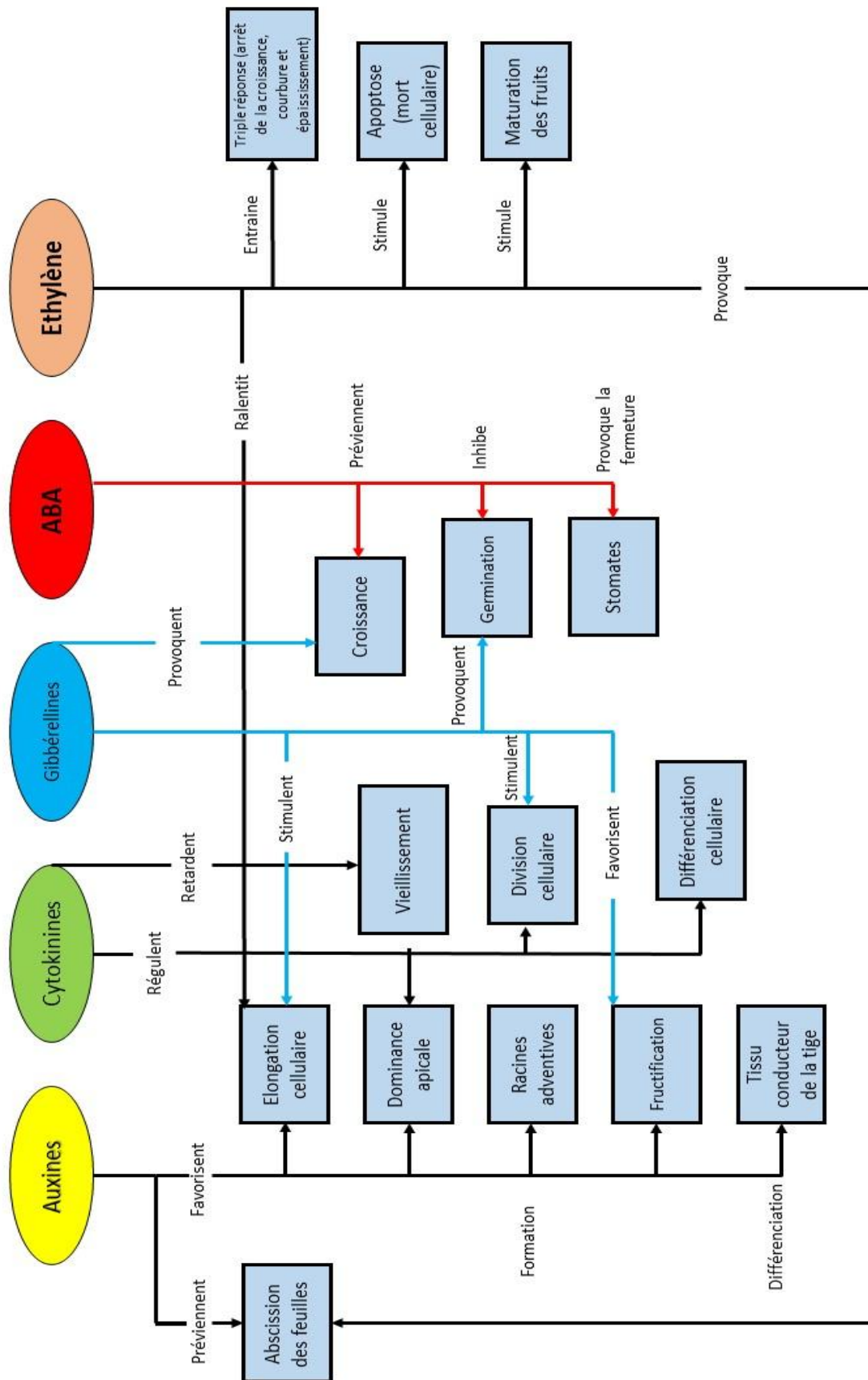
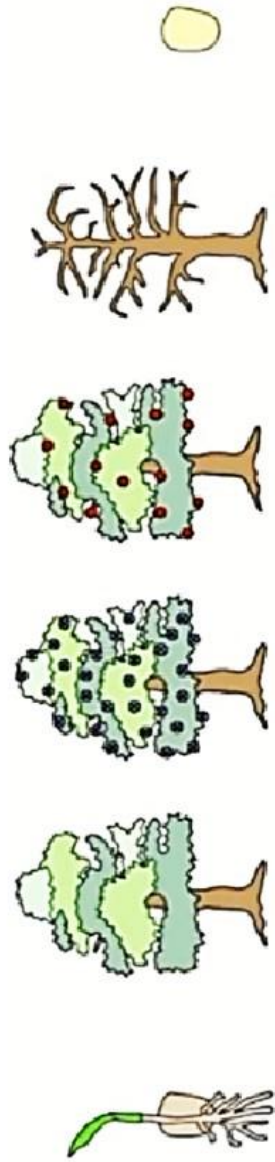


## Partie II – Phytohormones

### Synthèse sur les le Bilan des Phytohormones





	Germination	Production végétative	Floraison	Fructification	Abscission	Dormance de la graine
<b>Gibbérellines</b>	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow		
<b>Auxines</b>		Orange	Orange	Orange		
<b>Cytokinines</b>		Green	Green	Green		
<b>Ethylène</b>			Blue	Blue	Blue	
<b>ABA</b>					Red	Red

## Chapitre II – Les auxines

### I – IDENTIFICATION DE L'HORMONE

Chez les plantes, le concept de phytohormones a été découvert en travaillant sur le coléoptile de monocotylée (souvent l'avoine) qui s'oriente par rapport à la lumière (phototropisme positif). On peut constater que :

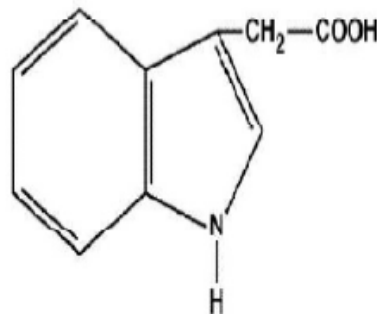
- Si on décapite le coléoptile, il ne peut plus s'orienter, de la même façon que si on cache celui-ci. Il y a donc un signal dans le haut de celui-ci qui influence l'orientation vis-à-vis de la lumière.
- Si on place une feuille de mica sur le coléoptile, du côté opposé à la lumière, il n'y a pas d'inclinaison.
- Si on place une feuille de mica sur le coléoptile, du côté lumière, le signal passe et l'inclinaison a lieu.

Cela peut surprendre. Mais mécaniquement, l'incurvation d'un côté correspond à l'auxèse du côté opposé. Il faut donc, pour se tourner du côté lumière, faire l'auxèse du côté opposé à la lumière !

- Si on décapite le coléoptile mais qu'on rétablit la communication avec de la gélatine, cela fonctionne de nouveau. Ce qui est en cause est donc une molécule.
- Sans lumière, la même expérience fonctionne de la même façon. Si l'incurvation va vers la lumière parce que c'est là la finalité du processus, celle-ci n'est absolument pas nécessaire à la molécule qui sert de signal.

La purification de cette molécule s'est faite avec un système de purification sur agarose avec les différents tissus, jusqu'à trouver ce qui faisait incurver la plante et à quelle concentration (en comparant avec le nombre de têtes de coléoptiles qui avaient été déposés sur la gélose). L'hormone trouvée a donc été l'**auxine**. C'est en réalité une famille dont le plus grand représentant est l'Acide indole acétique **IAA**.

### Structure of Indole-3-acetic Acid (IAA)



Ce sont des molécules doublement cycliques, avec un hétérocycle azote. La structure est proche du tryptophane, qui fait partie de sa voie de biosynthèse. Les auxines induisent un phénomène d'élongation cellulaire, mais sont toutes différentes en structure.

Globalement, l'IAA est plus synthétisé à l'apex qu'au niveau racinaire, même si ça se fait un peu partout à la fois. Il est aussi utilisé dans la formation de l'hydathode.

### II – BIOSYNTHÈSE, STOCKAGE ET INTERVENTION DE L'AUXINE

Les voies de biosynthèses de l'IAA sont longues, mais la voie majeure se résume globalement à une **décarboxylation** et une **désamination**. Elle part donc du tryptophane, arrive à l'IAA, passant par l'évacuation d'un azote et d'un carbone. D'autres voies sont plus efficaces (Trp → IAM → IAA) mais n'existent pas à l'état naturel chez la plante, uniquement chez certaines bactéries (*Agrobacterium tumefaciens*).

Même sans tryptophane, la plante peut employer des **voies alternatives** permettant de faire de l'auxine, en détournant le chemin originel de la voie du **chorismate** (précurseur du tryptophane).

L'auxine est une hormone qui ne reste pas sous forme libre : elle est active. La plante stocke celle-ci dans des réserves, utilisables sans passer par biosynthèse. Il existe deux formes de mises en réserves :

- Des formes réversibles de stockage que l'on peut utiliser instantanément si le besoin se fait sentir. Cela passe par des conjugaisons avec des glucides (myoinositol, glucose) comme dans les graines par exemple, ou des acides aminés (Leucines, Alanines). On peut aussi transformer l'IAA en IBA par exemple, pour le stocker.
- Des formes irréversibles que l'on qualifie de voies de dégradations. Elles utilisent souvent des oxygénases et modifient l'auxine pour la rendre irréversiblement dégradable.

On s'est rendu compte que cette hormone augmente après un stress. Cela peut donc être du à :

- L'augmentation de la voie de la biosynthèse
- L'inhibition de la dégradation
- Transport externe
- Libération des réserves

Le transport d'auxine est **polarisé**. Ainsi, si on prend un fragment d'hypocotyl orienté, et qu'on lui place des blocs donneurs et receveurs d'auxine de chaque côté, le bloc donneur doit se retrouver forcément de façon apicale et le receveur de façon basale.

### III – EFFETS DE L'AUXINE

L'IAA est un acide faible. Il existe donc sous forme non-dissociée IAAH et sous forme dissociée IAA<sup>-</sup>. La forme IAAH peut diffuser à travers la membrane. La forme chargée elle nécessite un transporteur membranaire symport avec 2 protons : c'est l'**influx auxinique**, résultant de deux mécanismes, un actif et un passif.

Mais dans une cellule, il y a un gradient de pH (Cytoplasme : pH 7 ; paroi : pH 5). Pour assurer le transport, il faut donc des protons dans la paroi. Ceux-ci passent par une pompe, qui éjecte systématiquement des protons à l'extérieur de la cellule, consommant de l'ATP. L'entrée d'auxine dans une cellule est donc ATP-dépendante.

L'auxine va aussi avoir besoin d'un efflux, puisqu'il faut qu'elle ressorte de la cellule pour aller dans la suivante. De façon surprenante, l'efflux ne se fait que de façon active sous forme d'anion, jamais sous forme IAAH.

De nos jours, on peut suivre l'expression des gènes ou protéines codant pour ces transporteurs. On a ainsi localisé la protéine AUX 1, permettant le transport localisé d'une cellule à une autre.

L'auxine n'agit pas que sur la cellule mais aussi au niveau organe entiers (coléoptiles, racines, bourgeons, ou tiges : on constate une augmentation après exposition). Cela dépend de l'organe, car chacun possède des doses maximum différentes, déterminant la sensibilité de l'organe à l'auxine (les racines, par exemple, sont les plus sensibles). S'il y a trop d'auxine on finit par avoir inhibition de l'effet.

Cet effet n'est pas dépendant du sucre, mais s'il n'y en a pas, on finit par avoir un plateau car on a besoin d'énergie.

A la mise en contact avec cette énergie, on aura une phase de latence, puis l'effet démarre – cela se fait conjointement avec l'acidification de la paroi, car il y a relargage de protons dans le milieu extérieur (on peut le constater en observant des **protoplastes** ou des coléoptiles abrasés, c'est-à-dire à la paroi abimée).

L'auxine va donc stimuler des pompes à protons, qui excrètent dans la paroi, permettant à des enzymes comme des **amylases** de rendre la paroi plus flexible. Dans le même temps, l'auxine stimulera également les aquaporines, faisant entrer de l'eau dans la vacuole, gonflant la cellule et donc permettant l'élongation de la cellule.

Pour trouver un éventuel récepteur membranaire à l'auxine qui serait responsable de la perception de celle-ci et du mécanisme sus-cité, on a utilisé des extraits de membranes, sur lequel on a mis des protéines qui co-précipitent ou se fixe avec notre produit. Cela nous a permis d'identifier l'**ABP** (Auxin Binding Protein). Mais par marquage et fusion avec un tag, on s'est rendu compte que ces protéines ne sont pas membranaires mais sont sur le RE. Elle emprunte le trafic RE-Golgi-Vésicules et se rapproche ainsi de la membrane ou elle active les pompes. La réception de l'auxine reste donc inconnue.

L'auxine joue un rôle dans un système de régulation qui passe par le **SCF<sup>TIR1</sup> ubiquitin E3 ligase auxin receptor complex**, composé de 4 protéines.

1. L'auxine est reconnue par la protéine de type F-box **TIR1**.
2. Les 3 autres protéines du complexe lient des ubiquitines.
3. Le complexe se lie à une protéine cible, **AUX/IAA**, et procède alors à la polyubiquitinylation de celle-ci
4. **AUX/IAA** est alors reconnue par les protéasomes, qui l'élimine.
5. De fait, le facteur de trans-régulation ARF se fixe n'est plus inhibé par **AUX/IAA**. Il peut se fixer sur son élément de réponse de l'ADN, et la transcription du gène associé à lieu.

Les gènes associés sont généralement ceux qui codent pour les ATPases à protons, etc....

Outre au niveau cellulaire et organe, au sens large, l'auxine va pouvoir :

- Jouer un rôle sur la dominance apicale (forte concentration d'IAA dans les méristèmes apicaux au détriment des méristèmes auxiliaires). Si l'on étête toutefois un arbre, les bourgeons auxiliaires repartent.
- Induire une **rhizogénèse**, formation de racine si on inhibe la formation de la tige (par trop hautes concentrations d'auxines). C'est le **bouturage**. Toutefois, il faut prendre garde à laver le plus possible l'auxine ensuite pour éviter d'inhiber l'élongation des racines.
- Induire la différenciation vasculaire. Si l'on étête (pour éviter la dominance apicale) et que l'on fait une blessure sur une plante, un simple manchon imbibé d'auxine permettra de différencier des cellules pour reformer une jonction à portée de la zone de blessure.
- Jouer un rôle sur l'abscission foliaire, qui dépend d'un équilibre auxine/éthylène.
  - En cas d'excès d'auxine dans la tige en rapport au pétiole, il n'y a pas d'abscission.
  - En cas d'équilibre de concentration entre les deux, il y a abscission.
  - Si on ajoute artificiellement de l'auxine, il va diffuser dans le pétiole et précipiter l'abscission.
- Stimuler la croissance des fruits charnus : la manipulation de l'auxine pourra par exemple permettre l'obtention de grosses pommes ou de fruits sans pépins.

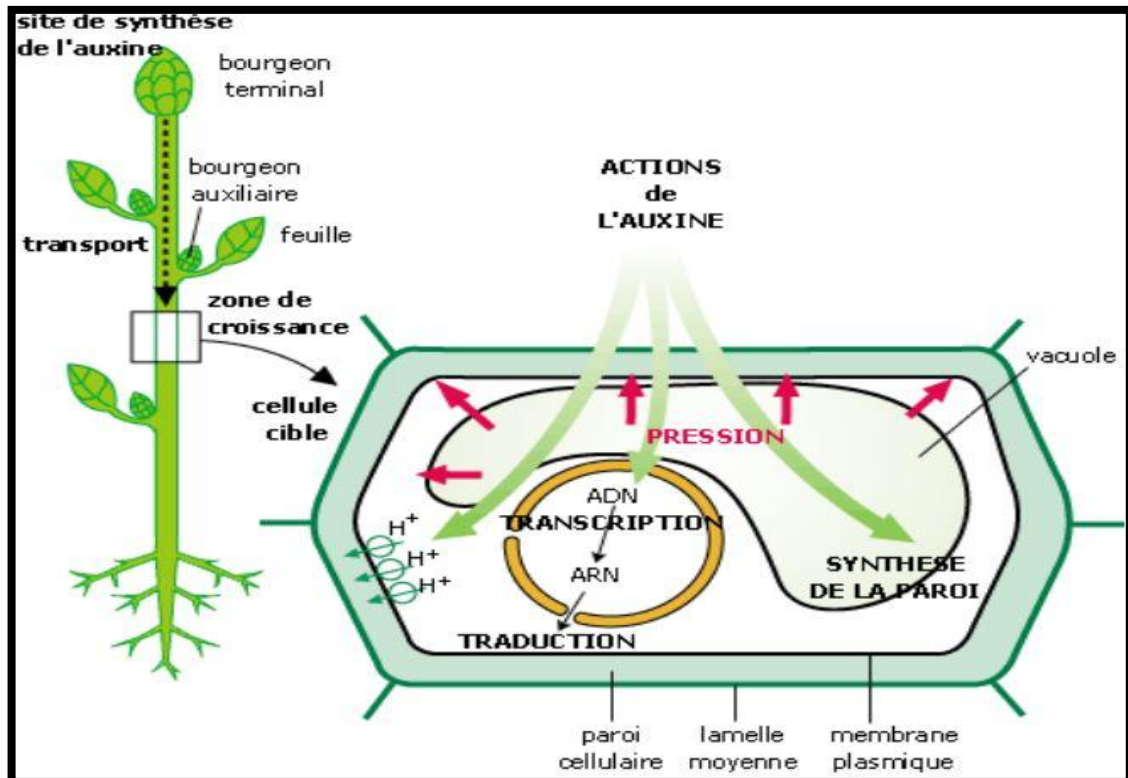


Figure 1 – Action des auxines.

## Comment agissent les phytohormones ?

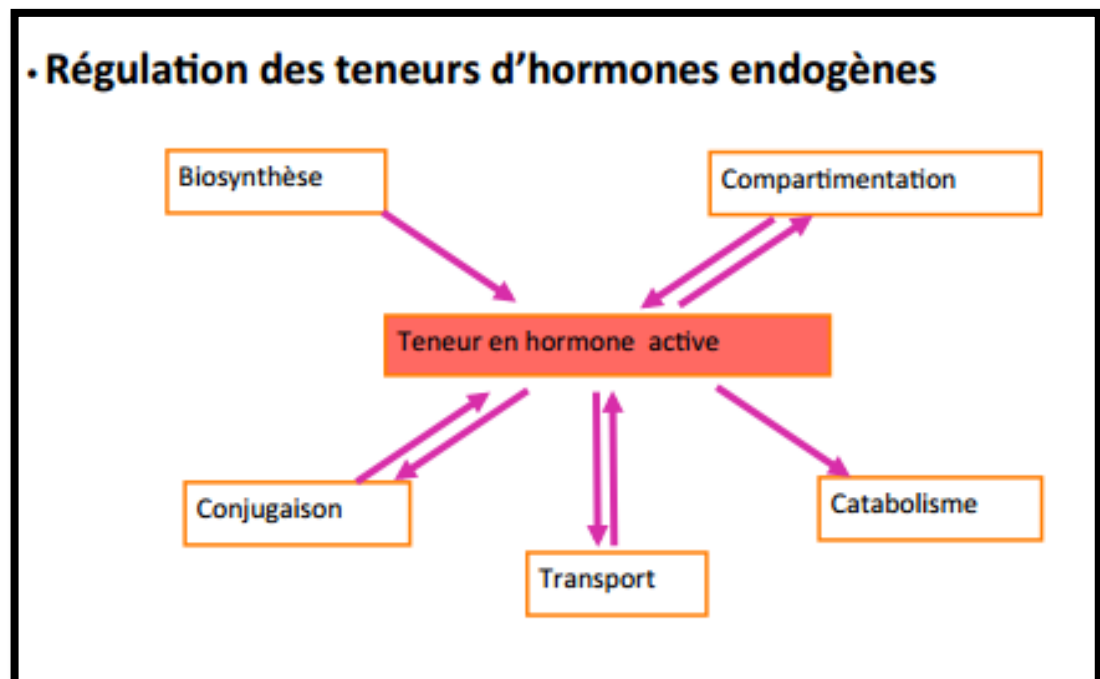
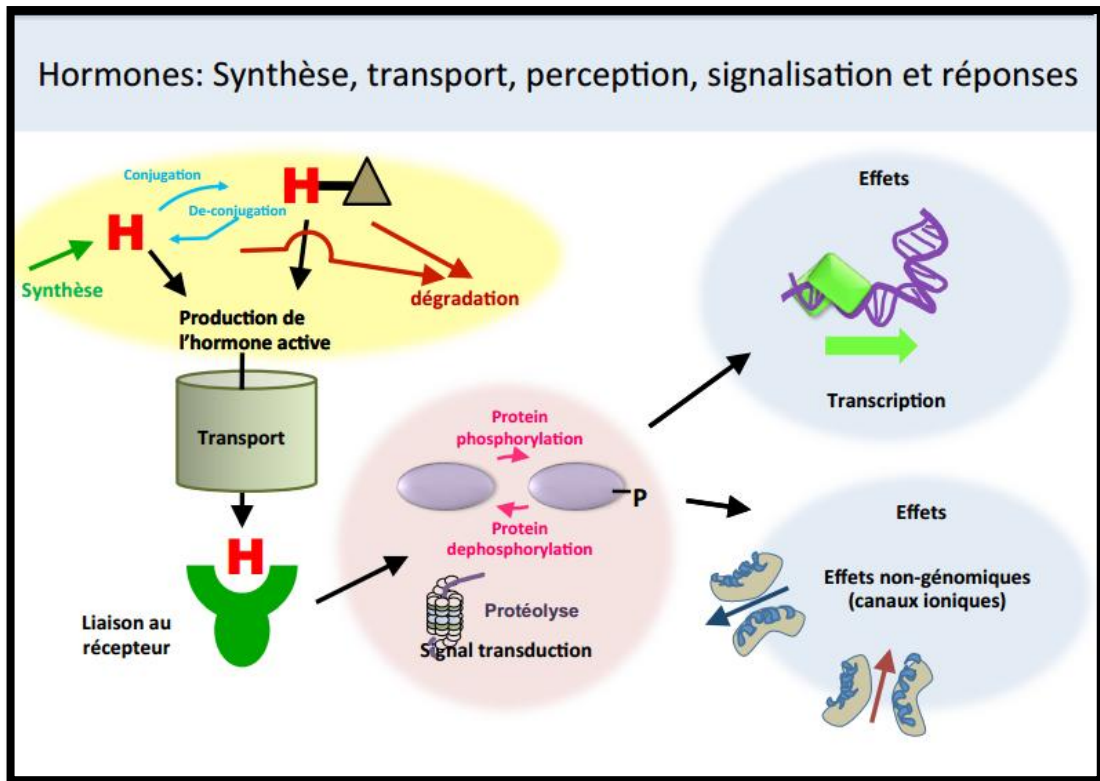


Figure 2 – Schéma Biosynthèse et régulation.

## Chapitre III – Gibbérellines

Elle va jouer un rôle sur la régulation de la taille des plantes et la germination des graines. Elle a été découverte en travaillant sur une maladie du riz, qui se manifeste par l'élongation anormale et production nulle, due à un champignon. Celui-ci, projeté sur un chou, provoque le dépliement de celui-ci.

Les molécules responsables sont les **gibbérellines**, molécules cycliques et C20 ou C19, dont il existe des centaines de formes car des états d'oxydation différents pour chaque carbone. Le noyau, toutefois, reste identique.

### I – BIOSYNTHÈSE DES GIBBÉRELLINES

Les gibbérellines sont des terpènes, qui sont issus d'une importante voie métabolique similaire aux stéroïdes :

1. Condensation de deux CoA en **acide mévalonique**.
2. Une fois phosphorylé (utilisation d'ATP) on arrive à la formation d'**isopentenyl pyrophosphate**.
3. Cette molécule en C5 permet de faire toutes les molécules en C5, C10, C15 ou C20, et donc toute la famille des terpènes, en se condensant avec elle-même. Cela inclut les diterpènes dont sont issues les gibbérellines, par cyclisation du GGPP en deux étapes dans les plastes, pour former la molécule patron ent-Kaurène.
4. Cette molécule subit alors des modifications dans le RE, puis forme diverses gibbérellines via des voies parallèles dans le cytoplasme. Certaines sont des formes actives, d'autres inactives (hydroxylation en C3 → activation ; ajout d'une hydroxylation en C2 → désactivation). Il y aura donc utilisation de ces formes comme un système de régulation.

Pour reconstituer ces voies, la seule approche possible est l'utilisation de mutants.

Cette voie de biosynthèse est régulée – quand il y a trop de gibbérellines, on a 2 solutions :

- Un **feedback négatif** par inhibition d'expression des gènes GA20ox et GA3ox
- Un **feedback positif** par stimulation du catabolisme et surexpression du gène GA2ox, favorisant les formes inactives.

Cela a pu s'étudier via étude par gène rapporteur, plus précisément le **gène GUS** codant pour la  $\beta$ -glucuronidase, qui clive le X-Glu formant un précipité bleu (même principe que la  $\beta$ -galactosidase, dont l'activité résiduelle chez les plantes empêche d'avoir des résultats significatifs)

Les gibbérellines se trouvent surtout dans les cellules proches des vaisseaux conducteurs, mais on les retrouve partout. Elles stimulent la croissance des tiges, mais si l'on réduit la teneur en auxine de la plante, celle des gibbérellines l'est aussi.

**L'auxine stimule donc la voie de biosynthèse, ou l'activation de la voie de biosynthèse, des gibbérellines.**

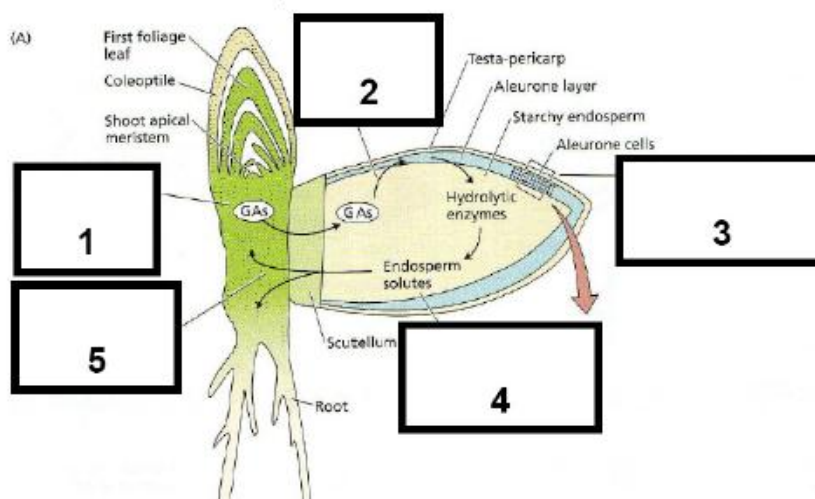
### II – RÔLE DES GIBBÉRELLINES

Les gibbérellines disposent aussi d'autres rôles auxiliaires :

- Chez le conifère, stimulation de la production de la pomme de pin (on l'utilise alors pour accélérer la maturation de ceux-ci)
- Influence sur la floraison et le sexe, que l'on peut donc modifier en jouant sur les gibbérellines.
- Pénétration du pollen dans le tube
- Développement du fruit charnu. On peut aussi induire une **parthénocarpie** en utilisant les gibbérellines.
- Développement et germination de la graine. Ceci dépend de la capacité à mobiliser les réserves de la graine.

Chez les monocotylées, l'embryon dispose d'un tissu maternel triploïde, l'**albumen**, bourré de sucre, et permet d'assurer l'énergie à l'embryon durant la germination. Cela dépend de l'hydrolyse de l'amidon qu'il contient, donc de la production d' $\alpha$ -

amylase. Ces enzymes sont produites dans le tissu entourant l'albumen, les cellules **aleurones**, sous l'action de l'acide gibbérellique issu de l'embryon lui-même. Par gène rapporteur on peut constater que l'expression de ce gène se fait effectivement bien de manière cantonnée à l'embryon.



En l'absence de GA, les facteurs de transcriptions activant les promoteurs des gènes de réponse sont inhibés par un **répresseur DELLA**. Après ajout sur des protoplastes d'aleurones, on aura :

1. Entrée d'une partie des gibbérellines dans la cellule. On pense qu'il existe aussi un récepteur membranaire auquel se fixe l'autre partie, recrutant un hétérotrimère de protéines G.
2. Cet hétérotrimère active deux voies :
  - La première est dépendante du calcium, car celui-ci, dont la concentration augmente très vite, pourra alors activer la **calmoduline**. Les concentrations en  $Ca^{2+}$  et en calmoduline augmentent donc rapidement après application de GA.
  - La seconde voie,  $Ca^{2+}$ -indépendante, utilise du GMPc dont la concentration se met à augmenter quelques minutes plus tard. Cette voie active une protéine de type F-Box, **GID2**, qui forme le **SCF<sup>GID2</sup> ubiquitin E3 ligase complex** avec d'autres protéines. La protéine activée rentre dans le noyau.
3. Les gibbérellines qui étaient entrées dans la cellule vont pénétrer à leur tour le noyau, et interagir avec le récepteur **GID1**, se plaçant alors sur le répresseur DELLA. Cela attire la protéine GID2 et donc tout le complexe dont elle fait partie, qui se fixe sur DELLA, induisant sa polyubiquitinylation, et donc sa dégradation par un protéasome.
4. On aura alors transcription de gènes comme **GAmyb**, un facteur de transcription. L'ARNm sort du noyau, est traduit, puis la protéine rentre à nouveau.
5. GAmyb se fixe sur l'élément cis GARE, la transcription du gène codant pour l' $\alpha$ -amylase commence et celle-ci est synthétisée après environ 1h30 dans le REG. Elle est alors envoyée dans des vésicules et excrétée sous l'action de kinases recrutées par la voie  $Ca^{2+}$ -dépendante activée plus tôt.

Tout travail sur la signalisation ou la perception d'une hormone se fait forcément sur des mutants. Le phénotype classique d'un mutant déficient est un mutant nain, que l'on peut reverser en partie par un double mutant : il y a donc des répresseurs de la voie des gibbérellines, qui eux-mêmes sont réprimés. Si ce « répresseur de répresseur » est muté, il n'agit plus, le répresseur des gibbérellines n'est plus réprimé, et celle-ci ne sont plus synthétisées. Mais si le répresseur est lui aussi muté, alors c'est comme si on avait rien fait !

---

### III – INHIBITION DE LA GERMINATION

On peut inhiber la germination en jouant avec une autre hormone à l'effet contraire, l'**acide abscissique**, qui va bloquer la germination en inactivant la voie de transduction de son signal. Cet acide jouera un rôle dans la dessiccation et la préparation à la dormance (pas de germination malgré de bonnes conditions). En cas d'excès d'acide abscissique, il n'y aura pas de dessiccation, mais quand même des problèmes de germination.