pour les dissections et les observations en microscopie confocale, les plantes sont cultivées en jours courts (8h de lumière : 120µMol/m²/s ; 65% Humidité) durant 4 semaines.

Pour le génotypage des plantes, les extractions d'ADN sont réalisées à partir d'un cotylédon ou un morceau de feuille selon la méthode Fenzi, Hourcade et Leung. Le tampon de lyse Fenzi (200mM Tris-HCl pH7.5, 250mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS) est ajouté aux échantillons broyés dans un microtube et centrifugés 2 minutes à 15800 RCF. Le surnageant est récupéré et ajouté à 300µL d'isopropanol. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante les tubes sont centrifugés 5 minutes à 15800 RCF. Le surnageant est ensuite éliminé. 300µL d'éthanol 100% sont ajoutés au culot et sont centrifugés 5 minutes à 15800 RCF. Après élimination du surnageant, le culot est séché puis et re-suspendu dans 50µL d'H₂O. Les différents mutants *arfs*, *cucs*, *mir164a-4* et les plantes CUC2gm4 ont été génotypés par PCR à l'aide de couples d'oligonucléotides indiqués dans le tableau ci-dessous. L'amplification est réalisée selon les conditions suivantes : 30sec de dénaturation à 95°C, 30sec d'hybridation à 55°C, 1min d'élongation à 72°C (30cycles). Les produits PCR sont ensuite déposés sur gel d'agarose 1% réalisé avec un tampon TAE 1X (Tris, Acétate, EDTA) avant d'être révélés sous UV après 30min de migration.

Oligonucléotides utilisés pour le génotypage :

| Noms Oligos | Séquences (5'->3') | Utilisé pour génotyper |
|-------------|------------------------------|--|
| arf1-5 LP | GTCTGCGGCTTGCTTTTGAC | <i>ARF1</i> allèle wt |
| arf1-5 RP | GTCTAACGATCTCTTGCTTCTGC | <i>ARF1</i> allèle wt et <i>arf1-5</i> mt |
| arf3-1 LP | TGGTTTCTCTGTTCTCGCC | <i>ARF3</i> allèle wt |
| arf3-1 RP | CGCAGTTTGCCATCATCTCC | <i>ARF3</i> allèle wt et <i>arf3-1</i> mt |
| mp-S319 LP | ATGGACTTGAGCAGTCAATGG | <i>ARF5</i> allèle wt |
| mp-S319 RP | CCTTCTTCACTCATCTGCTGG | <i>ARF5</i> allèle wt et <i>arf5-2/mp</i> ^{S319} mt |
| arf6-2 LP | GACGAATCTACTGCAGGAG | <i>ARF6</i> allèle wt |
| arf6-2 RP | CCAAGGGTCATCGCCGAGGAGAAGAACG | <i>ARF6</i> allèle wt et <i>arf6-2</i> mt |
| arf8-3 LP | TGCCACATATCTGGAAATGCA | <i>ARF8</i> allèle wt |
| arf8-3 RP | GAGACTTCACGAACGTACTATACT | <i>ARF8</i> allèle wt et <i>arf8-3</i> mt |

| | | |
|-------------------|--------------------------------|--|
| arf18 LP | TGCAGCAAAGTGAACCAACA | <i>ARF18</i> allèle wt |
| arf18 RP | ATCCCCATTCTCACCCCTGA | <i>ARF18</i> allèle wt et <i>arf18</i> mt |
| cup-1 | GGATCCGGAGGCTAAAGAAGTACCA | <i>cuc2-3</i> allèle mut et <i>CUC2</i> allèle wt |
| cup-4 | ATCCACATTATTACCAGCCCC | <i>CUC2</i> allèle wt |
| cuc3 LP | AGATGTGTTAAGCGAACTCGC | <i>CUC3</i> allèle wt |
| cuc3 RP | CTGTCCTCCCCATACTAAGCC | <i>cuc3-105</i> allèle mt et <i>CUC3</i> allèle wt |
| miR164A-2 | TCAATGCGTTACATATGCTG | <i>miR164a</i> allèle wt |
| miR164A-3 | CCATGCCATAGAGTAGATGC | <i>miR164a</i> allèle wt et mt |
| mir164a LP | CAACCACGTCTTCAAAGCAA | <i>mir164a-4</i> allèle mt |
| 117-5 Col rev | AATTCTTCCGCCATTGTCGTT | <i>CUC2g</i> allèle wt |
| 117-5 Col fwd | GCAATCTACGCCGAGTCAAC | <i>CUC2g</i> allèle wt |
| RLT-Fwd-AT5G53950 | CAGCCGTAGACCAACACAA | <i>CUC2g-m4</i> allèle mt |
| M13-rev | GGAAACAGCTATGACCATGAT | <i>CUC2g-m4</i> allèle mt |
| GABI LB | ATATTGACCATCATACTCATTGC | <i>cuc3-105</i> allèle mt, <i>arf18</i> mt |
| SAIL LB | TCCATAACCAATCTCGATACAC | <i>cuc2-3</i> allèle mt, <i>arf3-1</i> mt |
| LB1-SALK | CAAACCAGCGTGGACCGCTTGCTGCAACTC | <i>arf1-5</i> allèle mt, <i>arf5-2/mp-S319</i> mt |
| JMLB | GGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTG | <i>arf6-2</i> et <i>arf8-3</i> allèles mt |

V.B. Analyse des profils d'expression

V.B.1. Microscopie confocale

Les feuilles sont disséquées à l'aide d'aiguilles sous un stéréo microscope Nikon SMZ 745 et sont imagées avec un microscope confocal Leica TCS SP5. Les échantillons sont excités par un laser argon (10%) à 488nm avec une bande d'émission de 498-545µm pour la GFP et de 640-700µm pour l'auto fluorescence de la chlorophylle. La GFP est détectée à l'aide d'un photomultiplicateur avec un gain de 878. Les feuilles sont imagées dans toute leur épaisseur avec un pas en Z de 0,5µm, à une vitesse de 100 hertz, et avec une résolution de 1024x1024 pixels.

V.C.Traitements d'image

Le traitement des données a nécessité le développement d'un pipeline pour intégrer les données, les quantifier et établir des cartes moyennes. Ce travail est détaillé dans la première partie des résultats.

V.C.1.Répartition des noyaux dans l'épaisseur de la feuille

La répartition des noyaux est étudiée grâce à des coupes en Z de feuilles réalisées à l'aide de la fonction Orthogonal Views d'imageJ (Image → Stacks → Orthogonal Views).

V.C.2.Macro pour quantification de la fluorescence

La quantification de la fluorescence est réalisée sous imageJ et le déroulé de la méthode est enregistré sous forme d'une macro développée par L.Serra.

Les deux canaux de l'acquisition sont dans un premier temps séparés. A partir du canal GFP, les noyaux sont seuillés de manière automatique à l'aide de l'outil Threshold: le 0 correspond au bruit de fond et 255 à la fluorescence. Les noyaux sont dilatés puis correctement segmentés à l'aide de l'outil Watershed. Les noyaux ainsi séparés peuvent être détectés et positionnés à l'aide de l'outil d'analyse de particules qui permet de choisir la gamme de taille des objets circulaires souhaités (size=15-900 pixel ; circularity=0.10-1.00). La fluorescence est ensuite mesurée dans chaque noyau et sur chaque image de l'empilement, puis les intensités sont appréciées à l'aide d'un LUT où le noir représente les intensités de niveaux de gris de 0 à 7 équivalents au bruit de fond, le gris de 8 à 63 niveaux de gris, le bleu de 64 à 127, le jaune de 128 à 191 et le rouge de 192 à 255 niveaux de gris.

V.C.3.Mesure du ratio de la fluorescence dans la feuille

La fluorescence de 10 noyaux est mesurée aux creux des sinus et à la pointe de la dent 1, comme indiqué dans la figure III.A.6 puis ces valeurs sont moyennées et les ratios sont réalisés en comparant la moyenne de la fluorescence des sinus ou la moyenne de la fluorescence du sinus proximal par rapport à celle de la dent. Les ratios permettent une comparaison entre génotypes ou marqueurs tout en s'affranchissant d'éventuellement différences globales de fluorescence (cf paragraphe III.A.2).

V.D. Cartographie moyenne des profils d'expression

La cartographie moyenne des profils d'expression est réalisée à partir de projections maximales des acquisitions. Afin de s'affranchir du décalage développemental entre les deux moitiés du limbe, chaque feuille individuelle est divisée en deux. Chaque demi-feuille est déformée pour correspondre au contour moyen de la feuille du même âge. Le profil d'expression peut ensuite être appliqué à ce contour moyen modifié (cf paragraphe III.A.3).

V.E. Analyse des mutants et des constructions 35S ::CUC2-GRxpARF5 ::GFP

V.E.1. Induction au dexaméthasone

Les graines F1 pCaMv35S ::CUC2-GRxpARF5 ::GFP ont été semées *in vitro* sur milieu « arabidopsis » avec 10µM de DEX ou de l'éthanol 0,1% pour les contrôles. Les premières feuilles sont observées 10 jours après germination en jours long (16H, 18°C, 60% d'humidité).

V.E.2. Imagerie

Les observations des feuilles des ARFs mutés et des constructions pCaMv35S ::CUC2-GRxpARF5 ::GFP ont été réalisées à l'aide d'un microscope stéréoscopique Axio Zoom V16 (Zeiss).

V.E.3. Analyse des contours des feuilles

Les contours de feuilles sont réalisés et quantifiés à l'aide du software MorphoLeaf (Biot et al., 2016) de Free-D (Andrey and Maurin, 2005).

VI. Bibliographie

- Abel S, Ballas N, Wong LM, Theologis A** (1996) DNA elements responsive to auxin. *Bioessays* **18**: 647–654
- Abel S, Nguyen MD, Theologis A** (1995) The PS-IAA4/5-like family of early auxin-inducible mRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *J Mol Biol* **251**: 533–49
- Abel S, Oeller PW, Theologis A** (1994) Early auxin-induced genes encode short-lived nuclear proteins. *Biochemistry* **91**: 326–330
- Abel S, Theologis A** (1996) Early genes and auxin action. *Plant Physiol* **111**: 9–17
- Abley K, Sauret-Güeto S, Marée AFM, Coen E** (2016) Formation of polarity convergences underlying shoot outgrowths. *Elife* **5**: 1–43
- Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M** (1997) Genes Involved in Organ Separation in *Arabidopsis*: An Analysis of the cup-shaped cotyledon Mutant. *Plant Cell Am Soc Plant Physiol* **9**: 841–857
- Aida M, Ishida T, Tasaka M** (1999) Shoot apical meristem and cotyledon formation during *Arabidopsis* embryogenesis: interaction among the CUP-SHAPED COTYLEDON and SHOOT MERISTEMLESS genes. *Development* **126**: 1563–1570
- Aida M, Vernoux T, Furutani M, Traas J, Tasaka M** (2002) Roles of PIN-FORMED1 and MONOPTEROS in pattern formation of the apical region of the *Arabidopsis* embryo. *Development* **129**: 3965–3974
- Allen E, Xie Z, Gustafson AM, Carrington JC** (2005) microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* **121**: 207–221
- Aloni R, Ullrich KS, Langhans M, Ullrich CI** (2003) Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *Planta* **216**: 841–853
- Andrey P, Maurin Y** (2005) Free-D : an integrated environment for three-dimensional reconstruction from serial sections. **145**: 233–244
- Andriankaja M, Dhondt S, DeBodt S, Vanhaeren H, Coppens F, DeMilde L, Mühlenbock P, Skirycz A, Gonzalez N, Beemster GTS, et al** (2012) Exit from Proliferation during Leaf Development in *Arabidopsis thaliana*: A Not-So-Gradual Process. *Dev Cell* **22**: 64–78
- Bainbridge K, Guyomarc’h S, Bayer E, Swarup R, Bennett M, Mandel T, Kuhlemeier C** (2008) Auxin influx carriers stabilize phyllotactic patterning. *Genes Dev* **22**: 810–823
- Bajguz A, Piotrowska A** (2009) Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry* **70**: 957–969
- Baker, Sieber, Wellmer, Meyerowitz EM** (2005) The early extra petals1 Mutant Uncovers a Role for MicroRNA miR164c in Regulating Petal Number in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **15**: 303–315
- Barbez E, Kubeš M, Rolčík J, Béziat C, Pěňčík A, Wang B, Rosquete MR, Zhu J, Dobrev PI, Lee Y, et al** (2012) A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants.

Nature **485**: 119–122

- Bartel B, Bartel DP** (2003) Update on Small RNAs MicroRNAs : At the Root of Plant Development ? Plant Physiol **132**: 709–717
- Beemster GTS, De Veylder L, Vercruyssen S, West G, Rombaut D, Van Hummelen P, Galichet A, Grissem W, Inzé D, Vuylsteke M** (2005) Genome-wide analysis of gene expression profiles associated with cell cycle transitions in growing organs of Arabidopsis. Plant Physiol **138**: 734–743
- Ben-Gera H, Dafna A, Alvarez JP, Bar M, Mauere M, Ori N** (2016) Auxin-mediated lamina growth in tomato leaves is restricted by two parallel mechanisms. Plant J **86**: 443–457
- Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jürgens G, Friml J** (2003) Local, Efflux-Dependent Auxin Gradients as a Common Module for Plant Organ Formation. Cell **115**: 591–602
- Berleth T, Jürgens G** (1993) The role of the *monopteros* gene in organising the basal body region of the Arabidopsis embryos. Development **9**: 299
- Bezhan S, Winter C, Hershman S, Wagner JD, Kennedy JF, Kwon CS, Pfluger J, Su Y, Wagner D** (2007) Unique, shared, and redundant roles for the Arabidopsis SWI/SNF chromatin remodeling ATPases BRAHMA and SPLAYED. Plant Cell **19**: 403–16
- Bhatia N, Bozorg B, Larsson A, Ohno C, Jönsson H, Heisler MG** (2016) Auxin Acts through MONOPTEROS to Regulate Plant Cell Polarity and Pattern Phyllotaxis. Curr Biol **26**: 3202–3208
- Bilsborough GD, Runions A, Barkoulas M, Jenkins HW, Hasson A, Galinha C, Laufs P, Hay A, Prusinkiewicz P, Tsiantis M** (2011) Model for the regulation of Arabidopsis thaliana leaf margin development. Proc Natl Acad Sci U S A **108**: 3424–3429
- Biot E, Cortizo M, Burguet J, Kiss A, Oughou M, Maugarny-Caleš A, Gonçalves B, Adroher B, Andrey P, Boudaoud A, et al** (2016) Multiscale quantification of morphodynamics : MorphoLeaf software for 2D shape analysis. 3417–3428
- Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Lee OR, Mravec J, Titapiwatanakun B, Sauer M, Makam SN, Cheng Y, Bouchard R, Adamec J, et al** (2007) Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in Arabidopsis. Plant Cell **19**: 131–47
- Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K, Scheres B** (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. Nature **433**: 39–44
- Boer DR, Freire-Rios A, Van Den Berg WAM, Saaki T, Manfield IW, Kepinski S, López-Vidriero I, Franco-Zorrilla JM, De Vries SC, Solano R, et al** (2014) Structural basis for DNA binding specificity by the auxin-dependent ARF transcription factors. Cell **156**: 577–589
- Borghi L, Bureau M, Simon R** (2007) Arabidopsis JAGGED LATERAL ORGANS Is Expressed in Boundaries and Coordinates KNOX and PIN Activity. Plant Cell **19**: 1795–1808
- Braidwood L, Breuer C, Sugimoto K** (2014) My body is a cage: Mechanisms and modulation of plant cell growth. New Phytol **201**: 388–402
- Brand A, Shirding N, Shleizer S, Ori N** (2007) Meristem maintenance and compound-leaf patterning

utilize common genetic mechanisms in tomato. *Planta* **226**: 941–951

- Breuil-Broyer S, Morel P, De Almeida-Engler J, Coustham V, Negrutiu I, Trehin C** (2004) High-resolution boundary analysis during *Arabidopsis thaliana* flower development. *Plant J* **38**: 182–192
- Brunoud G, Wells DM, Oliva M, Larrieu A, Mirabet V, Burrow AH, Beeckman T, Kepinski S, Traas J, Bennett MJ, et al** (2012) A novel sensor to map auxin response and distribution at high spatio-temporal resolution. *Nature* **482**: 103–6
- Byrne ME, Barley R, Curtis M, Arroyo JM, Dunham M, Hudson a, Martienssen R a** (2000) Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature* **408**: 967–971
- Calderón Villalobos LIA, Lee S, De Oliveira C, Ivetac A, Brandt W, Armitage L, Sheard LB, Tan X, Parry G, Mao H, et al** (2012) A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nat Chem Biol* **8**: 477–85
- Cambridge A, Morris D** (1996) Transfer of exogenous auxin from the phloem to the polar auxin transport pathway in pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* **199**: 583–588
- Causier B, Ashworth M, Guo W, Davies B** (2012) The TOPLESS Interactome: A Framework for Gene Repression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **158**: 423–438
- Champagne C, Sinha N** (2004) Compound leaves: equal to the sum of their parts? *Development* **131**: 4401–4412
- Cho H, Ryu H, Rho S, Hill K, Smith S, Audenaert D, Park J, Han S, Beeckman T, Bennett MJ, et al** (2014) A secreted peptide acts on BIN2-mediated phosphorylation of ARFs to potentiate auxin response during lateral root development. *Nat Cell Biol* **16**: 66–76
- Clapier CR, Cairns BR** (2009) The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem* **78**: 273–304
- Cole M, Chandler J, Weijers D, Jacobs B, Comelli P, Werr W** (2009) DORN RÖSCHEN is a direct target of the auxin response factor MONOPTEROS in the *Arabidopsis* embryo. **1651**: 1643–1651
- Davies RT, Goetz DH, Lasswell J, Anderson MN, Bartel B** (1999) IAR3 encodes an auxin conjugate hydrolase from *Arabidopsis*. *Plant Cell* **11**: 365–376
- Dewitte W, Riou-Khamlichi C, Scofield S, Healy JMS, Jacquard A, Kilby NJ, Murray JAH** (2003) Altered Cell Cycle Distribution, Hyperplasia, and Inhibited Differentiation in *Arabidopsis* Caused by the D-Type Cyclin CYCD3. *Plant Cell* **15**: 79–92
- Dewitte W, Scofield S, Alcasabas AA, Maughan SC, Menges M, Braun N, Collins C, Nieuwland J, Prinsen E, Sundaresan V, et al** (2007) *Arabidopsis* CYCD3 D-type cyclins link cell proliferation and endocycles and are rate-limiting for cytokinin responses. *Proc Natl Acad Sci* **104**: 14537–14542
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M** (2005a) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. **435**: 441–445
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Weijers D, Lechner E, Yamada M, Hobbie L, Ehrismann JS, Jürgens G, Estelle M** (2005b) Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev Cell* **9**: 109–119

- Dhonukshe P, Aniento F, Hwang I, Robinson DG, Mravec J, Stierhof YD, Friml J** (2007) Clathrin-Mediated Constitutive Endocytosis of PIN Auxin Efflux Carriers in Arabidopsis. *Curr Biol* **17**: 520–527
- Donnelly PM, Bonetta D, Tsukaya H, Dengler RE, Dengler NG** (1999) Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of Arabidopsis. *Dev Biol* **215**: 407–19
- Dreher KA, Brown J, Saw RE, Callis J** (2006) The Arabidopsis Aux / IAA Protein Family Has Diversified in Degradation and Auxin Responsiveness. **18**: 699–714
- Duval M, Hsieh T, Kim S, Thomas T** (2002) Molecular characterization of AtNAM: a member of the Arabidopsis NAC domain superfamily. *Plant Mol Biol* **50**: 237–248
- Eklöf JM, Brumer H** (2010) The XTH gene family: an update on enzyme structure, function, and phylogeny in xyloglucan remodeling. *Plant Physiol* **153**: 456–466
- Ellis CM, Nagpal P, Young JC, Hagen G, Guilfoyle TJ, Reed JW** (2005) AUXIN RESPONSE FACTOR1 and AUXIN RESPONSE FACTOR2 regulate senescence and floral organ abscission in Arabidopsis thaliana. 4563–4574
- Emery JF, Floyd SK, Alvarez J, Eshed Y, Hawker NP, Izhaki A, Baum SF, Bowman JL** (2003) Radial Patterning of Arabidopsis Shoots by Class III HD-ZIP and KANADI Genes. *Curr Biol* **13**: 1768–1774
- Engelhorn J, Reimer JJ, Leuz I, Gobel U, Huettel B, Farrona S, Turck F** (2012) DEVELOPMENT-RELATED PcG TARGET IN THE APEX 4 controls leaf margin architecture in Arabidopsis thaliana. *Development* **139**: 2566–2575
- Eshed Y, Bowman JL, Baum SF** (2002) Establishment of polarity in angiosperm lateral organs. *Trends Genet* **18**: 134–141
- Eshed Y, Izhaki A, Baum SF, Floyd SK, Bowman JL** (2004) Asymmetric leaf development and blade expansion in Arabidopsis are mediated by KANADI and YABBY activities. *Development* **131**: 2997–3006
- Fahlgren N, Montgomery TA, Howell MD, Allen E, Dvorak SK, Alexander AL, Carrington JC** (2006) Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR3 by TAS3 ta-siRNA Affects Developmental Timing and Patterning in Arabidopsis. *Curr Biol* **16**: 939–944
- Feng G, Qin Z, Yan J, Zhang X, Hu Y** (2011) Arabidopsis ORGAN SIZE RELATED1 regulates organ growth and final organ size in orchestration with ARGOS and ARL. *New Phytol* **191**: 635–646
- Ferjani A, Horiguchi G, Yano S, Tsukaya H** (2007) Analysis of leaf development in fugu mutants of Arabidopsis reveals three compensation modes that modulate cell expansion in determinate organs. *Plant Physiol* **144**: 988–99
- Friml J, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwarz H, Hamann T, Offringa R, Jürgens G** (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature* **426**: 147–153
- Fu Y, Xu L, Xu B, Yang L, Ling Q, Wang H, Huang H** (2007) Genetic interactions between leaf polarity-controlling genes and ASYMMETRIC LEAVES1 and 2 in Arabidopsis leaf patterning. *Plant Cell Physiol* **48**: 724–735
- Furutani M, Vernoux T, Traas J, Kato T, Tasaka M, Aida M** (2004) PIN-FORMED1 and PINOID regulate

boundary formation and cotyledon development in Arabidopsis embryogenesis. *Development* **131**: 5021–30

Gagne JM, Downes BP, Shiu S, Durski AM, Vierstra RD (2002) The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci* **99**: 11519–11524

Galbiati F, Sinha Roy D, Simonini S, Cucinotta M, Ceccato L, Cuesta C, Simaskova M, Benkova E, Kamiuchi Y, Aida M, et al (2013) An integrative model of the control of ovule primordia formation. *Plant J* **76**: 446–455

Gälweiler L, Guan C, Müller A, Wisman E, Mendgen K, Yephremov A, Palme K (1998) Regulation of Polar Auxin Transport by AtPIN1 in Arabidopsis Vascular Tissue. *Science* (80-) **282**: 2226–2230

Garcia D, Collier SA, Byrne ME, Martienssen RA (2006) Specification of Leaf Polarity in Arabidopsis via the trans-Acting siRNA Pathway. *Curr Biol* **16**: 933–938

Geisler M, Blakeslee JJ, Bouchard R, Lee OR, Vincenzetti V, Bandyopadhyay A, Titapiwatanakun B, Peer WA, Bailly A, Richards EL, et al (2005) Cellular efflux of auxin catalyzed by the Arabidopsis MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant J* **44**: 179–194

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

Guilfoyle TJ, Hagen G (2007) Auxin response factors. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 443–460

Guo M, Thomas J, Collins G, Timmermans MCP (2008) Direct repression of KNOX loci by the ASYMMETRIC LEAVES1 complex of Arabidopsis. *Plant Cell* **20**: 48–58

Gupta S, Shi X, Lindquist IE, Devitt N, Mudge J, Rashotte AM (2013) Transcriptome profiling of cytokinin and auxin regulation in tomato root. *J Exp Bot* **64**: 695–704

Hagemann W, Gleissberg S (1996) Organogenetic capacity of leaves: The significance of marginal blastozones in angiosperms. *Plant Syst Evol* **199**: 121–152

Hagen G, Guilfoyle TJ (2002) Auxin responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Mol Biol* **49**: 373–385

Hardtke CS, Berleth T (1998) The *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J* **17**: 1405–1411

Hasson A, Plessis A, Blein T, Adroher B, Grigg S, Tsiantis M, Boudaoud A, Damerval C, Laufs P (2011) Evolution and diverse roles of the CUP-SHAPED COTYLEDON genes in Arabidopsis leaf development. *Plant Cell* **23**: 54–68

Hay A, Barkoulas M, Tsiantis M (2006) ASYMMETRIC LEAVES1 and auxin activities converge to repress BREVIPEDICELLUS expression and promote leaf development in Arabidopsis. *Development* **133**: 3955–3961

Heisler MG, Ohno C, Das P, Sieber P, Reddy G V., Long JA, Meyerowitz EM (2005) Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the Arabidopsis inflorescence meristem. *Curr Biol* **15**: 1899–1911

- Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A** (1983) Components of Ubiquitin-Protein Ligase System. *J Biol Chem* **258**: 8206–8214
- Hershko and Ciechanover** (1998) The ubiquitin system. *Trends Biochem Sci* **22**: 383–387
- Hibara K, Karim MR, Takada S, Taoka K, Furutani M, Aida M, Tasaka M** (2006) Arabidopsis CUP-SHAPED COTYLEDON3 regulates postembryonic shoot meristem and organ boundary formation. *Plant Cell* **18**: 2946–2957
- Horiguchi G, Kim GT, Tsukaya H** (2005) The transcription factor AtGRF5 and the transcription coactivator AN3 regulate cell proliferation in leaf primordia of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **43**: 68–78
- Hu Y, Poh HM, Chua NH** (2006) The Arabidopsis ARGOS-LIKE gene regulates cell expansion during organ growth. *Plant J* **47**: 1–9
- Hu, Xie, Chua** (2003) The Arabidopsis Auxin-Inducible Gene. **15**: 1951–1961
- Hunter C, Willmann MR, Wu G, Yoshikawa M, de la Luz Gutiérrez-Nava M, Poethig SR** (2006) Trans-acting siRNA-mediated repression of ETTIN and ARF4 regulates heteroblasty in Arabidopsis. *Development* **133**: 2973–81
- Ishibashi N, Kanamaru K, Ueno Y, Kojima S, Kobayashi T, Machida C, Machida Y** (2012) ASYMMETRIC-LEAVES2 and an ortholog of eukaryotic NudC domain proteins repress expression of AUXIN-RESPONSE-FACTOR and class 1 KNOX homeobox genes for development of flat symmetric leaves in Arabidopsis. *Biol Open* **1**: 197–207
- Jackson RG, Lim EK, Li Y, Kowalczyk M, Sandberg G, Hogget J, Ashford DA, Bowles DJ** (2001) Identification and Biochemical Characterization of an Arabidopsis Indole-3-acetic Acid Glucosyltransferase. *J Biol Chem* **276**: 4350–4356
- Jones-rhoades MW, Bartel DP** (2004) Computational Identification of Plant MicroRNAs and Their Targets , Including a Stress-Induced miRNA. **14**: 787–799
- Jones AR, Kramer EM, Knox K, Swarup R, Malcolm J, Lazarus CM, Leyser HMO, Grierson CS** (2009) UKPMC Funders Group development. *Plant Cell* **11**: 78–84
- Kai K, Horita J, Wakasa K, Miyagawa H** (2007) Three oxidative metabolites of indole-3-acetic acid from Arabidopsis thaliana. *Phytochemistry* **68**: 1651–1663
- Kang J, Park J, Choi H, Burla B, Kretschmar T, Lee Y, Martinoia E** (2011) Plant ABC Transporters. *Arabidopsis Book* **9**: 1–25
- Kasprzewska A, Carter R, Swarup R, Bennett M, Monk N, Hobbs JK, Fleming A** (2015) Auxin influx importers modulate serration along the leaf margin. *Plant J* **83**: 705–718
- Kawamura E, Horiguchi G, Tsukaya H** (2010) Mechanisms of leaf tooth formation in Arabidopsis. *Plant J* **62**: 429–441
- Kelley DR, Arreola A, Gallagher TL, Gasser CS** (2012) ETTIN (ARF3) physically interacts with KANADI proteins to form a functional complex essential for integument development and polarity determination in Arabidopsis. *Development* **139**: 1105–1109

- Kepinski S, Leyser O** (2005) The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. **435**: 1–6
- Kerstetter RA, Bollman K, Taylor RA, Bomblies K, Poethig RS** (2001) KANADI regulates organ polarity in Arabidopsis. *Nature* **411**: 706–709
- Kidner C a, Martienssen R a** (2004) Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1. *Nature* **428**: 81–84
- Kim J, Harter K, Theologis A** (1997) Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 11786–91
- Kim JH, Kende H** (2004) A transcriptional coactivator, AtGIF1, is involved in regulating leaf growth and morphology in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 13374–13379
- Koenig D, Bayer E, Kang J, Kuhlemeier C, Sinha N** (2009) Auxin patterns *Solanum lycopersicum* leaf morphogenesis. *Development* **136**: 2997–3006
- Korasick DA, Westfall CS, Lee SG, Nanao MH, Dumas R, Hagen G, Guilfoyle TJ, Jez JM, Strader LC** (2014) Molecular basis for AUXIN RESPONSE FACTOR protein interaction and the control of auxin response repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 5427–32
- Kubeš M, Yang H, Richter GL, Cheng Y, Młodzińska E, Wang X, Blakeslee JJ, Carraro N, Petrášek J, Zažímalová E, et al** (2012) The Arabidopsis concentration-dependent influx/efflux transporter ABCB4 regulates cellular auxin levels in the root epidermis. *Plant J* **69**: 640–654
- Laufs P, Peaucelle A, Morin H, Traas J** (2004) MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in Arabidopsis meristems. *Development* **131**: 4311–4322
- Lee BH, Ko J-H, Lee S, Lee Y, Pak J, Kim JH** (2009a) The Arabidopsis GRF-INTERACTING FACTOR gene family performs an overlapping function in determining organ size as well as multiple developmental properties. *Plant Physiol* **151**: 655–68
- Lee D-K, Geisler M, Springer PS** (2009b) LATERAL ORGAN FUSION1 and LATERAL ORGAN FUSION2 function in lateral organ separation and axillary meristem formation in Arabidopsis. *Development* **136**: 2423–2432
- Li H, Johnson P, Stepanova A, Alonso JM, Ecker JR** (2004) Convergence of Signaling Pathways in the Control of Differential Cell Growth in Arabidopsis. **7**: 193–204
- Li H, Xu L, Wang H, Yuan Z, Cao X, Yang Z, Zhang D, Xu Y, Huang H** (2005) The Putative RNA-dependent RNA polymerase RDR6 acts synergistically with ASYMMETRIC LEAVES1 and 2 to repress BREVIPEDICELLUS and MicroRNA165/166 in Arabidopsis leaf development. *Plant Cell* **17**: 2157–2171
- Lin W, Shuai B, Springer PS** (2003) The Arabidopsis LATERAL ORGAN BOUNDARIES –Domain Gene ASYMMETRIC LEAVES2 Functions in the Repression of KNOX Gene Expression and in Adaxial-Abaxial Patterning. *Society* **15**: 2241–2252
- Lincoln C, Long J, Yamaguchi J, Serikawa K, Hake S** (1994) A knotted1-like homeobox gene in Arabidopsis is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *Plant Cell* **6**: 1859–76

- Liu D, Song Y, Chen Z, Yu D** (2009) Ectopic expression of miR396 suppresses GRF target gene expression and alters leaf growth in Arabidopsis. *Physiol Plant* **136**: 223–236
- Liu PP, Montgomery TA, Fahlgren N, Kasschau KD, Nonogaki H, Carrington JC** (2007) Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages. *Plant J* **52**: 133–146
- Liu X, Huang J, Wang Y, Khanna K, Xie Z, Owen HA, Zhao D** (2010) The role of floral organs in carpels, an Arabidopsis loss-of-function mutation in MicroRNA160a, in organogenesis and the mechanism regulating its expression. *Plant J* **62**: 416–428
- Ljung K** (2013) Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* **140**: 943–950
- Ljung K, Bhalerao RP, Sandberg G** (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth. *Plant J* **28**: 465–474
- Ljung K, Hull AK, Celenza J, Yamada M, Estelle M, Normanly J, Sandberg G** (2005) Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots. *Plant Cell* **17**: 1090–104
- Lodha M, Marco CF, Timmermans MCP** (2013) The ASYMMETRIC LEAVES complex maintains repression of KNOX homeobox genes via direct recruitment of Polycomb-repressive complex2. *Genes Dev* **27**: 596–601
- Long JA, Ohno C, Smith ZR, Meyerowitz EM** (2006) TOPLESS regulates apical embryonic fate in Arabidopsis. *Science* **312**: 1520–3
- Ludwig-Müller J** (2011) Auxin conjugates: Their role for plant development and in the evolution of land plants. *J Exp Bot* **62**: 1757–1773
- Luschnig C, Gaxiola RA, Grisafi P, Fink GR** (1998) EIR1, a root specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in Arabidopsis thaliana. *Genes Dev* **12**: 2175–2187
- Maeda H, Dudareva N** (2012) The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annu Rev Plant Biol* **63**: 73–105
- Mallory AC, Bartel DP, Bartel B** (2005) MicroRNA-Directed Regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 Is Essential for Proper Development and Modulates Expression of Early Auxin Response Genes. *Development* **17**: 1–16
- Mallory AC, Dugas D V, Bartel DP, Bartel B** (2004) MicroRNA Regulation of NAC-Domain Targets Is Required for Proper Formation and Separation of Adjacent Embryonic, Vegetative, and Floral Organs Allison. *Curr Biol* **14**: 1035–1046
- Marin E, Jouannet V, Herz A, Lokerse AS, Weijers D, Vaucheret H, Nussaume L, Crespi MD, Maizel A** (2010) miR390, Arabidopsis TAS3 tasiRNAs, and Their AUXIN RESPONSE FACTOR Targets Define an Autoregulatory Network Quantitatively Regulating Lateral Root Growth. *Plant Cell* **22**: 1104–1117
- Martín-Trillo M, Cubas P** (2010) TCP genes: a family snapshot ten years later. *Trends Plant Sci* **15**: 31–39
- Mashiguchi K, Tanaka K, Sakai T, Sugawara S, Kawaide H, Natsume M, Hanada A, Yaeno T, Shirasu K, Yao H, et al** (2011) The main auxin biosynthesis pathway in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci* **108**:

18512–18517

- Mattsson J, Sung ZR, Berleth T** (1999) Responses of plant vascular systems to auxin transport inhibition. *Development* **126**: 2979–91
- McConnell JR, Emery J, Eshed Y, Bao N, Bowman J, Barton MK** (2001) Role of PHABULOSA and PHAVOLUTA in determining radial patterning in shoots. *Nature* **411**: 709–713
- Michael TP, Breton G, Hazen SP, Priest H, Mockler TC, Kay SA, Chory J** (2008) A Morning-Specific Phytohormone Gene Expression Program underlying Rhythmic Plant Growth. *PLoS Biol* **6**: 1887–1898
- Michniewicz M, Zago MK, Abas L, Weijers D, Schweighofer A, Meskiene I, Heisler MG, Ohno C, Zhang J, Huang F, et al** (2007) Antagonistic Regulation of PIN Phosphorylation by PP2A and PINOID Directs Auxin Flux. *Cell* **130**: 1044–1056
- Mizukami Y, Fischer RL** (2000) Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 942–947
- Mockaitis, K, Estelle M** (2008) Auxin receptors and plant development: A new signaling paradigm. *Annu Rev Cell Dev Biol* **24**: 55–80
- Moon J, Hake S** (2011) How a leaf gets its shape. *Curr Opin Plant Biol* **14**: 24–30
- Mravec J, Kubes M, Bielach A, Gaykova V, Petrasek J, Skupa P, Chand S, Benkova E, Zazimalova E, Friml J** (2008) Interaction of PIN and PGP transport mechanisms in auxin distribution-dependent development. *Development* **135**: 3345–3354
- Mravec J, Skúpa P, Bailly A, Hoyerová K, Krecek P, Bielach A, Petrášek J, Zhang J, Gaykova V, Stierhof Y-D, et al** (2009) Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature* **459**: 1136–1140
- Müller A, Guan C, Gälweiler L, Tänzler P, Huijser P, Marchant A, Parry G, Bennett MJ, Wisman E, Palme K** (1998) AtPIN2 defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control. *EMBO J* **17**: 6903–6911
- Nagpal P, Ellis CM, Weber H, Ploense SE, Barkawi LS, Guilfoyle TJ, Hagen G, Alonso JM, Cohen JD, Farmer EE, et al** (2005) Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* **132**: 4107–4118
- Nanao MH, Vinos-Poyo T, Brunoud G, Thévenon E, Mazzoleni M, Mast D, Lainé S, Wang S, Hagen G, Li H, et al** (2014) Structural basis for oligomerization of auxin transcriptional regulators. *Nat Commun* **5**: 3617
- Nath U, Nath U, Crawford BCW, Carpenter R, Coen E** (2003) Genetic Control of Surface Curvature. **1404**: 1404–1408
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones J** (2006) A Plant miRNA Contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* (80-) **312**: 436–439
- Niinemets Ü, Portsmouth A, Tobias M** (2007) Leaf shape and venation pattern alter the support investments within leaf lamina in temperate species: A neglected source of leaf physiological differentiation? *Funct Ecol* **21**: 28–40

- Nikovics K, Blein T, Peaucelle A, Ishida T, Morin H, Aida M, Laufs P** (2006) The balance between the MIR164A and CUC2 genes controls leaf margin serration in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**: 2929–2945
- Noh B, Bandyopadhyay A, Peer WA, Spalding EP, Murphy AS** (2003) Enhanced gravi- and phototropism in Arabidopsis by mislocalizing the auxin efflux protein PIN1. *Nature* **423**: 999–1002
- Noh B, Murphy AS, Spalding EP** (2001) Multidrug Resistance. *Society* **13**: 2441–2454
- Novák O, Hényková E, Sairanen I, Kowalczyk M, Pospíšil T, Ljung K** (2012) Tissue-specific profiling of the Arabidopsis thaliana auxin metabolome. *Plant J* **72**: 523–536
- Oh E, Zhu J, Bai M, Arenhart RA, Sun Y, Wang Z** (2014) Cell elongation is regulated through a central circuit of interacting transcription factors in the Arabidopsis hypocotyl. 1–19
- Okada K, Ueda J, Komaki MK, Bell CJ, Shimura Y** (1991) Requirement of the Auxin Polar Transport System in Early Stages of Arabidopsis Floral Bud Formation. *Plant Cell* **3**: 677–684
- Okushima Y, Mitina I, Quach HL, Theologis A, Gene P, Street B** (2005a) AUXIN RESPONSE FACTOR 2 (ARF2): a pleiotropic developmental regulator. *Plant Cell* **17**: 29–46
- Okushima Y, Overvoorde PJ, Arima K, Alonso JM, Chan A, Chang C, Ecker JR, Hughes B, Lui A, Nguyen D, et al** (2005b) Functional Genomic Analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR Gene Family Members in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **17**: 444–463
- Ooka H, Satoh K, Doi K, Nagata T, Otomo Y, Murakami K, Matsubara K, Osato N, Kawai J, Carninci P, et al** (2003) Comprehensive analysis of NAC family genes in Oryza sativa and Arabidopsis thaliana. *Genome Res* **13**: 239–247
- Ori N, Eshed Y, Chuck G, Bowman JL, Hake S** (2000) Mechanisms that control knox gene expression in the Arabidopsis shoot. *Development* **127**: 5523–5532
- Ostin A, Kowalczyk M, Bhalerao RP, Sandberg G** (1998) Metabolism of indole-3-acetic acid in Arabidopsis. *Plant Physiol* **118**: 285–296
- Ouellet F, Overvoorde PJ, Theologis A** (2001) IAA17/AXR3: biochemical insight into an auxin mutant phenotype. *Plant Cell* **13**: 829–41
- Oughou M, Boudin M, Biot E, Laufs P, Burguet J** (2017) A strategy for the 2D mapping of gene expression domains for the analysis of organ morphogenesis. 1–10 (In submission)
- Ouyang J, Shao X, Li J** (2000) Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **24**: 327–333
- Overvoorde P, Okushima Y, Alonso JM, Chan A, Chang C, Ecker JR, Hughes B, Liu A, Onodera C, Quach H, et al** (2005) Functional Genomic Analysis of the AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID Gene Family Members in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **17**: 3282–3300
- Page R** (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* **12**: 357–358
- Palatnik JF, Allen E, Wu X, Schommer C, Schwab R, Carrington JC, Weigel D** (2003) Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* **425**: 257–263

- Paponov IA, Paponov M, Teale W, Menges M, Chakrabortee S, Murray JAH, Palme K** (2008) Comprehensive transcriptome analysis of auxin responses in Arabidopsis. *Mol Plant* **1**: 321–337
- Parry G, Calderon-Villalobos LI, Prigge M, Peret B, Dharmasiri S, Itoh H, Lechner E, Gray WM, Bennett M, Estelle M** (2009) Complex regulation of the TIR1/AFB family of auxin receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 22540–5
- Parry G, Marchant A, May S, Swarup R, Swarup K, James N, Graham N, Allen T, Martucci T, Yemm A, et al** (2001) Quick on the uptake: Characterization of a family of plant auxin influx carriers. *J Plant Growth Regul* **20**: 217–225
- Peaucelle A, Morin H, Traas J, Laufs P** (2007) Plants expressing a miR164-resistant CUC2 gene reveal the importance of post-meristematic maintenance of phyllotaxy in Arabidopsis. *Development* **134**: 1045–1050
- Pekker I, Alvarez JP, Eshed Y** (2005) Auxin Response Factors Mediate Arabidopsis Organ Asymmetry via Modulation of KANADI Activity. *17*: 2899–2910
- Petrasek J, Friml J** (2009) Auxin transport routes in plant development. *Development* **136**: 2675–2688
- Petrasek J, Jozef Mravec, Bouchard R, Blakeslee JJ, Abas M, Seifertova D, Wisniewska J, Tadele Z, Kubes M, Covanova M, et al** (2006) PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science* (80-) **312**: 914–917
- Philippar K, Fuchs I, Luthen H, Hoth S, Bauer CS, Haga K, Thiel G, Ljung K, Sandberg G, Bottger M, et al** (1999) Auxin-induced K⁺ channel expression represents an essential step in coleoptile growth and gravitropism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 12186–91
- Piya S, Shrestha SK, Binder B, Stewart CN, Hewezi T** (2014) Protein-protein interaction and gene co-expression maps of ARFs and Aux/IAAs in Arabidopsis. *Front Plant Sci* **5**: 744
- Pollmann S, Neu D, Lehmann T, Berkowitz O, Schäfer T, Weiler EW** (2006) Subcellular localization and tissue specific expression of amidase 1 from Arabidopsis thaliana. *Planta* **224**: 1241–1253
- Del Pozo JC, Diaz-Trivino S, Cisneros N, Gutierrez C** (2006) The Balance between Cell Division and Endoreplication Depends on E2FC-DPB, Transcription Factors Regulated by the Ubiquitin-SCFSKP2A Pathway in Arabidopsis. *Plant Cell Online* **18**: 2224–2235
- Rademacher EH, Lokerse AS, Schlereth A, Llavata-Peris CI, Bayer M, Kientz M, FreireRios A, Borst JW, Lukowitz W, Jürgens G, et al** (2012) Different Auxin Response Machineries Control Distinct Cell Fates in the Early Plant Embryo. *Dev Cell* **22**: 211–222
- Rademacher EH, Möller B, Lokerse AS, Llavata-Peris CI, Van Den Berg W, Weijers D** (2011) A cellular expression map of the Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR gene family. *Plant J* **68**: 597–606
- Ramos JA, Zenser N, Leyser O, Callis J** (2001) Rapid Degradation of Auxin / Indoleacetic Acid Proteins Requires Conserved Amino Acids of Domain II and Is Proteasome Dependent. **13**: 2349–2360
- Rayle DL, Cleland RE** (1992) The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol* **99**: 1271–1274
- Reddy GV, Heisler MG, Ehrhardt DW, Meyerowitz EM** (2004) Real-time lineage analysis reveals oriented

cell divisions associated with morphogenesis at the shoot apex of *Arabidopsis thaliana*.
Development **131**: 4225–37

Reeves PH, Ellis CM, Ploense SE, Wu MF, Yadav V, Tholl D, Chételat A, Haupt I, Kennerley BJ, Hodgens C, et al (2012) A regulatory network for coordinated flower maturation. *PLoS Genet* **8**: 1–17

Reinhardt D, Mandel T, Kuhlemeier C (2000) Auxin regulated the initiation and radial position of plants lateral organs. *Plant Cell* **12**: 507–518

Reinhardt D, Pesce E-R, Stieger P, Mandel T, Baltensperger K, Bennett M, Traas J, Friml J, Kuhlemeier C (2003) Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* **426**: 255–260

Remington DL, Vision TJ, Guilfoyle TJ, Reed JW (2004) Contrasting Modes of Diversification in the Aux / IAA and ARF Gene Families 1 [w]. *Plant Physiol* **135**: 1738–1752

Ren H, Gray WM (2015) SAUR Proteins as Effectors of Hormonal and Environmental Signals in Plant Growth. *Mol Plant* **510**: 84–91

Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP (2002) Prediction of plant microRNA targets. *Cell* **110**: 513–520

Robert HS, Friml J (2009) Auxin and other signals on the move in plants. *Nat Chem Biol* **5**: 325–332

Robert HS, Grunewald W, Sauer M, Cannoot B, Soriano M, Swarup R, Weijers D, Bennett M, Boutilier K, Friml J (2015) Plant embryogenesis requires AUX/LAX-mediated auxin influx. *Development* **702–711**

Rodriguez RE, Debernardi JM, Palatnik JF (2014) Morphogenesis of simple leaves: Regulation of leaf size and shape. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **3**: 41–57

Rodriguez RE, Mecchia M a, Debernardi JM, Schommer C, Weigel D, Palatnik JF (2010) Control of cell proliferation in *Arabidopsis thaliana* by microRNA miR396. *Development* **137**: 103–112

Ruegger M, Dewey E, Gray WM, Hobbie L, Turner J, Estelle M (1998) The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. **198–207**

Ruegger M, Dewey E, Hobbie L, Brown D, Bernasconi P, Turner J, Muday G, Estelle M (1997) Reduced naphthylphthalamic acid binding in the tir3 mutant of *Arabidopsis* is associated with a reduction in polar auxin transport and diverse morphological defects. *Plant Cell* **9**: 745–57

Sampedro J, Cosgrove DJ (2005) The expansin superfamily. *Genome Biol* **6**: 242

Scacchi E, Salinas P, Gujas B, Santuari L, Krogan N, Ragni L, Berleth T, Hardtke CS (2010) Spatio-temporal sequence of cross-regulatory events in root meristem growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 22734–22739

Scarpella E, Marcos D, Friml J, Berleth T, Scarpella E, Marcos D, Berleth T (2006) Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport. **1015–1027**

Schlereth A, Möller B, Liu W, Kientz M, Flipse J, Rademacher EH, Schmid M, Jürgens G, Weijers D (2010) MONOPTEROS controls embryonic root initiation by regulating a mobile transcription factor.

Nature **464**: 913–6

Schruff MC, Spielman M, Tiwari S, Adams S, Fenby N, Scott RJ (2005) The AUXIN RESPONSE FACTOR 2 gene of Arabidopsis links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. *Plant Cell* **17**: 251–261

Schuetz M, Berleth T, Mattsson J (2008) Multiple MONOPTEROS-dependent pathways are involved in leaf initiation. *Plant Physiol* **148**: 870–880

Sessions RA, Zambryski PC (1995) Arabidopsis gynoecium structure in the wild type and in ettin mutants. *Plant Cell* **7**: 1519–1532

Shin R, Burch AY, Huppert KA, Tiwari SB, Murphy AS, Guilfoyle TJ, Schachtman DP (2007) The Arabidopsis transcription factor MYB77 modulates auxin signal transduction. *Plant Cell* **19**: 2440–53

Shuai B, Reynaga-pen CG, Springer PS (2002) Lateral organ boundaries. *Plant Cell* **14**: 747–761

Simon S, Petrášek J (2011) Why plants need more than one type of auxin. *Plant Sci* **180**: 454–460

Simonini S, Bencivenga S, Trick M, Ostergaard L (2017) Auxin-Induced Modulation of ETTIN Activity Orchestrates Gene Expression in Arabidopsis. *Plant Cell* **29**: tpc.00389.2017

Simonini S, Deb J, Moubayidin L, Stephenson P, Valluru M, Freire-Rios A, Sorefan K, Weijers D, Friml J, Østergaard L (2016) A noncanonical auxin-sensing mechanism is required for organ morphogenesis in Arabidopsis. *Genes Dev* **30**: 2286–2296

Sinha NR, Williams RE, Hake S (1993) Overexpression of the maize homeo box gene, KNOTTED-1, causes a switch from determinate to indeterminate cell fates. *Genes Dev* **7**: 787–795

Skowrya D, Craig KL, Tyers M, Elledge SJ, Harper JW (1997) F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* **91**: 209–219

Stahle MI, Kuehlich J, Staron L, von Arnim AG, Golz JF (2009) YABBYs and the transcriptional corepressors LEUNIG and LEUNIG_HOMOLOG maintain leaf polarity and meristem activity in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**: 3105–3118

Stepanova a. N, Yun J, Robles LM, Novak O, He W, Guo H, Ljung K, Alonso JM (2011) The Arabidopsis YUCCA1 Flavin Monooxygenase Functions in the Indole-3-Pyruvic Acid Branch of Auxin Biosynthesis. *Plant Cell* **23**: 3961–3973

Stepanova AN, Robertson-Hoyt J, Yun J, Benavente LM, Xie DY, Doležal K, Schlereth A, Jürgens G, Alonso JM (2008) TAA1-Mediated Auxin Biosynthesis Is Essential for Hormone Crosstalk and Plant Development. *Cell* **133**: 177–191

Stowe-Evans EL, Harper M, Motchoulski A V, Liscum E (1998) NPH4, a Conditional Modulator of Auxin-Dependent Differential Growth Responses in Arabidopsis 1. *Plant Cell* **10**: 1265–1275

Sugawara S, Hishiyama S, Jikumaru Y, Hanada A, Nishimura T, Koshiba T, Zhao Y, Kamiya Y, Kasahara H (2009) Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 5430–5

Sugimoto-Shirasu K, Roberts K (2003) “Big it up”: endoreduplication and cell-size control in plants. *Curr Biol* **13**: 103–112

- Swarup R, Péret B** (2012) AUX/LAX family of auxin influx carriers—an overview. *Front Plant Sci* **3**: 225
- Swarup R, Swarup R, Marchant A, Marchant A, Ljung K, Ljung K, Sandberg G, Sandberg G, Palme K, Palme K, et al** (2001) Root Apex. *Genes Dev* 2648–2653
- Szemenyei H, Hannon M, Long JA** (2008) TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during Arabidopsis embryogenesis. *Science* (80-) **319**: 1384–1386
- Tabata R, Ikezaki M, Fujibe T, Aida M, Tian CE, Ueno Y, Yamamoto KT, MacHida Y, Nakamura K, Ishiguro S** (2010) Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR6 and 8 regulate jasmonic acid biosynthesis and floral organ development via repression of class 1 KNOX genes. *Plant Cell Physiol* **51**: 164–175
- Takada S, Hibara K, Ishida T, Tasaka M** (2001) The CUP-SHAPED COTYLEDON1 gene of Arabidopsis regulates shoot apical meristem formation. *Development* **128**: 1127–35
- Tameshige T, Okamoto S, Lee JS, Aida M, Tasaka M, Torii KU, Uchida N** (2016) A Secreted Peptide and Its Receptors Shape the Auxin Response Pattern and Leaf Margin Morphogenesis. *Curr Biol* **26**: 2478–2485
- Tan X, Calderon-villalobos LIA, Sharon M, Zheng C, Robinson C V, Estelle M** (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. **446**: 2–7
- Tao Y, Ferrer J, Ljung K, Pojer F, Hong F, Jeff A, Li L, Moreno JE, Bowman ME, Ivans LJ, et al** (2008) NIH Public Access. **133**: 164–176
- Taoka KI, Yanagimoto Y, Daimon Y, Hibara KI, Aida M, Tasaka M** (2004) The NAC domain mediates functional specificity of CUP-SHAPED COTYLEDON proteins. *Plant J* **40**: 462–473
- Tatematsu K, Kumagai S, Muto H, Sato A, Watahiki MK, Harper RM, Liscum E, Yamamoto KT** (2004) MASSUGU2 encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **16**: 379–93
- Terasaka K, Blakeslee JJ, Titapiwatanakun B, Peer WA, Bandyopadhyay A, Makam SN, Lee OR, Richards EL, Murphy AS, Sato F, et al** (2005) PGP4, an ATP binding cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin transport in Arabidopsis thaliana roots. *Plant Cell* **17**: 2922–39
- Timmermans MCP** (1999) ROUGH SHEATH2: A Myb Protein That Represses knox Homeobox Genes in Maize Lateral Organ Primordia. *Science* (80-) **284**: 151–153
- Titapiwatanakun B, Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Yang H, Mravec J, Sauer M, Cheng Y, Adamec J, Nagashima A, Geisler M, et al** (2009) ABCB19/PGP19 stabilises PIN1 in membrane microdomains in Arabidopsis. *Plant J* **57**: 27–44
- Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle T** (2003) The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell* **15**: 533–43
- Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle TJ** (2004) Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *Plant Cell* **16**: 533–43

- Tiwari SB, Wang XJ, Hagen G, Guilfoyle TJ** (2001) AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin. *Plant Cell* **13**: 2809–22
- Tsukaya H** (2008) Controlling size in multicellular organs: Focus on the leaf. *PLoS Biol* **6**: 1373–1376
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1999a) Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant J* **19**: 309–319
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1999b) Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 5844–9
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1997a) ARF1, a Transcription Factor That Binds to Auxin Response Elements. *Science* (80-) **276**: 1865–1868
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1997b) Aux/IAA Proteins Repress Expression of Reporter Genes Containing Natural and Highly Active Synthetic Auxin Response Elements. **9**: 1963–1971
- Vraud E, Brioudes F, Szécsi J, Leroux J, Brown S, Perrot-Rechenmann C, Bendahmane M** (2011) AUXIN RESPONSE FACTOR8 regulates Arabidopsis petal growth by interacting with the bHLH transcription factor BIGPETALp. *Plant Cell* **23**: 973–83
- Vernoux T, Brunoud G, Farcot E, Morin V, Van den Daele H, Legrand J, Oliva M, Das P, Larrieu A, Wells D, et al** (2011) The auxin signalling network translates dynamic input into robust patterning at the shoot apex. *Mol Syst Biol* **7**: 508–508
- Vernoux T, Kronenberger J, Grandjean O, Laufs P, Traas J** (2000) PIN-FORMED 1 regulates cell fate at the periphery of the shoot apical meristem. *Development* **127**: 5157–5165
- Vert G, Walcher CL, Chory J, Nemhauser JL** (2008) Integration of auxin and brassinosteroid pathways by Auxin Response Factor 2. **105**: 9829–9834
- Vieira P, De Clercq A, Stals H, Van Leene J, Van De Slijke E, Van Isterdael G, Eeckhout D, Persiau G, Van Damme D, Verkest A, et al** (2014) The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor KRP6 Induces Mitosis and Impairs Cytokinesis in Giant Cells Induced by Plant-Parasitic Nematodes in Arabidopsis. *Plant Cell* **26**: 2633–2647
- Vieten A, Vanneste S, Wisniewska J, Benková E, Benjamins R, Beeckman T, Luschnig C, Friml J** (2005) Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* **132**: 4521–4531
- Vlad D, Kierzkowski D, Rast MI, Vuolo F, Dello Ioio R, Galinha C, Gan X, Hajheidari M, Hay A, Smith RS, et al** (2014) Leaf shape evolution through duplication, regulatory diversification, and loss of a homeobox gene. *Science* **343**: 780–3
- Vogel S** (2009) Leaves in the lowest and highest winds temperature, force and shape. *New Phytol* **13**–26
- Vroemen CW, Mordhorst AP, Albrecht C, Kwaaitaal MACJ, de Vries SC** (2003) The CUP-SHAPED COTYLEDON3 gene is required for boundary and shoot meristem formation in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**: 1563–77
- Waites R, Hudson A** (1995) *phantastica*: a gene required for dorsoventrality of leaves in *Antirrhinum majus*. *Development* **121**: 2143–2154

- Waites R, Selvadurai HRN, Oliver IR, Hudson A** (1998) The PHANTASTICA gene encodes a MYB transcription factor involved in growth and dorsoventrality of lateral organs in *Antirrhinum*. *Cell* **93**: 779–789
- Walcher CL, Nemhauser JL** (2012) Bipartite Promoter Element Required for Auxin Response. *Plant Physiol* **158**: 273–282
- Wang J-W** (2005) Control of Root Cap Formation by MicroRNA-Targeted Auxin Response Factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell Online* **17**: 2204–2216
- Wang L, Gu X, Xu D, Wang W, Wang H, Zeng M, Chang Z, Huang H, Cui X** (2011a) MiR396-targeted AtGRF transcription factors are required for coordination of cell division and differentiation during leaf development in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **62**: 761–773
- Wang L, Kim J, Somers DE** (2013) Transcriptional corepressor TOPLESS complexes with pseudoresponse regulator proteins and histone deacetylases to regulate circadian transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 761–6
- Wang W, Xu B, Wang H, Li J, Huang H, Xu L** (2011b) YUCCA genes are expressed in response to leaf adaxial-abaxial juxtaposition and are required for leaf margin development. *Plant Physiol* **157**: 1805–19
- Weigel D, Ahn JH, Blazquez MA, Borevitz JO, Christensen SK, Fankhauser C, Ferrandiz C, Kardailsky I, Malancharuvil EJ, Neff MM, et al** (2000) Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **122**: 1003–1013
- Weijers D, Benkova E, Jäger KE, Schlereth A, Hamann T, Kientz M, Wilmoth JC, Reed JW, Jürgens G** (2005) Developmental specificity of auxin response by pairs of ARF and Aux/IAA transcriptional regulators. *EMBO J* **24**: 1874–85
- Weijers D, Schlereth A, Ehrismann JS, Schwank G, Kientz M, Jürgens G** (2006) Auxin triggers transient local signaling for cell specification in *Arabidopsis* embryogenesis. *Dev Cell* **10**: 265–270
- Willemsen V, Friml J, Grebe M, van den Toorn A, Palme K, Scheres B** (2003) Cell polarity and PIN protein positioning in *Arabidopsis* require STEROL METHYLTRANSFERASE1 function. *Plant Cell* **15**: 612–625
- Williams L, Carles CC, Osmont KS, Fletcher JC** (2005) A database analysis method identifies an endogenous trans-acting short-interfering RNA that targets the *Arabidopsis* ARF2, ARF3, and ARF4 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 9703–9708
- Won C, Shen X, Mashiguchi K, Zheng Z, Dai X, Cheng Y, Kasahara H, Kamiya Y, Chory J, Zhao Y** (2011) Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by tryptophan aminotransferases in *Arabidopsis* and YUCCAs in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci* **108**: 18518–18523
- Wu G, Lewis DR, Spalding EP** (2007) Mutations in *Arabidopsis* Multidrug Resistance-Like ABC Transporters Separate the Roles of Acropetal and Basipetal Auxin Transport in Lateral Root Development. *Plant Cell* **19**: 1826–1837
- Wu G, Lin W-C, Huang T, Poethig RS, Springer PS, Kerstetter R a** (2008) KANADI1 regulates adaxial-abaxial polarity in *Arabidopsis* by directly repressing the transcription of ASYMMETRIC LEAVES2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 16392–7

- Wu MF, Tian Q, Reed JW** (2006) Arabidopsis microRNA167 controls patterns of ARF6 and ARF8 expression, and regulates both female and male reproduction. *Development* **133**: 4211–4218
- Wu MF, Yamaguchi N, Xiao J, Bargmann B, Estelle M, Sang Y, Wagner D** (2015) Auxin-regulated chromatin switch directs acquisition of flower primordium founder fate. *Elife* **4**: 1–20
- Xu L, Liu F, Lechner E, Genschik P, Crosby WL, Ma H, Peng W, Huang D, Xie D** (2002) The SCF CO11 Ubiquitin-Ligase Complexes Are Required for Jasmonate Response in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**: 1919–1935
- Zažímalová E, Křeček P, Skůpa P, Hoyerová K, Petrášek J** (2007) Polar transport of the plant hormone auxin - The role of PIN-FORMED (PIN) proteins. *Cell Mol Life Sci* **64**: 1621–1637
- Zenser N, Dreher KA, Edwards SR, Callis J** (2003) Acceleration of Aux/IAA proteolysis is specific for auxin and independent of AXR1. *Plant J* **35**: 285–294
- Zenser N, Ellsmore A, Leasure C, Callis J** (2001) Auxin modulates the degradation rate of Aux/IAA proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 11795–11800
- Zgurski JM, Sharma R, Bolokoski DA, Schultz EA** (2005) Asymmetric auxin response precedes asymmetric growth and differentiation of asymmetric leaf1 and asymmetric leaf2 Arabidopsis leaves. *Plant Cell* **17**: 77–91
- Zhao S, Zhang M-L, Ma T-L, Wang Y** (2016) Phosphorylation of ARF2 Relieves Its Repression of Transcription of the K⁺ Transporter Gene *HAK5* in Response to Low Potassium Stress. *Plant Cell* **28**: 3005–3019
- Zhao Y** (2012) Auxin biosynthesis: A simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-Acetic acid in plants. *Mol Plant* **5**: 334–338
- Zheng N, Schulman B a, Song L, Miller JJ, Jeffrey PD, Wang P, Chu C, Koepf DM, Elledge SJ, Pagano M, et al** (2002) Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* **416**: 703–9
- Zimmermann R, Werr W** (2005) Pattern formation in the monocot embryo as revealed by NAM and CUC3 orthologues from *Zea mays* L. *Plant Mol Biol* **58**: 669–685
- Zourelidou M, Absmanner B, Weller B, Barbosa ICR, Willige BC, Fastner A, Streit V, Port SA, Colcombet J, de la Fuente van Bentem S, et al** (2014) Auxin efflux by PIN-FORMED proteins is activated by two different protein kinases, D6 PROTEIN KINASE and PINOID. *Elife* **3**: 1–25

Titre : Identification des modules de la signalisation auxinique impliqués dans la morphogénèse foliaire.

Mots clés : Auxine, *Arabidopsis thaliana*, ARFs, morphogénèse foliaire

Résumé : L'auxine est une hormone essentielle au développement des plantes, tant pour la division que l'expansion cellulaire. La transcription des gènes de réponses à l'auxine est permise par un mécanisme de signalisation faisant intervenir des complexes ubiquitine ligase E3 impliquant des protéines à F-box TIR1/AFBs, qui en présence d'auxine peuvent interagir avec les répresseurs transcriptionnels AUX/IAA pour induire leur dégradation et activer la transcription de gènes de réponses à l'auxine. Cette transcription implique des facteurs de transcription ARFs (Auxin Response Factors). Dans la feuille, un maximum d'auxine résultant de l'activité des transporteurs d'efflux d'auxine PIN1 participe à l'initiation des dents à la marge. Le facteur de transcription CUC2 qui permet la formation des domaines frontières intervient dans le contrôle de l'orientation des transporteurs PIN1. L'auxine réprime également CUC2 limitant ainsi son expression au sinus, ce qui semble nécessaire pour la formation des dents. Les acteurs de la signalisation auxinique impliqués dans la formation des dents ne sont néanmoins pas connus chez *Arabidopsis*.

Dans cette thèse, les profils d'expression des ARFs ont été mis en évidence dans les jeunes feuilles d'*Arabidopsis* au moment de la formation des dents et une cartographie fine a été établie. Trois ARFs potentiellement répresseurs ARF1, ARF3, ARF18 et trois activateurs ARF5, ARF6, ARF8 ont été identifiés comme étant exprimés dans la zone dent/sinus. La modification de leurs profils d'expression dans des formes de feuilles modifiées par des variations d'expression de CUC2 a également été étudiée. Afin de déterminer si ces ARFs sont impliqués dans la morphogénèse foliaire et plus particulièrement dans l'initiation des dents, le simple mutant *arf5-2/mp^{S319}*, et les doubles mutants *arf6-2 arf8-3*, *arf1-5 arf3-1*, *arf1-5 arf18-2* et *arf3-1 arf18-2* ont été générés et analysés. Les feuilles matures du mutant nul *arf5-2/mp^{S319}* présentent une taille plus importante que celles de Col-0, suggérant que ARF5 serait impliqué dans l'expansion cellulaire.

Title : Identifying auxin signaling modules involved in leaf serration

Keywords : Auxin, *Arabidopsis thaliana*, ARFs, leaf, morphogenesis

Abstract : Auxin is essential for plant development, more particularly by participating in cellular division and expansion. Transcription of auxin response genes is allowed by the auxin signaling pathway involving the F-box TIR1/AFBs proteins associated to ubiquitin ligase E3, which can interact with the AUX/IAA repressors in the presence of auxin to trigger their degradation and activate transcription of early auxin response genes involving the Auxin Response Factors (ARF). At the leaf margin, an auxin maximum resulting from the transport of auxin mediated by the auxin efflux carrier PIN1 is required for teeth formation. The transcription factor CUC2 that defines boundary domains, somehow redirects PIN1 to create a convergent flux to the apex of the tooth. Auxin represses CUC2 thus limiting its expression to the sinus. In *Arabidopsis*, the actors of the auxin signaling pathway involved in leaf serration are unknown.

In this thesis, the expression profiles of ARFs genes have been investigated in young leaves of *Arabidopsis*, more specifically during teeth formation and a detailed map was built. Three ARFs acting as putative repressors ARF1, ARF3 and ARF18 and three activators ARF5, ARF6 and ARF8 were identified as been expressed in the sinus/teeth area. Their expression profiles were also studied in leaves exhibiting modified shapes as a result of variations in CUC2 expression. To determine if these ARFs are involved in leaf morphogenesis and more particularly in tooth initiation, the *arf5-2* null mutant and the double null mutants *arf6-2 arf8-3*, *arf1-5 arf3-1*, *arf1-5 arf18-2* and *arf3-1 arf18-2* were generated and serration was analyzed. Length of *arf5-2* mature leaves is longer than the wild type, suggesting that ARF5 could be involved in cell expansion.

