
THESE

Présentée par :

Mr Antonin LEBLANC

et soutenue

Le 19 Mars 2013

En vue de l'obtention du

DOCTORAT de l'UNIVERSITE de CAEN

Spécialité : Physiologie, Biologie des Organismes, Populations
(Arrêté du 07 Aout 2006)

Apports des traitements pharmacologiques à l'étude des relations compensatoires structure-fonction (architecture racinaire-absorption de nitrate) sur la croissance de plantules de Colza d'hiver (*Brassica napus L. cv. Capitot*) en condition faiblement transpirante.

Membres du Jury

Rapporteurs :

Dr. Thierry SIMONNEAU, UMR LEPSE-INRA Supagro, Montpellier
Pr. Bruno TOURAINE, UMR LSTM, Université Montpellier 2

Examineurs :

Dr. Carole DELEU, UMR 1349 IGEPP, Université Rennes 1
Pr. Anis LIMAMI, IRHS, Université Angers
Dr. Erwan LE DEUNFF, UMR 950 EVA, UCBN Caen
Pr. Marie-Pascale PRUD'HOMME, UMR 950 EVA, UCBN Caen

Remerciements

Je remercie le Dr Erwan Le Deunff pour m'avoir encadré durant cette thèse, d'avoir cherché à me transmettre ces connaissances, ces méthodes de travail et sa curiosité scientifique.

Je tiens à remercier le Pr Bruno Touraine pour avoir accepté d'apporter son expertise à ce travail.

Je remercie le Dr Thierry Simonneau d'avoir accepté de rapporter et d'examiner cette thèse.

Je remercie le Pr Anis Limami pour avoir accepté d'apporter ces connaissances en examinant cette thèse.

Je remercie Carole Deleu pour avoir accepté d'examiner ce travail et pour nous avoir offert l'opportunité de collaborer au cours de ce travail de thèse. Je remercie d'ailleurs l'ensemble de l'équipe APBV pour son accueil lors de mes différents passages à Rennes.

Je remercie le Pr Marie Pascale Prud'homme d'avoir accepté d'examiner ce travail de thèse.

Merci à toute l'équipe du laboratoire EVA pour l'environnement de travail procuré. Merci à Frédérick Le Dilly de m'avoir accueilli (à l'époque) dans ce laboratoire.

Je souhaite remercier tous les techniciens et ingénieurs du laboratoire pour leur efficacité teinté de bonne humeur, leurs conseils avertis et leur soutien durant les manips. Je pense particulièrement à Raph, Anne-Françoise, Josiane, Sandrine, Julie, Marie Paule, Patrick...

Un très grand merci à Marie Pascale, Fredo et Philippe pour leur soutien, leurs conseils avisés et surtout de m'avoir consacré autant de leur temps en fin de thèse...

Je tiens à remercier et encourager les collègues thésards, docteurs croisé durant ma thèse au sein du laboratoire, pour l'émulation dans la recherche et certains extras...

La liste est longue, et je ne cherche pas à faire une liste exhaustive, mais je tiens à remercier tous mes amis qui m'ont soutenu (ou plutôt supporté) durant ces années de thèse. Merci à vous pour votre soutien dans le travail ou en dehors! Merci aux sportifs Raph (ton retour est attendu!), Sam (I'll be back, un jour!), Alex (focus sur les objectifs de vie!), Jérôme (toujours partant pour les stages chez toi)... pour les bols d'air (pur quand c'est à la montagne avec une raclette!) procuré par les différentes sorties passées et à venir! Merci pour les soirées et/ou traquenard, partie à ne pas développer... avec les principaux instigateurs Fanch (no comment. I'm bilingue!), Fx (les dents, c'est important), Romain... Et bien d'autres à qui je ne manquerais pas de faire des remerciements en personnes (une occasion de plus, comme si il en fallait...) Et bien sur les innommables Seb, David, Sylvain, Fred : sans commentaires!!

Merci Annelise pour ce que tu m'as apporté durant mon cursus et cette thèse.

Je ne pourrai jamais assez remercier ma famille, qui a toujours cru en moi et sans laquelle ce projet n'aurait jamais vu le jour...

A ma famille.

ABREVIATIONS

ABREVIATIONS

A: surface de la section étudiée (m ²)	GUS: gene de la β-Glucuronidase
AA : Acide Aminé	HATS: High Affinity Transport System
ACC: acide aminocyclopropane carboxylique	chATS: constitutive High Affinity Transport System
ACO: ACC oxydase	iHATS: inducible High Affinity Transport System
ACS: ACC synthase	HIS: Hybridation <i>In Situ</i>
ADN: Acide DésoxyriboNucléique	HR: Humidité Relative
Ag²⁺: ion argent	HXK1 : hexokinase I
AIA: Acide Indole 3-Acétique (auxine)	H⁺-ATPase: Pompe à protons
AIBA : acide aminoisobutyrique	IRMS: Isotopic Ratio Mass Spectrometry
AKT1 : Transporteur de potassium forte affinité	IRN : Indice de Récolte en azote
Ala: Alanine	Js* : correspond au flux actif de soluté qui résulte de l'action de transporteurs (en mol.m ⁻² .s ⁻¹)
ARF8 : Auxin Response Factor 8	Jv : correspond au flux d'eau (en m.s ⁻¹)
ARNc: ARN recombinant	J_{Veau} : flux d'eau (en m. s ⁻¹)
ARNr: ARN ribosomal	K : Potassium
AS : Acide Salicylique	K_h: conductivité hydraulique
ASA1 : alpha anthranilate synthétase	K_m : Constante de Michaelis (d'affinité)
ASB1 : bêta anthranilate synthétase	KHPO₄ : potassium hydrogen phosphate
Asn: Asparagine	KH₂PO₄ : potassium dihydrogen orthophosphate
Asp: Aspartate	K₂SO₄: Sulfate de potassium
ATP : Adénosine TriPhosphate	L: longueur de l'échantillon
AUX1 : Perméase (influx d'AIA)	LATS: Low Affinity Transport System
aux1 : gène codant un transporteur d'influx d'auxine	cLATS: constitutive Low Affinity transport System
AVG : Aminoéthoxyvinylglycine	Leu : Leucine
CAS: β-cyanoalanine synthase	Lp_{rac} : conductance hydraulique de la racine (en m. s ⁻¹ . MPa ⁻¹)
Ca²⁺ : ion Calcium	MFS: Major Channel Family
CBL9 : Calcineurin-B-like protein	Mg²⁺ : ion Magnésium
CEPA : Continuum Eau-Plante-Atmosphère	N : Azote
CIPK : Cobalamin-Interacting Protein Kinase	NAE : N Assimilation Efficiency
CIC : Chloride Channel	NAXT: NitrAte eXcretion Transporter
CO₂: Dioxide de carbone	NiR: Nitrite Réductase
Cs : concentration du soluté dans le milieu (en mol.m ³)	NIT4 : nitrilase
EUA: Efficience d'Utilisation de l'Azote	NO : monoxyde d'azote
GFP: Green Fluorescent Protein	NPA: acide naphtylphthalique
Gln: Glutamine	NNP : Nitrate Nitrite Porter
Glu: Glutamate	NR: Nitrate Réductase
GOGAT: glutamate synthétase	NRE : N Remobilization Efficience
GS: Glutamine Synthétase	
GSH : Glutathion	

NRT : Transporteur de nitrate
NUE : Nitrogen Use Efficiency
NUp: Nitrate Uptake
NUpE : N Uptake Efficiency
NUtE : N utilization Efficiency
OPP: voie des pentoses phosphates
P : Phosphore
PAR : Photosynthetically active radiation
PCR: Polymerase Chain Reaction
Phe : Phénylalanine
PIN : transporteur d'efflux d'AIA
PIP : aquaporine
PLP: Phosphate de Pyridoxal
PTR : Peptide TRansporter family
Q: débit volumique ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$)
Q-PCR: Polymerase Chain Reaction Quantitative
Racine I : Racine Primaire
RL: Racines latérales
rs1-1 : Mutant de la perception sucre
S : Soufre
SAM: S-adenosylméthionine
TIBA: acide 2,3,5-Triiodobenzoïque
Trp : Tryptophane
UPLC: Ultra Performance Liquid Chromatography
Vm : Vitesse initiale maximale
WUE : Water Use Efficiency
 ΔH : différence des hauteurs piézométriques en amont et en aval de l'échantillon
 ΔP : différence de potentiel hydrostatique (en MPa)
 $\Delta \pi$: différence de potentiel osmotique entre le xylème et le sol (en MPa)
 $\Delta \Psi$: potentiel hydrique
 Ψ_s : potentiel osmotique des solutés
 Ψ_{eau} : potentiel de l'eau dans la cellule
 Ψ_p : potentiel de pression
 Ψ_m : potentiel matriciel correspondant aux interactions solide-liquide sur le potentiel chimique de l'eau

σ : coefficient de réflexion
 ω : coefficient de mobilité passive (en $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$)

Mutants et gènes :

abi1-1 : ABA-insensitive
abi2-1 : ABA-insensitive
axr1 : répresseur transcriptionnel
axr2 : transport de l'auxine (insensible auxine)
axr3 : transport de l'auxine (insensible auxine)
axr4 : codant une protéine requise pour la localisation de la perméase AUX1
CrNrt: Transporteur de nitrate chez *Chlamydomonas reinhardtii*
ctr1-1 : root development
ein2-5: root development (insensible ACC)
etr1-3 : root development (insensible ACC)
eto1-1 : root development
GH3 : synthèse de conjugué d'auxine
gh3.3-9 : synthèse de conjugué d'auxine
gh3.5-1D: synthèse de conjugué d'auxine
gin1-1 : Mutant de la perception sucre
iaa3 : insensible à l'auxine et l'éthylène
iaa14 : insensible à l'auxine et l'éthylène
nrt2.1: mutant du gène *Nrt2.1*
nrt2.2: mutant du gène *Nrt2.2*
nrt2.1-nrt2.2: double mutant *Nrt2.1* et *Nrt2.2*
Nia1-Nia2: double mutant G'4-3 (Nitrate Réductase)
rdh6 : root hair défective 6
rht1: gène du nanisme
rht2 : gène du nanisme
rs1-1 : mutant de la perception sucre
sun6 : mutant de la perception sucre

SOMMAIRE

Sommaire

I. INTRODUCTION 1

II. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE 9

III. RESULTATS 68

IV. DISCUSSION GENERALE.....163

V. CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE190

VI. BIBLIOGRAPHIE.....195

VII. ANNEXE217

TABLE DES MATIERES

Table des matières

I. INTRODUCTION	1
A. Les enjeux agro-économiques pour l'agriculture mondiale	1
A.1. La première révolution verte: fin d'un paradigme	1
A.2. Les nouveaux facteurs agro-économiques à prendre en compte	1
A.3. La nécessité d'une deuxième révolution verte.....	2
B. Les enjeux agro-économiques plus spécifiques pour le Colza	2
B.1. Origine du Colza.....	3
B.2. La production française, européenne et mondiale du Colza.....	3
B.3. Intérêts économiques du Colza	3
B.4. Intérêts agronomiques	4
B.5. Inconvénients agronomiques du Colza.....	4
B.6. Principales voies pour l'amélioration de l'efficacité de l'utilisation de l'azote (EUA)	5
II. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	9

Fonction

FONCTION : Physiologie moléculaire du transport du nitrate.....	9
A. Physiologie de l'absorption du nitrate.....	9
A.1. Historique sur les cinétiques d'absorption des macro-éléments	9
A.2. Cinétique d'absorption du nitrate et interprétation enzyme-substrat	10
A.3. Caractérisation électro-physiologique des systèmes de transport du nitrate	12
A.4. Autres ajustements mathématiques et hypothèses interprétatives.....	13
B. Génétique moléculaire du transport du nitrate	15
B.1. Caractérisation moléculaire des transporteurs de nitrate	15
B.2. Expression <i>in planta</i> des transporteurs nitrate	17
B.3. Localisation tissulaire et cellulaire des transporteurs de nitrate.....	18
B.4. Correspondance entre les données cinétiques et les données moléculaires.....	20
C. Contrôle de la fonction nutritionnelle azotée à l'échelle de l'organe et de la plante entière.....	22
C.1. Régulations physiologiques et moléculaires des transporteurs de nitrate par le statut N	22
C.2. Régulation du transporteur NRT2.1 par le transporteur NRT1.1	25
C.3. Régulations physiologiques et moléculaires des transporteurs de nitrate par le statut C.....	25

Structure**STRUCTURE : Modification de la croissance racinaire en réponse à la disponibilité en nitrate.... 29**

A.	Structure et organisation de l'architecture racinaire	29
A.1.	Croissance du système racinaire exploratoire.....	29
A.2.	Structure et croissance du système absorbant	31
B.	Implication de l'auxine et de l'éthylène dans l'architecture racinaire	32
B.1.	Effet de l'auxine sur la croissance de la racine I et des poils absorbants	32
B.2.	Effet de l'éthylène sur la croissance de la racine I et des poils absorbants.....	33
C.	Disponibilité en azote et modification de l'architecture racinaire	36
C.1.	Effet du nitrate sur la croissance des systèmes racinaires exploratoire et absorbant	36
C.2.	Effets du glutamate sur la croissance de la racine I et des racines latérales.....	40
C.3.	Interactions entre les métabolismes N et hormonal sur la croissance racinaire.....	41

Relation Structure - Fonction**RELATIONS STRUCTURE-FONCTION : Transport de l'eau et du nitrate au cours de la croissance 45**

A.	Transport de l'eau et du nitrate au cours de la croissance.....	45
A.1.	Caractérisation du transport de l'eau dans la plante	45
B.	Le transfert radial de l'eau dans la racine : les différents modèles	50
B.1.	Transition entre flux osmotique et hydraulique.....	50
B.2.	Le modèle composite de Steudle issu des travaux sur racines excisées	50
B.3.	Les résultats contradictoires de Zimmermann issus des travaux sur plantes intactes.....	52
C.	Relation entre le transport de l'eau et le transport du nitrate.....	53
C.1.	Variations de la conductance hydraulique racinaire induite par une carence minérale	54
C.2.	Effet spécifique du nitrate sur la conductance hydraulique de racines excisées	54
C.3.	Éléments en faveur d'un contrôle par le nitrate de l'activité des aquaporines.....	55
C.4.	Variations photopériodiques des propriétés hydrauliques sur racines excisées sous contraintes hydrostatique (chambre à pression) ou osmotique (stress nutritionnel)	56
D.	Relations entre le statut nutritionnel et les propriétés hydrauliques sur plantes intactes	57
D.1.	Régulation de la conductance hydraulique par le nitrate sur plante intacte	58
D.2.	Régulation de la conductance stomatique par le nitrate sur plante intacte	58
D.3.	Absorption d'eau et d'ions en absence de transpiration: le contre flux de Münch	60
D.4.	Modèles hypothétiques de perception du stress nutritionnel et des réponses hydrauliques associées	61

CONCLUSION ET OBJECTIFS DE TRAVAIL	65
A. Relations structure-fonction de plantules de Colza soumises à un gradient de nitrate en conditions non transpirantes.....	66
B. Effet d'une modification de l'absorption de nitrate (fonction) sur la croissance racinaire et foliaire (structures)	66
C. Effet d'une modification de la croissance des systèmes racinaires exploratoire et absorbant (structure) sur l'absorption de nitrate (fonction)	67
III. RESULTATS	68

Etude générale structure - fonction

A. Etude descriptive des réponses morphologiques, physiologiques et moléculaires des plantules de Colza en fonction de la disponibilité en nitrate en conditions non transpirante.....	68
A.1. Contexte scientifique.....	68
A.2. Hypothèse de travail.....	69
A.3. Stratégies expérimentales	69
A.4. Méthodologies utilisées.....	69
A.5. Article 1.....	71
A.6. Principaux résultats obtenus	91
A.7. Conclusions et perspectives de recherches.....	93

Modification pharmacologique de la Fonction d'absorption

B. Apport des traitements pharmacologiques à l'étude des transporteurs de nitrate BnNRT2.1 et BnNRT1.1 : Le glutamate induit-il une modification de l'absorption du nitrate et de l'eau impliqués dans la croissance ?.....	94
B.1. Contexte scientifique.....	94
B.2. Objectif et hypothèse de travail	95
B.3. Stratégies expérimentales et méthodologiques.....	95
B.4. Méthodologies utilisées.....	96
B.5. Article 2.....	97
B.6. Principaux résultats obtenus	115
B.7. Conclusions et perspectives	117

Modification pharmacologique de la Structure racinaire

C.	Quel est l'impact d'un changement de la surface racinaire sur l'absorption de $K^{15}NO_3$ en réponse aux modifications d'élongation induites par la modulation de la synthèse d'éthylène à l'aide de l'AVG et de l'ACC?	119
C.1.	Contexte scientifique.....	119
C.2.	Hypothèse de travail.....	120
C.3.	Stratégies expérimentales	121
C.4.	Méthodologies utilisées.....	121
C.5.	Article 3.....	122
C.6.	Principaux résultats obtenus	139
C.7.	Conclusions et perspectives	141
D.	Quel est l'impact d'un changement de la surface racinaire sur l'absorption du $K^{15}NO_3$ en réponse aux modifications d'élongation racinaire induites par la modulation de la synthèse d'éthylène à l'aide de l'AIBA et de l'ACC ?	143
D.1.	Contexte scientifique.....	143
D.2.	Hypothèses de travail	144
D.3.	Stratégies expérimentales	144
D.4.	Méthodologies utilisées.....	144
D.5.	Article 4.....	146
D.6.	Principaux résultats obtenus	160
D.7.	Conclusions et perspectives	162
IV.	<i>DISCUSSION GENERALE.....</i>	163
A.	Coordination des relations Structure-Fonction en réponse à la disponibilité en nitrate et en absence de transpiration	165
A.1.	Conditions expérimentales de validation du modèle de Clarkson-Steudle.....	165
A.2.	Hypothèses de fonctionnement implicites induites par les conditions expérimentales en boîte de Pétri	165
A.3.	Validation expérimentale du modèle de Clarkson-Steudle	167
B.	Effets compensatoires Structure-Fonction sur l'absorption et le fonctionnement des transporteurs de nitrate BnNRT2.1 et BnNRT1.1 en absence de transpiration.....	175
B.1.	Rôle du transporteur NRT2.1 dans les effets compensatoires structure-fonction.....	176
B.2.	Rôle du transporteur NRT1.1 dans les effets compensatoires structure-fonction.....	180
C.	Effets de modifications racinaires induites par les différents traitements pharmacologiques sur l'absorption du nitrate et la croissance	184

C.1.	Impact des variations de l'architecture racinaire induits par la modulation du métabolisme de l'éthylène sur l'absorption du nitrate.....	185
C.2.	Impacts des variations de l'architecture racinaire induits par l'AVG sur l'absorption du nitrate	187
C.3.	Impacts des variations de l'architecture racinaire induits par le glutamate sur la croissance racinaire et foliaire	188
V.	CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE	190
A.	Conclusions générales	190
B.	Perspectives de recherches	192
B.1.	Effet du signal nitrate sur la croissance aérienne.....	192
B.2.	Effet du signal nitrate sur la croissance racinaire	193
VI.	BIBLIOGRAPHIE.....	195
VII.	ANNEXE	217

I. INTRODUCTION GENERALE

Contexte agro-économique

A. Les enjeux agro-économiques pour l'agriculture mondiale

A.1. La première révolution verte: fin d'un paradigme

Au lendemain de la seconde guerre mondiale, une option majeure a été prise dans le domaine de l'agriculture afin de pallier aux difficultés pour nourrir les populations des pays en voie de développement (Inde et Amérique du sud). Cette option, appelée la révolution verte, consistait en l'utilisation d'engrais, de pesticides, et en la sélection de variétés de céréales résistantes à la verse et de plus en plus productives. Cette option a permis d'augmenter considérablement les rendements agricoles et de permettre une auto-suffisance alimentaire des pays en voie de développement. Or, la mort de Norman Borlaug, père de cette révolution verte (1914-2009, généticien et prix Nobel de la Paix en 1970), coïncide avec une prise de conscience dans les pays occidentaux que les options choisies dans les années 50 pour augmenter les rendements des cultures ne pourront pas être maintenues en l'état.

A.2. Les nouveaux facteurs agro-économiques à prendre en compte

En effet, des projections jusqu'en 2050 indiquent que quatre facteurs majeurs vont entrer en conjonction et peser lourdement sur l'agriculture mondiale et les tensions internationales. Le premier facteur est l'augmentation de la population mondiale qui selon les projections, devrait passer de 6 à plus de 9 milliards d'individus. Cette augmentation de la population mondiale conduira inévitablement à une augmentation de la demande agricole. Le deuxième facteur est l'approche du « peak oil » conduisant à l'augmentation des coûts des énergies fossiles nécessaires à la production des engrais azotés. L'augmentation induite sur le coût des engrais et des pesticides conduira mécaniquement à une augmentation des coûts de la production agricole. Le troisième facteur est la raréfaction de l'eau non saumâtre, liée aux changements climatiques et à l'augmentation de sa demande pour la production agricole. A ceci, il faut ajouter un quatrième facteur correspondant à la diminution des gisements servant à la production des engrais phosphatés et potassiques dont l'épuisement est prévue d'ici 150 et 200 ans (Johnston, 2008). A ces quatre facteurs majeurs s'ajoute en Europe, et en particulier en France, la pression d'une demande sociale pour une durabilité des pratiques agricoles dans un contexte de déprise agricole

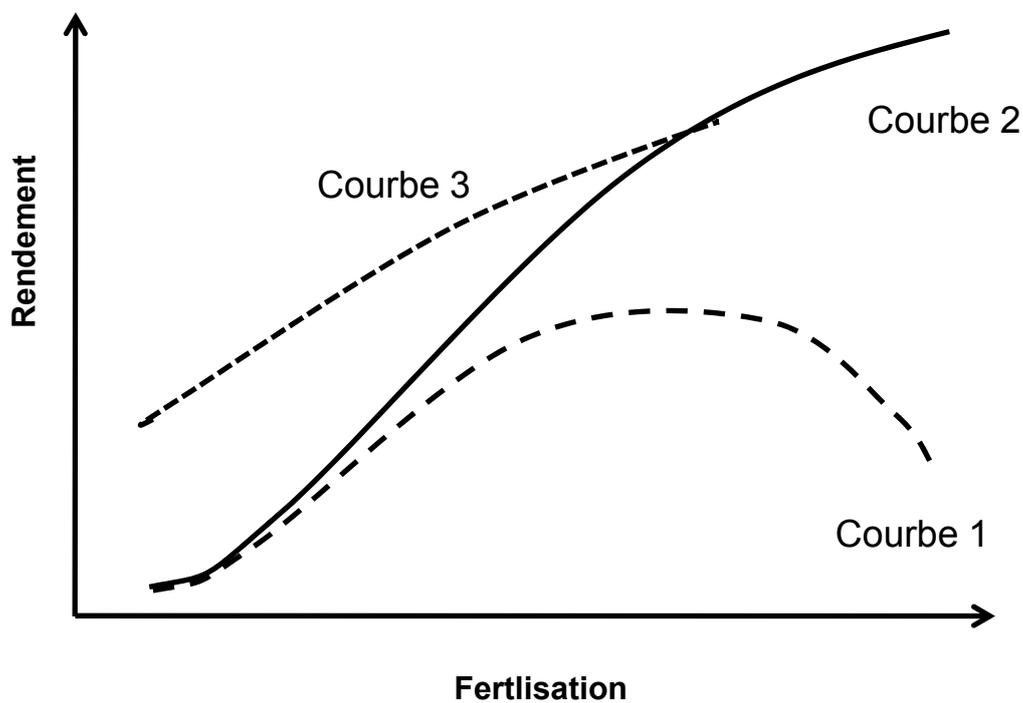


Figure I.1: Rendement des cultures en fonction de la disponibilité en nutriments. La courbe 1 montre les réponses des cultures de blé et de riz à la disponibilité en azote avant la révolution verte. Les rendements déclinent à forte fertilisation à cause de la verse. La courbe 2 montre l'augmentation des rendements après l'introduction du nanisme dans les variétés cultivées. La courbe 3 est une courbe hypothétique qui montre en quoi l'amélioration du prélèvement des nutriments pourrait améliorer les rendements en limitant les niveaux de fertilisation: la deuxième révolution verte!(d'après Lynch, 2007).

(perte des surfaces agricoles liées à une forte urbanisation, d'environ 60 000 ha tous les dix ans, soit deux départements français entre 1990 et 2010!).

A.3. La nécessité d'une deuxième révolution verte

Dans ce contexte plutôt propice, à l'intensification plutôt qu'à l'extensification des cultures, le maintien des rendements agricoles nécessite de nouvelles stratégies d'amélioration des plantes dans le but d'obtenir des pratiques culturales moins dispendieuses. Parmi ces stratégies, la réduction par deux environ des quantités de fertilisants à niveau de rendement équivalent est l'une des pistes envisagées et pourrait constituer selon Lynch (2007) la « deuxième révolution verte » (Fig. I.1). Pour les engrais azotés par exemple, cette stratégie vise donc à baisser les coûts de la fertilisation azotée (qui sont indexés sur les cours du gaz, donc du pétrole, mais qui dépendent aussi de la demande mondiale, en hausse!) et à développer des cultures avec des capacités identiques de croissance dans des sols moins fertilisés. Par conséquent, cette stratégie nécessite d'améliorer l'efficacité d'utilisation de l'azote (NUE : Nitrogen Use Efficiency) selon deux axes principaux de recherche: (i) l'amélioration de l'efficacité du prélèvement de l'azote (NUpE : N Uptake Efficiency) et (ii) l'amélioration de l'efficacité de remobilisation de l'azote (NUtE : N utilization Efficiency) des parties végétatives vers les parties récoltées (Good *et al.*, 2004 ; Hirel *et al.*, 2007 ; Garnett *et al.*, 2009).

Cependant, un facteur souvent oublié dans les stratégies d'amélioration de l'efficacité de prélèvement et de l'utilisation des macro-nutriments (N, P, K, S) est l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE : Water Use Efficiency). En effet, il est clairement démontré que la mobilité des ions dans le sol dépend du flux de diffusion et du flux de masse (convection) des macro-éléments qui sont directement liés à la teneur en eau du sol et à la transpiration des plantes (Barber, 1995 et 1963; Tinker et Nye, 2000). En d'autres termes, les changements climatiques globaux attendus (augmentation du CO₂ et baisse des précipitations) sont également des facteurs majeurs à prendre en compte dans les stratégies d'amélioration de l'efficacité d'utilisation des macro-nutriments (Brueck, 2008 ; Brouder *et al.*, 2009).

B. Les enjeux agro-économiques plus spécifiques pour le Colza

Dans ce contexte agro-économique global difficile, l'engouement actuel pour le Colza, semble à première vue être très pertinent. En effet, le Colza (*Brassica napus* L.) peut être utilisé soit dans la filière alimentaire (humaine ou animale) soit dans la filière industrielle (biocarburants, biolubrifiants,...). La culture du Colza pourrait donc répondre aux problèmes agro-économiques

actuels. Mais l'inconvénient majeur du Colza est qu'il nécessite de grandes quantités d'engrais notamment azotés pour maintenir une forte productivité.

B.1. Origine du Colza

Le Colza (*Brassica napus* L.) appartient à la famille des Brassicacées (anciennement Crucifères). Cette plante est le résultat du croisement naturel entre la Navette (*B. rapa*) et le Chou fourrager (*B. oleracea*). De ce fait, le Colza est une espèce amphidiploïde (réunion de deux génomes). Il existe deux types de Colza cultivés : le Colza d'hiver possédant un cycle de développement bisannuel de 250-310 jours et qui nécessite une période de vernalisation pendant la période auto-hivernale et le Colza de printemps (peu cultivé en France) ayant un cycle court de 120-150 jours, utilisé dans les pays de latitude Nord (Canada par exemple).

B.2. La production française, européenne et mondiale du Colza

La production européenne de graines représentait en 2010, 35 % de la production mondiale (21,7 millions de tonnes pour l'Europe contre 60,6 millions de tonnes au niveau mondial. Source : *Oil World*). Pour sa part, la France a vu la surface cultivée pour le Colza doubler entre 1994 et 2010, ce qui correspond à 1,46 million d'hectares et une production de 4,8 millions de tonnes de graines (source : *COCERAL*). Dans le même temps, la surface de cultures telles que le Tournesol ou le Soja est restée identique.

Dans le monde, la production de graines de Colza atteignait 60,6 millions de tonnes de graines, ce qui permettait de produire 23,7 millions de tonnes d'huile et 34 millions de tonnes de tourteaux en 2010 (source : *Oil World*). Les principaux producteurs dans le monde étant par ordre d'importance : l'Union Européenne, la Chine, le Canada, l'Inde, l'Australie et les États-Unis.

B.3. Intérêts économiques du Colza

Le Colza est une plante olé-protéagineuse cultivée principalement pour la production d'huile (40 à 42 % de la graine) alimentaire et industrielle, ainsi que pour celle de tourteaux (56 % de la graine), destinée à l'alimentation animale. L'huile alimentaire est obtenue après pressage à chaud de ses graines tandis que l'huile, obtenue après une seconde extraction à l'hexane, est mélangée avec le méthanol pour produire du diester (biocarburant). Les tourteaux, issus des graines pressées à chaud, sont riches en azote et utilisés pour l'alimentation animale. L'utilisation de l'huile de Colza dans l'alimentation humaine a été améliorée avec la sélection de variétés de Colza dit « double 0 » avec une teneur très faible : 1 à 3% en acide érucique. La qualité des tourteaux a été

améliorée en réduisant les teneurs en glucosinolates qui sont antinutritionnels et néfastes pour l'alimentation animale. Actuellement, des recherches sont conduites pour obtenir des huiles pauvres en acides linoléiques (oméga 3), ce qui permettra de les utiliser comme huile de friture sans hydrogénation préalable. La filière « biocarburant » prend une place très importante notamment en France et en Europe. En effet, les accords de Kyoto imposent l'incorporation de 5,75% de diester dans le diesel en 2010, mais le gouvernement français a décidé d'atteindre 7% pour cette même année. Pour réaliser ces objectifs, il est alors nécessaire d'augmenter les surfaces de culture : par exemple, 667 000 ha de Colza furent dédiés au diester en 2006 (source : *Agreste* et *ONIGC*), ce qui représente près de la moitié de la surface cultivée pour le Colza. De manière plus confidentielle, une filière de niche se développe avec la production d'huiles de Colza riches en acide érucique (50 à 60 %). Ces huiles sont notamment utilisées comme biolubrifiant, dans la composition de peintures, comme bio-détergents, et entrent dans la composition de plastiques,....

B.4. Intérêts agronomiques

La forte capacité du Colza à absorber l'azote permet de limiter la perte de nitrate par lessivage. L'enfouissement des pailles après récolte permet une augmentation de la matière organique dans le sol. L'utilisation du Colza d'hiver permet une présence de végétaux durant dix mois sur douze ce qui a également pour effet de limiter l'érosion des sols. La culture du Colza permet également une alternance culturale, donc une rupture dans les cycles de maladies des céréales.

B.5. Inconvénients agronomiques du Colza

Il existe des revers à l'intérêt croissant pour la culture du Colza car il nécessite beaucoup d'intrants azotés (180 kg N/ha en moyenne). Outre sa forte capacité à absorber le nitrate, le Colza possède un faible indice de récolte en azote (IRN) environ 0,5 à 0,6, ce qui signifie que sur l'ensemble de l'azote absorbé durant son développement, peu de celui-ci se retrouve dans les graines à la récolte. Le Colza a donc une mauvaise efficacité de l'utilisation de l'azote (EUA). Il rejette dans l'environnement une grande partie de l'azote absorbé par la chute de ses feuilles lors de la sénescence foliaire, pouvant atteindre 100 kg N.ha⁻¹ (Dejoux *et al.*, 1999). Dans le contexte agro-économique actuel, ce phénomène représente un problème important, d'une part pour des raisons économiques (coûts de production liés aux engrais azotés) et d'autre part pour des raisons environnementales (lessivage des nitrates et restitution de quantités importantes d'azote organique

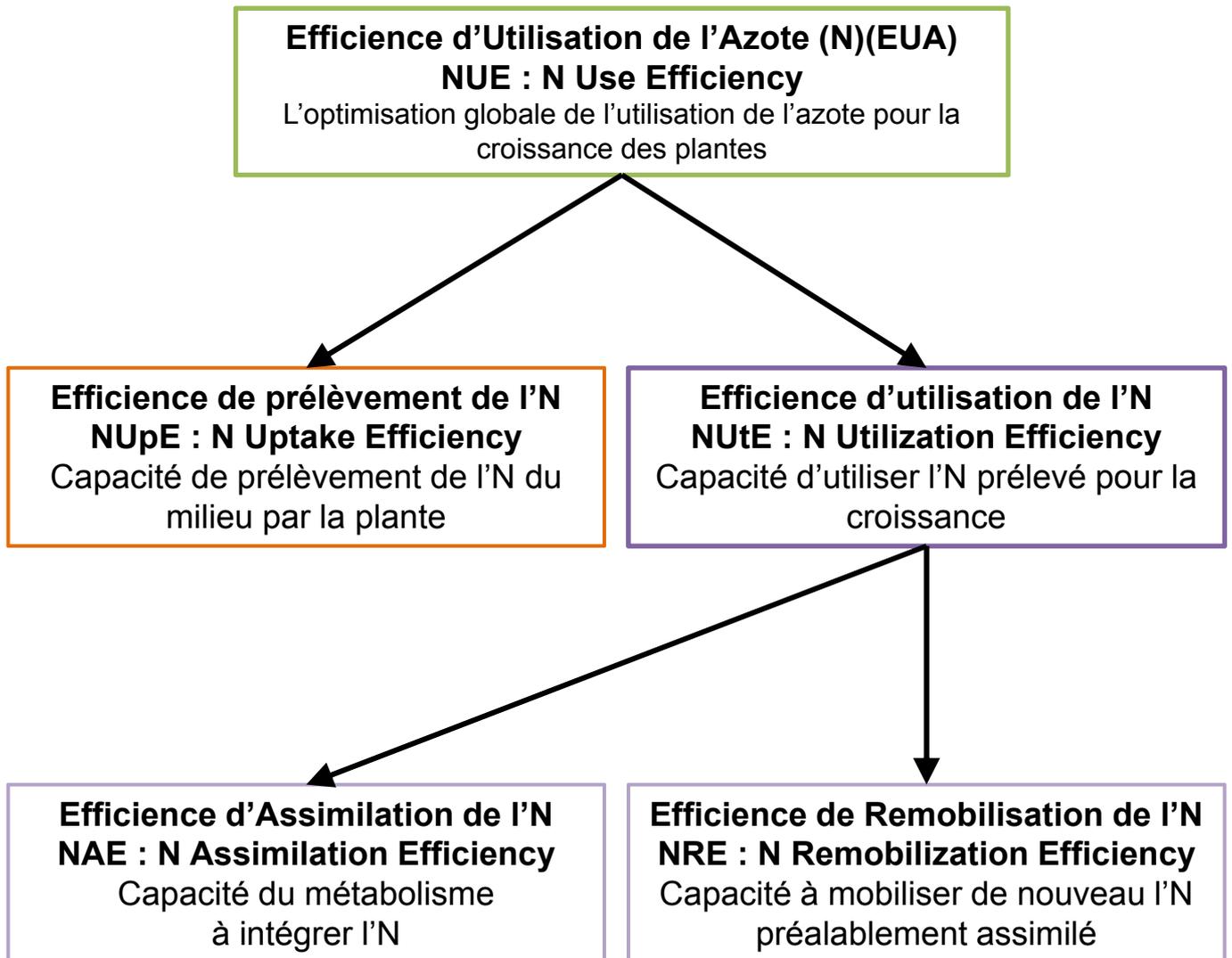


Figure I.2: Définition et organisation des différents termes portant sur l'optimisation de l'utilisation des éléments, ici le nitrate, par les plantes pour leur croissance.

dans l'environnement). Pour répondre à cette double problématique (forte absorption et forte perte d'azote), deux axes de recherches sont explorés.

B.6. Principales voies pour l'amélioration de l'efficacité de l'utilisation de l'azote (EUA)

L'EUA (ou NUE : N Use Efficiency) peut être décomposée en efficacité de prélèvement de l'azote (NUpE : N Uptake Efficiency) et en efficacité d'utilisation (NUtE : N Utilization Efficiency). L'efficacité d'utilisation de l'azote se décompose elle-même, en efficacité d'assimilation (NAE : N Assimilation Efficiency) et efficacité de remobilisation (NRE : N Remobilization Efficiency) (fig. I.2). Pour améliorer l'EUA, deux pistes de recherche sont actuellement suivies. **La première** consiste à améliorer l'efficacité de remobilisation de l'azote et en particulier les coefficients de transfert des assimilats azotés et carbonés des organes végétatifs vers les organes reproducteurs. **La deuxième** consiste à améliorer la capacité de prélèvement de l'azote dans le sol par les racines.

La première piste de recherche n'est pas seulement liée aux capacités de remobilisation des assimilats mais dépend également de la taille des organes puits (nombre de siliques, nombre de grains par siliques, et taille des cellules paranchymateuses des grains qui accumulent les assimilats). En effet, par exemple chez le blé tendre, les modifications de l'architecture des plantes grâce à l'introduction du nanisme (*via* les gènes *Rht1* et *Rht2*) et à l'augmentation de l'efficacité photosynthétique (changement du port des plantes) a permis d'augmenter par 2 à 3 la productivité. Celle-ci est principalement due à une augmentation de la densité de plantes au m² plutôt qu'à une augmentation de la taille ou du nombre de grains par épi (Makino, 2011). **Il n'y a donc eu chez le blé aucune sélection récente sur les capacités de remobilisation et la modification du nombre et de la taille de grains puisque celle-ci semble atteindre son potentiel maximal** (Makino, 2011). Par analogie avec le blé, chez le Colza, l'introduction du nanisme n'a permis qu'à la marge une augmentation des rendements car aucune recherche n'a porté sur l'augmentation du nombre ou de la taille des grains. En fait, il est très probable que les systèmes de transport intervenant dans les remobilisations (transporteurs d'AA et de sucres,...) soient déjà ultraperformants car sélectionnés depuis 200 millions d'années (colonisation de la biosphère par les Angiospermes). **En conséquence, les gains de rendement sont à rechercher dans la multiplication du nombre et de la taille des organes puits.** C'est ce que l'introduction des variétés hybrides a réalisé indirectement chez le Colza. En effet, l'hétérosis présent chez les hybrides a permis d'augmenter le nombre de grain par m² sans que la variation de la densité de semis de 40 à 100 grains par m² n'induisse de variations spectaculaires de productivité. **En**

conclusion, c'est principalement les modifications de la force puits des grains qui influent le plus sur les gains de productivité chez le Colza.

Dans ce contexte, **la deuxième piste de recherche** portant sur l'amélioration de la structure racinaire (architecture) paraît plus prometteuse. Selon Lynch (2007), les traits racinaires liés à la NUpE ont été sujets à une **sélection neutre voire négative** en raison d'apports excessifs de fertilisants utilisés par la révolution verte. **Les traits racinaires n'étant pas facilement accessibles au champ, ils n'ont jamais été utilisés comme critère de sélection.** Ils représentent donc une **source de variation phénotypique inexplorée (Garnett *et al.*, 2009)**. Cependant, les modifications de l'architecture racinaire jouent **sur au moins trois phénomènes majeurs intriqués** qu'il faut absolument garder à l'esprit.

Le premier phénomène concerne **l'ajustement fonctionnel de l'absorption** (compensation et décompensation) qui peut annuler l'effet bénéfique des modifications racinaires sur le long terme. Ce **phénomène d'ajustement fonctionnel en relation avec les modifications structurales au niveau racinaire** a été étudié, depuis les années 70, en situation hétérogène d'alimentation en nitrate à l'aide de dispositifs de type « split root » ou « patch nitrate » (Drew, 1975; Robinson *et al.*, 1994 ; Robinson, 1996; Gansel *et al.*, 2001 ; Zhang *et al.*, 1999; Linkhor *et al.*, 2002). Or des analyses statistiques récentes de la littérature, portant sur plus de 100 espèces, montrent que **les modifications structurales, induites en situation hétérogène d'alimentation en nitrate et en phosphate, ne confèrent pas sur le long terme un avantage sur la production de biomasse (Kembel et Cahill, 2005, De Kroon *et al.*, 2009)**. Ce qui suggère que **des phénomènes de décompensation fonctionnelle accompagnent les phénomènes de prolifération racinaire.** L'intrication de ces relations structure-fonction a été et reste malheureusement insuffisamment étudiée.

Le deuxième phénomène concerne les relations entre le transport du nitrate et celui de l'eau dans la plante pour sa croissance. En effet, s'il est acquis que le nitrate et l'eau sont indispensables pour la croissance des plantes, leurs interactions sont très loin d'être comprises et établies. Au plan éco-physiologique, négliger la question de l'effet du nitrate sur les propriétés hydrauliques (transpiration) en relation avec les changements structuraux (croissance et développement) revient à éviter un aspect important de la question de la coordination structure-fonction induite par le nitrate. En effet, la masse d'eau accumulée dans les tissus constitue **la seule variable morpho-physiologique qui rende compte des variations de croissance cellulaire et tissulaire induites par le nitrate.** Il est donc très probable que les effets compensatoires structure-fonction induits par la disponibilité en nitrate puissent être mesurés à différentes échelles spatio-temporelles grâce aux effets du nitrate sur la prise d'eau pour la croissance.

Enfin, le troisième phénomène concerne les effets du nitrate et du statut N sur la régulation de la transpiration. En effet, il est acquis depuis longtemps que **les variations de la transpiration** modifient la circulation de l'eau dans le sol et impactent les flux des macro-éléments dans le sol : flux convectif et diffusif *via* le continuum sol-plante-atmosphère (Barber, 1995 ; Tinker et Nye, 2000). Ce dernier phénomène représente donc une variable d'ajustement non négligeable pour la croissance qui s'extériorise en particulier lors de contraintes abiotiques comme la sécheresse, par exemple.

Dans ce contexte, **nos travaux de recherche se sont focalisés sur les interactions structurales et fonctionnelles entre l'architecture racinaire et l'absorption du nitrate**. Pour ce faire, nous nous sommes résolument placés dans un modèle et un dispositif expérimental simplifié : la culture de plantules de Colza en gel d'agarose. Cela nous permettait d'accéder facilement aux variations d'architecture racinaire (système exploratoire et absorbant) et de mesurer facilement, dans des conditions contrôlées et répétables, les variations d'architecture ou d'absorption de $K^{15}NO_3$ induites par les traitements.

Après avoir décrit et caractérisé sur les plans physiologiques et moléculaires les réponses des plantules de Colza en fonction de la disponibilité en nitrate dans un tel dispositif de culture, nous avons fait varier, à l'aide de traitements pharmacologiques, l'architecture racinaire (structure) ou l'absorption du nitrate (fonction) de façon à étudier leurs interactions. L'ensemble de ces résultats a fait l'objet de cinq publications dans des revues internationales (de rang A) à comité de lecture. Ces résultats, déjà publiés ou en cours de publication, s'articulent en trois volets :

1. Etude descriptive Structure-Fonction

➤ **Le Ny F., Leblanc A., Beauclair P., Deleu C., Le Deunff E.** (2013). In low transpiring conditions, nitrate and water fluxes for growth of *B. napus* plantlets correlate with changes in *BnNrt2.1* and *BnNrt1.1* nitrate transporter expression. *Plant Signaling and Behavior* : **8(2)**..

2. Modification pharmacologique de la Fonction

Leblanc A., Segura R., Deleu C., Le Deunff E. (2013). In low transpiring conditions, uncoupling the *BnNrt2.1* and *BnNrt1.1* NO_3^- transporters by glutamate treatment reveals the essential role of *BnNRT2.1* for nitrate uptake and the nitrate-signaling cascade during growth. *Plant Signaling and Behavior* : **8(2)**..

3. Modification pharmacologique de la Structure

➤ **Leblanc A., Renault H., Lecourt J., Etienne P., Deleu C., Le Deunff E.** (2008). Elongation changes of exploratory and root hair systems induced by ACC and AVG affect nitrate uptake and the *BnNRT2.1* and *BnNRT1.1* transporters genes expression in *Brassica napus*. *Plant Physiology* **146**: 1928-1940.

➤ **Lemaire L., Leblanc A., Deleu C., Le deunff E.** (2013). Modification of ethylene biosynthesis by ACC and AIBA revealed structural and functional relationship between changes in $K^{15}NO_3$ uptake and root absorbing surface. (soumis à *J exp Bot*)

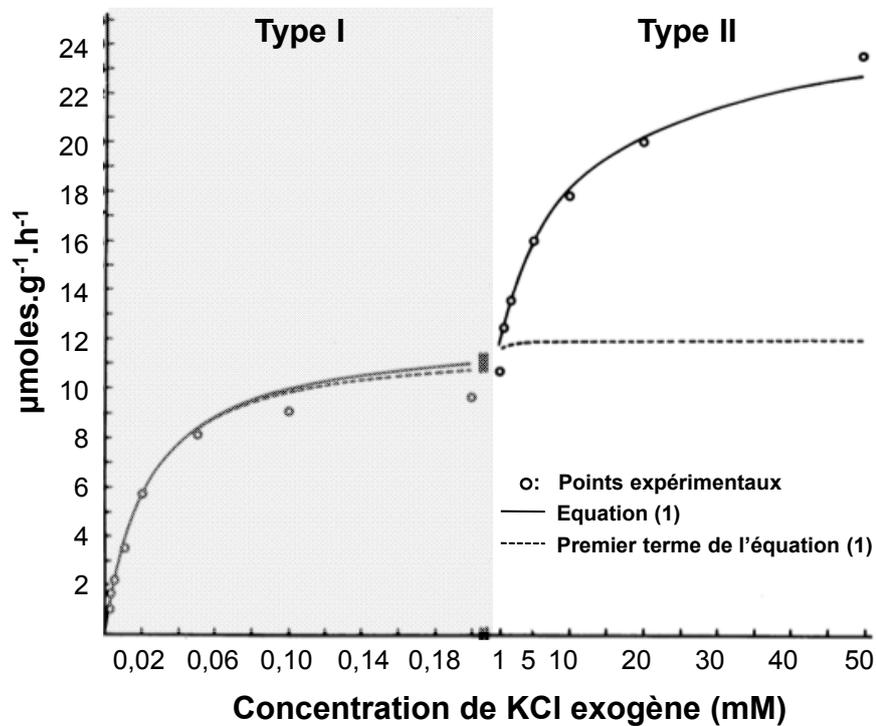
VII. Annexe

➤ **Beauclair P., Leblanc A., Lemauiel S., Deleu C., Le Deunff E.** (2009). Ethylene modifies architecture of root system in response to stomatal opening and water allocation changes between root and shoot. *Plant Signalling and Behavior*: **4(1)**: 1-3.

Ces travaux de thèse ont bénéficié d'une allocation de recherche ministérielle (MENRT) et ont été réalisés au sein du laboratoire UMR INRA UCBN 950 EVA de l'Université de Caen.

II. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

FONCTION : Physiologie moléculaire du transport du nitrate



Equation (1):
$$v = \frac{V_{max 1} (S)}{K_m 1 + (S)} + \frac{V_{max 2} (S)}{K_m 2 + (S)}$$

Figure II.1: Mesure de l'influx de potassium en fonction des concentrations externes de KCl. Les points expérimentaux sont obtenus en présence de 0,5 mM de CaCl₂ et pour une température de 30°C. L'ajustement mathématique à l'aide de l'équation (1), permet de calculer les paramètres suivants: **Type I:** Km= 11,4 mM, Vmax = 13,2 μmoles.g⁻¹.h⁻¹ et **Type II:** Km= 21 mM, Vmax = 11,9 μmoles.g⁻¹.h⁻¹. La courbe en pointillé représente le premier terme uniquement de l'équation (1) (d'après Epstein, 1963).

A. Physiologie de l'absorption du nitrate

A.1. Historique sur les cinétiques d'absorption des macro-éléments

La caractérisation et la définition des systèmes de transport du nitrate ont été réalisées par analogie aux travaux sur l'absorption du potassium effectués par Epstein dans les années 50. La démarche pionnière d'Epstein a consisté à considérer les cinétiques d'absorption du potassium par les racines comme formellement équivalentes aux relations « enzyme-substrat » utilisées en enzymologie. L'objectif principal d'Epstein était de mettre en évidence les systèmes enzymatiques responsables au niveau moléculaire de l'absorption du potassium dans les racinaires. Cette hypothèse, d'une équivalence enzyme-substrat, lui a donc permis de déduire l'existence putative de systèmes enzymatiques responsables de l'absorption du potassium à partir de mesures d'influx de potassium sur des temps courts (de l'ordre de la minute) en fonction de la concentration en potassium externe (Epstein, 1953 et 1966; Epstein et Hagen, 1952 ; Epstein *et al.*, 1963). Les points expérimentaux obtenus pour de faibles concentrations externes (<1 mM) définissent des courbes cinétiques nommées isothermes. Leur ajustement mathématique réalisé à l'aide d'une hyperbole est assimilé à une cinétique de type Michaelis-Menten d'ordre 1. Cet ajustement permet donc de déduire l'existence d'un système de transport putatif à forte affinité dont il est possible de déterminer un K_m (constante d'affinité) et un V_m (vitesse maximum d'absorption). Cependant, lorsque les concentrations externes de l'ion considéré sont supérieures à 1 mM, l'hypothèse d'un transport faisant intervenir un seul système de transport ne suffit plus à décrire les cinétiques observées. Ainsi, pour le potassium, l'affinité du transporteur devient plus faible et sa capacité d'absorption augmente considérablement. Dans le cadre de l'hypothèse enzyme-substrat, ces résultats ont donc nécessité de supposer l'existence d'un modèle dual ou biphasique constitué par deux systèmes de transport : **Un système de transport dit de type I**, caractérisé par une forte affinité et une faible capacité, opérant aux faibles concentrations et **un système de transport dit de type II**, caractérisé par une faible affinité et une forte capacité, opérant aux fortes concentrations. Si la réponse du système I est toujours hyperbolique, la réponse du système II peut être linéaire ou hyperbolique selon les espèces étudiées (Fig. II.1).

La pertinence de cette hypothèse interprétative et de cet ajustement mathématique ont été largement débattues dans les années 70 par les spécialistes mondiaux du transport ionique (Anderson, 1973 ; Baker et Hall, 1988). D'autres ajustements mathématiques et hypothèses interprétatives ont été proposés pour rendre compte des cinétiques et des régulations observées

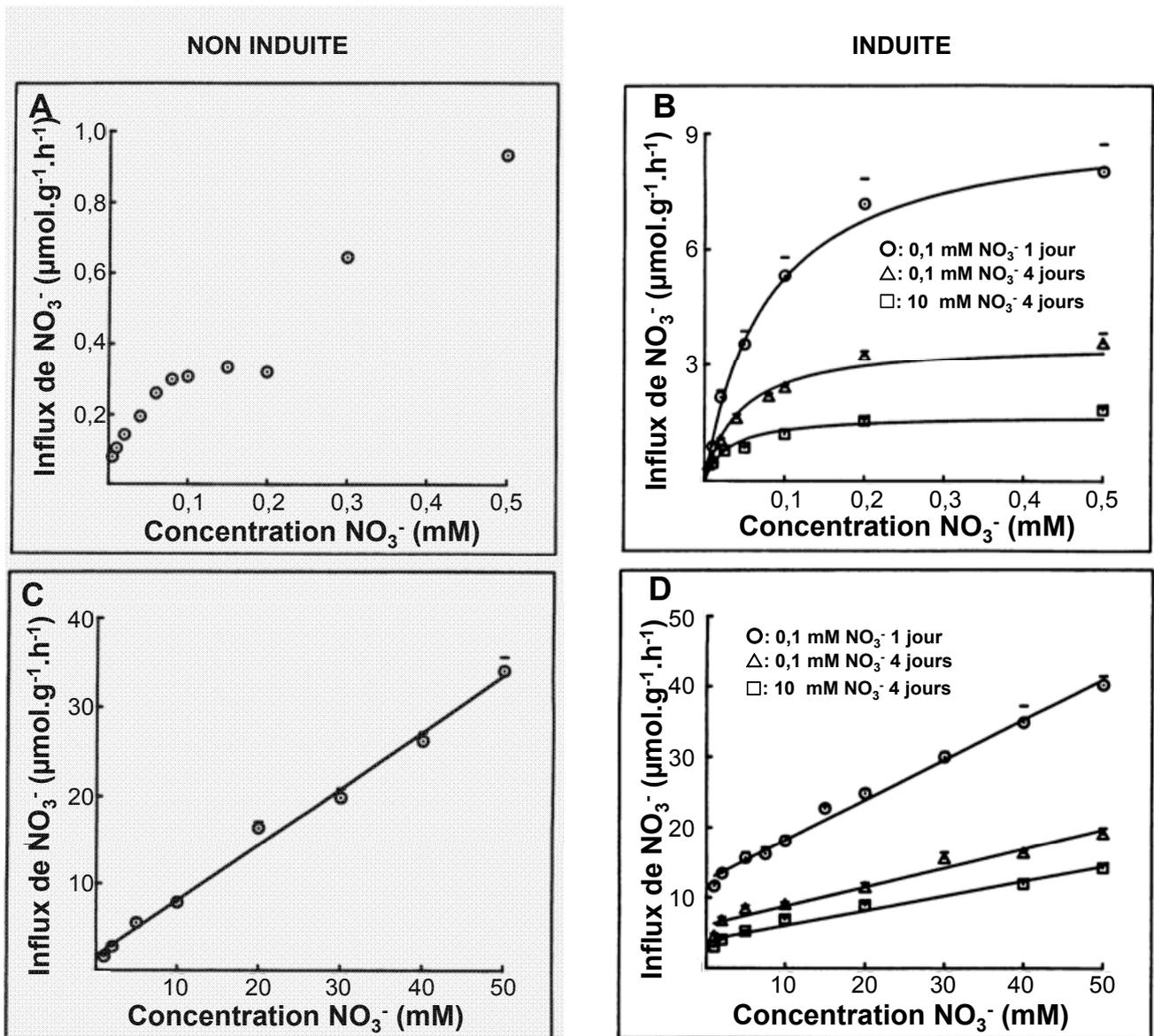


Figure II.2: Mesures de l'influx racinaire de K^{13}NO_3 de racines d'Orge (*Hordeum vulgare* L.) en fonction des concentrations externes de KNO_3 de 0,005 à 0,5 mM. **A)** Variations de l'influx sur des plantes non induites. **B)** Variations de l'influx sur des plantes prétraitées par 0,1 mM de KNO_3 pendant un (○) ou quatre (△) jours ou bien avec 10 mM de KNO_3 pendant quatre (□) jours. **C)** Influx de nitrate en présence d'une gamme de concentrations de 1 à 50 mM sur des plantes non induites et **D)** induites. Les barres d'erreurs représentent l'erreur-standard des moyennes (d'après Siddiqi *et al.*, 1990).

(cf. § : II.Fonction.A.4). Dans les paragraphes suivants, nous nous placerons dans **l'interprétation biphasique** d'Epstein, classiquement admise, pour la définition des systèmes de transport du nitrate chez les plantes supérieures comme le Colza. Cependant, nous montrerons que cette interprétation doit être sérieusement remise en cause au regard des résultats récents de biologie moléculaire sur les transporteurs de nitrate. C'est pourquoi nous présenterons brièvement, à la fin de ce chapitre, d'autres modèles interprétatifs possibles mais délaissés jusqu'à présent.

A.2. Cinétique d'absorption du nitrate et interprétation enzyme-substrat

L'étude de l'absorption du nitrate s'effectue à l'aide de traceurs isotopiques stables ou radioactifs de l'azote (^{13}N et ^{15}N). Les travaux pionniers de Doddema et Otten (Doddema *et al.*, 1978 ; Doddema et Otten, 1979a et b) chez *Arabidopsis thaliana* et de Glass et Siddiqi (Glass, 1988 ; Siddiqi *et al.*, 1989 ; Siddiqi *et al.*, 1990 ; Glass *et al.*, 1990 et Siddiqi *et al.*, 1992) chez *Hordeum vulgare* L. ont permis d'établir les cinétiques d'absorption du nitrate soit à partir de la disparition du nitrate du milieu, soit à l'aide de nitrate radioactif K^{13}NO_3 . Sur la base de l'hypothèse de « l'équivalence enzyme-substrat » d'Epstein, ces études ont ainsi permis de déduire l'existence de différents systèmes de transport du nitrate chez les plantes supérieures (Siddiqi *et al.*, 1990, Siddiqi *et al.*, 1992 ; Forde et Clarkson, 1999).

A.2.1. Le système de transport à forte affinité : (High Affinity Transport System : HATS) ou système I

Les cinétiques d'absorption de nitrate de plantes préalablement privées en nitrate et soumises à des concentrations externes comprises entre 0 et 1 mM chez *Arabidopsis thaliana* ou *Hordeum vulgare* L. révèlent l'existence d'un système d'absorption saturable par le nitrate et présent de façon constitutive dans les racines. L'ajustement mathématique des points expérimentaux, à l'aide d'une hyperbole, chez différentes espèces, a permis de caractériser les paramètres V_m et K_m de ce système de transport par analogie avec les cinétiques enzymatiques de type Michaelis-Menten, selon le modèle interprétatif d'Epstein. Le système de transport ainsi défini a été nommé cHATS pour « constitutive High Affinity Transport System ». Selon cette démarche, le système de transport HATS a pu être caractérisé chez de nombreuses espèces de plantes (Doddema et Otten, 1979a; Siddiqi *et al.*, 1990; Høgh-Jensen *et al.*, 1997, Faure-Rabasse *et al.*, 2002; Fig. II.2 A et B)

Lorsque les plantes privées de nitrate sont préalablement traitées par des concentrations variables de nitrate (0.1 ou 10 mM) et pendant des durées variables (1 à 4 heures) avant les

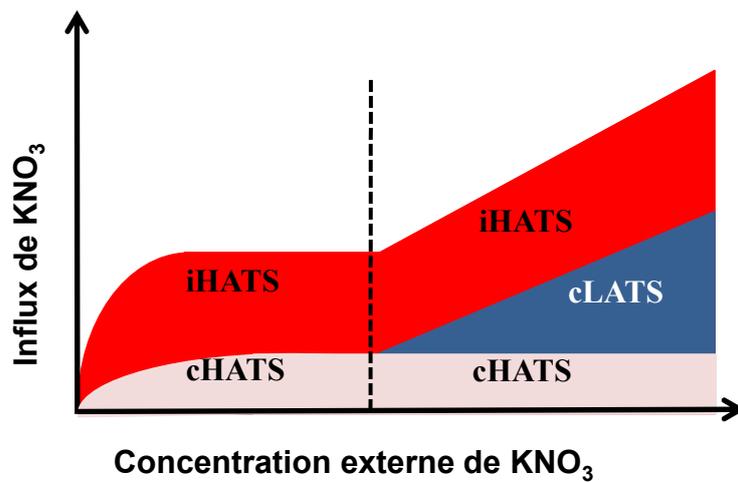


Figure II.3: Dédution graphique des différents systèmes de transport de nitrate basée sur l'hypothèse «d'équivalence enzyme-substrat » proposée par Epstein et son application aux cinétiques d'absorption des mutants des gènes *AtNrt2.1*, *AtNrt2.2* et *AtNrt1.1* chez *Arabidopsis*. Principe de déduction graphique et mathématique des différents systèmes de transport (d'après Filleur *et al.*, 2001 et Huang *et al.*, 1996).

mesures d'absorption, on observe l'induction d'un système de transport également saturable par le nitrate dont des valeurs de V_m et de K_m sont supérieures au système cHATS (Fig. II.2). Toujours par analogie avec les systèmes enzymatiques et par ajustement à une hyperbole, il a donc été défini une composante inductible du système HATS nommée iHATS pour « inducible High Affinity Transport System ».

Les études cinétiques n'ont cependant pas permis de déterminer si les deux composantes du HATS appartenaient à des systèmes de transport distincts ou à un même système de transport. Avant la caractérisation moléculaire et l'utilisation de mutants (cf. §: II.Fonction.B.4), l'utilisation d'inhibiteurs de la transcription (6-méthyl-purine), de la traduction (cycloheximide) ou de la synthèse protéique (p-fluorophénylalanine) ont permis de supposer que l'induction de la transcription et de la traduction conduisait à la synthèse de nouveaux transporteurs induisant l'augmentation des capacités d'absorption au niveau racinaire.

A.2.2. Le système de transport à faible affinité (Low Affinity Transport System : LATS) ou système II

Deux types de cinétique pour l'absorption de nitrate sont observées pour de fortes concentrations externes en nitrate (>1 mM). En fonction des espèces, il est observé soit une cinétique linéaire non saturable comme chez le Colza et l'Orge (Doddema et Telkamp, 1979 ; Pace et McClure, 1986 ; Siddiqi *et al.*, 1990 ; Høgh-Jensen *et al.*, 1997 ; Faure-Rabasse *et al.*, 2002), soit une cinétique de type hyperbolique saturable comme chez *Arabidopsis*, (Doddema et Telkamp, 1979; Huang *et al.*, 1996, Wang *et al.*, 1998, Liu *et al.*, 1999 ; Fig. II.2 C et D).

L'analyse interprétative de ces cinétiques, afin de déterminer les caractéristiques du système de transport sous-jacent, devient ici beaucoup plus complexe. En effet, il est nécessaire pour réaliser cette analyse de faire d'autres hypothèses qui correspondent à autant de modèles interprétatifs (cf. § : II.Fonction.A.4). **Le modèle dual ou biphasique considère que l'on a affaire à un nouveau système de transport distinct du HATS mais dont l'activité est additive et superposée à celui-ci.** A partir de cette hypothèse, il est alors possible, aux fortes concentrations, de soustraire la valeur de la V_{max} du système cHATS (Système I) pour déterminer les caractéristiques cinétiques du nouveau système de transport nommé cLATS (Système II) pour « constitutive High Affinity Transport System » selon la résolution graphique présentée dans la figure II.3. Cette interprétation, lorsqu'elle est appliquée à des cinétiques obtenues à l'aide de plantes préalablement induites, permet également de mettre en évidence, après la soustraction des valeurs additionnées de la V_{max} du cHATS et du iHATS, un seul système de transport correspondant au système cLATS (Fig. II.3). Selon ce modèle, il n'existe

donc pas de composante inductible pour le LATS et celui ci n'intervient qu'aux fortes concentrations.

Les cinétiques pour ce système de transport LATS sont décrites comme des cinétiques linéaires, et l'extrapolation mathématique de ces cinétiques a conduit à assimiler ce système de transport à faible affinité et à forte capacité à un canal ionique indépendant du fonctionnement des ATPases membranaires. Or, des études électrophysiologiques récentes ont montré que ce système de transporteur était de type symport $2\text{H}^+/\text{NO}_3^-$ (Glass *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 1996, Zhou *et al.*, 2000).

En résumé, dans le cadre interprétatif d'Epstein sur le transport ionique, il n'existerait chez les plantes supérieures que deux systèmes distincts de transport du nitrate: le HATS et le LATS. Le HATS présenterait deux composantes : une composante constitutive (cHATS) et une composante inductible (iHATS). Le LATS ne présenterait qu'une composante constitutive (cLATS).

A.3. Caractérisation électro-physiologique des systèmes de transport du nitrate

L'absorption du nitrate est réalisée contre un gradient de potentiel électro-chimique négatif et contre un gradient de concentration (Clarkson et Hanson, 1986). En effet, le cytosol des cellules racinaires est chargé négativement (-100 à -250 mV) par rapport au milieu externe et la concentration interne des cellules racinaires est généralement beaucoup plus élevée que dans le milieu extérieur (3 à 5 mM; Miller et Smith, 1996 ; Van der Leij *et al.*, 1998). Le transport du nitrate par les systèmes HATS et LATS aux faibles ou aux fortes concentrations externes nécessite donc de l'énergie (Zhen *et al.*, 1991; Walker *et al.*, 1995; Crawford, 1995). Cette énergie est fournie par l'hydrolyse d'ATP qui est produite à partir du fonctionnement d'une pompe H^+ -ATPase plasmalemmique comme l'a démontré l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des pompes H^+ -ATPase (Glass *et al.*, 1992).

A.3.1. Energétique et propriétés électro-chimiques du système HATS

Les propriétés électro-physiologiques du système HATS ont été étudiées chez l'Orge (*Hordeum vulgare* L.) en examinant les effets des concentrations externes en nitrate sur les propriétés électriques de ce système de transport. Des plantes pré-traitées par 200 μM de nitrate pendant 5 à 18 heures montrent une importante dépolarisation de leur membrane épidermique racinaire (5 à 30 mv). Cette dépolarisation montre une évolution inductible et saturable en relation

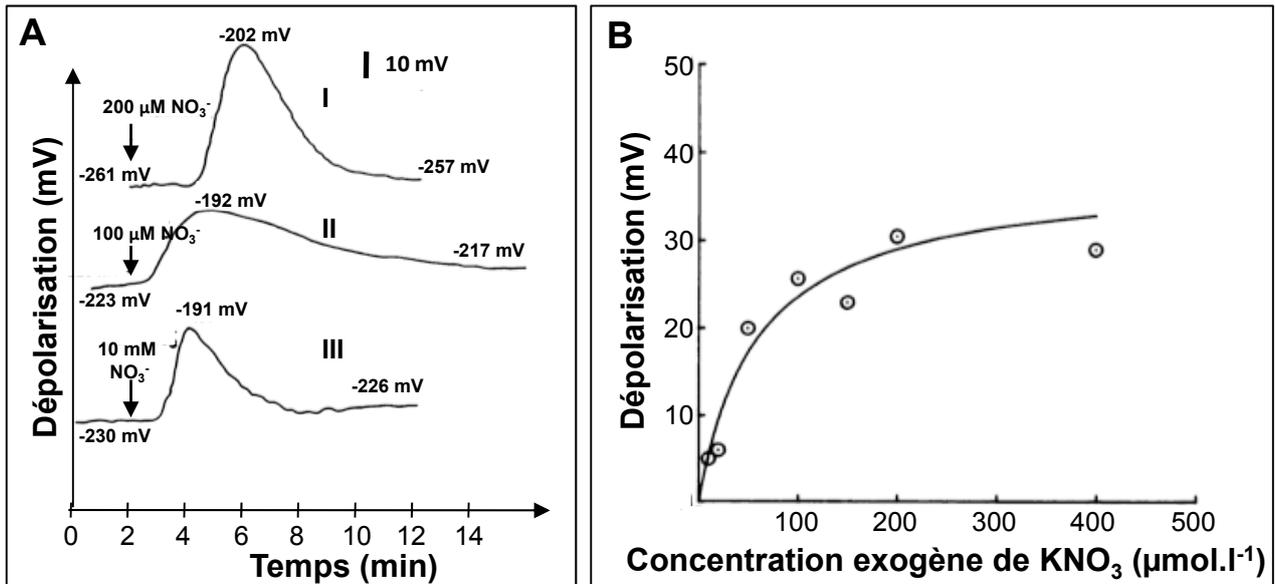


Figure II.4: A) Profil de dépolarisation en réponse à différentes concentrations de KNO_3 exogène après un prétraitement des plantules d'Orge par 100 μM de KNO_3 pendant 18h avec I: 200 μM ; II: 100 μM ; III: 10 mM. B) Dépolarisation maximale en fonction de la concentration de nitrate exogène après un prétraitement par 100 μM de KNO_3 pendant 18h (d'après Glass *et al.*, 1992).

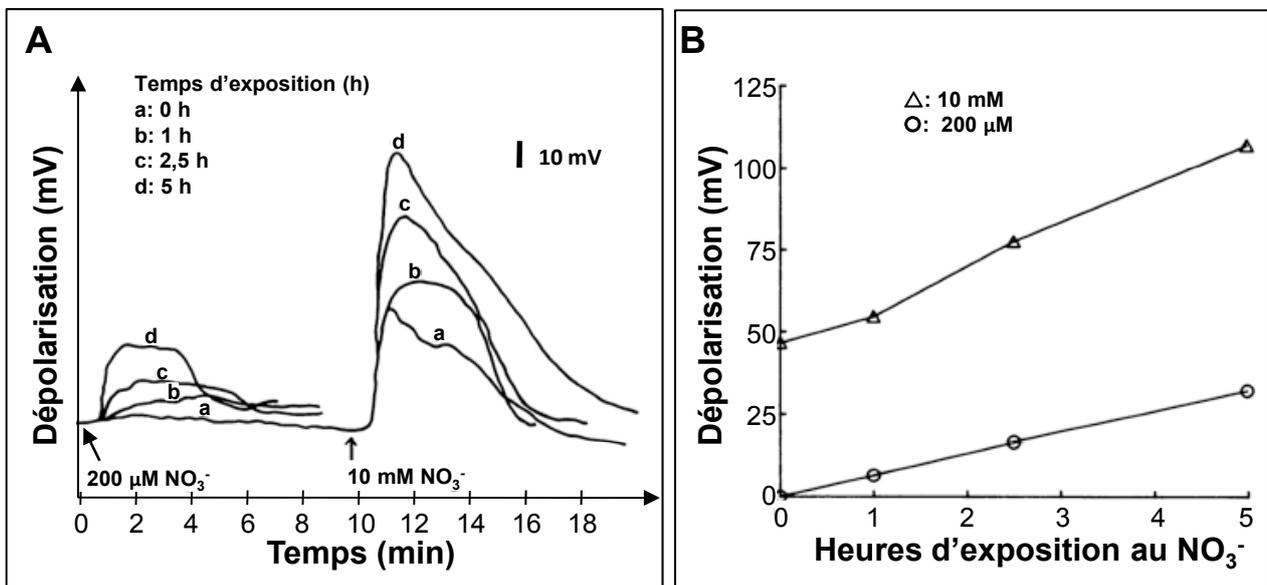


Figure II.5: A) Profils de dépolarisation induits par 200 μM ou 10 mM de KNO_3 , en fonction de la durée de prétraitement au KNO_3 pendant: a: 0h, b: 1h, c: 2,5h et d: 5h. B) Dépolarisation maximale en fonction de la durée d'exposition au KNO_3 , en présence de 200 μM (O) ou 10 mM (Δ) de KNO_3 (d'après Glass *et al.*, 1992).

avec les concentrations de nitrate externe et comparable à la cinétique de transport du système HATS (Fig. II.4). De même, la repolarisation après 2 à 3 jours de pré-traitement par le nitrate suit également parfaitement la diminution de l'influx de $K^{13}NO_3$ observée entre 24 et 96 heures de traitement (Fig. II.4A). La forte dépolarisation induite par un traitement de 200 μM de nitrate après un traitement préalable par du K_2SO_4 fortement acidifiant suggère l'intervention d'un symport $2H^+ / 1NO_3^-$ pour le système HATS.

A.3.2. Energétique et propriétés électro-chimiques du système LATS

Chez l'Orge, la dépolarisation observée pour les fortes concentrations en nitrate, comprises entre 0 et 20 mM sur des plantes non induites, est importante et linéaire (50 à 120 mV) malgré la soustraction des valeurs de dépolarisation induite par le système HATS. De plus, la dépolarisation en fonction des concentrations externes en nitrate est comparable à la cinétique de transport du système cLATS (Fig. II.5A et B). Ceci a permis de démontrer que **le transport du nitrate par le système LATS n'est pas diffusif comme cela avait été préalablement suggéré par des études cinétiques à l'aide de $K^{13}NO_3$** (Glass *et al.*, 1992). **Ce résultat constitue donc un premier démenti des hypothèses en cascade du modèle biphasique ou le système II était considéré comme une simple protéine canal.** En effet, un flux diffusif ne peut pas être aussi fortement dépolarisant. De la même façon que pour le HATS, l'étude de la dépolarisation par 5 mM de nitrate après un traitement fortement acidifiant par le K_2SO_4 suggère également l'intervention d'un symport $2H^+ / 1NO_3^-$ pour le système LATS (Fig. II.6).

En conclusion, il n'existerait aucune protéine canal donc aucun transport passif pour le nitrate. En dépit d'une cinétique linéaire, le système de transport LATS (dédit de l'interprétation enzyme-substrat) se comporterait comme un système de transport actif.

A.4. Autres ajustements mathématiques et hypothèses interprétatives

A.4.1. Le modèle multiphasique avec les systèmes de transport I et II en série

Ce modèle proposé par Per Nissen (1974 et 1991) correspond à l'amélioration du modèle d'Epstein précédemment révisé par Laties *et al.* (1964). Il accepte l'hypothèse d'un modèle biphasique faisant intervenir deux systèmes de transport distincts mais suppose que : (i) les systèmes I et II sont disposés en série sur la membrane plasmique et le tonoplaste des cellules

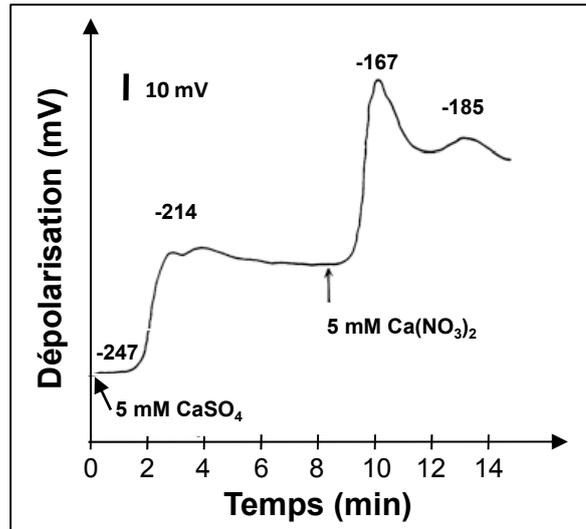


Figure II.6: Profil de dépolarisation obtenu pour des racines d'Orge lors de traitement : 5 mM de CaSO₄ puis 5 mM de Ca(NO₃)₂. Les racines sont préalablement traitées par 5 mM de CaSO₄ (d'après Glass *et al.*, 1992).

épidermiques racinaires (Laties *et al.*, 1964), puis (ii) ces systèmes changent de conformation en fonction de la concentration en potassium. Cette analyse repose principalement sur l'ajustement mathématique des cinétiques à l'aide de la transformation de Lineweaver et Burk (1934) où les valeurs d'influx sont exprimées en $1/V$ (V =influx) et les valeurs de concentrations de l'ion considéré en $1/S$ (S = concentration). Cette transformation fait alors apparaître pour les faibles et les fortes concentrations plusieurs hyperboles qui peuvent se résoudre en autant de droites linéaires de pentes variables correspondant aux changements d'affinité et de conformation (phases multiples) des systèmes de transport de type I ou II.

A.4.2. Le modèle électro-cinétique

Ce modèle proposé par Thellier (1970) est basé sur une approche biophysique et non plus enzymatique du transport des ions. Cette approche analyse les cinétiques d'absorption et le mécanisme biphasique sans invoquer le concept de transporteur mais celui de conductance ou d'activité catalytique tissulaire (Thellier, 1970; Thellier, 1971; Baker et Hall, 1988). Ce modèle repose sur la théorie flux-force qui suppose que le flux d'ion à travers la racine est formellement équivalent à la loi d'Ohm utilisée en thermodynamique. Cette équivalence, pour mesurer le comportement des flux dans le végétal, n'est pas nouvelle car elle a déjà été utilisée avec succès pour le transport de l'eau dans la plante et elle reste toujours valide aujourd'hui (cf. § : II.Structure-Fonction.A.1). Dans ce modèle, les valeurs d'influx sont considérées comme des valeurs de conductance à travers la racine. Ce modèle repose sur un ajustement mathématique qui transforme les valeurs arithmétiques de concentration en donnée logarithmiques ($Ln[conc]$), ce qui permet de linéariser les hyperboles rectangulaires sur toute la gamme de concentrations utilisées dans les conditions thermodynamiques proches de l'équilibre. Le transport au travers de la racine est alors décrit par deux paramètres : la pente de la courbe et son intersection avec l'axe des abscisses. En conséquence, cette interprétation n'essaie pas de déduire à partir des cinétiques, comme dans le modèle interprétatif enzyme-substrat, l'implication d'un ou de plusieurs systèmes de transport disposés en parallèle sur la membrane épidermique racinaire. Au contraire, elle n'infère pas sur la disposition et le couplage possible entre les différents transporteurs dans les différentes assises cellulaires de la racine. Ce formalisme plus simple ne cherche donc pas à déduire à partir des cinétiques l'existence de systèmes de transport ou de transporteurs mais à expliquer de façon physiologique l'absorption minérale, à l'échelle de la plante entière. L'approche flux-force plus simplificatrice délaissée par les physiologistes reste un outil puissant et pertinent d'analyse au plan physiologique. **Parce qu'elle adopte la même démarche biophysique et le même formalisme que le transport de l'eau dans la plante (Dainty, 1963 ;**

Thellier, 1973), elle devrait permettre de simplifier et d'unifier les formalismes décrivant l'absorption de l'eau et des ions dans les modèles agronomiques.

En résumé, nous comprenons que l'analyse et l'interprétation des cinétiques d'absorption des éléments minéraux par la plante dépendent à la fois d'un ajustement mathématique (hyperboles ou droites) et d'une hypothèse interprétative du fonctionnement racinaire face au transport ionique: approche enzyme-substrat ou approche flux-force. Sur la base de l'hypothèse interprétative choisie, la recherche de paramètres cinétiques peut également conduire à de nouvelles hypothèses (hypothèses en cascade). Ainsi, dans le cas de l'approche enzyme-substrat, à la suite de la transformation en double inverse ($1/S$; $1/V$) de Lineweaver et Burk, les conclusions peuvent diverger : modèles biphasique *versus* multiphasique (Torii et Laties, 1966 ; Lüttge et Laties, 1967; Nissen, 1974). De façon surprenante, toutes ces approches ne font l'objet aujourd'hui d'aucune discussion sérieuse alors que l'identification et la caractérisation moléculaire ainsi que l'analyse de mutants des transporteurs du nitrate permettent une lecture plus critique de ces différents modèles interprétatifs (cf. § : II.Fonction.B.4). Quant à la question de la correspondance entre les cinétiques et les transporteurs elle reste toujours posée (Forde et Clarkson, 1999). Trente ans auparavant, Clarkson (Clarkson et Hanson, 1980) écrivait déjà dans une revue de synthèse : « La régulation de la vitesse du transport ionique ne pourra être pleinement comprise que lorsque les mécanismes de transport impliqués pourront être décrits en termes moléculaires plutôt que cinétiques ».

B. Génétique moléculaire du transport du nitrate

B.1. Caractérisation moléculaire des transporteurs de nitrate

Dans les années 90, les transporteurs nitrate ont pu être identifiés et caractérisés au niveau moléculaire chez différentes espèces mais surtout chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Il a ainsi été montré que les transporteurs de nitrate identifiés appartiennent à deux familles distinctes : la famille NNP (Nitrate-Nitrite Porter) et la famille PTR (Peptide TRansporter family). Ces deux familles sont regroupées dans la super famille MFS (Major Facilitator Superfamily). Une troisième famille, représentée par les transporteurs CIC (Chloride Channel family) intervenant dans le transport tonoplastique du nitrate, a récemment été mise en évidence, tout comme les transporteurs NAXT (Nitrate eXcretion Transporter) intervenant sur l'efflux de nitrate.

Tableau II.I: Liste non exhaustive des gènes codants des transporteurs de nitrate, ainsi que le pourcentage d'homologie chez *Arabidopsis thaliana* et *Brassica napus*.

Famille de gène	Gène	No d'accension	% d'homologie	Espèces	Références
PTR	<i>AtNrt1.1</i> (<i>CHL1</i>)	L10357	84,1 %	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tsay <i>et al.</i> , 1993
	<i>BnNrt1.1</i>	AJ278966		<i>Brassica napus</i>	Le Deunff <i>et al.</i> , 2000
NNP	<i>AtNrt2.1</i>	NM100684	86,3 %	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Theologis <i>et al.</i> , 2000
	<i>BnNrt2.1</i>	AJ293028		<i>Brassica napus</i>	Le Deunff <i>et al.</i> , 2000

B.1.1. La famille de transporteurs NRT2 (Nitrate-Nitrite Porter)

Le premier transporteur de la famille NRT2 a été cloné chez le champignon *Aspergillus nidulans* à partir du mutant *crnA* partiellement résistant au chlorate, un analogue toxique du nitrate (Browlee et Arst, 1983 ; Unkless *et al.*, 1991, 1995). Trois gènes homologues *CrNRT2.1*, *CrNrt2.2* et *CrNrt2.3* ont ensuite été identifiés chez une algue verte : *Chlamydomonas reinhardtii*. Depuis, de nombreux gènes homologues ont été clonés chez les végétaux supérieurs : dicotylédones et monocotylédones (Tableau II.I). Chez *A. thaliana*, le séquençage complet du génome a permis de mettre en évidence sept gènes différents et de les localiser sur le chromosome I (*Nrt2.1*, *Nrt2.2* et *Nrt2.5*), le chromosome III (*Nrt2.6*) et le chromosome V (*Nrt2.3*, *Nrt2.4* et *Nrt2.7*).

B.1.2. La famille de transporteur NRT1 (Peptide TRansporter family)

Le premier transporteur NRT1 a été cloné et caractérisé chez *A. thaliana* grâce à des mutants résistants au chlorate (Tsay *et al.*, 1993). Ce gène baptisé *AtCh11* (pour résistant au chlorate) a ensuite été renommé *AtNrt1.1* (pour NitRate Transporteur 1.1). Sur la base d'homologies de séquence, de nombreux gènes homologues ont ensuite été découverts chez d'autres espèces telle que *Lycopersicon esculentum* (Forde, 2000) et *Brassica napus* L. (Muldin et Ingermarsson, 1995 ; Faure-rabasse *et al.*, 2002). Le séquençage complet du génome d'*A. thaliana* a permis de montrer que le gène *Nrt1.1* appartient à une famille multigénique de 53 membres : la famille PTR (Peptide TRansporter family). Parmi ces 53 membres, huit sont aujourd'hui caractérisés : *AtNrt1.1*, *AtNrt1.2*, *AtNrt1.4*, *AtNrt1.5*, *AtNrt1.6*, *AtNrt1.7*, *AtNrt1.8* et *Naxt1* (Tsay *et al.*, 2007 ; Huang *et al.*, 1999 ; Lin *et al.*, 2008 ; Segonzac *et al.*, 2011).

B.1.3. La famille de transporteurs CIC (Chloride Channel family)

Dans la famille des transporteurs de chlore (CIC), sept membres homologues ont été identifiés chez *A. thaliana* et nommés : *AtCIC* de a à g (De Angeli *et al.*, 2006). La protéine *AtCICa* serait localisée dans le tonoplaste et se comporterait comme un antiport $2\text{NO}_3^-/1\text{H}^+$. En effet, la caractérisation physiologique d'un mutant d'insertion, par de l'ADN-T dans le gène *AtCICa*, a montré que les mutants présentaient une teneur en nitrate réduite de 50% dans les racines et dans les feuilles, par rapport aux plantes sauvages, ainsi qu'une hypersensibilité au chlorate (Geelen *et al.*, 2000, Monachello *et al.*, 2009). Par ailleurs, Monachello *et al.* (2009) ont montré que le transporteur *AtCICa*, présent au niveau du tonoplaste, et le transporteur *AtCICe*, présent dans des thylakoïdes du chloroplaste, intervenaient dans l'homéostasie cellulaire pour le

nitrate. En effet, des mutants d'insertion par de l'ADN-T, dans les deux gènes codant ces transporteurs, ont montré une réduction des teneurs en nitrate, une augmentation des teneurs en nitrite et des changements d'expression des gènes *AtNrt2.1*, *AtNrt2.4*, *AtNrt2.5*, *AtNrt2.7* et *AtNrt1.1* dans les racines et les parties aériennes. En conséquence, il est probable que lors d'expériences dites à court terme (minute ou heure) chez des plantes préalablement privées en nitrate, cette famille de transporteurs joue un rôle essentiel dans l'homéostasie du nitrate dans les cellules *via* la régulation du transport et du stockage du nitrate dans la vacuole. En revanche, lors d'expériences dites à long terme (heure ou jour) sur des plantes non carencées, lorsque les teneurs racinaires en nitrate sont élevées, il est probable que ces transporteurs aient peu d'effets sur la régulation de l'absorption du nitrate puisque celui-ci est absorbé puis transporté vers les parties aériennes en l'espace de quelques minutes.

B.1.4. La famille de transporteurs NAXT (NitrAte eXcretion Transporteur)

Les sept membres de la sous-classe NAXT, identifiés récemment chez *A. thaliana* par spectrométrie de masse et analyse de séquences, appartiennent à la famille NRT1/PTR (Segonzac *et al.*, 2011). Les membres de cette sous-classe sont disposés en grappe sur le chromosome III et présentent de 62 à 83% d'homologie au niveau protéique. Tous les membres sont exprimés dans les racines et, en particulier le gène *Naxt1* et les gènes *Atg45680* et *Atg45710* qui sont fortement exprimés dans l'assise corticale. Le transporteur NAXT1 est impliqué dans le transport passif du nitrate comme le montre les études *in vitro* sur des vésicules de plasmalemme. Il a été montré que le transporteur NAXT intervient dans l'efflux de nitrate depuis les cellules épidermiques racinaires (Segonzac *et al.*, 2011). Les autres transporteurs de cette sous-classe pourraient également être impliqués dans le chargement du phloème comme le transporteur *Atg45700* fortement exprimé dans la stèle (Köhler et Raschke, 2000; Köhler *et al.*, 2002).

B.2. Expression *in planta* des transporteurs nitrate

Des études d'expression par PCR semi-quantitative et quantitative chez *A. thaliana* réalisées sur les membres de la famille NRT2 et de la famille NRT1 ont permis d'établir un profil d'expression dans les racines et les parties aériennes de plantes induites et non induites par le nitrate. Ces études ont également permis de déterminer quels transporteurs de nitrate étaient majoritairement impliqués dans le transport de nitrate racinaire.

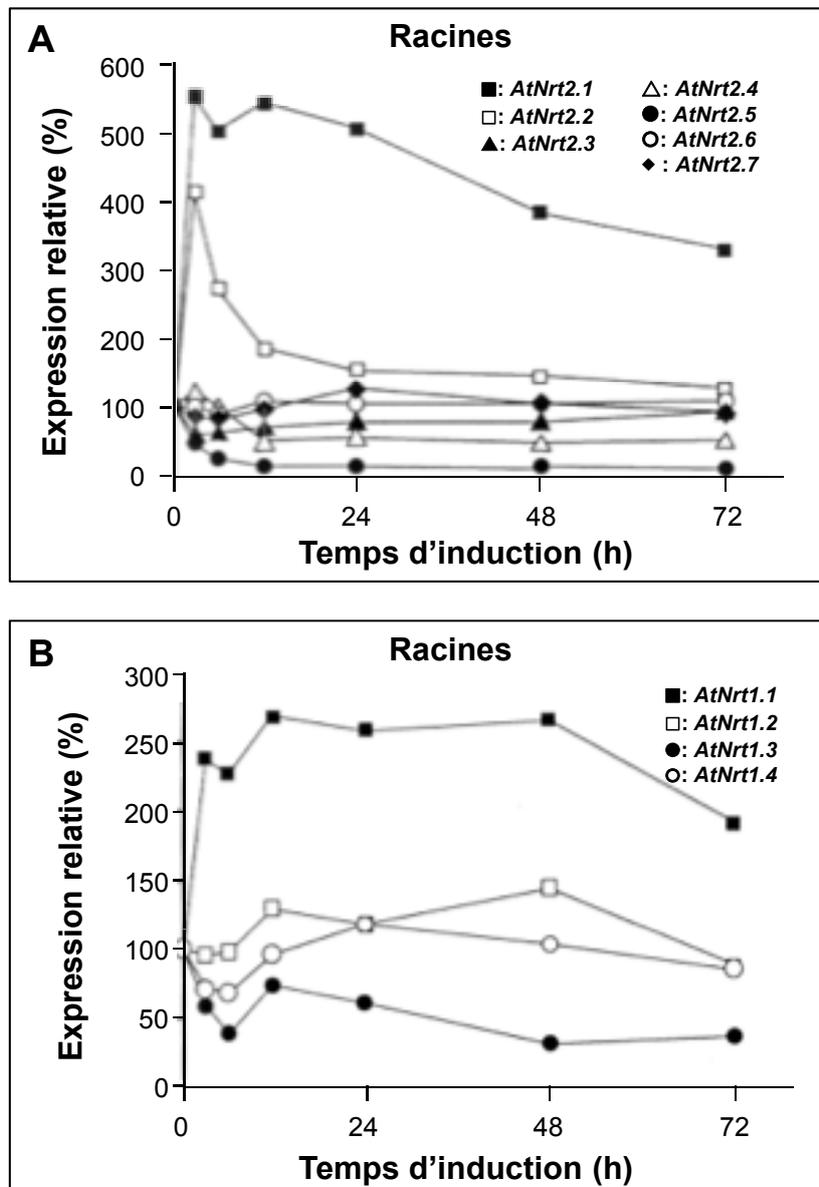


Figure II.7: Profil d'expression des gènes de la famille **A)** *AtNrt2* (*AtNrt2.1* ■; *AtNrt2.2* ; *AtNrt2.3* ▲; *AtNrt2.4* △; *AtNrt2.5* ●; *AtNrt2.6* ○; *AtNrt2.7* ◆) et de la famille **B)** *AtNrt1* (*AtNrt1.1* ■; *AtNrt1.2* ; *AtNrt1.3* ●; *AtNrt1.4* ○). L'expression relative par rapport au gène codant l'ARNr18S est suivie sur une période de 72h, dans les racines de plantules d'*A. thaliana* âgées de six semaines. Les plantules sont cultivées en hydroponie durant cinq semaines avec 0,5 mM de NH_4NO_3 , puis sont transférées pendant une semaine en présence de 0,5 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (d'après Okamoto *et al.*, 2003).

Ainsi, il ressort de ces études que tous les membres de la famille NRT2 sont plus exprimés dans les racines que les parties aériennes, excepté le gène *Nrt2.7*. Cependant, contrairement aux gènes codant des transporteurs NRT2.1 et NRT2.2, les gènes *Nrt2.3*, *Nrt2.4*, *Nrt2.5* et *Nrt2.6* ne sont pas induits par le nitrate (Orsel *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 2003). Le gène *AtNrt2.4* est faiblement induit après trois heures de traitement par le nitrate puis son expression décline rapidement (Fig. : II.7A). *AtNrt2.5* est un gène réprimé dans la racine tandis que *AtNrt2.3*, *AtNrt2.6* and *AtNrt2.7* sont des gènes exprimés constitutivement dans la racine en présence de nitrate (Orsel *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 2003).

Parmi les membres caractérisés chez *A. thaliana*, de la famille NRT1, seuls les gènes *Nrt1.1*, *Nrt1.2* et *Nrt1.5*, participent à l'absorption du nitrate au niveau racinaire (Wang *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999; Liu et Tsay, 2003; Lin *et al.*, 2008). En revanche, seul le transporteur NRT1.1, induit par le nitrate, est fortement exprimé dans la racine (Fig. II.7B; Okamoto *et al.*, 2003). Ces études d'expression ont été confirmées par des études transcriptomiques réalisées par plusieurs équipes sur *A. thaliana* à l'aide de puces à ADN de type Catma ou Affymetrix. Ces études montrent clairement que le nitrate induit majoritairement les gènes *Nrt1.1* et *Nrt2.1* au niveau racinaire (Orsel *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 2003).

B.3. Localisation tissulaire et cellulaire des transporteurs de nitrate

Les techniques d'hybridation *in situ* et d'activités histochimiques GUS et GFP de plantes transgéniques (respectivement *pNRT::GUS* et *pNRT::GFP*) ont permis de déterminer la localisation tissulaire et cellulaire de certains transporteurs de nitrate (Guo *et al.*, 2001 and 2002; Girin *et al.*, 2007; Orsel *et al.*, 2007; Chopin *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2008).

B.3.1. La localisation des transporteurs NRT2.1 et NRT2.2 de la famille NRT2

L'utilisation des plantes transgéniques exprimant des constructions génétiques : *pAtNRT2.1::GUS* et *p_{35S}GFP-NRT2.1*, ont montré que le transporteur NRT2.1 est principalement localisé dans la membrane plasmique des cellules épidermiques et corticales de la racine mature depuis l'apex jusqu'à l'hypocotyle (Girin *et al.*, 2007 ; Orsel *et al.*, 2007 ; Fig. II.8). De même, il a été montré que le transporteur NRT2.2 était co-localisé avec le transporteur NRT2.1. Ce résultat confirme que ces deux transporteurs jouent un rôle majeur dans le transport du nitrate exogène, mais il suggère également un rôle dans la perception du signal nitrate. En effet, la forte affinité des systèmes de transport cHATS ($K_m=6-20 \mu M$) et iHATS ($K_m=13-79 \mu M$) pour le nitrate

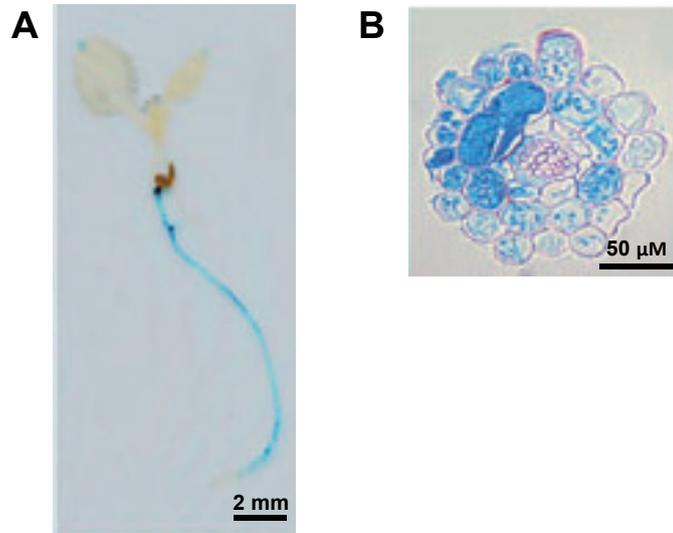


Figure II.8: Localisation histochimique de l'activité GUS chez des mutants *pAtNrt2.1(1201)::GUS* d'*A. thaliana*, âgés de sept jours. La coloration bleue indique l'activité du gène *AtNrt2.1*. **A)** Plantule entière cultivée sur 10 mM NH_4NO_3 . Barre d'échelle: 2 mm. **B)** Coupe transversale dans la partie mature d'une racine primaire cultivée sur 0,3 mM NO_3^- . Barre d'échelle : 50 μm (d'après Girin *et al.*, 2007).

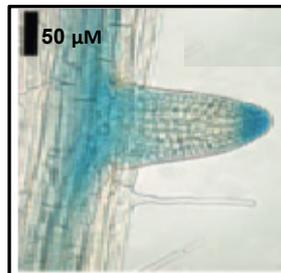


Figure II.9: Localisation du gène *AtNrt1.1* dans les racines latérales d'*A. thaliana*, à l'aide de la technique de localisation histochimique de l'activité GUS chez des mutants *pNrt1.1::GUS*. Les plantules sont cultivées sur 0,5 mM de KNO_3 . La coloration bleue indique l'expression du gène *AtNrt1.1*. Barre d'échelle : 50 μm (d'après Remans *et al.*, 2006b).

confère déjà en soi un caractère de senseur à ces transporteurs. Cette hypothèse est d'ailleurs confirmée par les travaux de Little *et al.* (2005) et de Remans *et al.* (2006a).

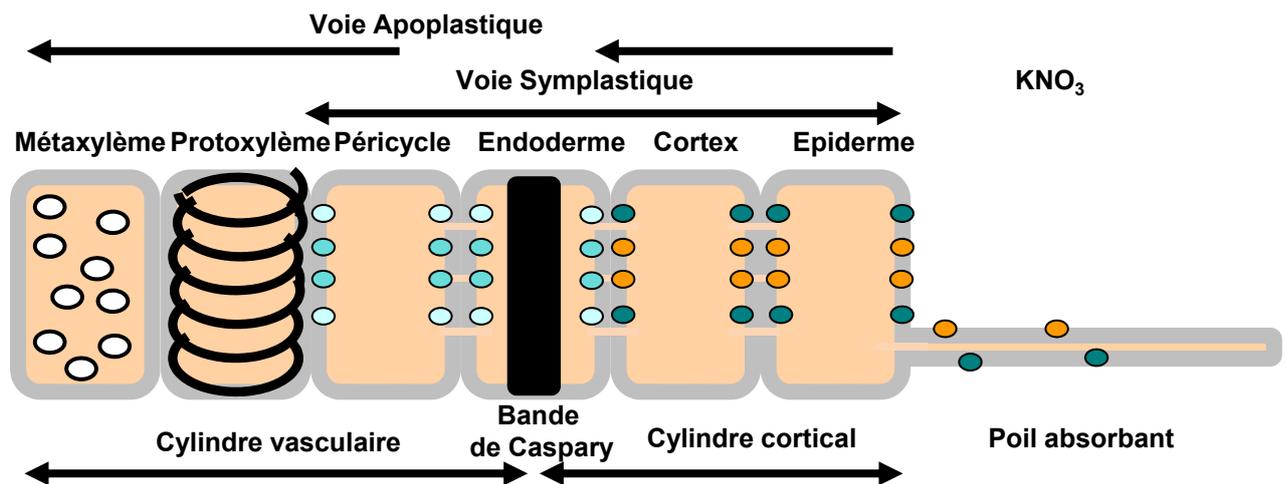
B.3.2. La localisation des transporteurs NRT1.1, NRT1.2 et NRT1.5 de la famille NRT1

Localisation du transporteur AtNRT1.1 : différentes études avec des plantules transgéniques d'*A. thaliana* *pNRT1.1::GUS* ou *pNRT1.1::GFP* ont démontré que le transporteur NRT1.1 est présent dans l'apex de la racine primaire (racine I) depuis le méristème jusqu'à la zone d'élongation (Guo *et al.*, 2001). Dans la zone mature de la racine, qui s'étend depuis la zone d'élongation jusqu'au collet, le transporteur NRT1.1 est principalement localisé dans les couches cellulaires de la stèle, c'est-à-dire dans les assises cellulaires de l'endoderme et du péricycle (Tsay *et al.*, 1993; Guo *et al.*, 2001 and 2002; Remans *et al.*, 2006b ; Fig. II.9). Cette localisation suggère que le transporteur NRT1.1 pourrait être impliqué dans le chargement du xylème ou la translocation du nitrate vers les parties aériennes. Cette localisation dans la racine mature serait en contradiction avec son rôle de "senseur" de la disponibilité en nitrate exogène, mais conviendrait à un rôle de "senseur" de la teneur en nitrate endogène (cf. §: II.Structure.C.1.5), ce qui sera discuté dans les paragraphes portant sur la régulation des transporteurs de nitrate.

Dans les parties aériennes des plantules d'*A. thaliana*, le transporteur NRT1.1 se situe dans les feuilles et les boutons floraux. Dans les plantes plus âgées, NRT1.1 est aussi localisé dans les stomates. L'analyse des mutants du transporteur NRT1.1 montre que ceux-ci présentent une résistance au stress hydrique, ce qui suggère un contrôle possible par le transporteur NRT1.1 des flux hydriques et nitriques *via* sa double localisation dans les tissus conducteurs et dans les cellules de garde des stomates.

Localisation des transporteurs AtNRT1.2 et AtNRT1.5 : l'étude de l'activité histochimique GUS et les études d'hybridation *in situ* (HIS) ont montré que le transporteur NRT1.5 est exprimé constitutivement et exclusivement dans la stèle (Lin *et al.*, 2008). Une étude récente a montré qu'il joue un rôle capital, mais non déterminant, dans le chargement du xylème et la translocation du nitrate vers les parties aériennes. En effet, la translocation du nitrate n'est pas totalement éliminée chez le mutant *nrt1.5* (Lin *et al.*, 2008). L'étude par HIS du transporteur NRT1.2 a révélé qu'il était constitutivement et spécifiquement exprimé dans les poils absorbants et les cellules épidermiques (Huang *et al.*, 1999).

En résumé, ces résultats montrent que les transporteurs NRT1.1 et NRT2.1 sont induits par le nitrate et possèdent un rôle majeur dans l'absorption du nitrate. Comme le montre la figure II.10, les **transporteurs sont localisés en parallèle dans les différentes assises cellulaires de la**



Transporteurs de nitrate

- *AtNrt2.1* et *AtNrt2.2*
- *AtNrt1.2*
- *AtNrt1.1*
- *AtNrt1.5*

Figure II.10: Coupe transversale schématique d'une racine primaire mature d'*A. thaliana*, représentant les différentes assises cellulaires ainsi que la répartition des principaux transporteurs de nitrate: Nrt2.1 ●, Nrt2.2 ●, Nrt1.1 ●, Nrt1.2 ●, Nrt1.5 ●. La localisation des transporteurs a été déduite à partir d'études d'hybridation *in-situ* et les activités histochimiques GUS et GFP chez des plantules transgéniques *pNRT::GUS* et *pNRT::GFP* (d'après Guo *et al.*, 2001 and 2002; Remans *et al.*, 2006a et b; Girin *et al.*, 2007; Orsel *et al.*, 2007; Chopin *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2008).

racine mature plutôt qu'en série sur la seule membrane épidermique. En effet, le transporteur NRT2.1 est situé dans les couches cellulaires épidermiques et corticales de la racine mature alors que le transporteur NRT1.1 est localisé dans les tissus de la stèle : endoderme et péricycle. Cette localisation cellulaire bouscule les idées reçues. En termes de structure-fonction (localisation-transport et/ou perception du signal nitrate), elle suggère un rôle complémentaire, voire une coordination ou un couplage possible entre de ces deux types de transporteurs.

B.4. Correspondance entre les données cinétiques et les données moléculaires

B.4.1. L'apport des mutants dans l'analyse des cinétiques d'absorption du nitrate

L'utilisation des mutants des gènes codants les transporteurs NRT2.1, NRT2.2 et NRT1.1 montre qu'il n'existe pas de correspondance simple entre un transporteur et un système de transport de type I (HATS) et II (LATS) : ce qui se comprend aisément au vu de la complexité et la localisation cellulaire des transporteurs : NRT1, NRT2, CIC et NAXT. Ainsi, chez *A. thaliana*, un mutant de délétion pour les gènes *Nrt2.1* et *Nrt2.2* : *nrt2.1-nrt2* montre une cinétique d'absorption modifiée pour la composante inductible du système HATS mais aucune modification de la composante LATS (Filleur *et al.*, 2001 ; Fig. II.11). De même, chez *A. thaliana*, des mutants d'insertion de l'ADN-T, *nrt2.1*, *nrt2.2* et *nrt2.1-nrt2.2*, révèlent que ces transporteurs interviennent de façon additive dans la composante iHATS (Li *et al.*, 2007). Cependant, ces mutants *nrt2.1* et *nrt2.1-nrt2.2* présentent une absorption réduite de moitié mais conservent un caractère inductible par le nitrate (Filleur *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2007). Si cette étude valide la démarche mathématique consistant à soustraire les valeurs de la V_m du système HATS aux valeurs d'influx obtenues aux fortes concentrations pour mettre en évidence le cLATS (Fig. II.12), en revanche, elle n'épuise pas la composante inductible et n'élimine pas la composante constitutive du système HATS suggérant que d'autres transporteurs sont impliqués.

L'utilisation d'un mutant du gène codant le transporteur NRT1.1 (*chl1.1-5*) révèle que ce transporteur est partiellement responsable du profil biphasique correspondant au fonctionnement du HATS et du LATS sur une gamme de concentrations de 0,05 à 10 mM de nitrate (Doddema et Telkamp, 1979; Huang *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2008). Il a été clairement démontré en système hétérologue (oocyte de xénope) que cette double affinité du transporteur NRT1.1 pour le nitrate est due à une phosphorylation sur la thréonine 101. Ainsi, lorsque le transporteur est phosphorylé, il présente une forte affinité pour le nitrate et, lorsqu'il est déphosphorylé, le

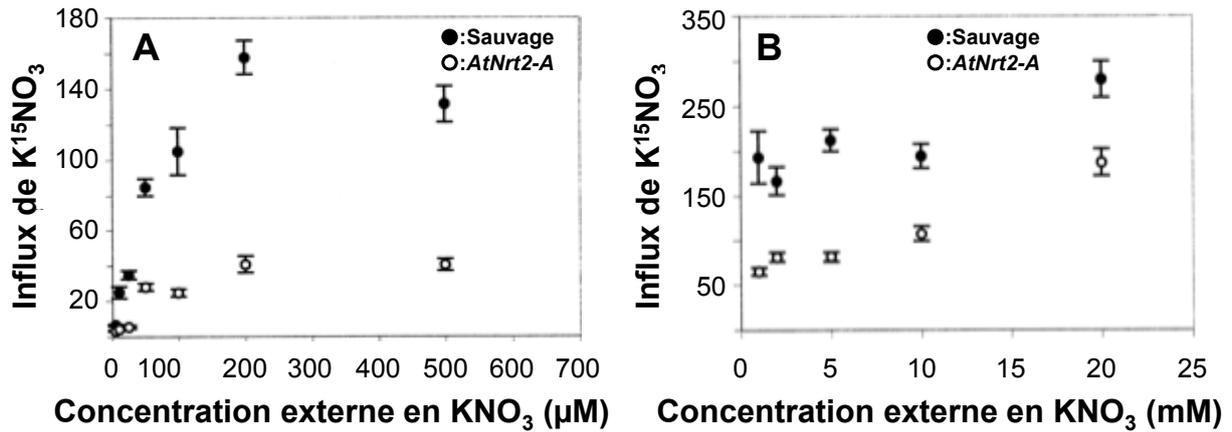


Figure II.11: Comparaison des cinétiques d'influx de nitrate chez les plantes sauvages (●) et les plantes mutantes *atnrt2-A* (○) (*atnrt2.2-nrt2.2*). Les plantes sont cultivées en hydroponie en présence de 1 mM de NH_4NO_3 , puis sont transférées dans un milieu avec 1 mM de KNO_3 pendant sept jours. **A)** Activité du système HATS: les concentrations de $K^{15}NO_3$ sont comprises entre 5 et 500 μM . **B)** Activité du système HATS et LATS: les concentrations de $K^{15}NO_3$ sont comprises entre 1 et 20 mM. Les mesures d'influx de nitrate dans les racines sont effectuées après 5 minutes de marquage au $K^{15}NO_3$ et sont exprimées en $\mu mol K^{15}NO_3 \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ de MS racinaire (\pm ES; $n = 6$) (d'après Filleur *et al.*, 2001).

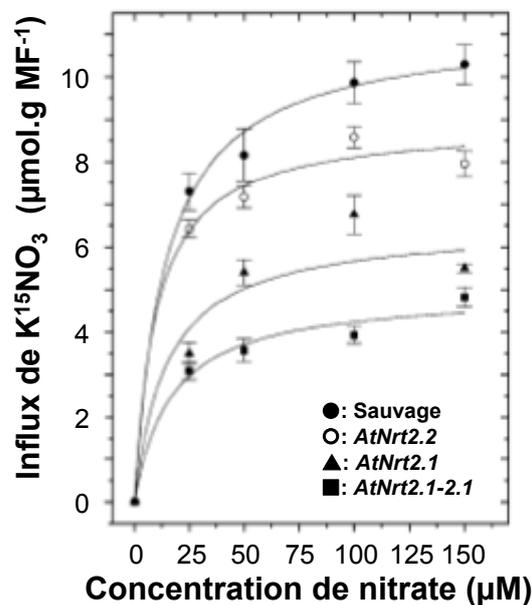


Figure II.12: Comparaison des cinétiques d'influx de nitrate des plantes d'*A. thaliana* âgées de 5 semaines: sauvages (●), simples mutantes pour les gènes *AtNrt2.2* (○), *AtNrt2.1* (▲) et double mutantes pour les gènes *atnrt2.1-nrt2.2* (■). Les plantes sont cultivées en présence de 1 mM de NH_4NO_3 pendant 4 semaines, puis sont privées de nitrate pendant 7 jours. Les racines sont ensuite exposées à 1 mM de KNO_3 pendant 6h avant les mesures d'influx à l'aide d'un marquage au $K^{15}NO_3$ (\pm ES; $n = 6$) (d'après Li *et al.*, 2007).

transporteur présente alors une faible affinité (Liu *et al.*, 2003; Fig. II.13). Ce transporteur intervient donc à la fois dans la partie constitutive des systèmes HATS et LATS. L'absorption résiduelle observée chez les mutants *chl1.5* et *35S-T101A* présente encore un profil biphasique d'absorption nette sur la gamme de concentration de nitrate utilisée. Par conséquent, le transporteur NRT1.1 n'intervient que partiellement dans les composantes cHATS et cLATS (Fig. II.14).

B.4.2. Limites de l'interprétation enzyme-substrat

La recherche d'une correspondance entre les données cinétiques et les données moléculaires fait apparaître plusieurs limites interprétatives de l'équivalence enzyme-substrat proposée par Epstein (Forde et Clarkson, 1999). Les études basées sur la fonction doivent désormais tenir compte non seulement de la structure racinaire, *via* la localisation des transporteurs dans les différentes assises cellulaires, mais également des études transcriptomiques correspondant aux familles de gènes des transporteurs NRT2, NRT1, CIC et NAXT ainsi que de l'analyse des cinétiques d'absorption de mutants correspondant à des transporteurs spécifiques.

Une première limite de l'interprétation enzyme-substrat provient du fait qu'elle suppose implicitement que les différentes assises cellulaires se résument à une seule assise épidermique où les transporteurs sont disposés en série dans la membrane plasmique. Comme nous l'avons vu précédemment, (cf §: II.Fonction.B.3) ce n'est pas le cas.

Une deuxième limite provient de la redondance fonctionnelle des transporteurs de nitrate et l'implication d'au moins 4 familles différentes de gènes des transporteurs : NRT2, NRT1, CIC et NAXT. Comme de nombreux gènes s'expriment de façon constitutive ou peuvent être induits par le nitrate (Orsel *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 2003), ces résultats impliquent que les mesures d'influx sont en fait des mesures de conductance et en aucun cas des mesures d'activité spécifique, ce que confirment les analyses des mutants. En conséquence, la racine doit être considérée comme une structure catalytique complexe faisant intervenir de multiples transporteurs disposés en série et en parallèle sur les membranes plasmiques et tonoplastiques dont les actions additives, couplées et coordonnées, conduisent à des valeurs de conductance spécifique. Par ailleurs, chez les espèces cultivées polyploïdes comme le Blé et le Colza, la redondance fonctionnelle de ces quatre familles de gènes est encore amplifiée par la redondance des génomes. De fait, chez ces espèces, des approches de type RNAi ou pharmacologiques, pour évaluer l'importance de certains transporteurs dans l'absorption du nitrate, l'efficacité de prélèvement et de l'utilisation de l'azote, sont donc préférables aux approches mutants utilisées sur *A. thaliana*.

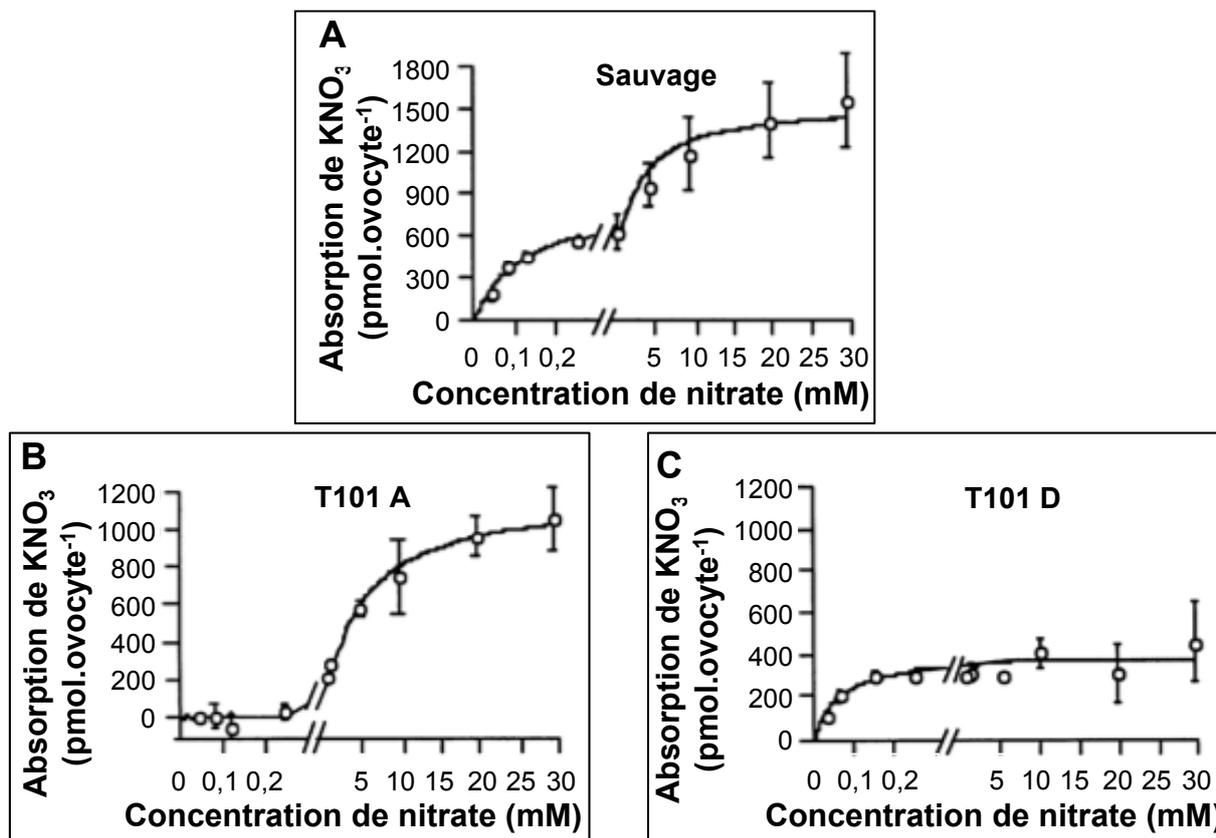


Figure II.13: Cinétique d'absorption du nitrate chez des ovocytes de xénope exprimant les ARNc du transporteur NRT1.1 sauvage (A) ou muté (B et C) au niveau de la tyrosine en position 101. A) ARNc non muté correspondant au gène *CHL1* (*AtNrt1.1*), B) ARNc avec une alanine en position 101 (T101A), C) ARNc avec un aspartate en position 101 (T101D). L'absorption est déterminée après incubation pendant 1,5 h à pH 5,5 sur une gamme de concentrations de 40 μ M à 30 mM de nitrate. La partie comprise entre 0 et 0,3 mM de nitrate est agrandie. Chaque point de mesure représente 3 répétitions composées chacune de cinq ovocytes (d'après Liu et al., 2003).

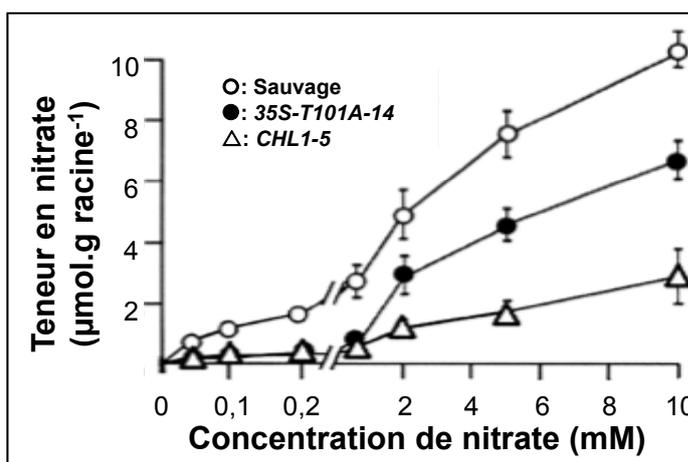


Figure II.14: Comparaison des cinétiques de l'absorption de nitrate chez des plantes sauvages (O) et des mutants *chl1-5* (Δ) ou exprimant la construction: 35S-T101A-14 (\bullet). Les plantes sont cultivées pendant 8 jours sur un milieu NH_4^+ , puis transférées sur des concentrations variables de nitrate comprises entre 0,04 à 10 mM de KNO_3 pendant 40 min. La partie entre 0 et 0,2 mM de nitrate est agrandie ($n = 3$; d'après Liu et Tsay, 2003).

Une troisième limite est apportée par la double affinité du transporteur NRT1.1 en fonction de son état de phosphorylation. Le fonctionnement de ce transporteur invalide l'ajustement mathématique et l'interprétation d'Epstein qui déduit l'existence de deux systèmes distincts de transport de nitrate.

Nous n'aborderons pas ici les arguments biochimiques et biophysiques sur les cinétiques enzymatiques qui démontrent le caractère inconsistant et très discutable de cette interprétation. Pour s'en convaincre, il suffit de lire l'ouvrage sur les cinétiques enzymatiques de Cornish-Bowden *et al.*, (2005). Pour l'ensemble de ces raisons, il est urgent et nécessaire de reprendre et de discuter les hypothèses explicites et implicites de la théorie enzyme-substrat appliquée au transport ionique. Même si cette théorie est à l'origine de nombreuses connaissances sur l'absorption des éléments minéraux, elle montre aujourd'hui ses faiblesses. A notre sens, cette révision s'impose si les physiologistes et les agronomes souhaitent enfin utiliser un formalisme mathématique générique, unique et réaliste, pour l'absorption de l'eau et des éléments minéraux, dans les modèles écophysiologicals et agronomiques, comme certains modèles structure-fonction le laissent déjà judicieusement apparaître (King *et al.*, 2003).

C. Contrôle de la fonction nutritionnelle azotée à l'échelle de l'organe et de la plante entière

Dans cette section, nous considérons deux types d'études : (i) des études dites de court terme (heures-jour) portant essentiellement sur la régulation transcriptionnelle des transporteurs de nitrate des familles NRT1 et NRT2 dans la racine, en mettant l'accent sur les transporteurs NRT1.1, NRT2.1 et NRT2.2 et, (ii) des études dites de long terme (jours-semaine), qui considèrent les régulations racinaires du transport du nitrate, à l'échelle de la plante entière, faisant intervenir les notions de croissance et de demande en azote, de signal nitrate, de perception du signal nitrate et du statut N.

C.1. Régulations physiologiques et moléculaires des transporteurs de nitrate par le statut N

C.1.1. Induction par les concentrations faibles en nitrate

L'étude de la transcription des gènes de la famille NRT2 a montré que les gènes *Nrt2.1* et *Nrt2.2* sont rapidement induits par le nitrate à leur niveau maximal au bout de trois heures de

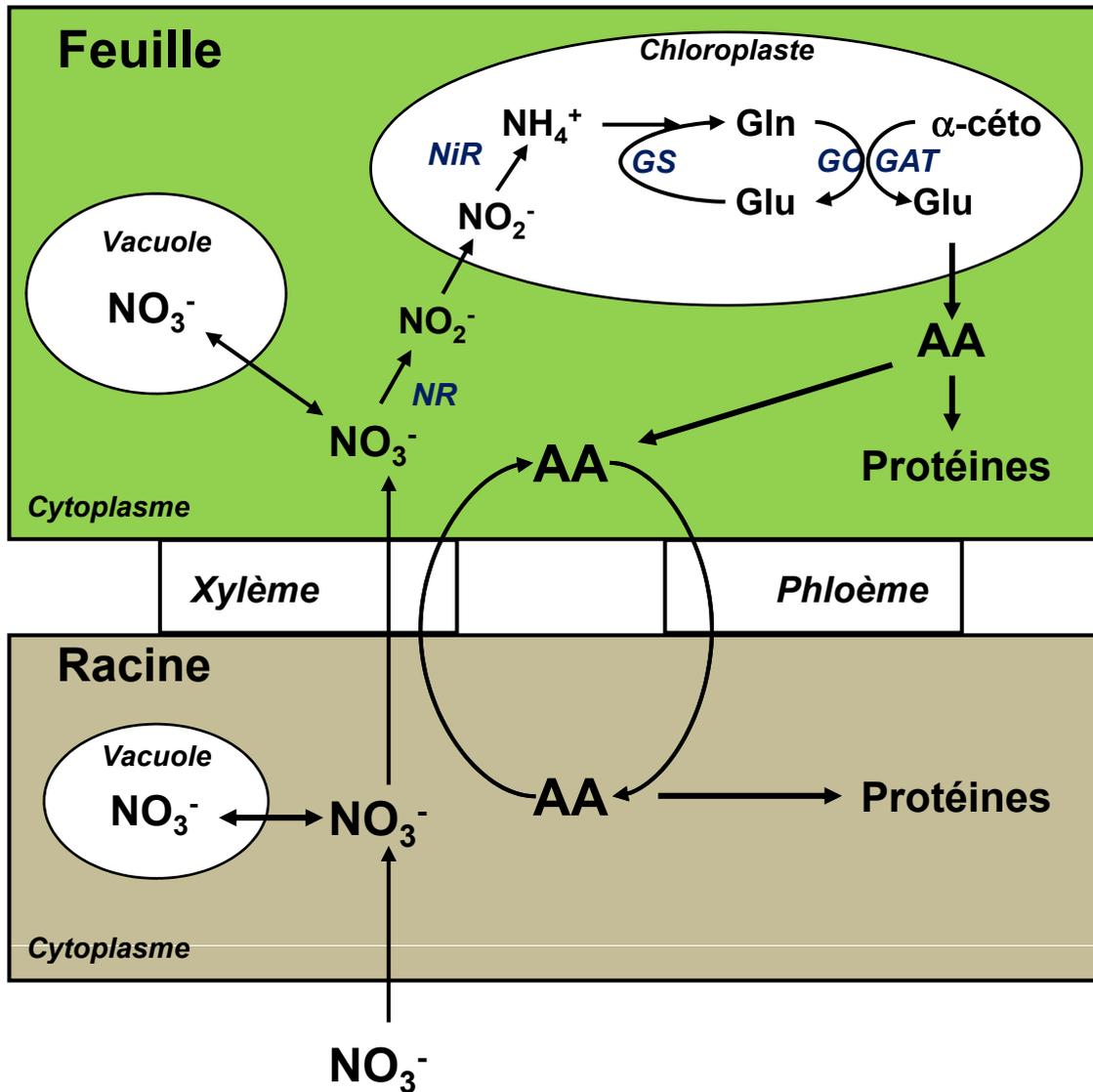


Figure II.15: Schéma simplifié de l'absorption et de l'assimilation du nitrate chez les plantes supérieures. NR: nitrate réductase; NiR: nitrite réductase; GS: glutamine synthétase; GOGAT: glutamate synthase; Gln: glutamine; Glu: glutamate; α -céto: α -cétoglutarate; AA: acides aminés (d'après Guignard, 2000).

traitement chez des plantes préalablement privées de nitrate pendant une semaine et réalimentées par 0,5 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (Orsel *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 2003). Ces études, plus systématiques, confirment les travaux antérieurs sur le gène *Nrt2.1* chez l'Orge (Trueman *et al.*, 1996; Vidmar *et al.*, 2000), *N. plumbaginifolia* (Krapp *et al.*, 1998), le Soja (Amarasingh *et al.*, 1998), *A. thaliana* (Filleur et Daniele-Vedele 1999; Zhuo *et al.*, 1999) et *B. napus* (Faure-Rabasse *et al.*, 2002). De très faibles concentrations de nitrate (10 à 50 μM) sont capables d'induire les gènes *Nrt2.1* et *Nrt2.2* (Krapp *et al.*, 1998; Filleur et Daniel-Vedele, 1999; Faure-Rabasse *et al.*, 2002), ce qui est cohérent avec leur implication dans la composante inductible du système de transport iHATS mis en évidence chez les mutants *Atnrt2* et *Atnrt2.1-nrt2.2* chez *A. thaliana* (Filleur *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2007).

Parmi les quatre gènes de la famille NRT1 étudiés chez *A. thaliana*, seuls le gène *Nrt1.1* est inductible par le nitrate. Ce résultat confirme les travaux antérieurs de Zhou *et al.* (1998) et Filleur et Daniel-Vedele (1999) mais infirme le fait que le transporteur NRT1.2 soit également inductible à court-terme par le nitrate (Huang *et al.*, 1999).

C.1.2. Inhibition par les produits de réduction et d'assimilation du nitrate

La réduction du nitrate fait intervenir séquentiellement la nitrate réductase (NR) qui produit du nitrite, puis la nitrite réductase (NiR) qui produit de l'ammonium. Ce dernier est utilisé par la glutamine synthétase (GS) qui produit la glutamine en consommant une molécule de glutamate. La glutamine est ensuite convertie par la glutamate synthétase (GOGAT) en présence d'une molécule α -cétoglutarate en deux molécules de glutamate. Celui-ci constitue la plaque tournante de l'azote dans la plante puisque sa conversion par la GS et différentes transaminases permet la production de tous les acides aminés protéinogènes (Fig. II.15).

Inhibition par le nitrite (NO_2^-)

Une étude récente a montré que les gènes *AtNrt1.1* et *Nia1* sont réprimés par le nitrite alors que le gène *Nrt2.1* y est insensible (Loqué *et al.*, 2003). Cette régulation a pu être mise en évidence chez *A. thaliana* grâce à différents mutants de la nitrate réductase. Il existe deux gènes *Nia1* et *Nia2* codant les deux isoformes de la nitrate réductase chez *A. thaliana*. Ces deux isoformes ne contribuent pas de façon équivalente à la réduction du nitrate. En effet, la comparaison entre des plantes sauvages et mutantes a montré que l'isoforme *NIA1* n'intervient que pour 10% de l'activité nitrate réductase totale (mutant *G5*) alors que le double mutant *G'4-3* pour les gènes *Nia1* et *Nia2* présente une activité NR réduite de 99,5%. Lorsque l'activité NR est fortement réduite chez le double mutant *G'4-3* (*Nia1-Nia2*) et *G5* (*Nia2*) la production de nitrite

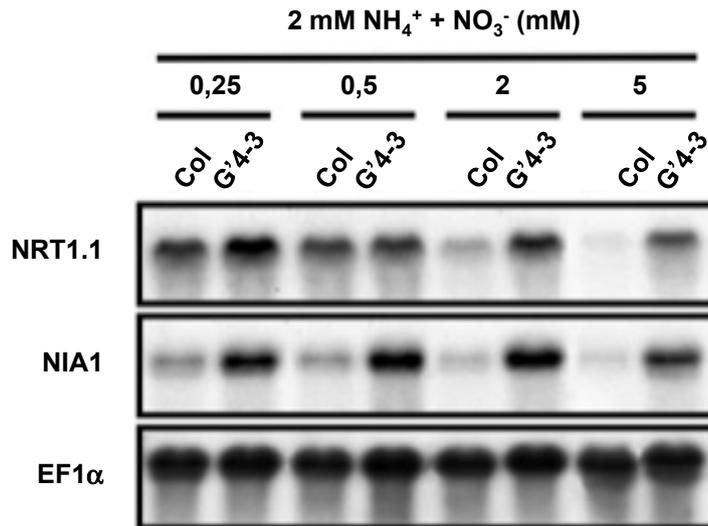


Figure II.16: Analyse par northernblot de l'expression des gènes *Nrt1.1* et *Nia1* dans les racines de plantes sauvages (Col) et mutantes (G'4-3) d' *A. thaliana*. Les plantes sont pré-traitées avec 2 mM de NH_4NO_3 pendant trois semaines, puis sont transférées pendant une semaine sur des concentrations variables de NH_4^+ et NO_3^- (de 0,25 à 5 mM) (d'après Loqué *et al.*, 2003).

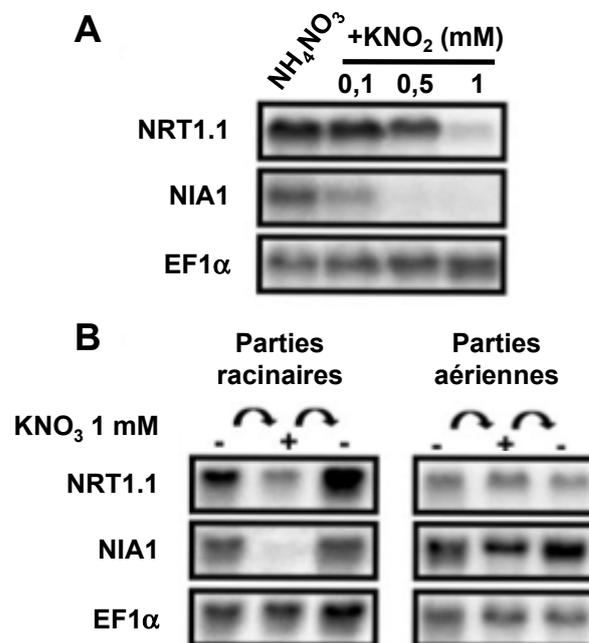


Figure II.17: Analyse par northern blot de l'expression des gènes *Nrt1.1* et *Nia1* dans les racines et les parties aériennes de plantes mutantes (G'4-3) d'*Arabidopsis*. Les plantes sont cultivées sur un milieu avec 1 mM de NH_4NO_3 pendant huit semaines. Les plantes sont ensuite transférées pendant 24 h sur A) des concentrations variables de 0,1 à 1 mM de KNO_2 et B) en présence de 1 mM de KNO_2 , puis les racines sont rincées pendant cinq minutes avec du CaSO_4 à 0,1 mM et sont replacées sur une solution standard pendant 24 heures. Les plantes témoins sont traitées par 1 mM de NH_4NO_3 (d'après Loqué *et al.*, 2003).

diminue et on observe une surexpression des gènes *Nrt1.1* et *Nia1* (Fig. II.16). A l'inverse, lorsque l'activité nitrate réductase reste élevée et la production de nitrite plus forte comme dans le mutant *nia::Ds* (*Nia1*) alors les gènes *Nrt1.1* et *Nia1* sont réprimés. Ces résultats ont pu être confirmés par un apport exogène de NO_2^- , qui induit une répression rapide et spécifique des gènes *Nrt1.1* et *Nia1*. Cependant, cette inhibition est réversible lorsque le NO_2^- est retiré de la solution nutritive (Fig. II.17). Ces résultats montrent clairement que le nitrite, premier produit de l'assimilation du nitrate, exerce un rétro-contrôle majeur dans la régulation du gène *Nrt1.1*, lorsque l'alimentation en nitrate et sa réduction atteignent leur niveau maximal.

Inhibition par l'ammonium

Si l'expression du gène *Nrt2.1* n'est pas régulée par le nitrite comme le gène *Nrt1.1*, en revanche son expression est affectée par la présence du NH_4^+ . En effet, l'expression du gène *Nrt2.1* est fortement réprimée en présence de NH_4^+ dans la solution nutritive (Amarasinghe *et al.*, 1998; Krapp *et al.*, 1998). Par ailleurs, lorsque les plantes sont cultivées en présence de nitrate, les mutants *G'4-3* présentent une expression du gène *Nrt2.1* fortement induite comparée aux plantes sauvages. Cependant, lorsque du NH_4^+ est ajouté à la solution nutritive, l'expression du gène *Nrt2.1* est inhibée alors que l'expression du gène *Nrt1.1* est induite de façon significative (Lejay *et al.*, 1999). Ces résultats laissent supposer que les variations d'accumulation endogène de NH_4^+ sont responsables de la régulation transcriptionnelle de *Nrt2.1*. Dans ce sens, des mutants anti-sens de la Fd-GOGAT de Tabac et des mutants *Glu1-2* de la Fd-GOGAT1 d'*A. thaliana* montrent que l'accumulation de NH_4^+ dans les racines est corrélée à une réduction ou une absence d'expression des transcrits *Nrt2.1* (Touraine *et al.*, 2001; Kissen *et al.*, 2010). Chez l'Orge, l'utilisation d'inhibiteurs de la nitrate réductase (tungstate), de la glutamine synthétase (méthionine sulfoximine) et de la GOGAT (azaserine) confirme que le NH_4^+ est responsable de l'inhibition transcriptionnelle du gène *Nrt2.1*. (Vidmar *et al.*, 2000). Cependant, comme l'apport exogène du NH_4^+ inhibe l'influx de nitrate et augmente l'efflux de nitrate en quelques minutes, ces résultats n'excluent pas la possibilité d'une inhibition post-transcriptionnelle de l'activité du transporteur NRT2.1 par le NH_4^+ (Kronzucker *et al.*, 1999).

Rétro-contrôle par les acides aminés

Le NH_4^+ n'est pas le seul inhibiteur de l'absorption du nitrate. En effet, il a été démontré depuis longtemps que les acides aminés, produits directs de l'assimilation du nitrate, sont capables de réguler l'absorption du nitrate et l'expression du gène *Nrt2.1* (Muller and Touraine, 1992; Muller *et al.*, 1995 ; Zhuo *et al.*, 1999; Vidmar *et al.*, 2000). Les travaux de Vidmar *et al.* (2000) à

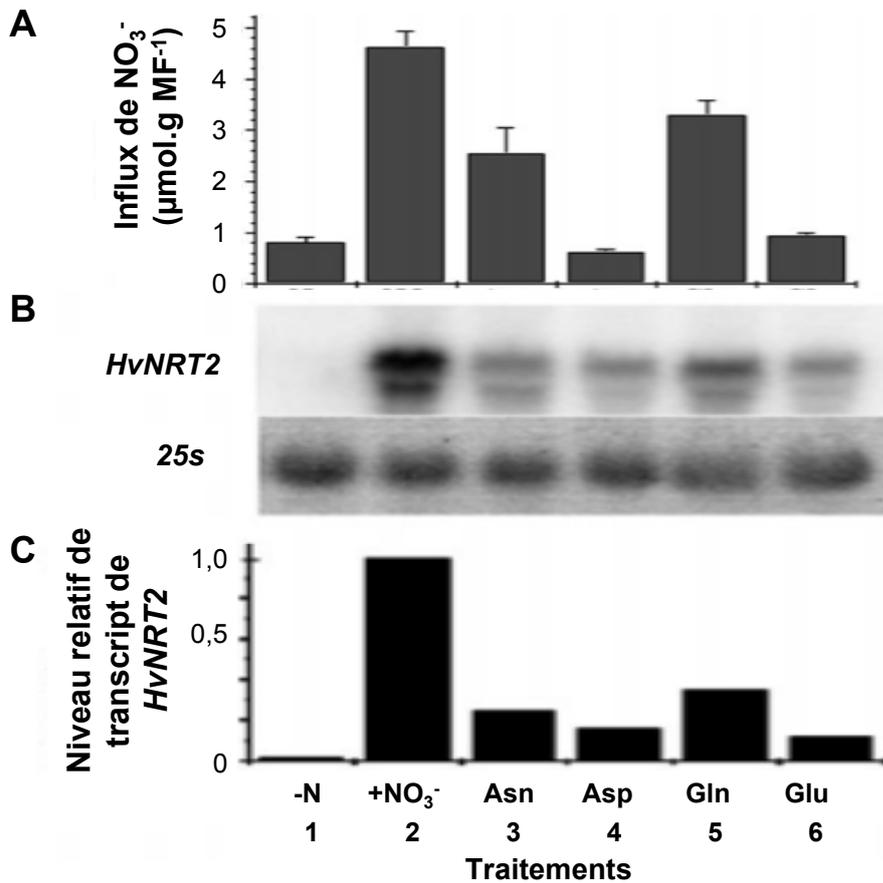


Figure II.18: Effet d'un apport exogène d'acide aminé sur l'influx de $K^{13}NO_3$ et sur la transcription du gène *HvNrt2.1* dans les racines de plantules d'orge âgées de 7 jours. Les plantules sont cultivées sur la solution de Johnson sans azote diluée au 1/10. **A)** L'influx de nitrate est mesuré à l'aide de $50 \mu M$ de $K^{13}NO_3$ ($n=4$). **B)** Analyse par northern blot de l'expression de *HvNrt2.1* racinaire. **C)** Expression relative moyenne des transcripts. L'abondance relative est calculée par rapport au traitement 1 après 6 h de traitement nitrate. Les traitements acides aminés sont appliqués pendant 6 heures avant les mesures: **1:** sans KNO_3 ; **2:** 10 mM de KNO_3 ; **3:** 10 mM de KNO_3 + 1mM Asn; **4:** 10 mM de KNO_3 + 1mM Asp; **5:** 10 mM de KNO_3 + 1mM Gln; **6:** 10 mM de KNO_3 + 1mM Glu (d'après Vidmar *et al.*, 2000).

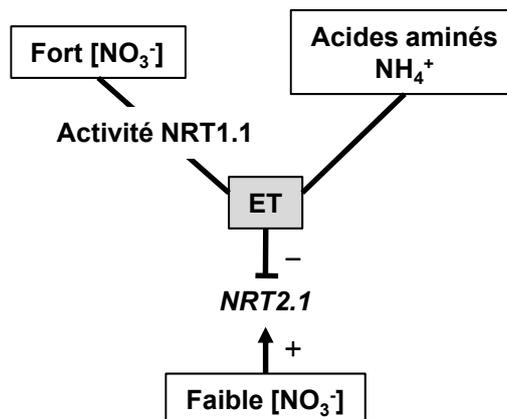


Figure II.19: Modèle hypothétique de régulation de l'expression du transporteur AtNRT2.1 dans les racines d'*Arabidopsis*. Le modèle suppose que l'expression du transporteur AtNRT2.1 peut être induite par le nitrate mais être rétro-inhibée par les produits de l'assimilation de l'azote (acides aminés ou NH_4^+) et l'activité du transporteur NRT1.1 en présence de fortes concentrations de nitrate (d'après Krouk *et al.*, 2006).

l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques de la nitrate réductase (tungstate), de la glutamine synthétase (méthionine sulfoximine) et de la GOGAT (azaserine) ont cherché à identifier le ou les acides aminés clés de cette régulation. Ainsi, l'inhibition de la GOGAT par l'azaserine permet d'augmenter le pool endogène de glutamine libre qui est alors corrélé avec une diminution de l'absorption du nitrate et des transcrits *HvNrt2.1*. De même, l'apport exogène des acides aminés, comme Ala, Asn, Asp, et Glu, induit une augmentation du pool de glutamine et une diminution concomitante de l'absorption du nitrate et des transcrits de *HvNrt2.1*. Ces résultats laissent supposer que la glutamine pourrait être le principal inhibiteur de la transcription du gène *Nrt2.1* (Vidmar *et al.*, 2000; Fig. II.18). Dans d'autres études physiologiques chez *A. thaliana* et *B. napus*, les corrélations établies entre le niveau d'expression du gène *Nrt2.1* et les concentrations endogènes de glutamine vont dans ce sens (Nazon *et al.*, 2003; Beuve *et al.*, 2004).

C.2. Régulation du transporteur NRT2.1 par le transporteur NRT1.1

Des études approfondies chez *Arabidopsis* sur la régulation du gène *AtNrt2.1* par le statut N (nitrate et acides aminés) a révélé que le gène *AtNrt2.1* était sur-exprimé en présence de faibles concentrations en nitrate (<0,5 mM), en présence de NH_4^+ et de glutamine (Munos *et al.*, 2004; Krouk *et al.*, 2006). L'utilisation du mutant *chl1.10* du gène *AtNrt1.1* a permis de montrer que dans ces conditions, l'activité du transporteur NRT1.1 est requise pour déréguler le gène *AtNrt2.1* selon le mécanisme de régulation présenté dans la figure II.19. L'hypothèse éco-physiologique proposée pour expliquer ce phénomène suppose que ce mécanisme a pour but de prévenir les effets néfastes d'une alimentation unique ammoniacale. Cette hypothèse a été confirmée par l'utilisation des mutants *nrt2.1-1* et *nrt2.1-2* en situation d'alimentation ammoniacale (1 mM NH_4^+).

C.3. Régulations physiologiques et moléculaires des transporteurs de nitrate par le statut C

C.3.1. Régulation par la lumière et les sucres

Il est reconnu depuis longtemps que l'absorption du nitrate est régulée au cours du cycle nyctéméral (Dehlon *et al.*, 1995, Cardenas-Navarro *et al.*, 1998, MacDuff et Bakken 2003, Malagoli *et al.*, 2004). Chez *Arabidopsis*, ces variations d'absorption sont corrélées aux variations d'expression des gènes *AtNrt1.1* et *AtNrt2.1*. Ceux-ci montrent des changements diurnes importants avec une baisse significative d'expression au cours de la phase nocturne (Lejay *et al.*,

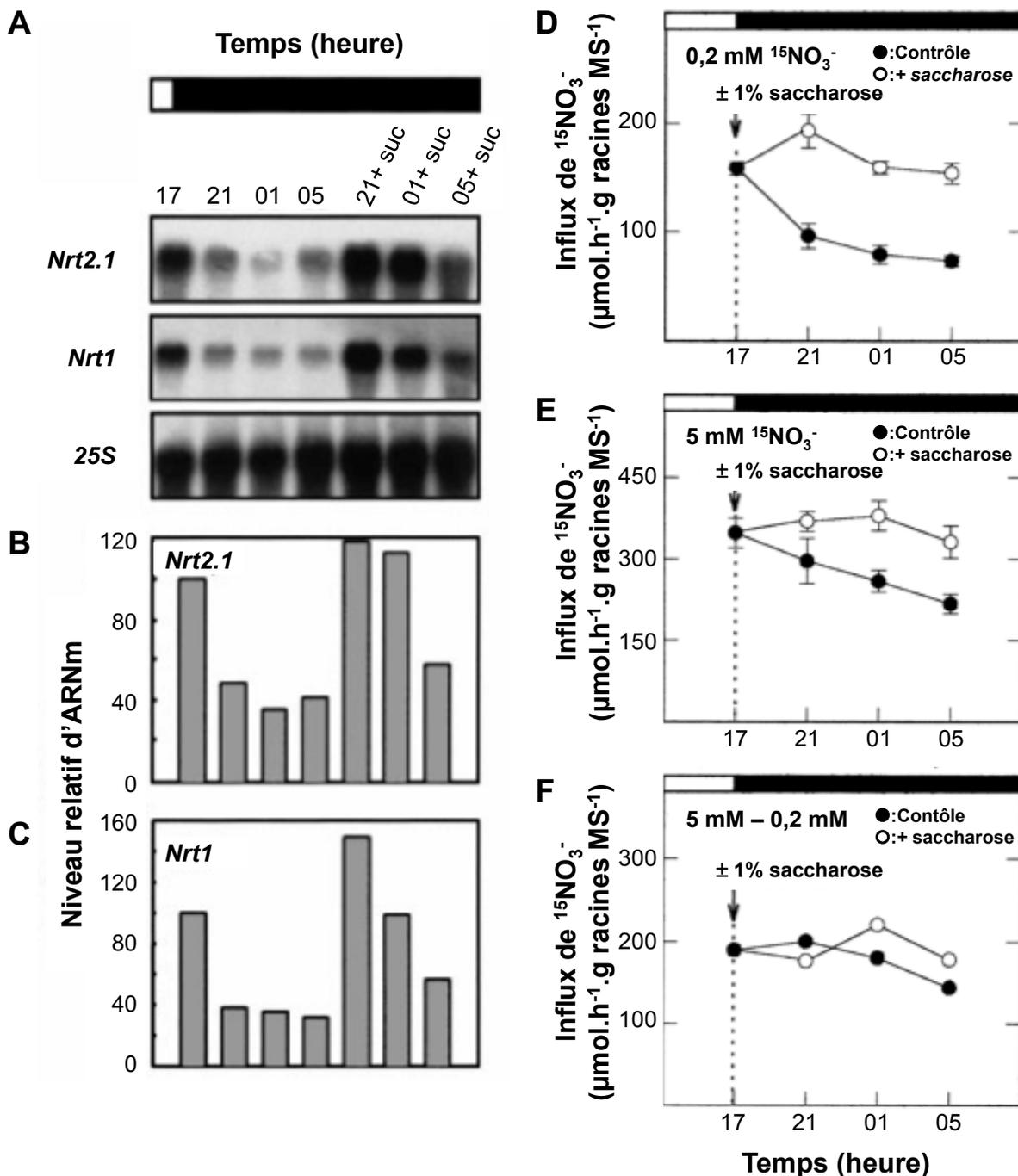


Figure II.20: Effet du saccharose lors de la transition entre le jour et la nuit (barre supérieure noire) sur l'expression des gènes *AtNrt2.1* et *AtNrt1.1* et l'absorption de K^{15}NO_3 dans les racines d'*Arabidopsis* âgées de six semaines, en présence de 1 mM de KNO_3 . Les plantes traitées reçoivent 1% de saccharose à 17h (○) et des antibiotiques alors que les plantes contrôle (●) reçoivent uniquement des antibiotiques. **A)** Analyse par northernblot de l'expression relative de **B)** *AtNrt2.1* **C)** *AtNrt1.1* par rapport au gène de référence codant l'ARNr 25S. L'influx de K^{15}NO_3 est mesuré après cinq minutes de marquage, pour les concentrations de **D)** 0,2 mM de nitrate et **E)** 5 mM **F)** la différence entre les valeurs d'influx obtenues en **D)** et **E)** permettent de déterminer l'influx du système LATS à 5 mM de nitrate ($n = 12$; \pm ES; d'après Lejay *et al.*, 1999).

1999). L'apport exogène de saccharose durant la phase nocturne induit une augmentation de l'influx du nitrate ainsi qu'une augmentation des transcrits *AtNrt1.1* et *AtNrt2.1* (Fig. II.20). Une corrélation entre l'intensité lumineuse et le saccharose suggère un contrôle *via* des mécanismes identiques, c'est-à-dire *via* des produits de la photosynthèse. L'utilisation d'analogues de sucres (3-*O*-méthylglucose, 2-déoxy-glucose, et mannose) ainsi que l'utilisation de plusieurs mutants de la perception du signal sucre (*rs1-1*, *sun6* et *gin1-1*) ont permis de montrer que la régulation de *AtNrt2.1* fait intervenir d'autres voies et mécanismes de perception du signal sucre. L'inhibition par le glucose et le saccharose des transcrits *AtNrt2.1* chez une lignée anti-sens pour l'hexokinase1 (HXK1) plaide en faveur d'un rôle majeur de cette activité catalytique ou des produits du métabolisme carboné, situés en aval de l'hexokinase1, dans la régulation du gène *Nrt2.1* (Lejay *et al.*, 2003). L'exploration plus systématique des réponses des transporteurs AtNRT1.1 et AtNRT2.1, à l'aide de traitements par des sucres phosphorylés, des analogues de sucres, du CO₂ et des intensités lumineuses variées, a révélé une corrélation entre les concentrations de glucose-6P et l'expression de *AtNrt1.1* et *AtNrt2.1*. L'inhibition des gènes *AtNrt1.1* et *AtNrt2.1* par la 6-amino-nicotinamide (inhibiteur de la phosphogluconate déshydrogénase), en présence de saccharose, démontre que la voie des pentoses phosphates (OPP) intervient dans la perception du signal sucre en relation avec le prélèvement d'azote. Cependant, le mécanisme par lequel la voie OPP gouverne la régulation du prélèvement d'azote, *via* le statut carboné, reste encore à élucider (Lejay *et al.*, 2008).

C.3.2. Régulation par les hormones

A l'échelle de la plante entière, les réponses morphologiques des racines et des parties aériennes au signal nitrate font intervenir des voies de signalisations locales et à longue distance (systémique) liées à la synthèse et au transport des hormones (Forde, 2002 ; Kiba *et al.*, 2011). De plus en plus d'études commencent à établir clairement les liens entre les voies de signalisation des hormones et l'absorption du nitrate lors de la croissance et du développement (Gutiérrez *et al.*, 2007; Nero *et al.*, 2009).

Auxine

L'utilisation de plantes d'*A. thaliana* transformées par une construction *NRT1.1::GUS* ou *GFP* a révélé que l'application exogène d'auxine (AIA) ou l'introduction dans ces transformants des mutations *yucca* et *rooty* (induisant une surproduction d'auxine) provoque une sur-expression du gène *AtNrt1.1* dans les parties aériennes et les racines (Guo *et al.*, 2001 et 2002 ; Fig. II.21). Dans les racines traitées par l'AIA, le niveau de transcrit du gène *AtNrt1.1* augmente après 30

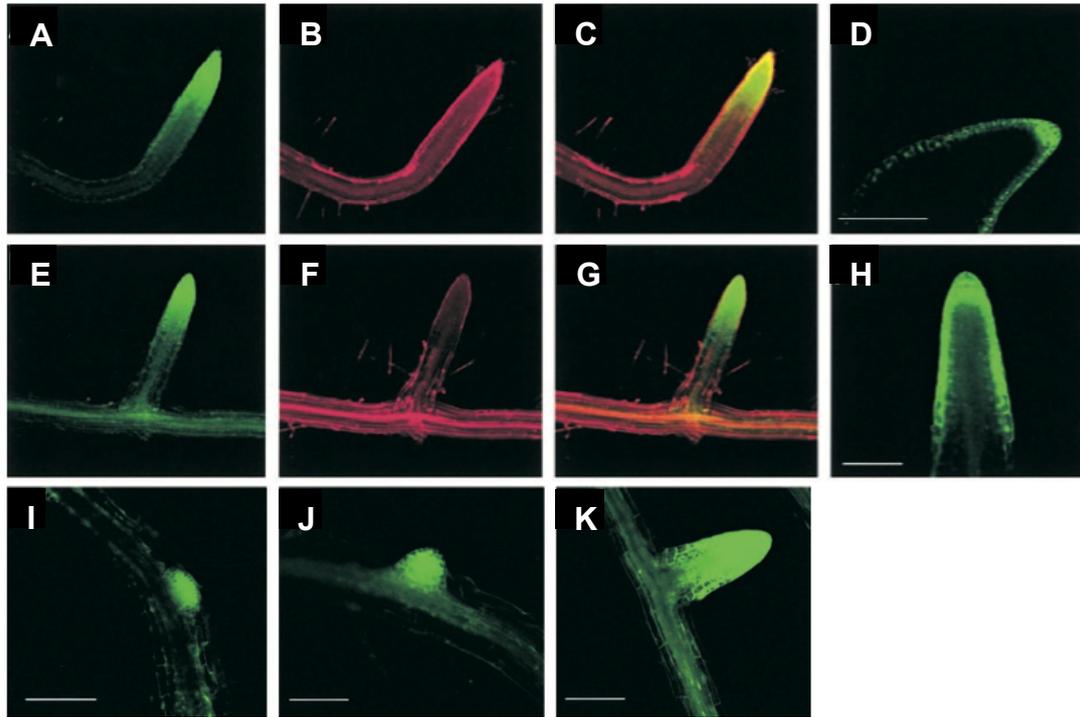


Figure II.21: Analyse de l'expression de constructions HaeII CHL1-GFP dans les racines d'*A. thaliana*, en microscopie confocale laser. **A-C)** Coupes longitudinales de la racine primaire de plantules âgées de cinq jours. **A)** Signal GFP seul. **B)** Racine traitée par du iodure de propidium (IP: marqueur de paroi cellulaire). **C)** Combinaison des images **A** et **B**. **D** et **H)** Coupes longitudinales de la pointe de racine primaire de plantule de un jour **D)** et trois jours **H)** Barre d'échelle = 100 μ m. **E-G)** Coupe longitudinale de racine secondaire de plantule âgée de sept jours. **E)** Signal GFP seul. **H)** Image PI. **G)** combinaison des images **E** et **H**. **I-K)** Analyse de l'expression d'une construction de gène : *CHL1::GFP* lors de la formation de racine latérale. **I)** Stade VI. **J)** La racine émerge. **K)** La racine émerge complètement, avec l'apparition de tissus mature (d'après Guo *et al.*, 2001).

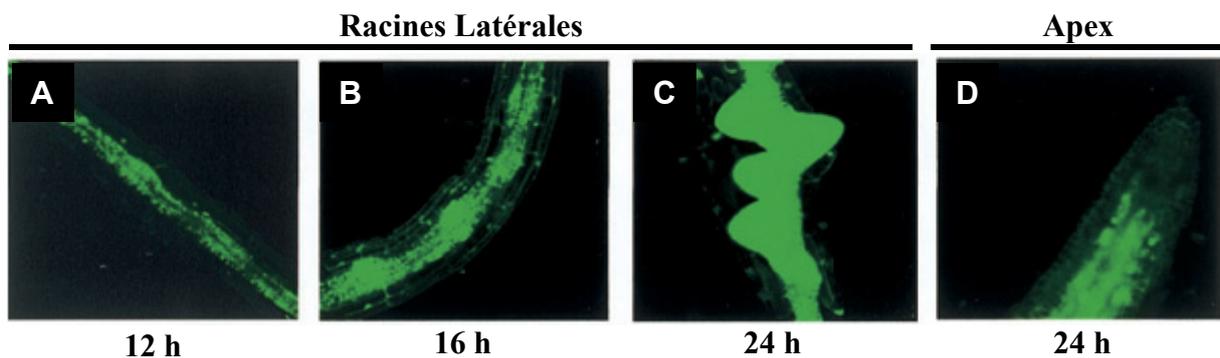


Figure II.22: Profil d'expression d'une construction de gène: *CHL1::GFP* lors de la formation des racines latérales dans les parties matures de racines d'*A. thaliana* en présence de 10 μ M d'AIA. L'expression est suivie durant 24 h après exposition à l'IAA, par microscopie confocale: **A)** après 12 h, **B)** 16 h et **C)** 24 h de traitement. **D)** Expression dans la pointe de la racine primaire, après 24 h d'exposition à l'AIA (d'après Guo *et al.*, 2002).

minutes de traitement. Par ailleurs, la similitude dans la distribution d'expression du gène *AtNrt1.1* (construction *NRT1.1::GUS*) avec celle d'un autre gène induit par l'auxine (construction *DR5::Gus*) indique qu'elle est bien un signal majeur impliqué dans la régulation du gène *Nrt1.1* (Guo *et al.*, 2002 ; Fig. II.22).

Ethylène

Il a été montré que l'apport exogène de nitrate, à de fortes concentrations, induit une synthèse importante et transitoire pendant les six premières heures d'éthylène au niveau racinaire (Tian *et al.*, 2009). Au delà de six heures, les plantes traitées par 10 mM de nitrate présentent une production d'éthylène plus importante que les plantes traitées par 0,1 mM (Fig. II.23). Par ailleurs, le traitement pharmacologique des racines d'*Arabidopsis* par 10 µM d'acide aminocyclopropane carboxylique (ACC), précurseur métabolique de l'éthylène, ou 10 µM d'aminéthoxyvinylglycine (AVG), inhibiteur de l'ACC synthétase, en présence de 0,1 ou 10 mM de nitrate, montre que l'expression des gènes *AtNrt1.1* et *AtNrt2.1* est modulée par l'éthylène. Ce résultat est confirmé par le fait que chez les mutants *etr1-3* et *ein2-1* codant des récepteurs de l'éthylène, la régulation par le nitrate des transporteurs AtNRT1.1 et AtNRT2.1 est abolie (Fig. II.24).

Cytokinines

L'effet d'une application racinaire de cytokinine (trans-zéatine) sur l'expression des gènes *AtNrt1.2-AtNrt2.7* et *AtNrt1.1-AtNrt1.7* a été analysé par PCR quantitative. Cette étude révèle que l'application exogène de cytokinine, en présence de 0,1 mM ou 10 mM de nitrate, réprime l'expression racinaire de tous les gènes *Nrt* étudiés (Kiba *et al.*, 2011). Ainsi, ce résultat suggère que l'effet des cytokinines est indépendant du statut N et qu'elles agissent comme un signal de satiété pour inhiber l'absorption du nitrate (Kiba *et al.*, 2011). Dans les parties aériennes, le même traitement a un effet stimulateur sur l'expression des gènes *AtNrt1.3*, *AtNrt1.4*, *AtNrt1.7*, *AtNrt2.6* et *AtNrt2.7*, ce qui laisse supposer que, dans les parties aériennes, les cytokinines interviennent dans la distribution et la répartition du nitrate. Ces résultats confirment des analyses transcriptomiques précédentes montrant que l'apport racinaire de cytokinines réprimait l'expression des gènes *AtNrt2.1* et *AtNrt2.3* (Sakakibara *et al.*, 2006).

En conclusion, l'ensemble de ces résultats montre que les deux principaux transporteurs de nitrate (AtNRT1.1 et AtNRT2.1) impliqués de façon majeure dans l'absorption de ce dernier au niveau racinaire et, localisés de façon complémentaire dans les

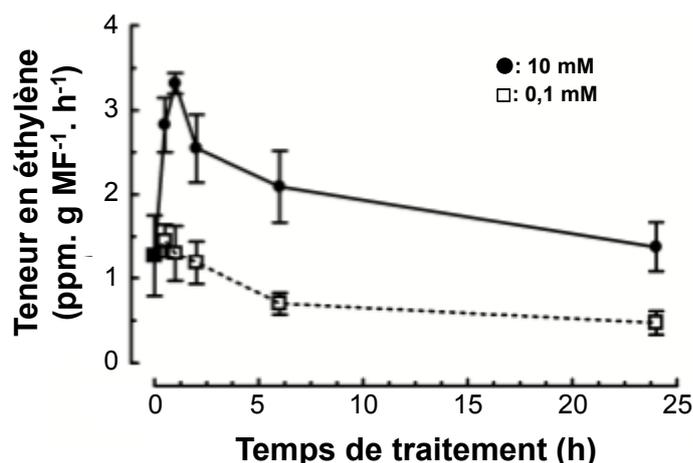


Figure II.23: Mesure des teneurs en éthylène en fonction de deux concentrations distinctes de nitrate chez des plantes sauvage d'*A. thaliana* (Col-0). Les plantes sont pré-traitées avec 0,1 mM de nitrate durant 5 jours et sont transférées sur 0,1 mM ou 10 mM de nitrate. L'évolution des teneurs en éthylène sont suivies durant 25 h après le transfert ($n = 5$; \pm ES; d'après Tian *et al.*, 2009).

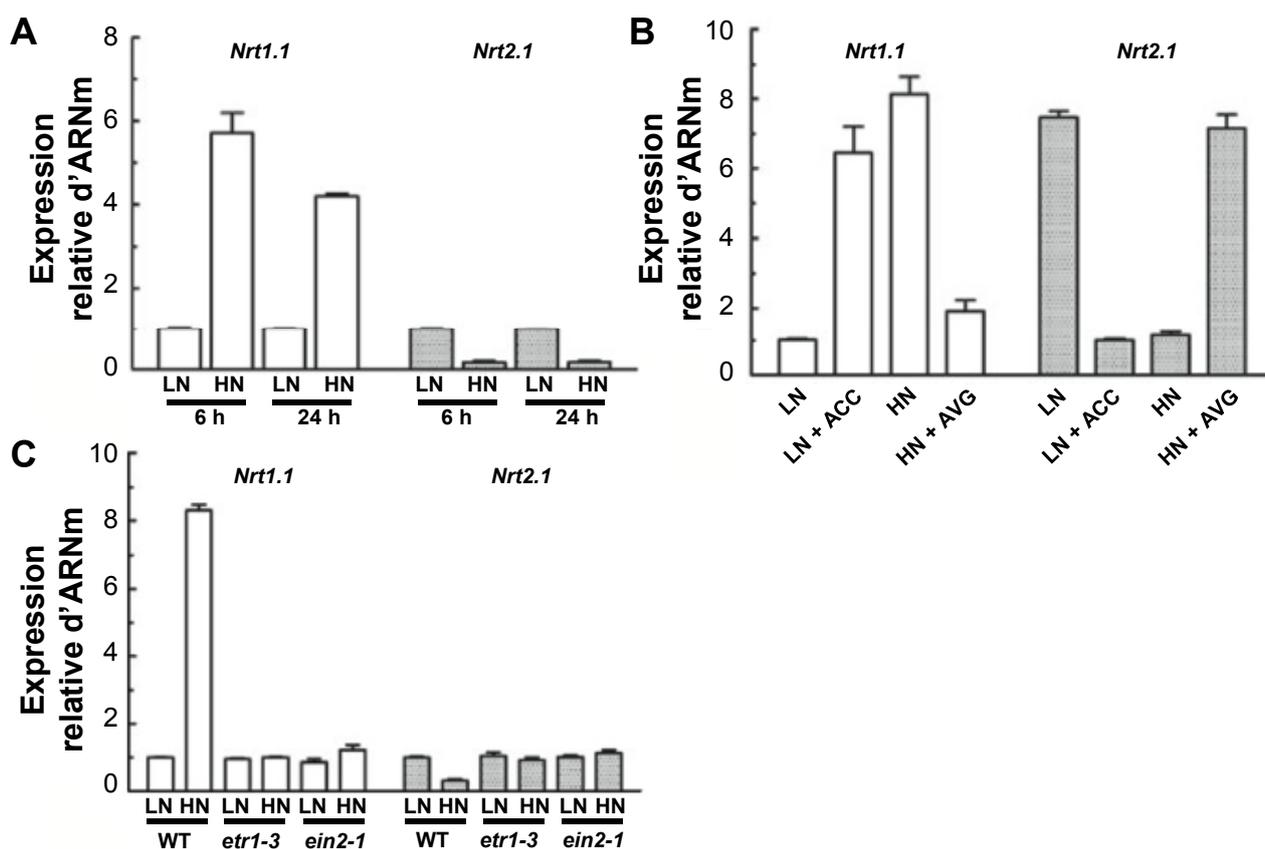


Figure II.24: Mesure de l'expression relative des gènes *AtNrt1.1* et *AtNrt2.1* chez des plantes sauvages d'*A. thaliana* en réponse à des variations de concentrations de nitrate **A)** 0,1 mM (Low N; LN) ou 10 mM (High N; HN) de nitrate. **B)** Effet des traitements ACC (10 μ M) et AVG (10 μ M) à faible (0,1 mM; LN) ou forte (10 mM; HN) concentration de nitrate. **C)** Expression de *AtNrt1.1* et *AtNrt2.1* chez différents mutants insensibles à l'éthylène : *etr1-3* et *ein2-1*. Les plantes sont pré-traitées avec 0,1 mM de KNO_3 durant cinq jours (d'après Tian *et al.*, 2009).

assises cellulaires de la racine mature, sont régulés de façon similaire par le statut C mais de façon différente par le statut N (Lejay *et al.*, 1999; Loqué *et al.*, 2003). En conséquence, il existe à ce jour seulement deux effecteurs identifiés dont le traitement des plantes peut permettre de décorréler la régulation des transporteurs AtNRT1.1 et AtNRT2.1: les acides aminés (*i.e.* Glu et Gln) et le nitrite. Les acides aminés inhibent l'expression du gène *Nrt2.1* mais n'ont aucun effet sur l'expression du gène *Nrt1.1* alors que le nitrite a un effet opposé sur la transcription de ces deux gènes. En effet, l'approche mutant pour ces deux gènes est rendue difficile du fait de la redondance fonctionnelle des gènes *Nrt* au sein des familles NRT2 et NRT1. Les effets compensatoires, faisant intervenir d'autres membres d'une même famille sont possibles, comme c'est le cas chez le mutant *atnrt2a* (*Atnrt2.1nrt2.2*) traité par de fortes concentrations externes de nitrate (Orsel *et al.*, 2004). En conséquence, l'étude de mutants spécifiques pour ces deux gènes chez des espèces polyploïdes de grande culture (*i.e.* Blé ou Colza) est actuellement irréaliste, car la redondance fonctionnelle est amplifiée par une redondance des génomes. Chez ces espèces, les approches pharmacologiques ou RNAi prennent donc tout leur sens pour comprendre l'importance relative de ces deux familles de gènes dans l'absorption du nitrate et les co-régulations qui peuvent exister entre elles.

STRUCTURE : Modification de la croissance racinaire en réponse à la disponibilité en nitrate

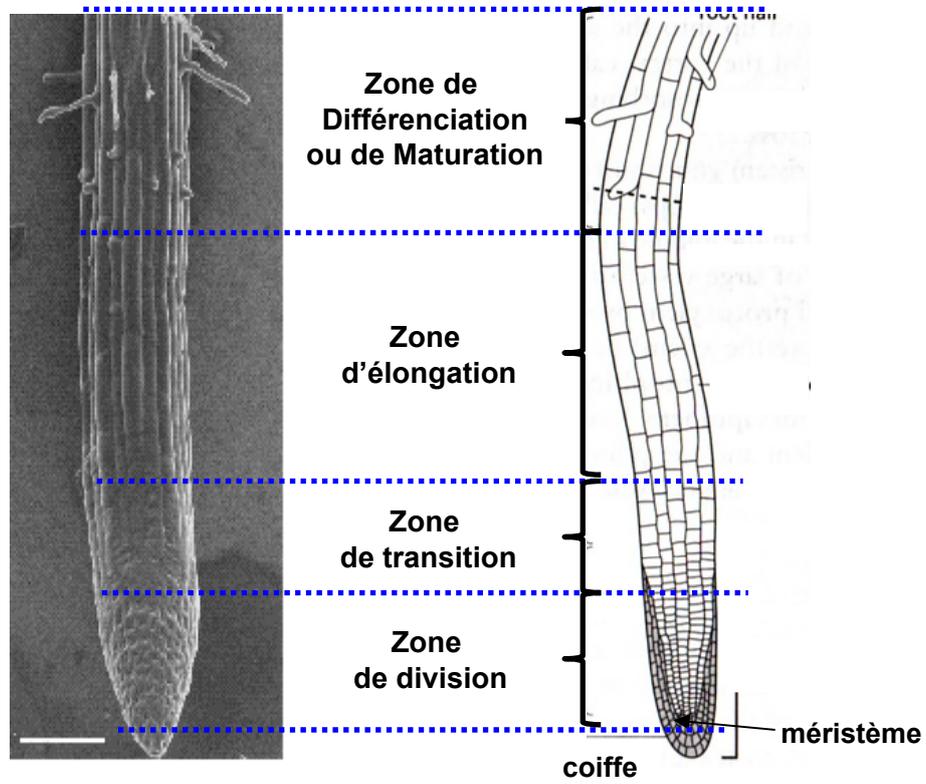


Figure II.25: Répartition le long de la racine, des différentes zones cellulaires (d'après Verbelen *et al.*, 2006; Dolan *et al.*, 1993).

A. Structure et organisation de l'architecture racinaire

L'architecture racinaire joue un rôle majeur dans l'ancrage des plantes dans le sol mais surtout dans l'efficacité d'absorption de l'eau et des éléments minéraux comme le nitrate. Il est possible de distinguer deux composantes dans l'architecture racinaire: le système exploratoire, formé par la racine primaire (I) et les racines latérales (RL), puis le système absorbant, composé par les poils absorbants distribués le long de la racine I et les RL. Dans un premier temps, nous présenterons les connaissances acquises sur le déterminisme génétique intervenant dans la croissance et le développement de ces deux composantes majeures établies à partir d'études pharmacologiques et des analyses de mutants du métabolisme hormonal chez *Arabidopsis*. Dans un deuxième temps, nous montrerons, les relations métaboliques directes ou indirectes qui commencent à être établies entre le métabolisme hormonal et le métabolisme de l'azote dans la croissance racinaire des plantules d'*Arabidopsis* en réponse à la disponibilité en nitrate ou en glutamate.

A.1. Croissance du système racinaire exploratoire

A.1.1. Structure et croissance longitudinale de la racine primaire

Le système exploratoire chez le Colza et *Arabidopsis* se met en place après la croissance et le développement de la racine I. La racine I est formée à partir du méristème racinaire élaboré très tôt, au stade embryonnaire, dans l'embryon cordiforme (Dolan *et al.*, 1993; Scheres *et al.*, 1994). Lors de la germination, l'activation du méristème induit la croissance de la racine I par division et par élongation des cellules issues des initiales du méristème. Chez *Arabidopsis*, la racine I présente une structure ainsi qu'une organisation longitudinale et transversale invariante en files et en assises cellulaires très régulières qui a pu être mise en évidence par une double analyse : clonale et cytologique (Scheres *et al.*, 1994). Des études pharmacologiques et des analyses de mutants ont ensuite permis de compléter les connaissances et déterminer les acteurs moléculaires clés intervenant dans la croissance de la racine I.

La racine I peut être divisée en cinq zones distinctes comme le montre la figure II.25 (Verbelen *et al.*, 2006 ; Dolan *et al.*, 1993).

i) La zone méristématique apicale, qui est constituée par le centre quiescent et les initiales (méristème *stricto sensu*), est protégée par les cellules de la coiffe.

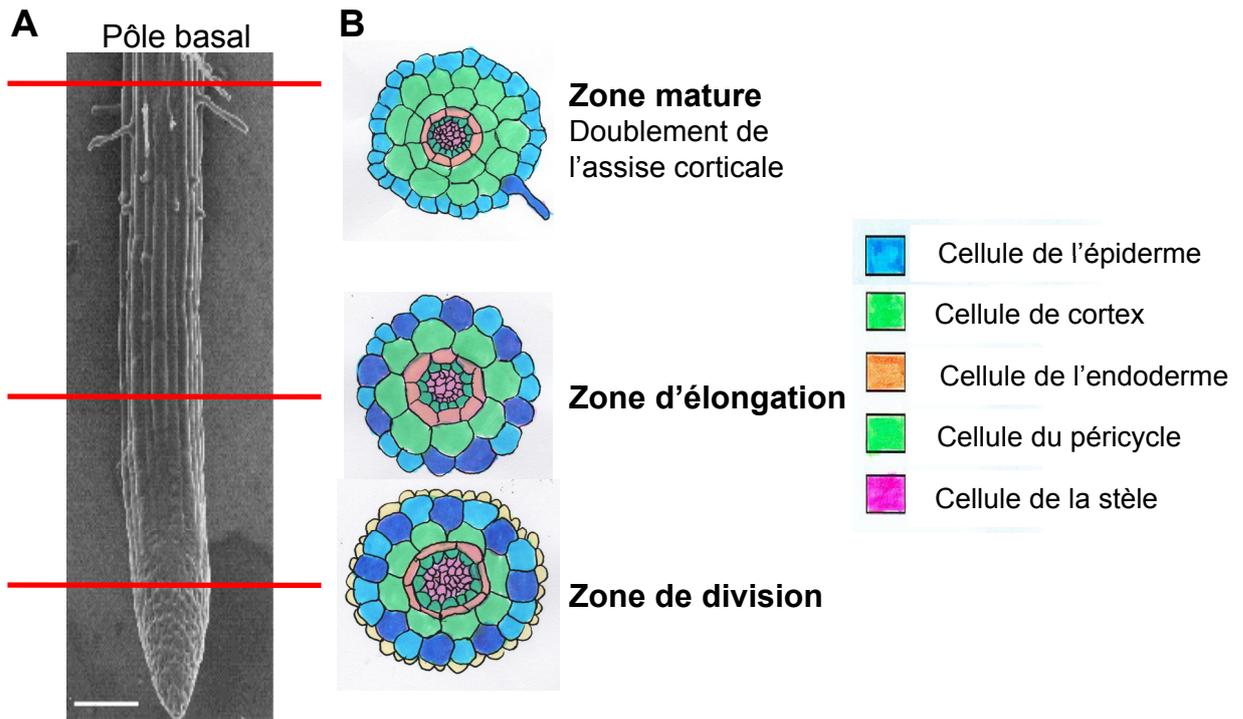


Figure II.26: Coupes transversales dans les différentes zones racinaires: 1) zone de division; 2) zone d'élongation; 3) zone mature de la racine. Les différentes lignées cellulaires sont représentées par un code couleur. **A)** Localisation des différentes coupes transversales sur une image d'une racine. Barre d'échelle : 25 μ m. **B)** représentation schématique des différentes coupes transversales. (d'après Dolan *et al.*, 1993).

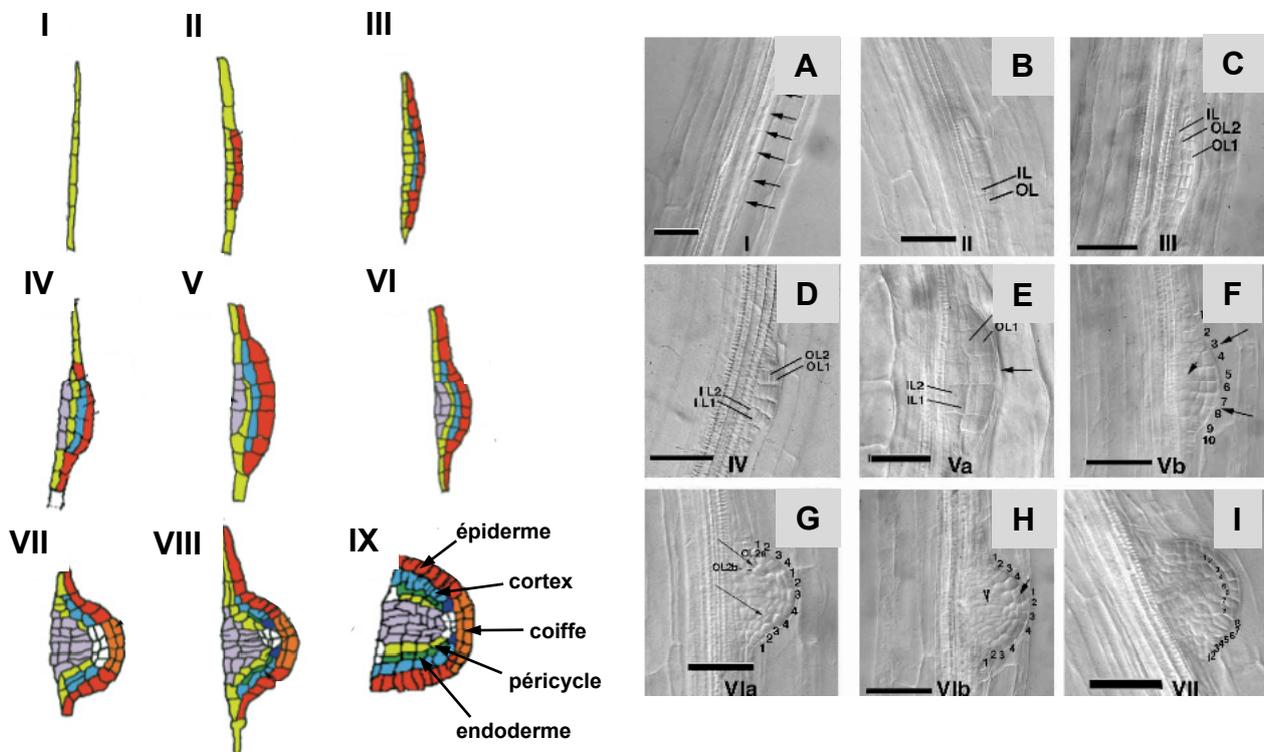


Figure II.27: Coupes longitudinales représentant les différentes étapes successives du développement d'une racine latérale: (**I à IX**) représentation schématique et (**A à I**) observation *in vivo* en microscopie photonique (d'après Malamy et Benfey, 1997).

ii) La zone de division qui est formée par les divisions intenses des cellules issues des initiales méristématiques.

iii) La zone de transition qui correspond à une zone intermédiaire entre la zone de division et d'élongation. Dans cette zone, les cellules subissent des changements cellulaires comme une polarisation et un début de vacuolisation.

iv) La zone d'élongation où les cellules vacuolisées s'allongent fortement.

v) Puis, la zone de différenciation où certaines cellules épidermiques, qui ont presque atteint leur longueur définitive, fabriquent latéralement un bulbe à partir duquel le poil absorbant va pouvoir se développer. Au-delà de la zone d'élongation, la racine est pleinement mature et les cellules épidermiques ont atteint leur taille et leurs dimensions définitives.

A.1.2. Structure et croissance transversale de la racine primaire

La structure radiale de la racine I mature d'*Arabidopsis* présente, depuis l'épiderme jusqu'à la stèle, un nombre relativement invariable d'assises cellulaires, composées d'un nombre relativement fixe de cellules (Dolan *et al.*, 1993). La figure II.26 présente la structure radiale, depuis l'assise épidermique jusqu'à la stèle dans la zone méristématique, la zone d'élongation et le début de la zone de différenciation.

A.1.3. Structure et croissance des racines latérales

Les racines latérales (RL) sont mises en place à partir de cellules du péricycle, dites « cellules fondatrices », placées de façon opposée au pôle xylémique. Les divisions de ces cellules qui suivent un plan régulier vont être à l'origine de plusieurs couches cellulaires formant un méristème primordial identique au méristème de la racine I. Celui-ci donnera naissance, après son émergence des tissus de la racine I et son activation, à une nouvelle racine latérale (Malamy et Benfey, 1997 ; Fig. II.27). Après l'activation du méristème latéral, la croissance, la structure et l'organisation des RL sont identiques à la racine I. Ce plan régulier de divisions a permis de définir, au niveau cellulaire, huit stades de développement parfaitement codifiés chez *Arabidopsis*, depuis l'initiation jusqu'à l'émergence (Malamy et Benfey, 1997). Ceux-ci ont permis d'identifier, de façon très précise, des mutants intervenant à des stades clés dans la formation des RL (Casimiro *et al.*, 2003 ; Casson et Lindsey, 2003).

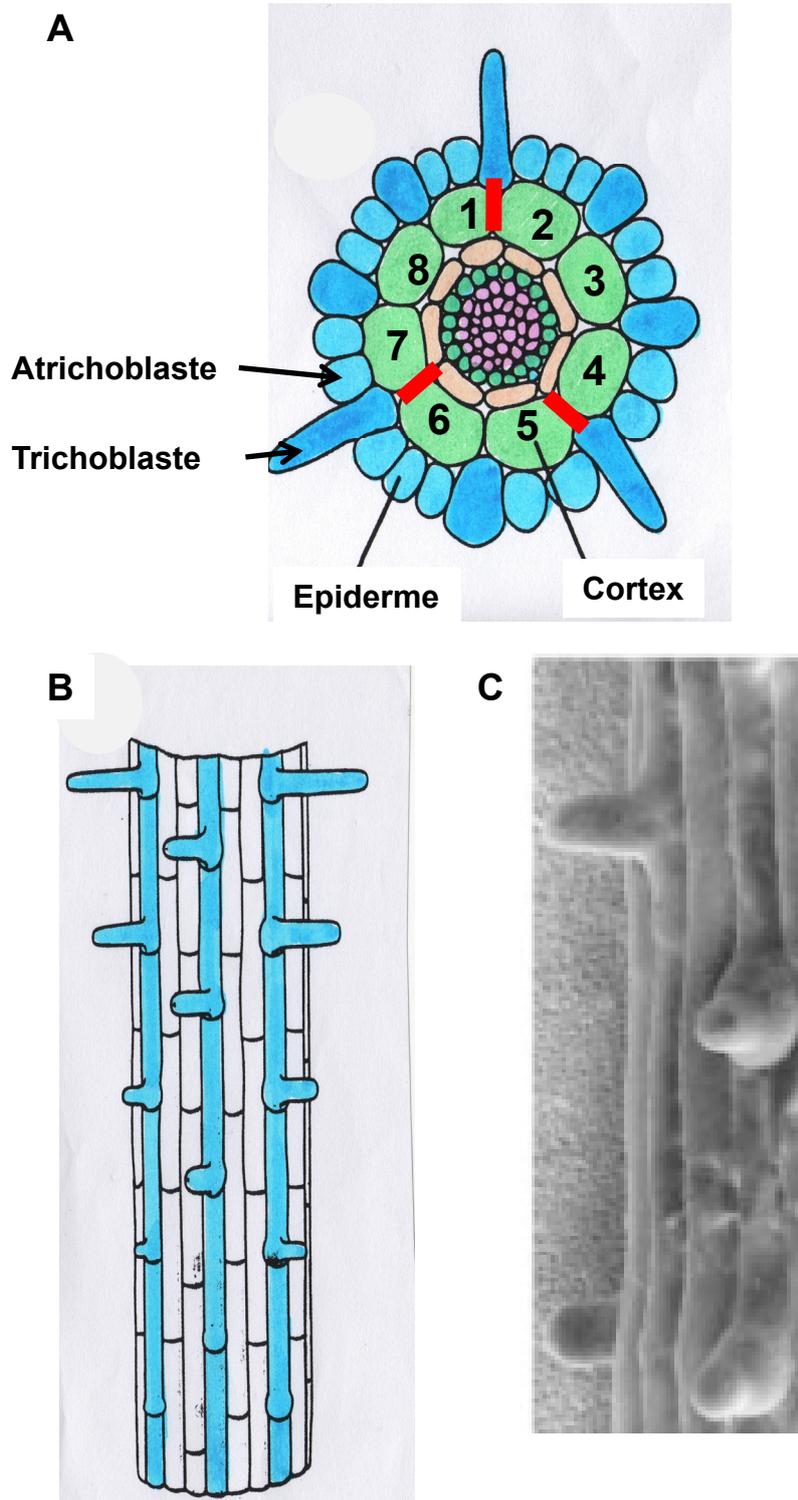


Figure II.28: Représentation de la localisation des poils absorbants **A)** en coupe transversale, avec la disposition des différentes assises cellulaires. Le chevauchement cellulaire nécessaire pour le développement d'un poil absorbant est représenté par une barre rouge. **B)** Schématisation et **C)** image en microscopie électronique, des fils cellulaires qui comportent les poils absorbants le long de la racine mature (d'après Schiefelbein *et al.*, 1997).

A.2. Structure et croissance du système absorbant

A.2.1. Formation et croissance du poil absorbant

Le poil absorbant est formé dans la zone de différenciation de la racine I lors de la différenciation des cellules épidermiques. Compte tenu de la structure relativement invariante du nombre de cellules des assises cellulaires épidermiques et corticales de la racine I d'*Arabidopsis*, les cellules épidermiques à l'origine des poils absorbants (trichoblastes) occupent une position spécifique. Ces cellules épidermiques sont toujours à cheval sur deux cellules corticales sous-jacentes. Comme dans les plantules d'*Arabidopsis*, le nombre de cellules corticales est invariable et égal à huit cellules. Nous comptons ainsi, huit files de cellules superposées ayant des poils absorbants, sur la circonférence racinaire. Des études cytologiques et génétiques ont permis d'établir les étapes clés dans la formation du poil absorbant. Lorsque la spécification de la cellule épidermique en poils absorbants a eu lieu, la morphogenèse du poil absorbant a été découpée en trois étapes successives: l'initiation, la formation du bulbe et l'élongation. Le poil absorbant se différencie ainsi à partir d'un bourgeon, qui se forme à la base des cellules épidermiques spécifiées (trichoblastes). Ensuite un bulbe se forme puis s'allonge pour laisser apparaître un poil absorbant. Des mutants, bloqués à différents stades depuis la spécification jusqu'à l'élongation finale (Fig. II.28), ont permis d'identifier de façon très précise les gènes clés intervenant dans toutes les étapes de la formation du poil absorbant (Scheifelbein, 2000).

En résumé, l'architecture racinaire est composée d'un système exploratoire et d'un système absorbant. Le système exploratoire est généré à partir du fonctionnement du méristème de la racine I et des méristèmes des racines latérales initiés à partir des cellules du péricycle dans la racine I mature. La formation du système absorbant achève la maturation des cellules formées à partir du fonctionnement des méristèmes dans la zone de différenciation de la racine I et des racines latérales. Chronologiquement, le système absorbant est donc édifié après le système exploratoire.

Tableau II.2: Liste non exhaustive des mutants présentant une modification moléculaire ou cellulaire dans la formation des racines latérales (d'après Péret *et al.*, 2009).

Molecular/cellular processes	Mutants	Stage	Lateral root phenotype
Auxin homeostasis	<i>sur1</i>		Increased LR number
	<i>sur2</i>		Increased LR number
	<i>ilr2</i>		Reduced LR number
	<i>arf8</i>		Increased LR number
	<i>ilr1 iar3 ill2</i>		Reduced LR number
	<i>ydk1</i>		Reduced LR number
Auxin signalling	<i>dfl1</i>		Reduced LR number
	<i>tir1afb1</i>		Reduced LR number
	<i>axr1</i>		Reduced LR number
	<i>axr6/cul1</i>		Reduced LR number
	<i>iaa1/axr5</i>		Reduced LR number on auxin
	<i>iaa3/shy2-2</i>	& E	Reduced LR number
	<i>iaa14/slr</i>	& E	No LR
	<i>iaa18/crane</i>		Reduced LR number
<i>iaa19/msg2</i>		Reduced LR number	
Auxin transport	<i>iaa28</i>		Strongly reduced or no LR
	<i>arf7 arf19; mir160-resistant</i>	& E	No LR
	<i>ARF10/16/17</i>		Reduced LR number
	<i>aux1</i>		Reduced LR number
Auxin transport protein addressing and regulation	<i>lax3</i>	E	Reduced LR number
	<i>pin1/3/4/7 and combinations</i>	& P	Reduced LR number
	<i>pgp4</i>		Increased LR number
Cell cycle	<i>gnom</i>		Reduced LR number
	<i>axr4</i>		Reduced LR number
	<i>pinoid</i>		Reduced LR number
Cell-to-cell communication	<i>big/tir3/doc1</i>		Reduced LR number
	<i>35S:KRP2</i>		Reduced LR number
Chromatin remodelling	<i>alf4</i>		No LR
Cytokinin pathway	<i>acr4; crr1/2/3/4 and combinations</i>		More LR primordia and disturbed spacing
F-box proteins	<i>pickle</i>		Increased LR number on auxin
F-box proteins	<i>brx-2</i>		Increased LR number on cytokinin
	<i>35S:SINAT5</i>		Reduced LR number
	<i>cegenduo</i>		Increased LR number
F-box proteins	<i>xbat32-1</i>		Reduced LR number
	<i>arabidillo1/2</i>		Reduced LR number

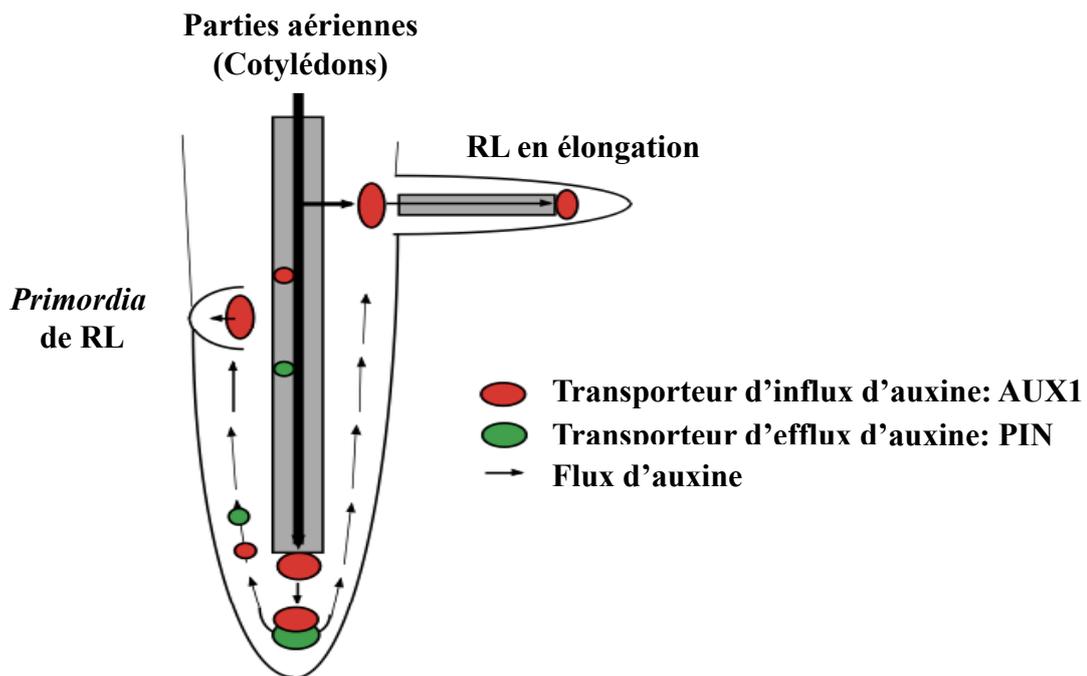


Figure II.29: Modélisation du transport de l'auxine dans les racines de jeunes plantules, ainsi que lors de la formation de racines latérales. L'auxine provenant des cotylédons est nécessaire pour l'initiation des *primordia* des racinaires latérales. Par la suite l'auxine provenant des jeunes feuilles est nécessaire pour l'émergence et l'élancement des racines latérales (Marchant *et al.*, 2002). L'auxine des parties aériennes est transportée dans le cylindre vasculaire racinaire, soit *via* des transporteurs d'auxine soit par le transport phloémique. Le transporteur d'auxine AUX1 est nécessaire pour le déchargement du phloème de l'auxine dans l'apex racinaire. La redistribution de l'auxine et le transport basipétal nécessite le transporteur d'auxine AUX1 et les transporteurs d'efflux (PIN). Le transporteur basipétal joue un rôle dans l'initiation des racines latérales et dans le développement des *primordia* des racines latérales (d'après Casson et Lindsey 2003).

B. Implication de l'auxine et de l'éthylène dans l'architecture racinaire

Dans les années 90, de nombreuses études pharmacologiques et génétiques ont permis de déterminer quels étaient les acteurs moléculaires clés dans la croissance, le développement du système exploratoire ainsi que du système absorbant chez *Arabidopsis* (Casimiro *et al.*, 2003; Péret *et al.*, 2009; Schiefelbein, 2000). L'ensemble de ces études révèle d'une part, que l'auxine (AIA) et l'éthylène sont les deux acteurs majeurs et d'autre part, que leur interaction est primordiale dans la croissance de la racine I, des racines latérales et des poils absorbants.

B.1. Effet de l'auxine sur la croissance de la racine I et des poils absorbants

L'auxine joue un rôle majeur sur la croissance et le développement du système exploratoire. En effet, comme indiqué dans le tableau II.2, les mutants responsables d'anomalies dans le développement racinaire correspondent à des gènes intervenant principalement dans: la synthèse d'auxine et son homéostasie, le transport de l'auxine, la répartition de l'auxine le long de la racine et la perception du signal auxine.

Des applications exogènes d'auxine comme l'acide indole acétique (AIA) et l'acide naphthalène acétique (NAA) stimulent la formation des racines latérales (Evans *et al.*, 1994 ; Casson et Lindsey, 2003) alors que des inhibiteurs de la synthèse ou du transport phloémique comme l'acide naphtylphthalamique (NPA) et l'acide 2,3,5-tri-iodobenzoïc (TIBA) suppriment l'initiation des racines latérales (Reed *et al.*, 1998 ; Casimiro *et al.*, 2001). Les mutants résistants à l'auxine comme *aux1* (codant un transporteur d'influx d'auxine), *axr1* (codant un répresseur transcriptionnel des gènes induits rapidement en réponse à l'auxine) et *axr4* (codant une protéine requise pour la localisation de la perméase AUX1) présentent un nombre réduit de racines latérales alors que des mutants *yucca*, *superroot* et *rooty*, qui interviennent dans l'homéostasie pour l'AIA et qui accumulent l'auxine à de fortes concentrations, produisent un excès de racines latérales (Boerjan *et al.*, 1995; Celenza *et al.*, 1995 ; King *et al.*, 1995). Des dosages de l'AIA par spectrométrie de masse ont montré que l'AIA est synthétisé préférentiellement dans les parties aériennes mais aussi dans les apex racinaires (Bhalerao *et al.*, 2002 ; Ljung *et al.*, 2005). L'AIA est ensuite redistribuée à travers un réseau complexe de transporteurs au sein de la racine qui font intervenir des transporteurs d'influx : AUX et d'efflux : PIN (Friml, 2003 ; Blakeslee *et al.*, 2005). L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques du transport phloémique à longue distance de l'AIA (TIBA et NPA) depuis les parties aériennes jusqu'à l'apex racinaire a révélé que le

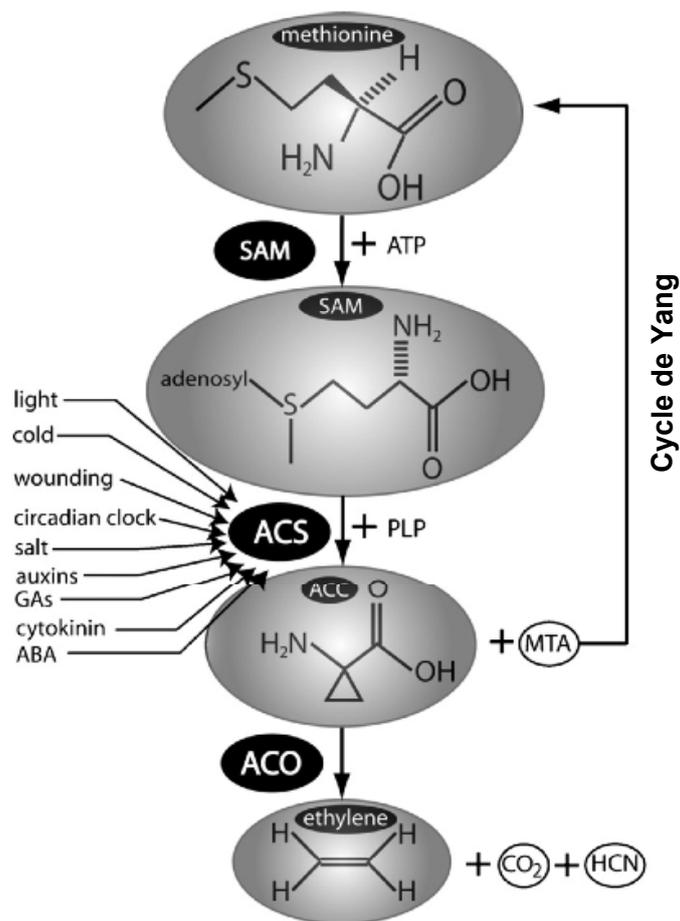


Figure II.30: Voie de synthèse de l'éthylène. La synthèse de l'éthylène s'effectue en trois étapes: la première étape fait intervenir l'enzyme SAM synthétase, qui nécessite de l'ATP pour produire de l'S-adenosyl-méthionine (SAM) à partir de la méthionine. La deuxième étape fait intervenir l'enzyme ACC synthétase qui nécessite du Phosphate de Pyridoxal (PLP), pour produire de l'1-aminocyclopropane-1-carboxylique acide (ACC) à partir d'une molécule de SAM. La dernière étapes fait intervenir l'enzyme ACC oxydase, qui produit de l'éthylène à parti d'ACC. Les différents facteurs modulant l'activité des enzymes de la voie de synthèse de l'éthylène sont présentés. (d'après Dugardeyn et Van Der Straeten 2008).

transport basipète de l'AIA est nécessaire à l'initiation des racines latérales (Reed *et al.*, 1998 ; Casson and Lindsey, 2003). L'inhibition de la formation des racines latérales par le NPA peut être levée par des applications localisées d'AIA au niveau du collet des plantules (Reed *et al.*, 1998). L'ensemble des études sur le transport et la synthèse d'AIA racinaire a conduit à définir le modèle de développement racinaire présenté figure II.29. Celui-ci est basé sur le transport acropète et basipète de l'auxine (« fontaine auxinique ») responsable de la croissance et du développement du système racinaire exploratoire (Casson and Lindsey, 2003).

De même, des études pharmacologiques et génétiques à l'aide de mutants ont montré, pour la formation du système exploratoire, que le système absorbant est sous le contrôle de gènes intervenant dans la signalisation auxinique. En effet, lorsque la spécification d'une cellule épidermique vers la formation d'un poil absorbant est réalisée, la morphogenèse (initiation, formation du bulbe et l'élongation) est modifiée par des mutants de signalisation auxinique. Ainsi, les mutants *axr2* et *axr3* (résistants à l'auxine, l'éthylène et l'ABA) produisent peu de poils absorbants alors que l'initiation des poils absorbants semble normale (Scheifelbein, 2000). De même, les mutants *axr1* et *aux1* présentent une réduction de la longueur des poils absorbants (Pitts *et al.*, 1998). **Le traitement des racines par du 2,4-D ou des inhibiteurs du transport de l'AIA génère des poils absorbants plus longs** (Pitts *et al.*, 1998).

B.2. Effet de l'éthylène sur la croissance de la racine I et des poils absorbants

La voie de synthèse et la voie de signalisation de l'éthylène sont plus simples que celles de l'auxine. En effet, l'éthylène est synthétisé à partir de la S-adénosylméthionine (SAM) à l'aide de deux réactions successives faisant intervenir l'ACC synthétase (ACS) et l'ACC oxydase (ACO). L'ACS appartient à la famille des transaminases et nécessite le phosphate de pyridoxal ou vitamine B6 comme co-facteur (Tarun *et al.*, 1998, Huai *et al.*, 2001). Cette enzyme convertit la SAM en acide amino-cyclopropane carboxylique ou ACC, précurseur de l'éthylène. L'ACC est ensuite convertit en éthylène en présence d'oxygène par l'ACO (Fig. II.30). Il en est de même pour l'auxine, plusieurs gènes, présents dans la synthèse, le métabolisme et la perception du signal éthylène (Tableau II.2), interviennent dans la croissance et le développement du système racinaire (Smalle et Van Der Straeten, 1997).

Des traitements pharmacologiques, à l'aide de précurseur de l'éthylène (ACC) et d'un inhibiteur de l'ACC synthétase (AVG), ont montré et confirmé que l'éthylène inhibe la croissance de la racine I (Smalle et van Der Straeten, 1997). En effet, les plantes traitées pendant sept jours par 0,1 μM d'ACC présentent une élongation racinaire réduite de moitié par rapport aux plantes

non traitées. Cette réduction tissulaire de l'élongation racinaire est corrélée avec une réduction de l'élongation cellulaire. Cette inhibition intervient dans la zone de transition et d'élongation de la racine I et survient rapidement dans les dix premières minutes de traitement (Le *et al.*, 2004). L'éthylène régule également la division cellulaire. En effet, les mutants *eto1-11* et *eto1-12* (*ethylene overproducer*) ainsi que les plantes traitées par l'ACC, montrent des divisions surnuméraires des cellules du centre quiescent (Ortega-Martinez *et al.*, 2007; Ruzicka *et al.*, 2007).

Plusieurs résultats montrent également que l'éthylène joue un rôle majeur dans la formation des racines latérales. Chez *Arabidopsis*, le gène *AtACSI* (ACC synthétase 1) est spécifiquement induit dans la zone du péricycle où est initié et formé le méristème des racines latérales. Son expression augmente d'ailleurs avec l'émergence des racines latérales (Rodriguez-Pousada *et al.*, 1993). Le mutant d'*Arabidopsis* *axr1*, insensible à l'éthylène et à l'auxine, possède un nombre limité de racines latérales (Estelle et Somerville, 1987; Lincoln *et al.*, 1990). A contrario, les mutants *etr1* et *ein1*, codant des récepteurs éthylène, également insensibles à l'éthylène, développent des racines latérales normales. Des travaux récents ont révélé que l'induction de la synthèse et de la signalisation éthylénique, *via* les mutants *eto1-1* et *ctr1-1* ou *via* l'application exogène d'ACC, inhibe la formation des racines latérales. Le traitement par l'ACC peut être restauré par le nitrate d'argent. Les ions Ag^{2+} sont des inhibiteurs de la perception du signal éthylène car ils bloquent l'action des récepteurs éthylène. A l'inverse, les mutants *ein2-5* et *etr1-3*, qui bloquent la réponse à l'éthylène, favorisent la formation des racines latérales. Ces mutants sont également insensibles à l'ACC (Negi *et al.*, 2008)

La morphogenèse des poils absorbants à partir de cellules épidermiques est également sous le contrôle de l'éthylène. Ainsi, le traitement pharmacologique de plantules d'*Arabidopsis* par 50 μ M d'ACC induit la formation de poils absorbants en position ectopique, alors que le traitement par 5 μ M d'AVG ou d'ions Ag^{2+} réprime la formation des poils absorbants (Taminoto *et al.*, 1995; Masucci et Schiefelbein, 1997; Pitts et 1998). La mutation *rdh6* (root hair déficiente 6) inhibe l'initiation des poils absorbants et induit la production de racines sans poils absorbants. Cette mutation peut être restaurée par un apport d'ACC ou d'AIA dans le milieu de culture. De même, le mutant *ctr1* présente une augmentation du nombre de poils absorbants dont certains sont en position ectopique.

B.2.1. Interaction éthylène/auxine dans la croissance et le développement racinaire

L'élongation de la racine I est inhibée de façon synergique par l'action de l'AIA et de l'ACC ce qui démontre l'existence d'une signalisation croisée entre l'auxine et l'éthylène dans la croissance racinaire. Cette interaction provient du fait que l'éthylène régule à la fois la synthèse, le transport et la répartition de l'auxine le long de la racine I (Stepanova *et al.*, 2005; Swarup *et al.*, 2007; Ruzicka *et al.*, 2007). Ainsi, l'éthylène induit les gènes codant les sous-unités alpha et bêta de l'anthranilate synthétase (ASA1 et ASB1) qui catalysent la première étape de la synthèse du tryptophane précurseur de l'AIA. En effet, chez les mutants *wei2* et *wei7* (weak ethylene insensitive) l'élongation racinaire est insensible à un traitement par l'éthylène mais peut être restaurée par l'application de 10 µM de Trp ou d'anthranilate et partiellement par 10 µM d'AIA (Stepanova *et al.*, 2005).

L'inhibition de l'élongation racinaire nécessite aussi le fonctionnement de certaines voies de signalisation de l'auxine, comme le démontre les mutants *axr2* et *axr4* (auxine résistant ; présentant une résistance à l'auxine et à l'éthylène) ainsi que les mutants *iaa3* et *iaa14* (résistants aux traitements auxine et codant des répresseurs de transcription induits par l'auxine), car ils sont insensibles à l'éthylène (Li *et al.*, 2006 ; Ruzicka *et al.*, 2007).

Des études récentes ont également montré que les interactions éthylène-auxine interviennent à la fois sur l'initiation des cellules fondatrices des racines latérales mais aussi durant l'émergence de celles-ci (Ivachenko *et al.*, 2008). L'éthylène agit sur l'initiation et la formation des racines latérales en favorisant le transport acropète et basipète de l'auxine dans la racine I, comme le montre les expériences de radio marquage de l'AIA chez les plantes traitées par l'ACC ou les mutants *eto1-1*. De même, les mutants *ein2-5* et *etr1-3* présentent une réduction du transport acropète de l'AIA et le mutant *aux1-7*, déficient dans l'influx d'auxine, sont insensibles à l'éthylène (Negi *et al.*, 2008).

En résumé, les revues bibliographiques qui font état des connaissances sur la construction de l'architecture racinaire montrent clairement que l'auxine et l'éthylène sont les acteurs majeurs de la croissance et du développement des systèmes racinaires exploratoire et absorbant. Mis à part quelques gènes intervenant dans le cycle cellulaire, la voie de synthèse des cytokinines, ou la synthèse de facteurs de transcription, il est important de souligner qu'aucun des gènes responsables des mutations racinaires majeures identifiées n'est lié au transport ou au métabolisme d'un macro-élément, bien qu'il soit reconnu que la

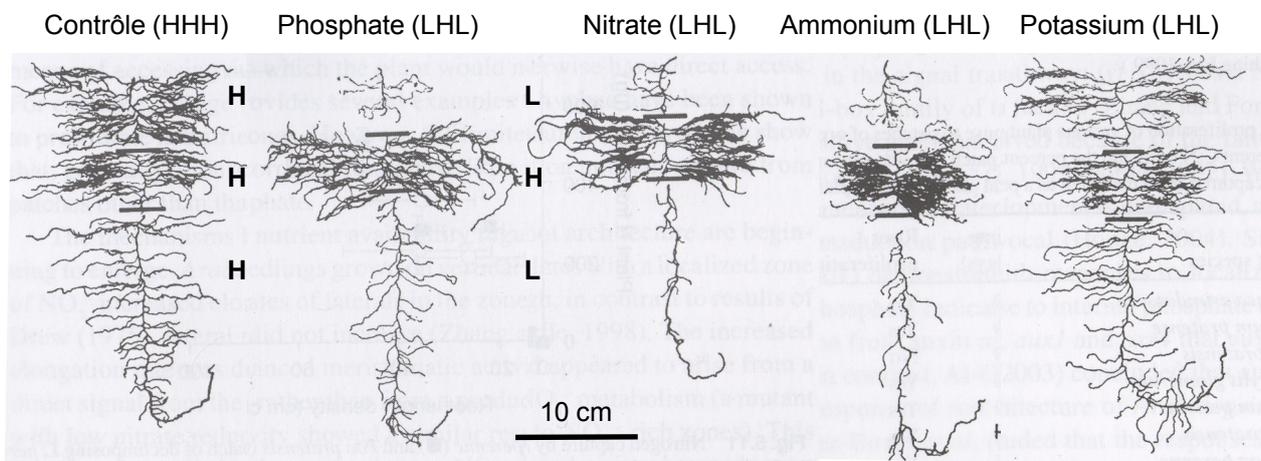


Figure II.31 : Profil de l'architecture du système racinaire de plant d'Orge, en réponse à une alimentation segmentée sur trois niveaux et deux concentrations différentes (haute, H; basse, L) en phosphate, nitrate, ammonium, potassium. (d'après Drew *et al.*, 1975).

disponibilité des éléments minéraux N, P, K et S modifie de façon significative l'architecture racinaire (Lopez-Buccio *et al.*, 2005a).

C. Disponibilité en azote et modification de l'architecture racinaire

Dans le sol, les racines sont fréquemment soumises à une alimentation hétérogène en éléments minéraux comme le nitrate. Dans le but de comprendre comment le signal nitrate coordonne les modifications de croissance racinaire et foliaire, les travaux pionniers de Drew et Saker (Drew *et al.*, 1973 ; Drew, 1975; Drew et Saker,1975) ont été approfondis chez le Tabac et *Arabidopsis* afin de mettre au jour, à l'aide de mutants du métabolisme azoté ou du développement racinaire, les cascades de signalisation responsables de l'intégration de la fonction nutritionnelle N à l'échelle de la plante entière, et de déterminer quels étaient les senseurs potentiels du signal nitrate (Scheible *et al.*, 1997a et b ; Zhang et Forde, 1998 et 2000 ; Zhang *et al.*, 1999 ; Remans *et al.*, 2006b, Ho *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2009).

C.1. Effet du nitrate sur la croissance des systèmes racinaires exploratoire et absorbant

C.1.1. Les travaux séminaux

Les effets d'une alimentation hétérogène sur la croissance et le développement racinaire ont commencé à être **étudiés de façon systématique** pour différents éléments minéraux par Drew (1975) et Drew et Saker (1975) grâce à la mise au point de systèmes expérimentaux en pots ou sur papier filtre permettant d'alimenter de façon hétérogène les racines de jeunes plantes d'Orge par différentes concentrations d'éléments minéraux (Fig. II.31). Ces travaux ont montré que les racines proliféraient dans la zone alimentée par les plus fortes concentrations de nitrate et de phosphate (Fig. II.31). Dans le cas du nitrate, ces résultats ont été confirmés chez d'autres espèces à l'aide du système expérimental « split root », utilisé en culture hydroponique, et qui consiste à séparer en deux parties égales la racine de jeunes plantes et à alimenter l'une des deux parties seulement en nitrate (Lainé *et al.*, 1995). A l'aide de ce dispositif et d'un marquage isotopique par le $K^{15}NO_3$, il a été possible de montrer que la partie racinaire alimentée présentait un doublement transitoire des capacités d'absorption du nitrate dans les 24 premières heures et une prolifération racinaire significative par rapport à la partie non alimentée au bout de quelques jours (Lainé *et al.*, 1995). **Bien que séparés dans le temps, ces phénomènes physiologiques de compensation, sur**

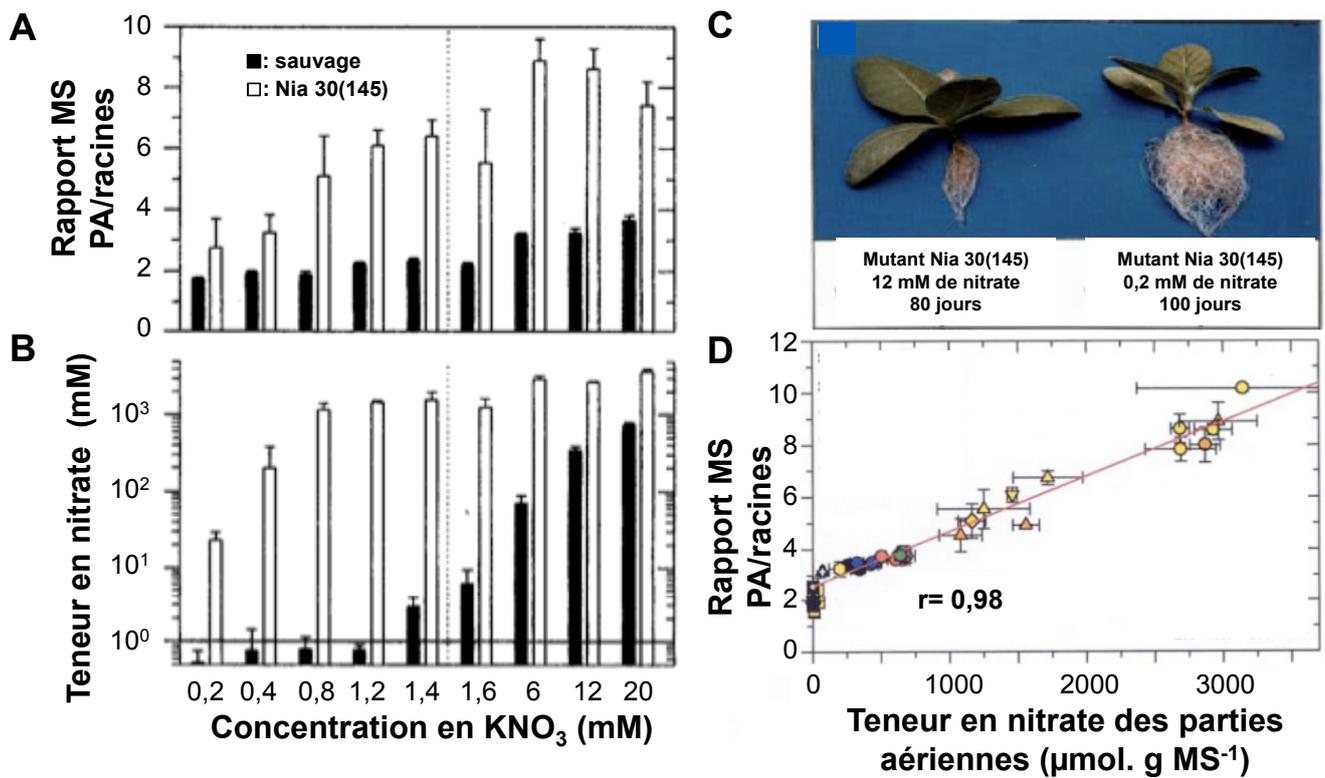


Figure II.32: Effet du nitrate sur le rapport parties aériennes / parties racinaires et les teneurs en nitrate endogènes, chez des plants de tabac sauvage (barres blanches) ou de mutant *Nia30* (barres noires) ayant une activité NR réduite. **A)** rapport parties aériennes / parties racinaires, **B)** teneurs en nitrate dans les parties aériennes (L'axe des ordonnées est exprimé de façon exponentiel) (\pm ES; $n = 5$). **C)** Image représentant des mutants de tabac *Nia 30* en présence de 12 mM ou 0,2 mM de nitrate. **D)** Relation entre le rapport parties aériennes / parties racinaires et les teneurs en nitrate dans les parties aériennes ($r^2 = 0,98$) (d'après Schieble *et al.* 1997a et b; et Zhang *et al.*, 1999).

la fonction (absorption) et sur la structure (architecture racinaire), sont présents chez de nombreuses espèces. Leurs significations éco-physiologiques ont été discutées par Robinson *et al.* (1994 et 1996).

Le rôle signalétique du nitrate sur les modifications de croissance racinaire (structure) a ensuite été approfondi chez le Tabac et *Arabidopsis* à partir de mutants du métabolisme N et de la signalisation auxinique.

C.1.2. Réponses systémiques du système racinaire à un apport homogène de nitrate

Lorsque les racines de mutants NR de Tabac sont alimentées de façon homogène par 0,2 ou 12 mM de nitrate pendant dix semaines environ, les plantes fortement alimentées présentent une réduction importante du développement de leur système racinaire. A l'inverse, les plantes faiblement alimentées présentent une prolifération de leur système racinaire (Fig. II.32C). Chez les plantes soumises à de fortes concentrations de nitrate, la réduction de l'élongation racinaire est directement liée à la bascule du rapport feuilles/racines et à l'accumulation de nitrate dans les parties aériennes (Fig. II.32A et B) comme le démontre la corrélation obtenue entre les teneurs en nitrate foliaire et le rapport des matières sèches entre les feuilles et les racines (Fig. II.32D). La réduction de l'élongation racinaire chez les mutants alimentés par 12 mM de nitrate est également due à un arrêt de l'allocation de sucres solubles comme le saccharose, le fructose et le glucose vers les racines. Aucune modification de la synthèse ou de l'allocation des acides aminés vers les racines ne semble intervenir dans la réponse morphologique racinaire (Schieble *et al.*, 1997a).

Chez *Arabidopsis*, des études cytologiques réalisées sur des plantes sauvages et le mutant *nia1-nia2* pour la NR ont permis de préciser que l'inhibition de l'élongation racinaire observée aux fortes concentrations en nitrate (10 et 50 mM), n'affectait pas le nombre des racines latérales mais bloquait leur activation juste après l'émergence (Zhang *et al.*, 1999). Par ailleurs, un apport de 2% de saccharose dans le milieu permettait de lever l'inhibition suggérant un contrôle de l'élongation par le statut N *via* le rapport C/N.

C.1.3. Réponse locale du système racinaire à un apport hétérogène de nitrate

Lorsque des mutants NR de Tabac sont alimentés de façon hétérogène, pendant 3 à 6 semaines à l'aide d'un dispositif « split root » par 0,2 mM et 12 mM de nitrate, on observe une très forte prolifération des racines dans la partie alimentée par 12 mM de nitrate. De la même

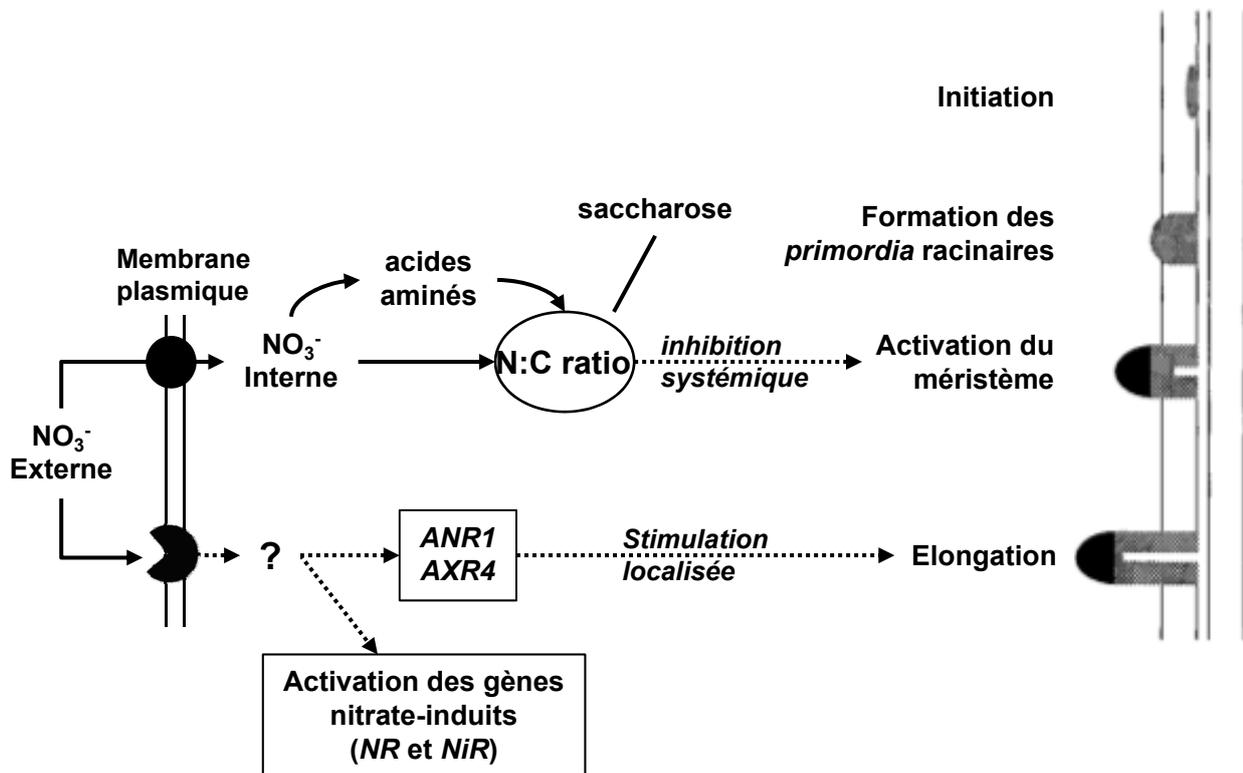


Figure II.33: Représentation du modèle dual de la régulation par le nitrate et du développement des racines latérales chez *A. thaliana*. Les flèches en pointillé représentent les mécanismes de signalisation et les flèches pleines représentent le transport ou des étapes métaboliques (d'après Zhang *et al.*, 1999).

façon, des plantules d'*Arabidopsis*, soumises à un apport hétérogène de nitrate en gel d'agarose segmenté (Segmented Agar Plate), présentent une plus forte élongation des racines latérales dans la partie alimentée par de fortes concentrations de nitrate (0,1 à 10 mM). Ces résultats contradictoires dans le développement du système racinaire lors d'une alimentation homogène *versus* hétérogène peuvent s'expliquer si l'on fait intervenir une voie de signalisation locale (régulation « feed-forward ») distincte d'une voie de signalisation systémique (régulation « feed-back »). Chez *Arabidopsis*, l'utilisation de mutants (*aux1*, *axr2* et *axr4*) a permis de montrer qu'il existait un recouvrement entre cette voie locale de signalisation du nitrate et le métabolisme de l'auxine. En effet, les mutants *axr4* insensibles à l'auxine, présentaient une inhibition de l'élongation racinaire lors d'un apport localisé de nitrate. Le gène *axr4* code une protéine requise pour la localisation membranaire au niveau racinaire de la perméase AUX1.

C.1.4. Le modèle dual de régulation par le nitrate de la croissance des racines latérales

Ces deux voies de signalisation sont illustrées dans un modèle dual de régulation par le nitrate de la croissance du système racinaire exploratoire présenté figure II.33 (Zhang *et al.*, 1999). En fait, ce modèle qui cherche à intégrer la fonction nutritionnelle à l'échelle de la plante entière, complète le modèle feed-back/feed-forward de Stitt *et al.* et introduit implicitement la notion de « senseur du signal nitrate » et de « senseur du statut C/N » (Stitt et Scheible, 1998). Dès lors, les recherches se sont focalisées sur la réponse locale et la détermination du « senseur du signal nitrate ». L'une des difficultés majeures que rencontrent ces recherches est la différence temporelle dans les réponses mesurées qui sont généralement rapides au niveau moléculaire, mais observables tardivement (6 à 12 jours) au niveau de la croissance racinaire chez *Arabidopsis*.

C.1.5. Transporteur et senseur nitrate: la notion de transcepteur

Les transporteurs nitrate à forte affinité : NRT2.1 et NRT2.2, et à faible affinité : NRT1.1 ont fait logiquement partie des candidats potentiels impliqués dans la perception du signal nitrate, dans les voies de signalisation locale et systémique, intervenant dans la formation du système racinaire exploratoire.

L'implication du transporteur de nitrate NRT1.1 dans la formation des racines latérales, a été mise en évidence **en conditions hétérogènes d'alimentation** et donc validée **dans la voie locale de signalisation par le nitrate** (Remans *et al.*, 2006; Walch-Liu et Forde, 2008, Krouk *et al.*, 2010). En conditions d'alimentation hétérogène, les mutants *chl1* montrent une inhibition de

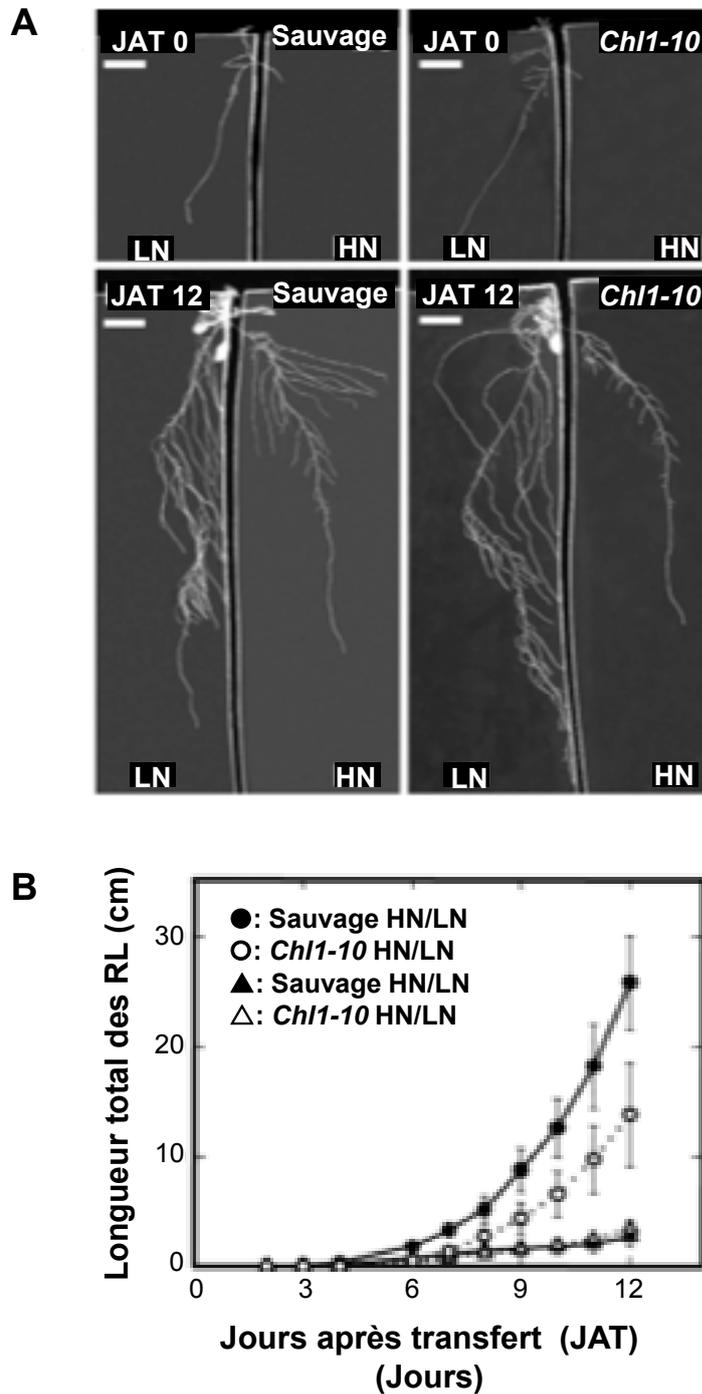


Figure II.34: Effet d'un apport localisé de nitrate, en système "split root" en boîte de Pétri, sur l'architecture racinaire de plantes d'*A. thaliana* sauvage et mutante *chl1-10* (sous-exprimant le gène du transporteur NRT1.1). Une partie est alimentée avec 10 mM de KNO_3 et l'autre partie est alimentée avec 0,05 mM de KNO_3 . **A)** Système racinaire de plantules sauvages et mutantes, de 0 et 12 jours après leur transfert sur système "split root". **B)** Évolution de 0 à 12 jours après transfert sur système "split root" de la longueur des racines latérales. (\pm ES; $n = 10$ à 14) (d'après Remans *et al.*, 2006).

la formation des RL dans la partie alimentée par de fortes concentrations en nitrate (Fig. II.34). Cette inhibition n'est pas associée avec une diminution de l'absorption du nitrate mais à une répression du facteur de transcription *ANR1* impliqué dans la formation des RL suggérant que le transporteur NRT1.1 puisse agir comme un senseur du nitrate en amont d'ANR1 (Zhang et Forde, 1998). Cependant, la preuve définitive de l'implication de NRT1.1 comme senseur nitrate a été apportée par une étude de l'interaction du nitrate et du glutamate sur l'élongation de la racine I, chez des mutants et des transformants du transporteur NRT1.1 ayant perdus leur capacité de phosphorylation. En effet, des lignées transgéniques, exprimant de façon constitutive une forme non phosphorylable de NRT1.1, ont été introduites dans un mutant *chl1.5*. Chez ces transformants, le nitrate était incapable de restaurer l'effet inhibiteur du glutamate sur l'élongation racinaire. En revanche, les transformants exprimant de façon constitutive une forme sauvage de NRT1.1 phosphorylable en présence de nitrate, étaient capables de contrecarrer l'effet inhibiteur du glutamate. Ces résultats ont donc permis de dissocier la fonction de senseur nécessitant une phosphorylation et la fonction de transporteur de nitrate de NRT1.1. Pour cette double fonction et par analogie avec les senseurs/transporteurs rencontrés chez la levure, le transporteur NRT1.1 a été qualifié de transcepteur (Holsbeeks *et al.*, 2004 ; Rubio-Teixeira *et al.*, 2010).

Afin de montrer le rôle du transporteur NRT2.1 dans la formation des racines latérales, **la voie de signalisation systémique a été utilisée à l'envers**. Les plantes ont donc été placées en conditions de privation plutôt qu'en excès de N de façon à induire plutôt qu'à inhiber la formation des RL (Little *et al.*, 2005; Remans *et al.*, 2006a). En effet, le transfert de plantules sauvages d'*Arabidopsis* de 10 à 0,05mM nitrate induit une augmentation de l'activité du système de transport de nitrate à forte affinité (HATS), stimule l'apparition de nouvelles racines latérales et l'élongation des racines latérales déjà en place. En revanche, chez le mutant de délétion *atnrt2.1-1* ne possédant plus les gènes *Nrt2.1* et *Nrt2.2*, le transfert en conditions limitantes en N inhibe l'apparition de nouvelles racines latérales mais stimule l'élongation des racines latérales déjà en place. La réduction du nombre de nouvelles racines latérales chez le mutant n'est pas causée par la très forte baisse de l'absorption mais bien induite par l'absence des transporteurs NRT2.1 et NRT2.2. En effet, le transfert des plantules de 10 mM nitrate sur une gamme de concentration de 10 à 0 mM nitrate a révélé que la réduction du nombre des racines latérales chez le mutant n'était pas corrélée avec les quantités d'azote absorbées (Fig. II.35). Ces résultats suggéraient donc un rôle stimulateur des transporteurs NRT2.1 et NRT2.2 à une étape particulière de la formation des racines latérales en conditions limitantes en azote. A l'inverse de ces résultats, Little *et al.* (2005) ont montré que le mutant *nrt2.1* agit comme un répresseur et non comme un activateur dans la

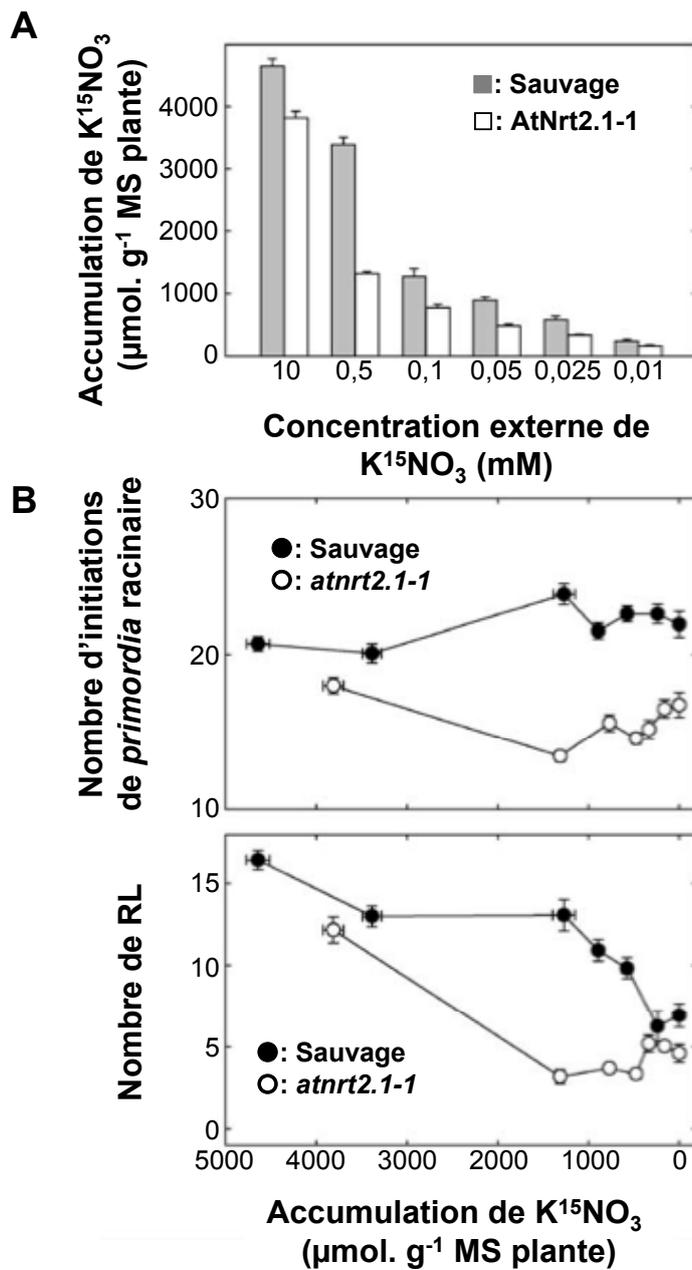


Figure II.35: **A)** Accumulation de K¹⁵NO₃ et **B)** mesure du développement des racines latérales visibles (longueur > 0,5 mm) dans la partie nouvellement formée, chez des plantes sauvage d'*A. thaliana* et de mutants *atnrt2.1-1*. Les plantes sont transférées, après six jours de culture avec 10 mM de KNO₃, sur des concentrations variables en nitrate de 0,01 à 10 mM de KNO₃. (± ES; n = 12) (d'après Remans *et al.*, 2006).

formation des racines latérales. En dépit de leurs conclusions contradictoires, ces travaux s'accordent sur le fait que les transporteurs NRT2.1 et NRT2.2 interviennent sur la formation des racines latérales indépendamment de leur rôle dans le transport du nitrate. Comme pour NRT1.1, cette double fonction de transport et de senseur du signal nitrate argue en faveur d'un rôle possible de transcepteur du transporteur NRT2.1.

C.2. Effets du glutamate sur la croissance de la racine I et des racines latérales

Si la disponibilité en nitrate peut modifier la croissance racinaire, d'autres formes d'azote comme les acides aminés peuvent également intervenir. Bien que les acides aminés soient en général présents à très faibles concentrations dans les sols ($>100 \mu\text{M}$, Jones *et al.*, 2005), il a été montré récemment que des concentrations de L-glutamate de l'ordre de $50 \mu\text{M}$ inhibent l'élongation de la racine I d'*Arabidopsis* (Walch-Liu *et al.*, 2006 ; Fig. II.36A). La présence de L-glutamate dans le milieu est perçue spécifiquement à l'apex racinaire comme l'ont révélé des expériences d'apport hétérogène en système SAP (Fig. II.36C et D). L'utilisation d'une lignée *cyclin::GUS* a révélé que la présence de L-glutamate inhibe l'activité mitotique dans la zone de division du méristème apical. Si le L-glutamate n'interfère pas sur l'initiation et l'émergence des racines latérales, en revanche, les racines latérales acquièrent au cours de leur développement une sensibilité accrue au glutamate. Ainsi le L-glutamate inhibe la croissance des RL lorsque celles-ci ont atteint une longueur de 5 à 10 mm. Une comparaison entre différents écotypes d'*Arabidopsis* a montré qu'il existait des différences de sensibilité de la racine I au L-glutamate. Par ailleurs, les analyses de mutants de la signalisation (*tir1-1* et *axr1-3*, *axr1-2* et *axr2-1*) et du transport de l'auxine (*aux1-7* et *axr4-2*) ont mis en évidence un recouvrement des voies de signalisation du glutamate et de l'auxine. En effet, le mutant *aux1-7*, qui présente une altération du transport basipète et acropète de l'AIA, montre une réduction de sensibilité au L-glutamate alors que les mutants *axr1-3* et *axr1-2*, associés à l'activation de l'enzyme d'ubiquitination E1, sont hypersensibles au glutamate.

L'effet du glutamate comme du nitrate semble donc faire intervenir une interaction entre les métabolismes de l'azote et de l'auxine sur l'élongation racinaire. Cependant, comme dans le cas du nitrate, la mise à jour de la voie de signalisation et du senseur du glutamate est encore loin d'être atteinte.

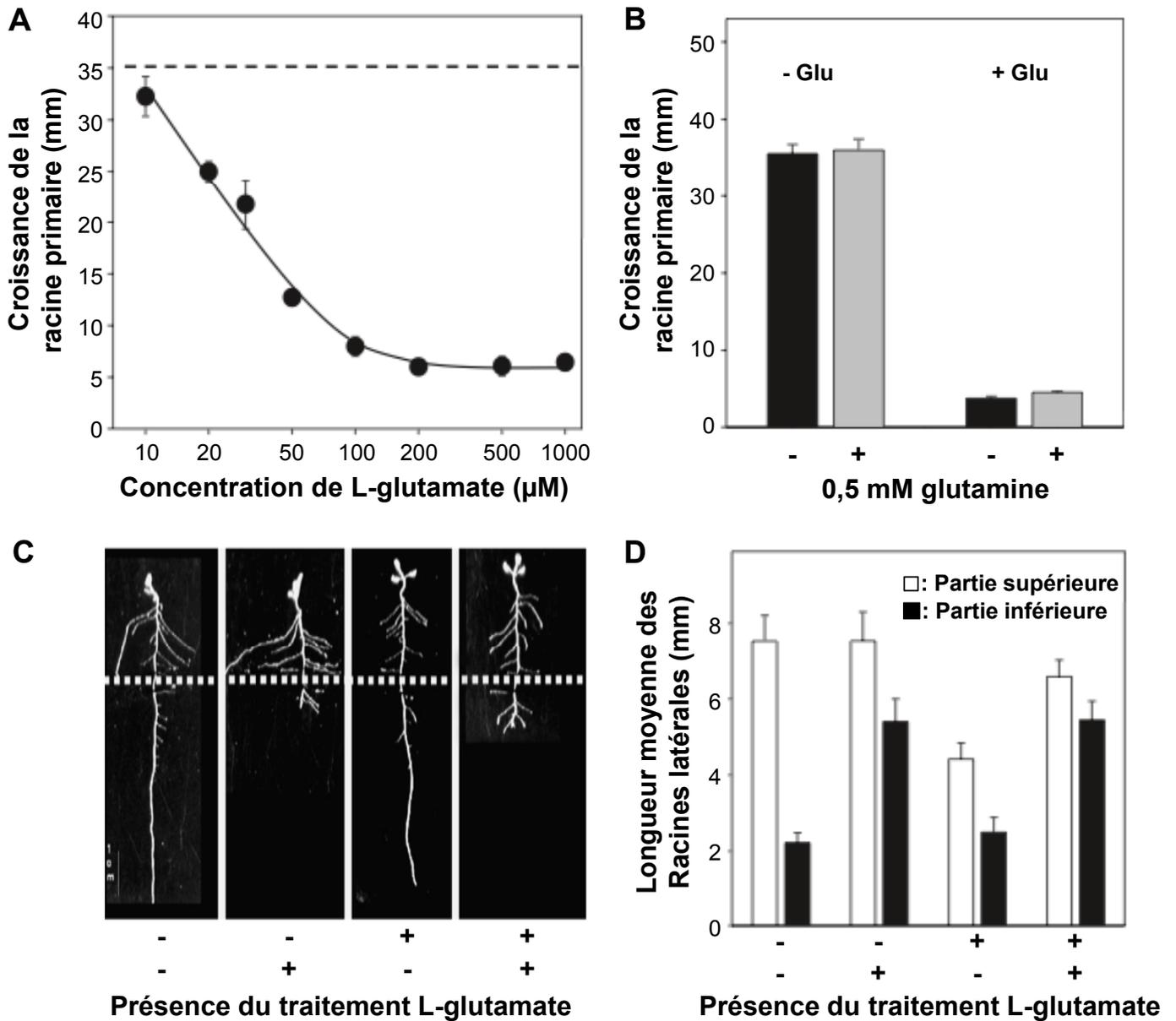


Figure II.36: Réponse du système racinaire de plantules d'*A. thaliana* (ecotype C24) à un apport exogène de L-glutamate. **A)** Effet de concentrations variables de L-glutamate sur l'élongation de la racine I. (\pm ES; $n = 6$). **B)** Effet d'un apport de 50 μM de L-glutamate sur l'élongation de la racine I en présence (+) ou non (-) de 0,5 mM de glutamine (\pm ES; $n = 8-9$). **C)** Effet d'un apport segmenté de 50 μM de L-glutamate sur le système racinaire. La ligne en pointillé représente la zone de segmentation. les symboles (+) et (-) représentent respectivement la présence et l'absence de L-glutamate dans chaque partie segmentée. **D)** Effet de l'apport segmenté de L-glutamate sur la longueur moyenne des racines latérales: la partie segmentée supérieure est indiquée par les barres blanches et la partie inférieure par les barres noires. (\pm ES; $n = 5-6$). Les plantules germent durant quatre jours en boîte de Pétri puis sont transférées sur les traitements durant six jours. Sauf indication contraire, les milieux de culture contiennent 0,5 mM de glutamine. (d'après Walch-Liu *et al.*, 2006).

C.3. Interactions entre les métabolismes N et hormonal sur la croissance racinaire

Nous présentons ici des résultats récents qui confirment les hypothèses implicites sur les relations entre la croissance racinaire et les métabolismes de l'azote et de l'auxine et d'autres hypothèses qui ouvrent des voies de futures recherches plus prometteuses.

C.3.1. Mesures des concentrations racinaires d'AIA en réponse à l'azote

Il a toujours été implicitement admis que la prolifération racinaire, lors d'une carence en azote, et l'inhibition de la croissance, lors d'un excès d'azote, étaient liées aux teneurs racinaires en auxine (Zhang *et al.*, 1999 ; Forde et Lorenzo, 2001; Forde, 2002). Ainsi, la carence en nitrate induirait une augmentation de la synthèse racinaire et du transport phloémique d'auxine conduisant à une croissance racinaire accrue, alors qu'un excès de nitrate induirait une baisse de la synthèse et du transport d'auxine entraînant une inhibition de l'élongation. De même, lors d'un apport hétérogène en nitrate, la réponse locale du système racinaire à un apport d'azote serait due à une synthèse accrue d'auxine au niveau local. Récemment, ces hypothèses ont été partiellement vérifiées.

Chez le Maïs, Tian *et al.* (2008) ont montré que l'inhibition de la croissance racinaire induite par les fortes concentrations de nitrate est corrélée à une baisse des concentrations phloémiques et racinaires d'AIA. Cependant, lors d'un apport hétérogène de nitrate en « système split root », la prolifération racinaire locale dans la partie alimentée par le nitrate n'est pas liée à une augmentation des concentrations racinaires d'AIA mais à la baisse du transport phloémique d' $[^3\text{H}]$ AIA et des concentrations en AIA (Liu *et al.*, 2010). Des apports d'AIA dans la partie alimentée par le nitrate (de 0,01 à 1 μM) inhibent encore plus l'élongation racinaire suggérant que l'AIA, à lui seul, n'est pas le seul facteur intervenant dans la réponse locale au nitrate (Liu *et al.*, 2010).

Du fait d'une distribution très hétérogène de l'AIA dans la racine, comme l'ont montré les dosages spectrométriques ou l'emploi de la lignée *DR5::GUS*, il reste cependant très difficile, à partir des mesures globales de concentrations tissulaires, de rendre compte des variations fines de l'AIA dans la racine, en réponse au nitrate (Ljung *et al.*, 2005).

C.3.2. Rôle des acides aminés dans l'homéostasie pour l'AIA

L'homéostasie cellulaire pour l'AIA dépend de plusieurs mécanismes tel que le stockage et la dégradation sous forme de conjugués d'auxine comme l'illustre la figure II.37. L'AIA, qui est la

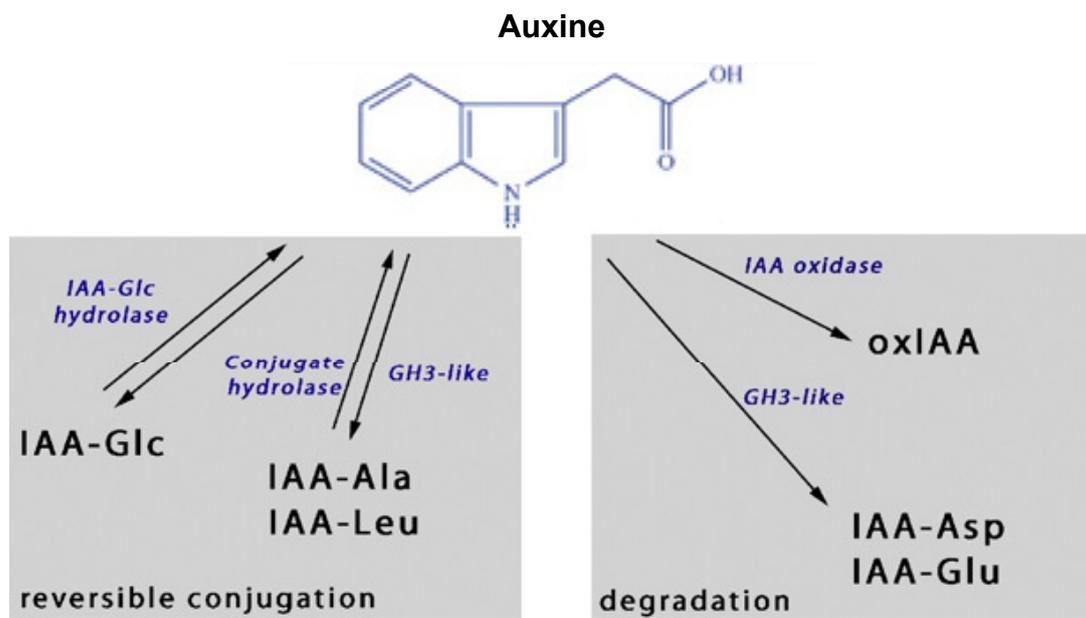


Figure II.37: Représentation des voies réversibles ou irréversibles des conjugués d'auxine permettant son homéostasie. (d'après Tromas *et al.*, 2010).

forme majeure d'auxine dans la cellule, peut être convertie en conjugués de type ester et amide, impliquant respectivement des UDP-glucose transférases et des amidotransférases. Une partie des formes conjuguées avec les acides aminés comme l'AIA-Ala, l'AIA-Leu et l'AIA-Phe sert au stockage de l'AIA et peut être hydrolysée par des hydrolases pour redonner de l'AIA libre (Staswick, *et al.*, 2005). D'autres formes, comme AIA-Asp et l'AIA-Glu sont des formes oxydables destinées à être dégradées (Normanly, 1997; Ljung *et al.*, 2002). Les concentrations des conjugués AIA-acides aminés augmentent après le traitement des plantes par l'AIA (Barratt *et al.*, 1999) ; dans les racines d'*Arabidopsis*, le dosage de l'AIA et des conjugués AIA-Asp et AIA-Glu par LC-MS-MS montrent qu'ils suivent une évolution parallèle (Kowalczyk et Sandberg, 2001). Les AIA amidotransférases ont été très récemment identifiées chez *Arabidopsis* (Staswick *et al.*, 2002 ; Staswick *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2008). Les gènes, codant ces enzymes, sont induits par l'auxine et appartiennent à une famille de dix-neuf membres divisés en trois sous-groupes (I, II et III) qui dépendent du type de substrat utilisé pour la conjugaison (AA, AS, GSH,...). Sept membres appartenant au sous-groupe II (*GH3.2* à *6*, *GH3.9* et *GH3.17*) sont capables de synthétiser des amides entre les acides aminés et l'AIA (Staswick *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008). Du fait de la forte redondance fonctionnelle des gènes de la famille GH3, les mutants correspondant à un seul gène ne montrent pas souvent de phénotype clair. Cependant, le mutant *gh3.3-9* présente une élévation racinaire réduite (Khan et Stone, 2007). De même, la lignée (*gh3.5-ID*) qui surexprime le gène *GH3-5* conduit à un phénotype racinaire altéré (Zhang *et al.*, 2007a). De façon, surprenante le conjugué AIA-Trp, ne semble pas être une forme de stockage de l'AIA mais intervient comme un inhibiteur des processus de croissance induits par l'AIA. L'AIA-Trp élimine l'inhibition de la croissance racinaire causée par l'apport de fortes doses d'AIA et inhibe la stimulation des racines latérales, induite par l'AIA (Staswick, 2009).

Jusqu'à ce jour, aucun parallèle n'a été établi entre le profilage des acides aminés et des conjugués AIA-AA, en relation avec les réponses à la disponibilité en nitrate des racinaires. Cependant, il apparaît urgent et impératif d'approfondir ces relations qui constituent certainement un point d'entrée direct, dans la compréhension des relations entre le métabolisme de l'azote et de l'AIA dans la croissance racinaires, ainsi que dans les mécanismes d'homéostasie pour l'Asp, le Glu et l'AIA. En effet, ce champ d'investigation pourrait remettre complètement en cause la notion de trancepteur définie précédemment.

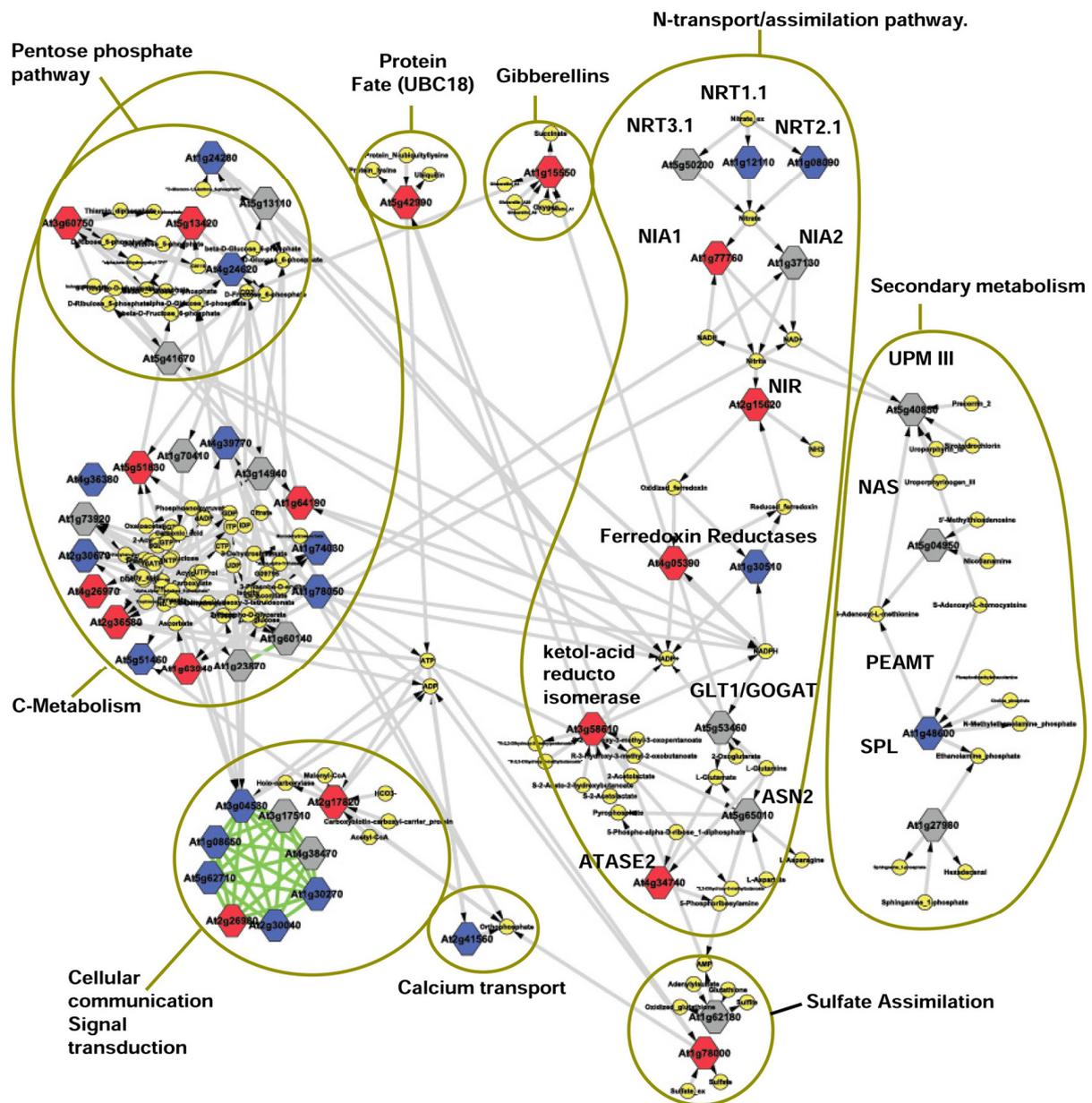


Figure II.38: Réseau de neuf clusters de gènes liés au métabolisme de l'azote. Cette schématisation permet de mettre en évidence les différents niveaux métaboliques ayant une interaction représentée par un code couleur: Hexagones bleu: les gènes exclusivement liés au métabolisme du nitrate; Hexagones rouge: gènes exclusivement liés au métabolisme du carbone et de l'azote; Hexagones gris: autres gènes; Cercles jaunes : les métabolites; Lignes grises: les interactions métaboliques; Lignes vertes : interactions protéines/protéines (d'après Nero *et al.*, 2009).

C.3.3. Signalisation croisée des réponses aux hormones et à l'azote à l'échelle de l'organe

Une étude transcriptomique récente portant sur l'analyse de soixante-seize puces ADN de type Affimetrix provenant de cinq laboratoires différents a permis de dégager plusieurs modules de gènes intervenant en réponse au signal nitrate (Nero *et al.*, 2009). Un module de cent vingt-six gènes induits et réprimés a ensuite été confronté aux résultats de deux cent soixante-dix-huit puces obtenues en réponse à des traitements hormonaux variés. La confrontation des résultats a permis de diviser le module de cent vingt-six gènes en deux sous-ensembles de gènes : des gènes qui répondent exclusivement au signal nitrate et d'autres qui répondent conjointement au signal nitrate et au signal hormonal (Fig. II.38). De façon surprenante, les gènes répondant de façon croisée aux deux types de signaux étaient plus induits que ceux répondant seulement au signal nitrate. Ce type d'analyse permet donc de mettre en évidence des signaux hormonaux qui amplifient la réponse au signal nitrate ainsi que des gènes candidats impliqués dans les relations entre le nitrate, la croissance et le développement. **En conséquence, les gènes, identifiés dans cette étude, sont probablement les candidats les plus sérieux dont nous disposons, actuellement, pouvant intervenir précocement sur la modulation de la NUE.**

C.3.4. Signalisation des réponses aux hormones et à l'azote au niveau cellulaire

Une nouvelle approche méthodologique permettant de réaliser des études transcriptomiques au niveau de protoplastes isolés, de différents types cellulaires de la racine, a permis d'identifier les acteurs moléculaires intervenant dans une signalisation croisée nitrate/auxine dans les cellules du péricycle (Gifford *et al.*, 2008). Cette voie de signalisation fait intervenir le *miARN167* et sa cible : le facteur de transcription ARF8 (Auxin Response Factor 8) induit par l'auxine. Ces deux gènes interviennent lors de la formation des cellules fondatrices des méristèmes des racines latérales. Cette interaction jouerait donc un rôle majeur dans la formation des *primordia* méristématiques des racines latérales en réponse au nitrate (Fig. II.39). L'emploi d'inhibiteurs pharmacologiques de la glutamine synthétase, seuls ou en présence de Gln, a démontré que les acides aminés, plutôt que le nitrate, semblaient contrôler cette voie de signalisation (Gifford *et al.*, 2008). De façon tout à fait surprenante, le *miARN167* et le facteur ARF8 contrôle également l'expression des gènes *AtGH3-5*, *AtGH3-2* et *AtGH3-6* impliqués dans l'homéostasie pour l'AIA (Tian *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2006a; Ludwig-Müller, 2009).

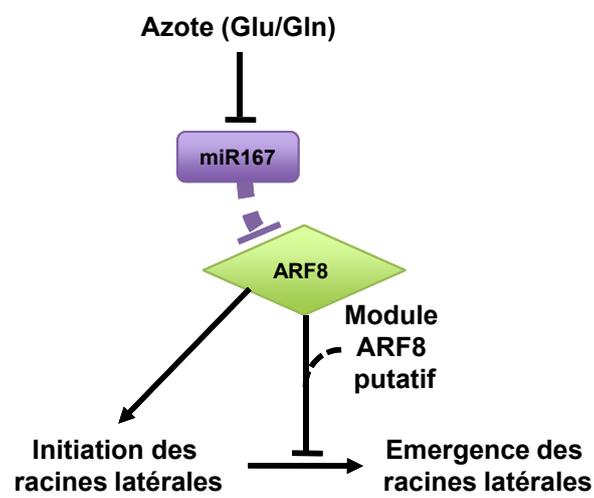


Figure II.39: Modélisation du contrôle antagoniste, par le micro ARN: miR167 et la protéine ARF8, de la détermination entre l'initiation et l'émergence des racines latérales, en réponse à la disponibilité en nitrate (d'après Gifford *et al.*, 2008).

En résumé, si des études semblent assigner un **rôle de transcepteur aux transporteurs NRT1.1 et NRT2.1**, le temps nécessaire à l'observation d'une réponse racinaire significative chez les mutants *nrt1* et *nrt2* laisse perplexe (6 à 9 jours) au regard des temps de réponse observés sur la croissance cellulaire lors de traitements d'auxine ou d'éthylène (quelques minutes à quelques heures). Ces résultats sont également à mettre en relation avec l'absence d'identification de mutants du développement racinaire correspondant à un transporteur de macro-élément comme le sulfate, le phosphate ou le nitrate. **De même, l'attribution actuelle de sept fonctions différentes au transporteur NRT1.1 : transporteur de nitrate à forte et à faible affinité, transporteur d'auxine, d'acides aminés, de peptides et récepteur nitrate lui confère une « malléabilité protéique » qui défie la mesure et la logique intellectuelles.** Bien que le lien entre le nitrate et la croissance des plantes soit clairement établi, il est surprenant qu'aucune étude sérieuse n'ait abordé l'effet du signal nitrate sur la croissance et l'élongation cellulaire telle que cette question a été posée et résolue, dans les années soixante à quatre-vingt-dix, concernant le signal auxinique (Rayle et Cleland, 1992).

En conclusion, jusqu'à présent, les études des modifications de l'architecture racinaire en réponse à la disponibilité en nitrate à l'aide de mutants des transporteurs NRT1.1 et NRT2.1 ont cherché à montrer l'implication de ces transporteurs dans les réponses observées *via* un rôle possible de ces transporteurs comme récepteur de nitrate (Remans *et al.*, 2006 a et b, Walch-Liu et Forde, 2008). Si ces études, portant sur **l'effet de la fonction sur la structure**, ont révélé la présence d'interactions entre les voies de signalisation nitrate et auxine, **la démarche inverse**, consistant à moduler la synthèse d'auxine et à mesurer l'impact des variations de structure sur l'activité et l'expression des transporteurs de nitrate, **n'a jamais été envisagée**. Pourtant, les effets rapides et majeurs des traitements AIA sur le développement des systèmes racinaires exploratoire et absorbant devrait permettre de mettre en évidence si la fonction des transporteurs NRT1.1 et NRT2.1 est purement compensatoire sur le plan de l'absorption et/ou intervient réellement en relation avec la signalisation hormonale sur la croissance racinaire. **Parmi les outils pharmacologiques disponibles, la modulation de la synthèse d'éthylène semble la plus pertinente pour réaliser cette approche inverse.** En effet, l'éthylène intervient à la fois sur la croissance des systèmes exploratoire et absorbant, seul ou en interaction avec l'auxine *via* la synthèse, le transport et la répartition de l'AIA le long de la racine (Stepanova *et al.*, 2005; Swarup *et al.*, 2007; Ruzicka *et al.*, 2007).

RELATIONS STRUCTURE-FONCTION : Transport de l'eau et du nitrate au cours de la croissance

A. Transport de l'eau et du nitrate au cours de la croissance

S'il est acquis que le nitrate et l'eau sont indispensables pour la croissance des plantes, les relations entre le transport du nitrate et de l'eau sont très loin d'être comprises et établies. Au plan éco-physiologique, négliger la question de l'effet du nitrate sur les propriétés hydrauliques en relation avec les changements structuraux (croissance et développement) revient à éviter la question de la coordination structure-fonction induite par le nitrate. En effet, si l'eau intervient sur les flux du nitrate du sol vers la racine (flux convectif et diffusif) et les flux vasculaires (xylémiques et phloémiques) dans la plante, **elle constitue également la seule variable morpho-physiologique qui rende compte des variations de croissance cellulaire et tissulaire induites par le nitrate**. Lorsque l'eau n'est pas limitante, les bascules dans les flux et l'allocation d'eau entre les racines et les parties aériennes pour la croissance en réponse à la disponibilité en nitrate vont donc pouvoir rendre compte des processus morphologiques affectés par le nitrate. Le but de ce chapitre est de montrer que **si l'on souhaite déterminer à plusieurs échelles spatio-temporelles les effets compensatoires structure-fonction** induits par la disponibilité en nitrate, **il est souhaitable de se placer, dans un premier temps, dans une situation physiologique simplifiée** où les interactions entre l'eau et le nitrate sont couplés.

A.1. Caractérisation du transport de l'eau dans la plante

A l'inverse du transport des ions minéraux, la présence de transporteurs spécifiques pour l'eau (aquaporines) dans la plante n'a pas été suspectée initialement. L'eau ne pouvant se concentrer dans les tissus, c'est une approche biophysique basée sur la thermodynamique des processus irréversibles qui a été utilisée pour décrire le transport de l'eau dans la plante plutôt qu'une approche enzyme-substrat comme dans le cas des ions (Slatyer et Taylor, 1960; Dainty, 1963; Kramer, 1983).

A.1.1. La théorie flux-force appliquée au transport de l'eau

Le mouvement de l'eau dans la plante peut être formalisé à partir de la loi générale régissant le transport de chaleur, de liquides et d'électricité ainsi que du mouvement de molécules par diffusion selon l'équation :

$$\text{Flux} = \frac{\text{Force motrice}}{\text{Résistance}} = - \text{conductance} \times \text{Force motrice} \quad (1)$$

Où la force motrice peut correspondre à une différence de potentiel électrique, hydrique et calorique aux bornes du système et K_h représente la conductance électrique, hydraulique ou calorique. Pour l'eau, cette loi fut initialement établie par Darcy (1856) pour décrire la circulation de l'eau par gravité dans un système poreux (sable) et formalisée par l'équation suivante :

$$Q = K_h A \frac{\Delta H}{L} \quad (1)$$

Où Q est le débit volumique ($m^3 \cdot s^{-1}$), K_h est la conductivité hydraulique (ou coefficient de perméabilité du milieu poreux $m \cdot s^{-1}$), A la surface de la section étudiée (m^2), ΔH est la différence des hauteurs piézométriques en amont et en aval de l'échantillon, L est la longueur de l'échantillon.

Appliquée à la plante, la force motrice correspond au potentiel hydrique $\Delta\Psi$ et l'équation 1 devient :

$$\text{Flux d'eau} = \frac{\text{Différence de potentiel hydrique } (\Delta\Psi)}{\text{Résistance}} \quad (2)$$

Cette équation est donc **directement équivalente à la loi d'Ohm** décrivant le flux d'électricité dans un conducteur :

$$\text{Courant (i)} = \frac{\text{U (différence de potentiel aux bornes du système en volts)}}{\text{Résistance (unité)}}$$

Le transport de l'eau dans le Continuum Eau-Plante-Atmosphère (CEPA) est donc, en tout point, comparable à la loi d'Ohm et aux lois rattachées de Kirchoff. Les lois de Kirchoff (ou lois des nœuds et des mailles), établissent que les résistances sont additives dans un système dont les composants sont disposés en série, alors que dans un système dont les composants sont disposés

en parallèle, se sont les conductances (inverse des résistances) qui sont additives (Van der Horst, 1948; Steudle et Peterson, 1998).

A.1.2. Les forces régissant le potentiel hydrique racinaire

Dans des conditions isothermes, les facteurs impliqués dans les relations hydriques à l'équilibre peuvent être résumés par l'équation suivante :

$$\Psi_{\text{eau}} = \Psi_{\text{p}} + \Psi_{\text{s}} + \Psi_{\text{m}} \quad (3)$$

Où Ψ_{eau} est le potentiel de l'eau dans la cellule, Ψ_{s} le potentiel osmotique des solutés, Ψ_{p} le potentiel de pression et Ψ_{m} le potentiel matriciel correspondant aux interactions solide-liquide sur le potentiel chimique de l'eau. En général, le Ψ_{m} est une forme particulière du terme hydrostatique dans les interfaces eau et air dans le sol ou dans la feuille. Il peut être négligé dans la racine et l'équation (3) devient :

$$\Psi_{\text{eau}} = \Psi_{\text{p}} + \Psi_{\text{s}} \quad (4)$$

Où Ψ_{eau} a toujours une valeur négative, Ψ_{p} est soit négatif lors de la transpiration des plantes, soit positif lors d'une absence de transpiration (pendant la nuit ou en conditions de forte humidité relative induisant la fermeture des stomates).

Lorsqu'une différence de pression hydrostatique est substituée à Ψ_{p} et une différence de pression de turgescence à Ψ_{s} , la différence de potentiel hydrique créant la force motrice dépend alors de ces deux forces agissant de façon opposée, l'une osmotique et l'autre hydrostatique en MPa selon l'équation suivante (Dainty, 1963) :

$$\Delta\Psi_{\text{eau}} = \Delta\Psi_{\text{p}} - \sigma\Delta\Psi_{\text{s}} \quad (5)$$

Ces deux composantes n'ont pas le même effet sur le flux d'eau en raison du fait que la pression osmotique dépend de la perméabilité des membranes racinaires aux solutés (mesurée par le coefficient de réflexion σ ; sans unité). Le coefficient de réflexion est compris entre 0 et 1 et mesure la capacité des solutés à passer la membrane par rapport à l'eau. Si $\sigma = 1$, les membranes racinaires sont complètement imperméables aux solutés mais pas à l'eau et si $0 < \sigma < 1$ alors les membranes deviennent plus perméables aux solutés vis-à-vis de l'eau. Pour la plupart des solutés osmotiquement actifs, la perméabilité des membranes pour l'eau est si forte que les valeurs de σ sont proches de 1.

A.1.3. Impacts des forces hydrostatiques et osmotiques sur le flux d'eau

L'équation (5) décrivant le flux d'eau du sol vers la racine peut alors s'écrire de la façon suivante (Dainty, 1963):

$$J_{\text{veau}} = Lp_{\text{rac}}(\Delta\Psi_{\text{eau}}) = Lp_{\text{rac}}(\Delta P - \sigma\Delta\pi) \quad (6)$$

Où J_{veau} est le flux d'eau (en m. s⁻¹), Lp_{rac} est la conductance hydraulique de la racine (en m. s⁻¹. MPa⁻¹), ΔP est la différence de potentiel hydrostatique (en MPa) et $\Delta\pi$ est la différence de potentiel osmotique entre le xylème et le sol (en MPa) et σ (le coefficient de réflexion ; sans unité) est compris entre 0 et 1 et mesure la perméabilité de la membrane aux solutés vis-à-vis de l'eau.

Le modèle de transfert de l'eau dans la racine est donc basé sur un **modèle à deux compartiments séparés par une membrane individuelle semi-perméable** qui sépare l'ensemble des assises racinaires du compartiment xylémique. La pertinence de ce modèle pour décrire le flux d'eau dans la plante a été discutée par Neumann (1976) et Dainty (1985). **En effet, les voies de circulation de l'eau et des ions dans les différentes assises racinaires constituent une véritable « boîte noire »**. Par exemple, il est très probable que le cadre de Caspari impose à l'eau et aux solutés de passer d'une voie de transport apoplastique à une voie de transport cellulaire. Ce que ne prend pas en compte la formalisation utilisée. En conséquence, **le coefficient de réflexion (σ_r), qui mesure la discrimination entre l'eau et les solutés, doit être considéré comme un paramètre opérationnel** qui rend compte, de façon globale, de la perméabilité racinaire à travers une seule membrane individuelle semi-perméable, mais en aucun cas, des événements sous-jacents. Même si un modèle à trois compartiments aurait été plus souhaitable avec un compartiment interne correspondant à l'endoderme, ce modèle a été conservé par la communauté scientifique dans la mesure où **il est d'un usage plus pratique, notamment, dans la détermination expérimentale des paramètres utilisés**. Ce formalisme permet, tout de même, de décrire deux situations extrêmes.

Le flux hydraulique : pression hydrostatique

Dans la première situation, le flux d'eau est seulement dû au ΔP et le $\Delta\pi$ est faible ou nul car le coefficient de réflexion est proche ou égal à zéro (il n'y a pas de discrimination entre l'eau et les solutés). Cette situation est rencontrée lorsque les plantes transpirent et que **le potentiel hydrique est principalement commandé par la pression hydrostatique négative dans le xylème**, ce qui signifie que la sève brute est sous tension. L'eau est alors absorbée de façon

passive, suivant les potentiels hydriques décroissants, le **flux est alors désigné comme un flux hydraulique**.

Le flux osmotique : pression osmotique

Dans la seconde situation, ΔP diminue et le potentiel osmotique, créé par l'accumulation des solutés dans le xylème, induit un transport radial d'eau dans la racine. Le coefficient de réflexion (σ_r) augmente, ce qui signifie que la discrimination entre l'eau et les solutés augmente. La membrane devient hémi-perméable et sélective, l'effet osmotique devient maximal. Cette situation est rencontrée lorsque la transpiration est réduite durant la nuit du fait de la fermeture des stomates, lorsque les plantes sont placées à forte humidité relative, ou lorsque les feuilles sont immergées dans une solution aqueuse. Dans ce dernier cas, une pression positive d'eau est générée dans la racine, la sève brute, qui est sous pression (poussée racinaire), peut induire une sortie d'eau dans les parties aériennes par les hydratodes (lacunes sous-épidermiques situées dans le prolongement des nervures principales): **c'est le phénomène de guttation**. L'eau est alors absorbée par osmose et le flux est alors désigné comme un flux osmotique (Kramer, 1983). La racine se comporte presque comme un osmomètre parfait où le compartiment interne correspond au xylème et le compartiment externe à la solution du sol.

En résumé, le modèle du transport de l'eau dans la plante est basé sur une loi flux-force (énoncée initialement par la loi de Darcy) formellement équivalente à la loi d'Ohm. Cette loi décrit le flux d'eau à partir des forces agissant sur le transfert d'eau dans la plante : les pressions hydrostatique et osmotique. **Ce modèle analyse donc le transport de l'eau sans invoquer le concept de transporteur mais à partir des paramètres tels que la conductance hydraulique (Lp_{rac}) et le coefficient de réflexion (σ_r)**. La validité de l'équation bio-physique, qui décrit le flux d'eau, a été d'abord testée expérimentalement sur racines excisées à l'aide de chambres à pression (chambre de Scholander), afin de mimer le flux hydrostatique induit par la transpiration (contrainte hydrostatique) ou en faisant varier la concentration des solutés du milieu de culture en l'absence de transpiration et en analysant les exsudats xylémiques (contrainte osmotique). Plus récemment, cette équation a été testée sur des plantes intactes au cours d'un cycle photopériodique en enregistrant la pression xylémique après empalement des racines à l'aide de fins capillaires (sondes à pression).

B. Le transfert radial de l'eau dans la racine : les différents modèles

B.1. Transition entre flux osmotique et hydraulique

La transition entre flux hydraulique et osmotique d'eau ainsi que la validité expérimentale de ce modèle flux-force appliquée au transfert de l'eau dans la racine fait débat depuis les années soixante-dix (Fiscus, 1975, Dalton *et al.*, 1975 ; Fiscus et Kramer, 1975 ; Passouria, 1988; Schneider *et al.*, 1997; Steudle, 1994a et b ; Steudle et Zimmermann, 1977 ; Wegner et Zimmermann, 2009). En effet, il a été montré expérimentalement que le flux d'eau n'est pas une relation parfaitement linéaire en fonction de la différence de potentiel hydrique (Lopushinsky *et al.*, 1964 ; Mees and Watherley, 1957a et b). **Ce modèle est en fait trop simplificateur dans la mesure où il suppose que les forces hydrostatiques et osmotiques sont indépendantes et qu'il considère l'ensemble des assises cellulaires de la racine comme une seule membrane semi-perméable.** En fait, même si dans ce modèle la Lp_{rac} doit être considérée comme constante, de nombreuses expériences ont montré que celle-ci varie.

Fiscus (1975) et Dalton *et al.* (1975) ont interprété le manque de linéarité du flux comme une diminution progressive du potentiel osmotique **par effet de dilution des concentrations de solutés dans le xylème, lorsque la plante transpire.** Cependant, Steudle et Zimmermann (1977) ont montré expérimentalement, sur racines de Maïs excisées, qu'il n'existe pas de linéarité entre le potentiel osmotique et le flux d'eau, même lorsque le potentiel hydrostatique est nul. **L'effet de dilution, même s'il existe, ne peut donc être seul en cause pour expliquer la non linéarité du flux.** Pour Passouria (1988), la conductance varie aussi, en fonction de l'ouverture et de la fermeture des plasmodesmes en relation avec la turgescence des cellules (Oparka et Prior, 1992 ; Passouria, 1988).

B.2. Le modèle composite de Steudle issu des travaux sur racines excisées

Pour Steudle (2000a et b), l'absence de linéarité de flux d'eau en fonction de la différence de potentiel hydrique et les faibles valeurs mesurées des coefficients de réflexion pour les solutés sont dues au fait que l'eau peut emprunter deux voies différentes pour circuler à travers la racine : la voie apoplastique et la voie transcellulaire, dont l'importance relative varie en fonction des conditions physiologiques.

Lorsque l'eau emprunte la voie apoplastique, elle transite au travers d'un réseau d'espaces intercellulaires délimités par les parois cellulaires. Cette voie ne fait pas intervenir de transport actif et ne permet pas un transfert d'eau jusqu'au xylème dans la partie mature de la racine. En

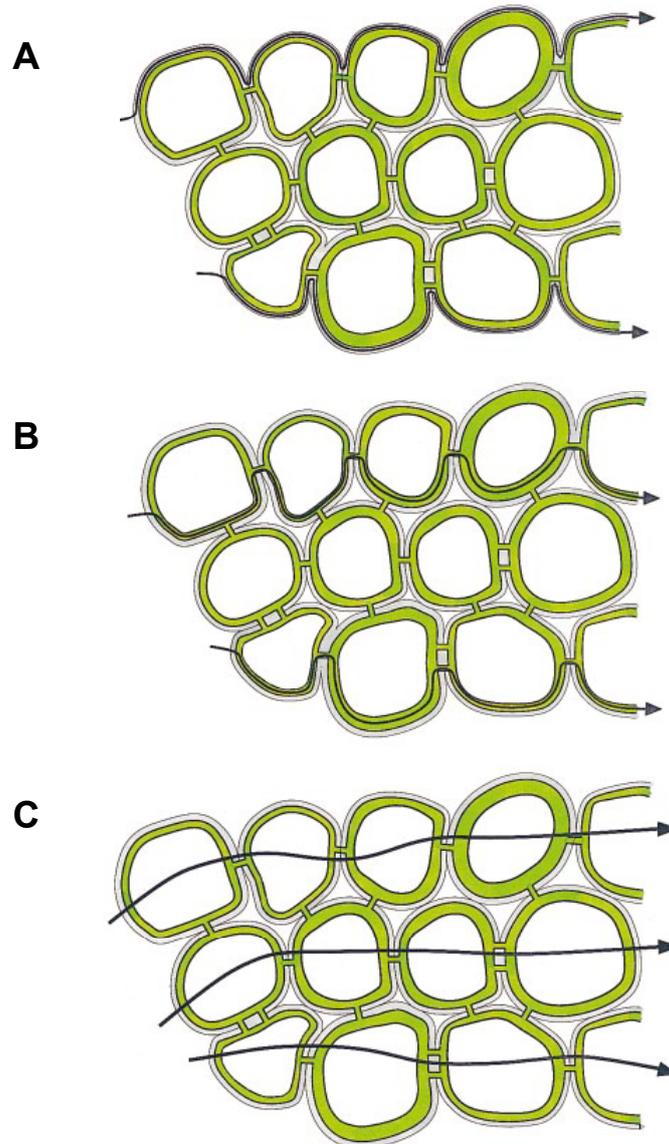


Figure II.40: Représentation des trois voies de transport possibles pour les flux d'eau et de solutés dans les tissus racinaires des plantes. En gris : les parois cellulaires; en vert : le symplaste (réunion des cytoplasmes des différentes cellules *via* les plasmodesmes); flèche noire : le trajet de l'eau. **A)** La voie apoplastique est une voie pariétale de transport ne nécessitant pas de transporteurs. **B)** La voie symplastique, qui traverse le symplaste cellulaire nécessitant un transport actif pour le passage de la membrane plasmique. **C)** La voie transcellulaire, nécessitant le passage de plusieurs membranes cellulaires, est dépendante de plusieurs transports actifs (d'après Steudle et Peterson, 1998).

effet, la présence de la bande de Caspary au niveau de l'endoderme rend la paroi imperméable à l'eau et aux solutés (électrolytes et non électrolytes) et, par conséquent, oblige les flux d'eau ou de solutés à utiliser la voie cellulaire. Dans l'endoderme, la perméabilité pour l'eau reste néanmoins supérieure à celle des solutés. Cette voie ne peut atteindre les tissus conducteurs que dans la zone de l'apex de la racine où la bande de Caspary n'existe pas encore. Cependant, dans cette zone, les tissus conducteurs ne sont pas encore matures, ce qui réduit fortement l'implication de cette voie dans le transport de l'eau et des ions, comme l'ont montré des études sur les capacités d'absorption d'eau le long de la racine, depuis l'apex jusqu'au collet (Kramer, 1983; Fig. II.40 A).

Lorsque l'eau emprunte la voie cellulaire (voies symplastique et intercellulaire), le flux d'eau s'effectue au travers des cellules et l'eau emprunte des transporteurs spécifiques : aquaporines. Le transport est donc un transport actif. Dans cette voie de transport, il faut distinguer deux types différents de transports qui ne peuvent pas être dissociés expérimentalement. En effet, le flux d'eau peut transiter de cellules à cellules à travers les membranes cellulaires des différentes assises cellulaires racinaires (*via* les aquaporines) ou bien *via* le réseau de plasmalemmes (*via* les plasmodesmes ; Fig. II.40 B et C).

B.2.1. Principe du modèle composite de Steudle

Steudle a donc proposé un **modèle dit « composite du transport de l'eau dans la racine »** pour expliquer les variations de Lp_{rac} et du coefficient de réflexion σ_r dans les différentes situations observées expérimentalement dans le transfert de l'eau racinaire (Steudle, 1994 a et b). Dans ce modèle, l'eau et les solutés peuvent transiter, sans discrimination, par la voie apoplastique, tandis que leur transport cellulaire, aux travers des membranes, fait intervenir des systèmes de transporteurs d'eau et de solutés.

En présence de transpiration, le flux d'eau très important emprunte principalement la voie apoplastique et le flux de solutés (électrolytes et non électrolytes) est peu lié au flux d'eau. La résistance au flux d'eau est donc faible et la valeur du coefficient de réflexion proche ou égale à 0 ($\sigma_r = 0$). Il n'y a pas de passage de membranes plasmiques ou seulement au niveau de l'endoderme à cause du cadre de Caspary.

En absence de transpiration, le flux d'eau plus faible, dépend principalement de la différence de potentiel osmotique créée par l'accumulation des ions dans le xylème. Dans ce cas, le flux d'eau et les flux de solutés sont liés. Le coefficient de réflexion augmente et sa valeur s'approche de 1, la membrane devient héli-perméable et discrimine fortement l'eau et les solutés.

La racine fonctionne presque comme un osmomètre parfait. Cependant, la détermination des valeurs des coefficients de réflexion pour l'eau et de différents solutés, à l'échelle racinaire, a

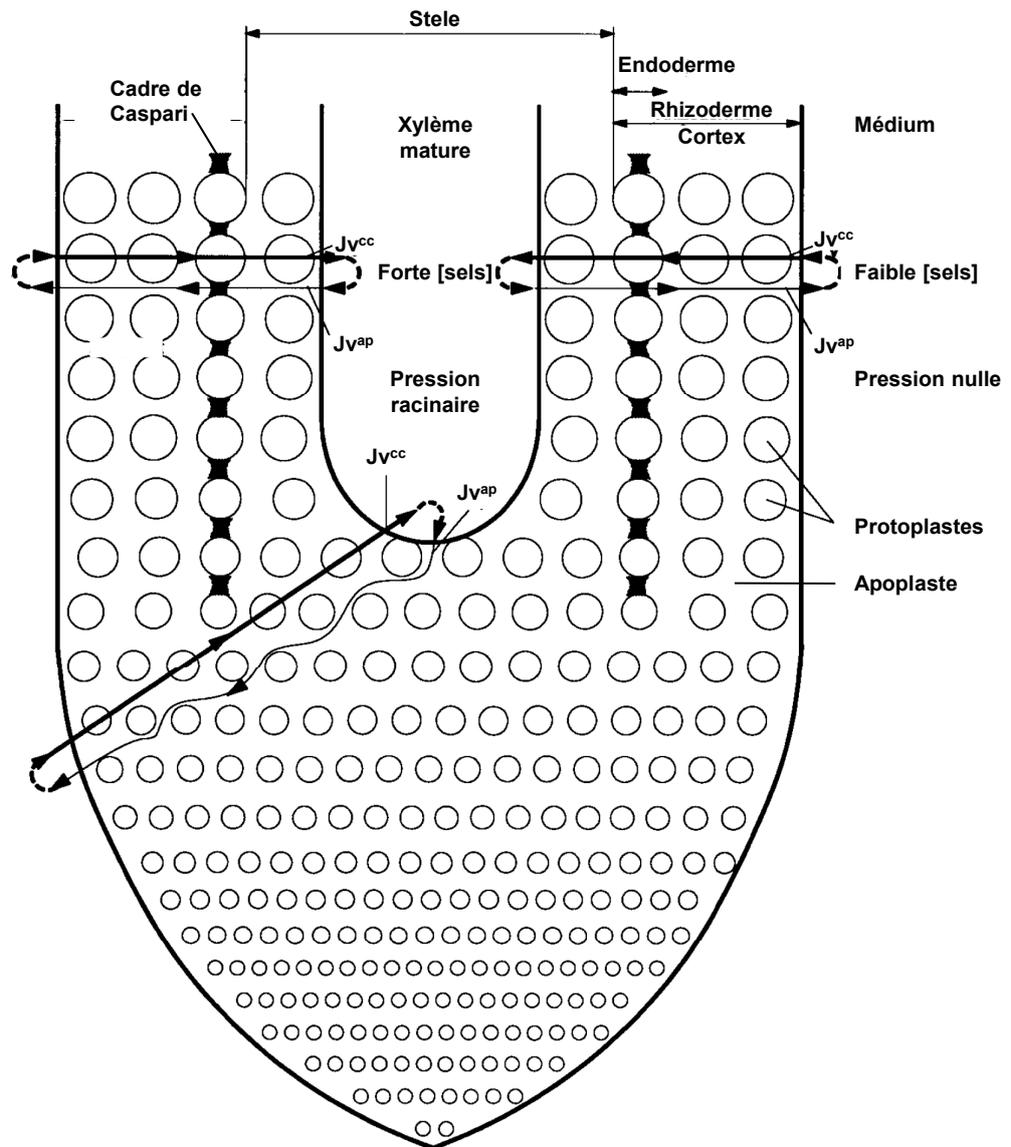


Figure II.41: Représentation du modèle de transport composite dans le système racinaire. L'eau et les solutés utilisent deux voies différentes: les transports symplastique (J_v^{cc} cellules à cellules) et apoplastique (J_v^{ap}) (d'après Steudle et Peterson, 1998).

montré que les coefficients de réflexion n'étaient pas égaux à 1 mais s'en rapprochaient. Ainsi, ont été mesurés, chez le Maïs, les coefficients suivants : $\sigma_{\text{KNO}_3} = 0,67$, $\sigma_{\text{NaCl}} = 0,64$; $\sigma_{\text{PEG}} = 0,82$, $\sigma_{\text{saccharose}} = 0,54$; $\sigma_{\text{mannitol}} = 0,74$ et $\sigma_{\text{KCl}} = 0,53$. **En conséquence, en absence de transpiration, la racine ne se comporte pas comme un osmomètre parfait.** Par ailleurs, expérimentalement, la comparaison entre les valeurs de conductivité cellulaire et de conductivité racinaire permet de déterminer la voie préférentiellement utilisée (apoplastique *versus* cellulaire). Le modèle composite fonctionne aussi bien chez les plantes ligneuses et herbacées, mais il a été montré des différences d'ordre de grandeur importante (facteur 10) dans les valeurs de Lp_{rac} , sous contrainte hydraulique et osmotique, chez les espèces ligneuses (Rudinger 1994 ; Steudle et Heydt, 1997; Steudle *et al.*, 1996 ; Steudle et Peterson, 1998 ; Fig. II.41).

B.3. Les résultats contradictoires de Zimmermann issus des travaux sur plantes intactes

Zimmermann *et al.* ont testé expérimentalement le modèle flux-force du transport de l'eau **sur plantes intactes** en mesurant la pression xylémique à l'aide d'une sonde à pression et en faisant varier *i*) la pression osmotique de la solution nutritive, *ii*) l'éclairement et *iii*) l'humidité relative. L'objectif était de moduler la transpiration et de décrire de multiples situations physiologiques (Ryggol *et al.*, 1993; Schneider *et al.*, 1997). Ils ont ainsi suivi chez le Blé, l'Orge et le Maïs, au cours d'un cycle photopériodique, les variations de la pression xylémique, de la pression osmotique et du coefficient de réflexion (Lopez *et al.*, 2003 ; Fig. II.42). **En faisant l'hypothèse que la plante intacte se comporte comme un osmomètre parfait donc que $J_{\text{eau}}=0$** , il est alors possible de calculer le coefficient de réflexion dans les différentes conditions expérimentales à l'aide de la formule:

$$\sigma_r = \frac{\Delta P_x}{\Delta \pi}$$

En utilisant cette formule, ils ont obtenu **des résultats inverses à ceux décrits dans le modèle composite de Steudle lorsque la plante transpire** (Fig. II.41). Ils montrent, en effet, qu'**à plein régime transpiratoire, la plante se comporte comme un osmomètre parfait** : le coefficient de réflexion est égal à 1 ($\sigma_r=1$). A l'inverse, en absence de transpiration, pendant la nuit ou lorsque la plante est placée à forte humidité relative, le coefficient de réflexion diminue $\sigma_r=0,15-0,4$.

Cette contradiction provient du fait que lorsque la plante transpire le terme : $\sigma \Delta \pi$ de l'équation (6) est proche de zéro. Or, cette valeur nulle peut être due : soit à la forte diminution de

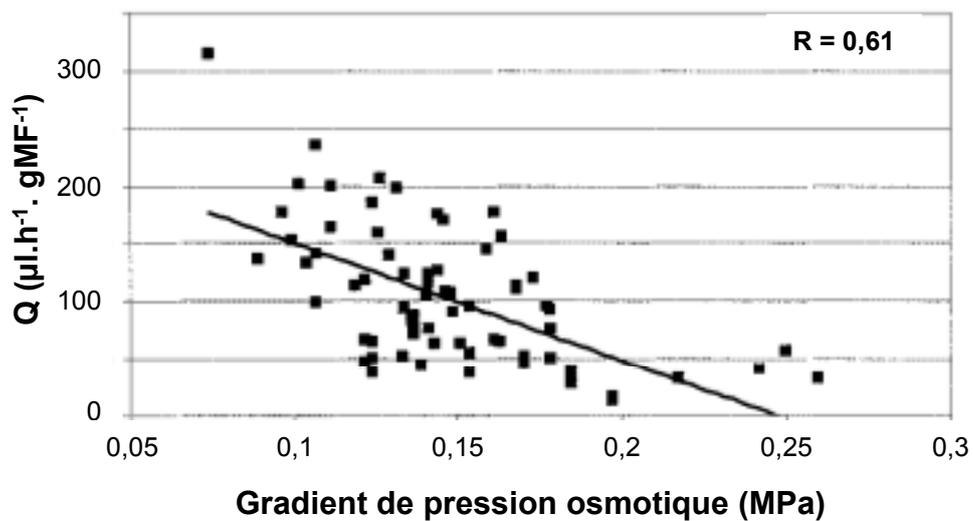


Figure II.42: Relation entre le flux d'eau (Q) et le gradient de la pression osmotique entre le milieu externe et la sève xylémique. Chaque point représente une mesure effectuée sur une plante cultivée en photopériode standard (16 h de jour/ 8 h de nuit). La régression linéaire est significative avec une valeur de $P = 0,005$ (d'après Lopez *et al.*, 2003).

$\Delta\pi$ (effet de dilution), soit à celle de σ_r . Pour Zimmermann, la sélectivité membranaire entre l'eau et les solutés est maximale, lorsque la transpiration de la plante est à son maximum, puisqu'à ce moment, seule l'eau peut passer au travers de la membrane hémi-perméable de la racine donc $\sigma_r = 1$. C'est donc seulement $\Delta\pi$ qui chute vers une valeur proche de zéro. Pour Steudle, $\sigma_r = 0$, bien que cette approximation ne cadre pas avec la définition du coefficient de réflexion, il faut garder à l'esprit, comme l'a dit Dainty (1963), que **le coefficient de réflexion est un paramètre opérationnel**. Celui-ci rend compte, à l'échelle racinaire, d'une superposition, pour l'eau et les solutés, de trois voies de passage (apoplastique, cellulaire et symplastique), dont **l'importance respective peut être que supposée mais non établie expérimentalement (« boîte noire »)**.

Malgré cette divergence d'interprétation, **en absence de transpiration**, les résultats de Zimmermann s'accordent avec les résultats et le modèle de Steudle. Dans cette situation, **les plantes se comportent presque comme des osmomètres parfaits** puisque les coefficients de réflexion pour les différents solutés étudiés en parallèle avec le passage de l'eau varient de 0,2 à 0,8. **Dans cette situation**, il est raisonnable de supposer que **l'absence de tension xylémique et la présence d'une poussée racinaire, exercée par les solutés, favorisent majoritairement le transport actif de l'eau et des solutés via des transporteurs membranaires placés en parallèle sur les assises cellulaires**, plutôt qu'un transport passif par voie apoplastique.

En résumé, les approches expérimentales, basées sur l'équation flux-force du transport de l'eau, tentent d'expliquer les variations de la conductance hydraulique et du coefficient de réflexion en relation avec les forces appliquées. Les déviations expérimentales des mesures par rapport au modèle bio-physique sont expliquées grâce au « modèle composite » de Steudle. Celui-ci a été établi à partir de mesures sur racines excisées. Cependant, les travaux sur plantes intactes viennent démentir quelque peu ces conclusions. Comme l'a souligné Clarkson (1993) : **« la vérité est que notre perception de la façon dont l'eau et les solutés circulent (parcours cellulaire) dans la racine, est basée beaucoup plus sur l'intuition que sur des informations »**. De façon surprenante, bien que nous disposions, depuis vingt ans, de nombreux outils moléculaires sur les transporteurs d'eau et d'ions ainsi que des outils permettant de mesurer les flux d'eau et d'ions, aucune étude sérieuse n'a abordé cette question fondamentale pour l'agriculture. **En considérant attentivement les résultats de Steudle et de Zimmermann, il ressort qu'en conditions de faible transpiration (pendant la nuit ou à forte humidité relative) le transport membranaire actif de l'eau et des solutés doit être prépondérant**.

C. Relation entre le transport de l'eau et le transport du nitrate

C.1. Variations de la conductance hydraulique racinaire induite par une carence minérale

Le couplage établi, entre les flux d'eau et de solutés dans l'équation biophysique (6), a été observé dans le cas de carences pour divers éléments minéraux. Ainsi, des travaux anciens sur racines excisées montrent que l'augmentation des concentrations en ions minéraux, comme le nitrate dans la solution nutritive, stimule l'exsudation de sève xylémique (Ezeta et Jackson, 1975; Minshall, 1964 et 1968; Triplett *et al.*, 1980). Sur des plantules intactes de Cotonnier, une carence nutritionnelle pour le nitrate et le phosphate induit la diminution de la conductivité hydraulique racinaire (L_{prac}). Celle-ci précède la diminution de la transpiration et de la conductance foliaire (Radin, 1990 ; Radin et Ackerson, 1981; Radin et Matthews, 1989 ; Radin and Eidenbock, 1984). En fait, la baisse de la conductance racinaire a été observée lors de privation pour les trois anions majeurs : NO_3^- , $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ et SO_4^{2-} chez l'Orge et le Blé (Carvajal *et al.*, 1996 ; Karmoker *et al.*, 1991).

C.2. Effet spécifique du nitrate sur la conductance hydraulique de racines excisées

Dans les années quatre-vingt-dix, une attention particulière a été portée aux variations de la conductance hydraulique racinaire induites par la nature de l'élément minéral considéré. Ainsi le traitement de racines excisées par le NaCl réduit la L_{prac} (Carvajal *et al.*, 2000; Peyranao *et al.*, 1997; Martinez-Ballesta *et al.*, 2000) alors que le traitement par le nitrate ou le KCl l'augmente (Graham et Ulrich, 1972; Hoarau *et al.*, 1996). Dans le cas du nitrate, les modifications induites du flux xylémique *via* l'application d'une contrainte hydrostatique (chambre à pression) ou osmotique (concentration en sel de la solution nutritive) ont confirmé que le KNO_3 (comparé au KCl) augmentait beaucoup plus la conductance hydraulique. En effet, lors d'une contrainte osmotique, comparé au KCl, le nitrate (10 mM) augmente la conductance d'un facteur 2,2 à 3,9 tandis que lors d'une contrainte hydrostatique, la présence de nitrate augmente la conductance d'un facteur 1,6. Cependant, la conductance induite par la force hydrostatique était 5 à 20 fois supérieure à celle induite par la contrainte osmotique (Hoarau *et al.*, 1996).

Des résultats similaires ont été récemment obtenus sur racines excisées de Tournesol, de Maïs et de Tomate soumises à une contrainte osmotique induite par le nitrate (Gloser *et al.*, 2007, Gorska *et al.*, 2008a). Ainsi, il a été montré sur des plantules de Tournesol et de Maïs que la conductivité augmentait, en moins de deux heures, lors du changement de concentrations externes

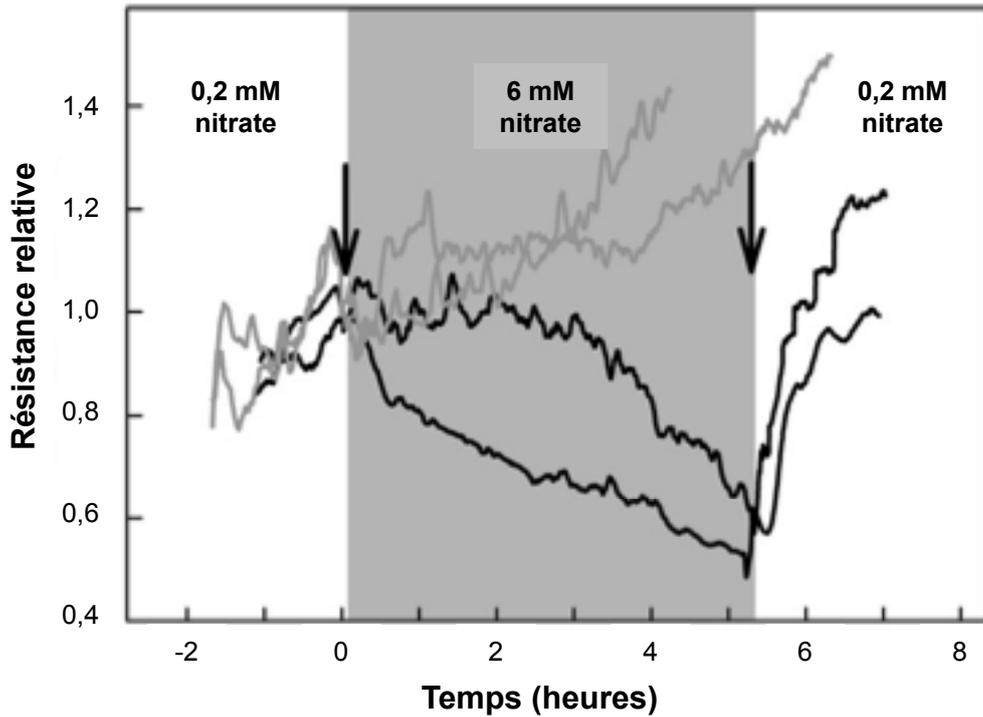


Figure II.43: Mesure de la résistance hydraulique racinaire de deux plantes de Tournesol, en réponse à une augmentation (passage de 0,2 à 6 mM de KNO_3 flèche noire à gauche) et une diminution (passage de 6 à 0,2 mM de KNO_3 flèche noire à droite) de la concentration exogène de nitrate (courbes noires). Les deux plantes témoins sont traitées avec une concentration de 0,2 mM de KNO_3 (courbes grises). La résistance hydraulique est mesurée *in vivo* à l'aide d'une chambre à pression. (d'après Gloser *et al.*, 2007).

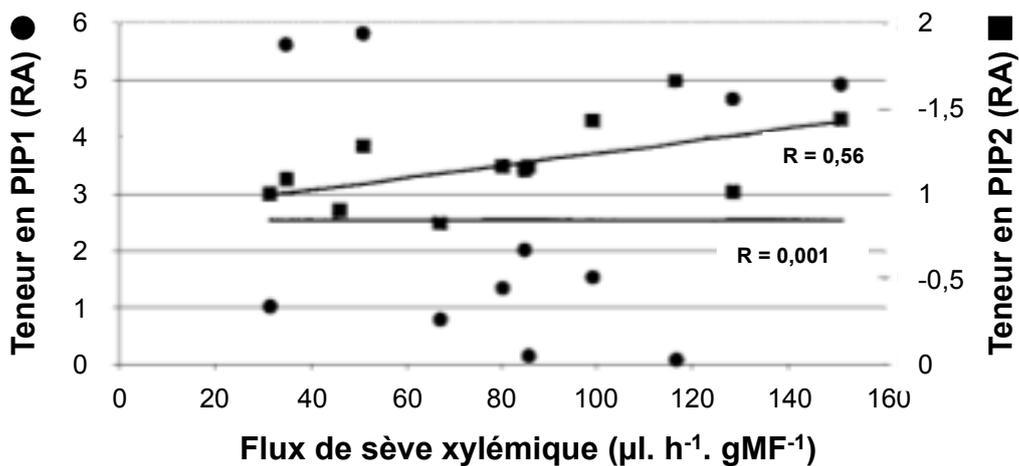


Figure II.44: Relations établies après neuf jours de traitement entre les teneurs des protéines (ZmPIP1, ZmPIP2) et le flux d'eau dans les racines de maïs. La régression linéaire n'est significative avec une valeur de $P < 0,01$ uniquement entre ZmPIP2 et le flux de sève xylémique (d'après Lopez *et al.*, 2003).

en nitrate de 0,2 à 6 mM et diminuait, en quelques minutes, lors du passage de 6 à 0,2 mM (Gloser *et al.*, 2007; Gorska *et al.*, 2008a ; Fig. : II.43).

Deux hypothèses, non mutuellement exclusives, ont été proposées pour expliquer l'augmentation de conductivité racinaire, sous contrainte osmotique, induite par le nitrate. Le nitrate pourrait soit *i*) modifier le potentiel hydrique en augmentant le potentiel osmotique *via* l'accumulation de nitrate dans le xylème, soit *ii*) induire une augmentation de la conductivité hydraulique des tissus racinaires *via* l'augmentation de la transcription et de l'activité des canaux à eau : « aquaporines » sans pour autant qu'il y ait une forte accumulation de nitrate dans le xylème.

C.3. Eléments en faveur d'un contrôle par le nitrate de l'activité des aquaporines

Lors d'une contrainte osmotique induite par le nitrate (13 mM) sur racines excisées de Maïs, la forte augmentation du flux hydraulique n'est pas liée à l'augmentation de l'osmolarité de la solution exsudée (Barthes *et al.*, 1995, Lopez *et al.*, 2003). De même, au cours d'un cycle nyctéméral, les oscillations du flux xylémique d'eau ne sont pas corrélées positivement à l'augmentation du potentiel osmotique du xylème comme attendu, mais corrélées négativement (Lopez *et al.*, 2003). Ces résultats sont en accord avec l'idée que l'augmentation de conductance hydraulique racinaire fait intervenir principalement la voie trans-cellulaire et l'activité des aquaporines. Dans ce sens, les oscillations diurnes du flux xylémique en réponse à la contrainte osmotique induite par le nitrate ne sont pas liées aux patrons d'expression des ARNm codant des aquaporines de la famille PIP1 et PIP2, mais corrélées avec les variations des quantités de protéines PIP2 (Lopez *et al.*, 2003 ; Fig. II.44). Ces résultats suggèrent donc une régulation possible par le nitrate lui-même de l'activité des aquaporines (ouverture des canaux). Ils sont également en accord avec des résultats récents, chez le Maïs, montrant que les variations de la conductivité hydraulique induite par le nitrate sont plutôt liées à des modifications post-transcriptionnelles des aquaporines (phosphorylation) qu'à un changement de leur expression (Gorska *et al.*, 2008 a et b ; Fig. II.45). En effet, le changement rapide (minutes-heures) de la conductance hydraulique n'est pas associé avec le changement d'expression de six gènes codant des aquaporines de la famille *ZmPIP1* et de 7 gènes codant des aquaporines de la famille *ZmPIP2*. L'ensemble de ces résultats concorde également avec les études transcriptomiques chez *A. thaliana* et *L. esculentum* en réponse au nitrate où les aquaporines ne semblent pas induites au niveau transcriptionnel à court terme (30 min et 3h) mais à long terme après une privation de quarante-huit heures (Schieble *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2000, 2003, 2004; Wang *et al.*, 2001).

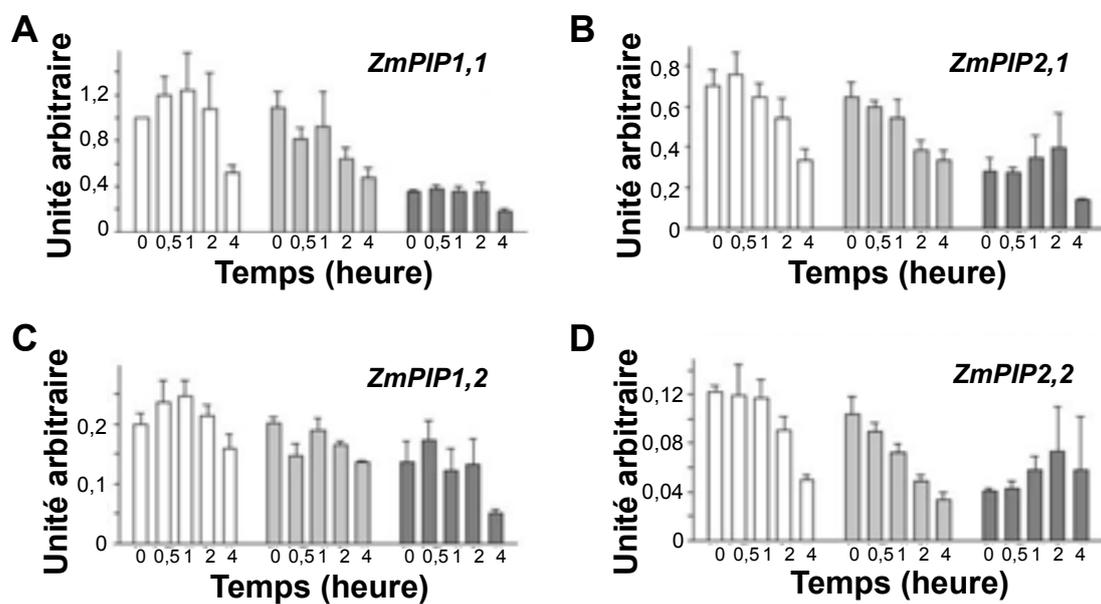


Figure II.45: Expression relative de différentes aquaporines dans les racines de maïs: **A)** ZmPIP1.1; **B)** ZmPIP2.1; **C)** ZmPIP1.2 et **D)** ZmPIP2.2. Les barres blanches représentent les valeurs des témoins, les barres grises représentent les valeurs pour les plantes cultivées en présence de 5 mM de KNO₃ et les barres grises foncées représentent les valeurs pour les plantes cultivées avec 5 mM de KNO₃ après un pré-traitement au tungstate pendant 48 h. (\pm ES; n = 3 répétitions d'un pool de trois plantes; d'après Gorska *et al.*, 2008a).

Néanmoins, le lien biochimique direct ou indirect entre le traitement par le nitrate et les variations d'activité des aquaporines (ouverture des canaux par phosphorylation) n'est pas clairement établi. En effet, le traitement des racines excisées de Maïs et de Tournesol par des inhibiteurs de la GS (méthionine sulfoximine) et de la NR (tungstate) empêche l'augmentation du flux xylémique, alors que chez les plantes traitées par le tungstate, un apport de NH_4^+ ou d'urée restaure les valeurs de conductance. Ces résultats suggèrent donc l'implication possible d'un des produits de l'assimilation du nitrate dans les variations observées de la Lp_{rac} lors d'un traitement par le nitrate (Barthes *et al.*, 1996; Gloser *et al.*, 2007). Cependant, le fait que le tungstate inhibe significativement l'expression des aquaporines, l'accumulation de nitrate dans les cellules racinaires, mais aussi le fait qu'il puisse influencer la synthèse d'ABA et d'AIA, conduit à examiner avec beaucoup de précaution ces résultats (Gorska *et al.*, 2008b), qui plaident, plutôt, en faveur d'un rôle signalétique ou métabolique spécifique du nitrate.

C.4. Variations photopériodiques des propriétés hydrauliques sur racines excisées sous contraintes hydrostatique (chambre à pression) ou osmotique (stress nutritionnel)

En 1986, Fiscus a étudié et modélisé, sur racines excisées, les variations des paramètres intervenant sur le flux de solutés en relation avec les propriétés hydrauliques racinaires sous contrainte hydrostatique (chambre à pression) à partir de l'équation suivante :

$$J_s = (1-\sigma) C_s J_v + \omega \Delta\pi + J_s^* \quad (1)$$

Dans cette équation, établie par Fiscus en 1975, le premier terme : $(1-\sigma) C_s J_v$ décrit la résistance induite par le flux d'eau (solvant) sur le flux de soluté (« drag effect »). σ correspond au coefficient de réflexion (sans unité), C_s est la concentration du soluté dans le milieu (en mol.m^3), J_v correspond au flux d'eau (en m.s^{-1}). Le deuxième terme : $\omega \Delta\pi$, correspond à la mobilité passive du soluté avec ω coefficient de mobilité passive (en $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$), $\Delta\pi$ le potentiel osmotique créé par la différence de concentration du soluté entre le xylème et la solution (en MPa). Dans le troisième terme, J_s^* correspond au flux actif de soluté qui résulte de l'action de transporteurs (en $\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Ce modèle du flux de solutés, comme le modèle sur le flux d'eau, est un modèle à deux compartiments.

Cette étude a révélé que l'ensemble des paramètres de l'équation $\sigma, \omega, \Delta\pi, J_v, J_s^*$ variait de façon nycthémerale, sans pouvoir expliquer ce qui était responsable de ces changements. Cependant, l'estimation des variations de la Lp_{rac} , ré-introduite dans l'équation, a montré que celle-ci restait relativement stable au cours du cycle photopériodique.

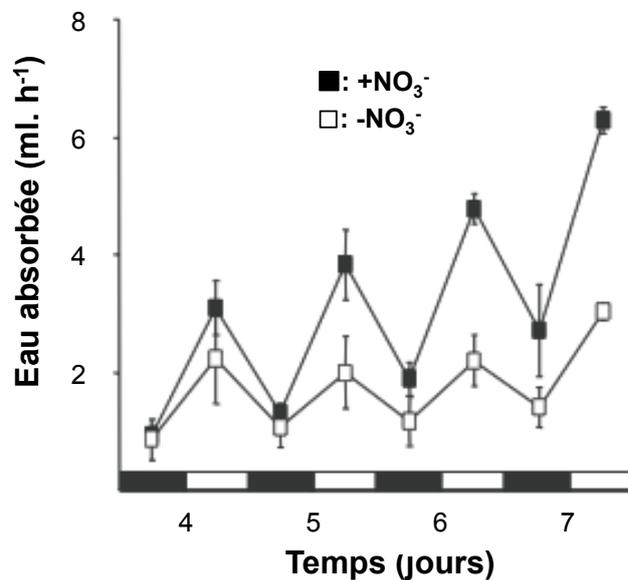


Figure II.46 : Effet d'un apport localisé d'azote sur le taux d'absorption d'eau chez *Phaseolus vulgaris* L. entre 3 et 7 jours de traitement. Les plantes sont cultivées en système "split-root". Un compartiment est alimenté avec une solution contenant du nitrate (■) et l'autre compartiment est privé en nitrate (□). Les barres blanches et noires sur l'axe des abscisses représentent les périodes de jour et de nuit. Il y a significativité lorsqu'il n'y a pas chevauchement (t-test $n = 4$). (d'après Carvajal *et al.*, 1996).

Plus récemment, une autre étude sur les modifications des paramètres hydrauliques sur racines excisées de Blé au cours d'un cycle nyctéméral a été établie à partir de l'équation du flux d'eau:

$$J_{\text{veau}} = Lp_{\text{rac}} (\Delta P - \sigma \Delta \pi)$$

L'absence de transpiration et le recours à aucune chambre à pression, dans les conditions de mesure utilisées, conduit à faire disparaître le terme ΔP de l'équation (Carvajal *et al.*, 1996):

$$J_{\text{veau}} = - Lp_{\text{rac}} (\sigma \Delta \pi) \quad (2)$$

Cette étude a révélé que le flux d'exsudation (J_v) et la conductance hydraulique (Lp_{rac}) calculés à partir de l'équation (2) varient au cours d'un cycle nyctéméral (Fig. II.46). De même, le flux de soluté (J_s), calculé à partir de l'osmolarité de la solution exsudée, montre que celui-ci varie aussi de façon nyctémérale. Le flux d'exsudation (J_v) et la conductance hydraulique (Lp_{rac}) sont plus forts pendant la phase lumineuse que la phase nocturne. Cependant le flux de soluté (J_s) est le plus fort à la fin de la phase nocturne et décline au cours de la photopériode. En conséquence, l'augmentation de la Lp_{rac} le jour signifie que la force motrice ($\sigma \Delta \pi$) est faible alors que la diminution de Lp_{rac} la nuit signifie que la force motrice est plus forte. Par ailleurs, l'élimination du nitrate de la solution nutritive conduisait à une diminution significative de J_v et de Lp_{rac} , que ce soit pendant la phase diurne ou nocturne, sans modifier les différences jour/nuit de ces paramètres. De même, la réalimentation des plantes par 5 mM de nitrate induisait une augmentation des valeurs de J_v et Lp_{rac} jusqu'aux valeurs des plantes contrôles, sans modifier également les différences jour /nuit (Carvajal *et al.*, 1996).

Au cours de ces deux études, les différences, dans les variations nyctémérales de la conductance racinaire, sont surprenantes et méritent plus d'attention (Fiscus, 1986 ; Caraval *et al.*, 1996). Elles devraient permettre d'affiner l'équation du flux de solutés, établi par Fiscus en 1975 mais peu éprouvée ni testée depuis (Dainty, 1985; Clarkson, 1993).

D. Relations entre le statut nutritionnel et les propriétés hydrauliques sur plantes intactes

Sur plantes intactes, il apparaît que les conductances hydraulique et stomatique qui interviennent sur les propriétés hydrauliques dépendent fortement du statut nutritionnel (Carvajal *et al.*, 1996 ; Chapin *et al.*, 1988 ; Chapin, 1990 ; Clarkson *et al.*, 2000). Ceci peut être, facilement, mis en évidence à l'aide de la « technique split root » sur plantes intactes en conditions transpirantes.

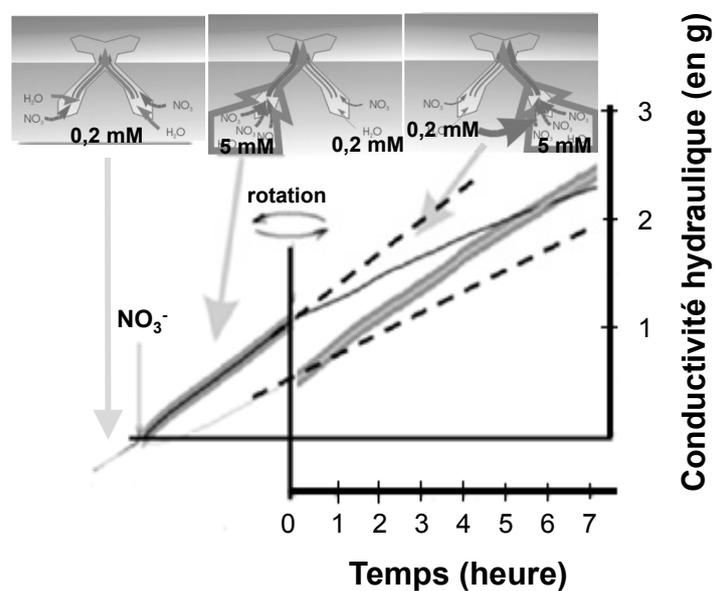


Figure II.47 : Mesure de l'accumulation d'eau chez des plants de Concombres (*Cucumis*), en condition transpirante, dans un système "split root" où le système racinaire est séparé en deux compartiments différents. *i*) une concentration identique de 0,2 mM de nitrate est appliquée sur les deux compartiments racinaires. *ii*) l'un des deux compartiments est mis en présence de 5 mM de nitrate. La rotation indique que les systèmes racinaires sont inversés dans les deux compartiments de solutions. (d'après Gorska *et al.*, 2008).

D.1. Régulation de la conductance hydraulique par le nitrate sur plante intacte

Plusieurs études récentes en système « split root » ont montré que le nitrate induit une augmentation significative de l'absorption d'eau dans la partie alimentée alors que l'absorption d'eau dans la partie non alimentée reste très réduite (Guo *et al.*, 2002 et 2007; Gorska *et al.*, 2008b). Ce phénomène est rapide, puisqu'il survient en moins de 2 heures, lors d'un changement brusque des concentrations externes en nitrate de 0,2 à 5 mM ; il est également réversible. En effet, l'inversion de la partie alimentée avec la partie non alimentée fait chuter l'absorption dans la partie anciennement alimentée et augmente l'absorption d'eau, dans la partie nouvellement alimentée par le nitrate (Fig. II.47). L'importance de cette augmentation de l'absorption d'eau induite par le nitrate ne peut être expliquée que par une modification de la transpiration *via* une augmentation parallèle de la conductivité hydraulique racinaire et de la conductance stomatique (Guo *et al.*, 2002 et 2007 ; Gorska *et al.*, 2008a).

Cependant, la relation, entre les changements de conductance hydraulique et stomatique, en réponse aux variations du nitrate, n'est pas toujours parfaitement corrélée. Ainsi, sous forts régimes lumineux, lors d'une limitation en nitrate, la baisse de la conductance hydraulique racinaire précède la baisse de la conductance stomatique, comme l'ont montré plusieurs études chez les plantules de Cotonnier, de Blé et de Tomate (Chapin *et al.*, 1988 ; Clarkson *et al.*, 2000 ; Karmoker *et al.*, 1991 ; Radin et Boyer, 1982 ; Radin, 1983 ; Radin et Eidenbock, 1984). La question des relations, entre le statut N et la régulation de la conductance stomatique, mérite que nous portions une attention particulière aux résultats récents de la littérature.

D.2. Régulation de la conductance stomatique par le nitrate sur plante intacte

D.2.1. Régulation de la conductance stomatique par une signalétique à longue distance : racines-feuilles

Plusieurs hypothèses, basées sur une signalétique à longue distance, ont été proposées pour expliquer la fermeture stomatique en situation de stress hydrique et nutritionnel pour l'azote (Radin et Boyer, 1982 ; Chapin *et al.*, 1988; Dodd *et al.*, 2003). Ainsi, pour certains auteurs, le stress hydrique ou azoté induirait une alcalinisation de la sève xylémique qui favoriserait l'action chimique de l'ABA, d'origine racinaire (Wilkinson et Davies 2002; Davies *et al.* 2002 ; Wilkison et Davies, 2008). En effet, la carence en nitrate induit une baisse de l'activité nitrate réductase

dans les feuilles et une augmentation dans les racines. Cela conduit à l'augmentation des produits de réduction du nitrate comme les acides organiques (*i.e.* malate) dans le xylème, ce qui alcalinise la sève. Pour d'autres auteurs, le signal serait d'origine hydraulique (Radin et Boyer, 1982 ; Chapin *et al.*, 1988; Dodd *et al.*, 2003).

Une étude récente réalisée sur des plantules d'*Arabidopsis* à l'aide d'une méthode non invasive de détection de la synthèse d'ABA (sonde *pAtHB6::LUC*) a montré que, lors d'un stress hydrique, l'ABA est principalement synthétisé dans les feuilles (Christmann *et al.*, 2005). De plus, l'utilisation de greffes, entre racines et parties aériennes provenant de plantes sauvages *pAtHB6::LUC* et mutantes *aba2* (mutant bloquant la synthèse du précurseur de l'ABA), a démontré que le signal longue distance n'était pas chimique (ABA) mais hydraulique. En effet, l'induction d'un brusque stress hydrique, à l'aide du sorbitol chez des plantes sauvages et mutantes *aba2* et *abi2* (gène codant une phosphatase impliquée dans la signalisation ABA), montre une baisse très rapide de la pression de turgescence des cellules du mésophylle en réponse au stress hydrique. Cependant, la fermeture des stomates n'est observée que chez les plantes sauvages. En conséquence, la baisse de conductance stomatique foliaire n'est pas liée à la synthèse d'ABA racinaire mais dépend, *via* les variations du signal hydraulique racinaire, de la synthèse et la signalisation de l'ABA foliaire (Christmann *et al.*, 2007).

D.2.2. Régulation de la conductance stomatique par une signalétique à courte distance

Chez *Arabidopsis*, le monoxyde d'azote (NO), produit par la nitrate réductase (NIA1) à partir du nitrite dans les cellules de garde, est une molécule signal clé qui intervient dans la fermeture des stomates en amont de l'ABA (Crawford, 2006 ; Desikan *et al.*, 2002 ; Neil *et al.*, 2008). En effet, les plantes mutantes *nialnia2*, qui possèdent une activité nitrate réductase très réduite, ne peuvent plus synthétiser le NO et ne peuvent plus fermer leurs stomates, même en réponse à un traitement ABA ou nitrite. L'utilisation de mutant *abi1-1* et *abi2-1* a confirmé que le signal NO agit en amont dans la cascade de transduction du signal ABA (Desikan *et al.*, 2002).

Par ailleurs, il a été démontré que le **transporteur NRT1.1** n'est pas seulement impliqué dans l'absorption du nitrate au niveau racinaire mais qu'il est aussi impliqué dans la régulation de l'ouverture stomatique. En effet, des constructions promoteur *NRT1.1::GFP* ont montré que le transporteur NRT1.1 est localisé dans les cellules de garde des stomates et que le mutant *nrt1.1* présente une résistance à la sécheresse, *via* une réduction significative de l'ouverture stomatique (Guo *et al.*, 2002). Ces résultats laissent donc entrevoir une régulation possible par le nitrate de

l'absorption d'eau et de la transpiration, *via* le fonctionnement du transporteur NRT1.1. Un tel lien a déjà été proposé dans le cas du potassium *via* le transporteur AKT1 présent dans les poils absorbants et le stomate (Cheong *et al.*, 2007). La régulation coordonnée de AKT1 serait due aux senseurs de calcium CBL1 et CBL9 de la famille calcineurin B-like. Ceux-ci interagiraient avec la protéine kinase CIPK23, pour réguler l'absorption du potassium et la transpiration, *via* la phosphorylation du transporteur AKT1. De façon intrigante, il a été montré récemment que la phosphorylation du transporteur NRT1.1 dans les racines est également sous le contrôle de CBL9 et CIPK23 (Hu *et al.*, 2009; Ho *et al.*, 2009).

D.3. Absorption d'eau et d'ions en absence de transpiration: le contre flux de Münch

De façon à vérifier l'importance du flux transpiratoire dans l'absorption des ions pour la croissance, Tanner et Beevers (1990, 2001) ont alimenté des plantes de Maïs et de Tournesol, seulement pendant la nuit, lorsque la transpiration est fortement réduite. A l'issue d'un cycle complet de culture, les plantes témoins et les plantes alimentées pendant la nuit présentaient les mêmes quantités d'ions accumulés (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) ainsi que la même croissance et la même biomasse. Cependant, les plantes, alimentées en conditions non transpirantes, avaient transpiré 12 à 15 fois moins d'eau que les plantes témoins (Tanner et Beevers, 2001). **En conséquence, la transpiration semble n'avoir aucun effet sur le transport des éléments minéraux et celui de l'eau des racines jusqu'aux feuilles.** Le phénomène de pression osmotique (poussée racinaire) induit, par l'accumulation d'ions dans le xylème, est donc suffisant pour permettre le flux d'eau nécessaire à la croissance des cellules et le phénomène de guttation. **Cependant, pour expliquer la croissance, il faut admettre qu'il existe une composante, non transpiratoire du transport xylémique d'eau, dénommée contre-flux de Münch (direction inverse au flux phloémique de Münch), qui permet le mouvement des ions et des solutés des racines vers les parties aériennes. Ce contre-flux de Münch, issu du recyclage vers le xylème de l'eau en provenance du phloème des feuilles aux racines** grâce aux communications entre vaisseaux phloémiques et xylémiques, exerce une pression sur l'eau du xylème. Les quantités d'eau, recyclées par ce mécanisme, représentent, d'après les estimations de Tanner et Beevers (1990), entre **9% (chez les plantes qui transpirent) et 30% (chez les plantes qui transpirent peu).**

Une expérience similaire d'alimentation en nitrate et en ammonium, uniquement pendant la nuit, a été réalisée sur *Phleum pratense* et *Festuca pratensis* (Macduff et Bakken, 2003). Le suivi

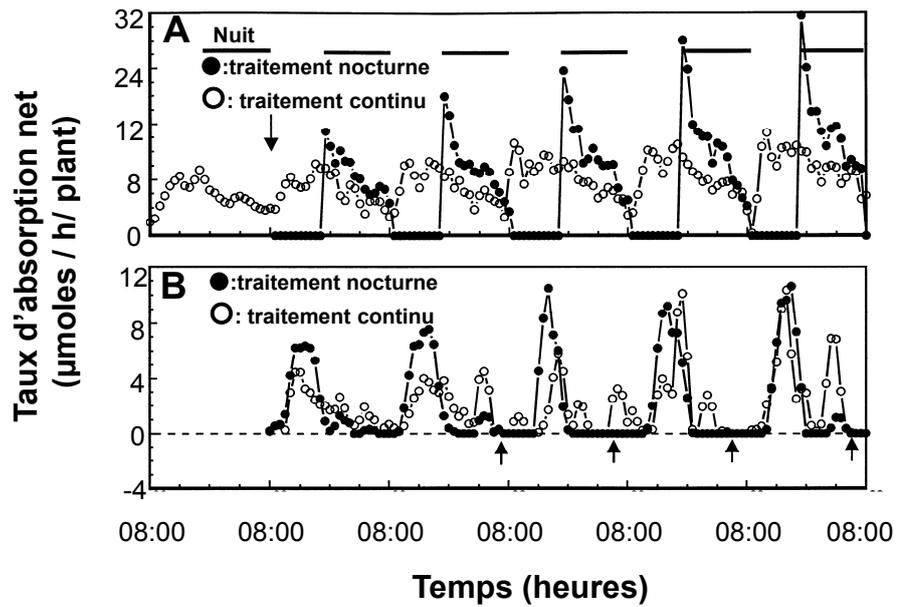


Figure II.48: Variation nyctémérale du taux d'absorption de 20 mM A) d'ammonium et B) de nitrate chez *Phleum pratensis*. L'apport du nitrate ou d'ammonium est effectué soit de manière continue (cercle blanc), soit uniquement durant les périodes nocturnes (cercle noir). Les traits noirs représentent les périodes nocturnes. ($n=187$; d'après Macduff et Bakken, 2003)

de l'absorption du nitrate et de l'ammonium, durant plusieurs cycles nyctéméraux, a permis de montrer que l'absorption nocturne compense l'absence d'absorption diurne et ne dépend pas de la transpiration (Fig. II.48). **Ce qui signifie que le flux transpiratoire en lui-même ne joue aucun rôle dans la régulation de l'absorption du nitrate, au niveau systémique ou de la plante entière, mais que c'est la demande en azote pour la croissance qui régule l'absorption du nitrate et de l'ammonium par les transporteurs.** Ces résultats confirment donc les travaux de Tanner et Beevers (1990, 2001) sur l'existence très probable d'un contre flux de Münch permettant la circulation des solutés, ce qui permet de conclure que **la transpiration n'est pas seule responsable du flux d'eau à l'intérieur de la plante.**

Par ailleurs, des **études, réalisées en conditions transpirante et non transpirante** sur des plantes sauvages et des mutants NR de Tabac, apportent de nombreux éléments complémentaires sur le rôle du nitrate, sur les flux d'eau, pour la croissance des parties aériennes et des racines (Scheilble *et al.*, 1997a et b; Stitt et Feil, 1999). Ainsi, ces études montrent clairement le rôle signalétique du nitrate sur la croissance et suggèrent également, en conditions non transpirantes (boîtes de Pétri), que les modifications de croissance foliaire, induites par le signal nitrate, précèdent l'action possible du nitrate comme osmoticum. Ces travaux soulignent aussi, de façon indirecte, le rôle des transporteurs de nitrate dans l'absorption et l'allocation parallèle de l'eau ainsi que du nitrate pour la croissance au sein de la plante (Scheilble *et al.*, 1997a ; Stitt et Feil, 1999).

L'une des conclusions majeures de l'ensemble de ces travaux est, qu'en absence de transpiration, les flux d'eau et d'ions, nécessaires à la croissance, sont fortement liés. Le nitrate, intervenant fortement dans la croissance des plantes, la question est donc maintenant de savoir, si le fonctionnement des transporteurs nitrate et le signal nitrate ne pourraient pas contrôler les flux d'eau, au sein de la plante, en conditions non transpirantes.

D.4. Modèles hypothétiques de perception du stress nutritionnel et des réponses hydrauliques associées

Dans le souci d'intégrer des éléments épars de la littérature, Clarkson *et al.* (2000) et Cramer *et al.* (2009), ont proposé des modèles intégratifs sur la perception et les réponses physiologiques associées au stress nutritionnel N. Ces deux modèles font intervenir l'activité des transporteurs de nitrate et d'eau, la croissance racinaire et foliaire et le contrôle stomatique (transpiration, photosynthèse). L'intérêt de ces modèles éco-physiologiques est qu'ils proposent une vision intégrée de la fonction nutritionnelle à l'échelle de la plante entière.

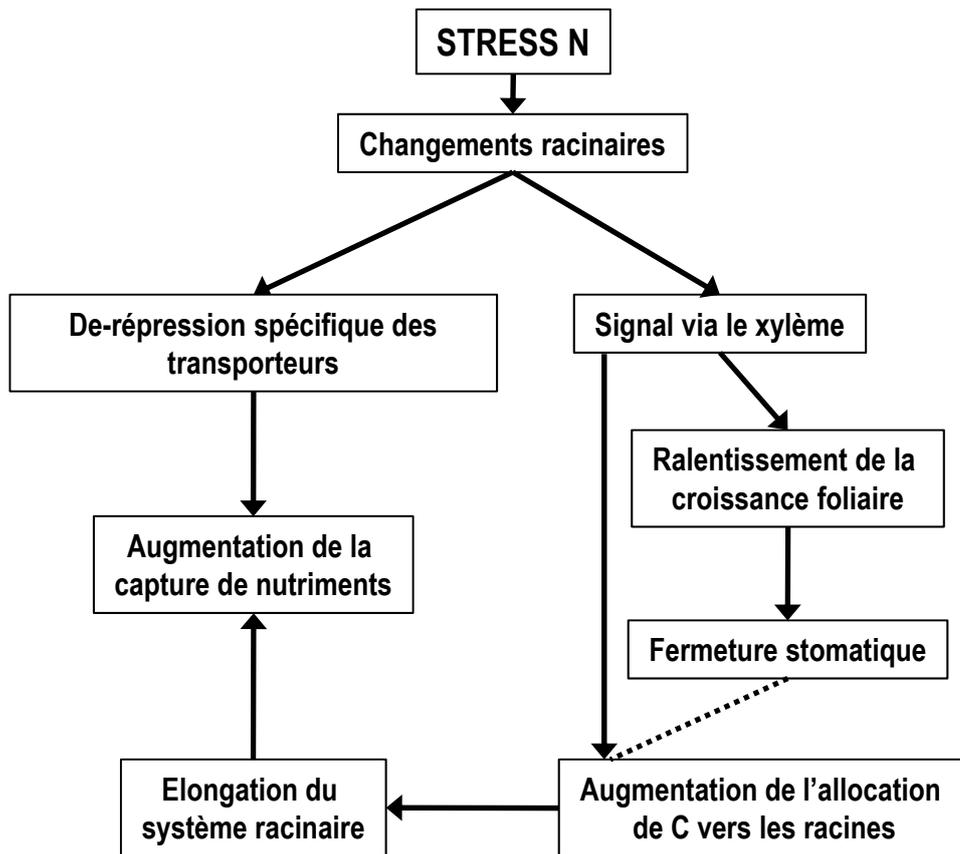


Figure II.49: Modèle hypothétique des événements physiologiques et morphologiques induits par un stress nutritionnel pour l'azote. La partie de gauche représente les réponses morpho-physiologiques de la racine impliquant également les transporteurs de nitrate. La partie de droite représente la séquence d'événements morpho-physiologiques au niveau des parties aériennes (d'après Clarkson *et al.*, 2000).

Le modèle structures-fonctions (surfaces racinaire et foliaire-absorption et transpiration) de Clarkson *et al.* (2000) introduit implicitement les propriétés hydrauliques: flux transpiratoire et allocation pour la croissance, *via* les modifications de conductance hydraulique racinaire qui sont toujours les grands absents de la plupart des modèles physiologiques actuels (Fig. II.49). En fait, ce modèle pose implicitement les questions d'ordre signalétique suivantes : comment l'information nutritionnelle est-elle transformée en réponse hydraulique? La réponse hydraulique est-elle suffisante pour intervenir à longue distance, depuis les racines jusqu'aux feuilles, pour réguler la conductance stomatique? Comment le signal nitrate est-il intégré pour induire des modifications de croissance foliaire et racinaire? Il n'y répond pas, comme il ne répond pas à la question du rôle régulateur que pourraient jouer les transporteurs d'éléments minéraux dans ces réponses.

De façon complémentaire, le **modèle hypothétique fonction-fonction** (absorption-transpiration) proposé par Cramer *et al.* (2009) tente de montrer que le nitrate régule la conductance hydraulique racinaire et que le NO, issu du nitrate, contrôle la conductance stomatique et agit sur la régulation du flux diffusif et du flux de masse des éléments minéraux, dans le sol (Fig. II.50). Si **ce modèle fonction-fonction** tient compte de la régulation de la conductance stomatique par la nitrate réductase au travers de la production de NO (Desikan *et al.*, 2002 ; Neill *et al.*, 2008), en revanche, il ne tient pas compte de deux découvertes récentes sur le contrôle de la conductance stomatique par le nitrate. La première, concerne la démonstration de l'implication d'un signal hydraulique racinaire sur la synthèse d'ABA foliaire (Christmann *et al.*, 2007 ; Tardieu *et al.*, 2010). La seconde, concerne l'implication du transporteur de nitrate NRT1.1 dans le contrôle stomatique (Guo *et al.*, 2003). **De même, ce modèle ne tient pas compte des modifications de structure des racines et des parties aériennes induites en réponse au nitrate.**

En résumé, lors d'une contrainte osmotique, induite sur racines excisées par l'augmentation des concentrations externes de nitrate, la conductivité hydraulique racinaire est fortement stimulée. De la même façon, sur plantes intactes en conditions transpirantes, l'augmentation des concentrations de nitrate, dans la solution nutritive, accroît les conductances hydraulique et stomatique. **Le flux racinaire d'eau, induit par le nitrate, ne semble pas dû à une augmentation de la pression osmotique suite à l'accumulation de nitrate dans le xylème, mais bien plutôt à un changement d'activité des aquaporines.** Bien que les résultats actuels n'expliquent pas comment le nitrate et/ou le signal nitrate modifie l'activité des aquaporines au niveau moléculaire ; sur le plan physiologique, ces résultats posent la question de l'importance du

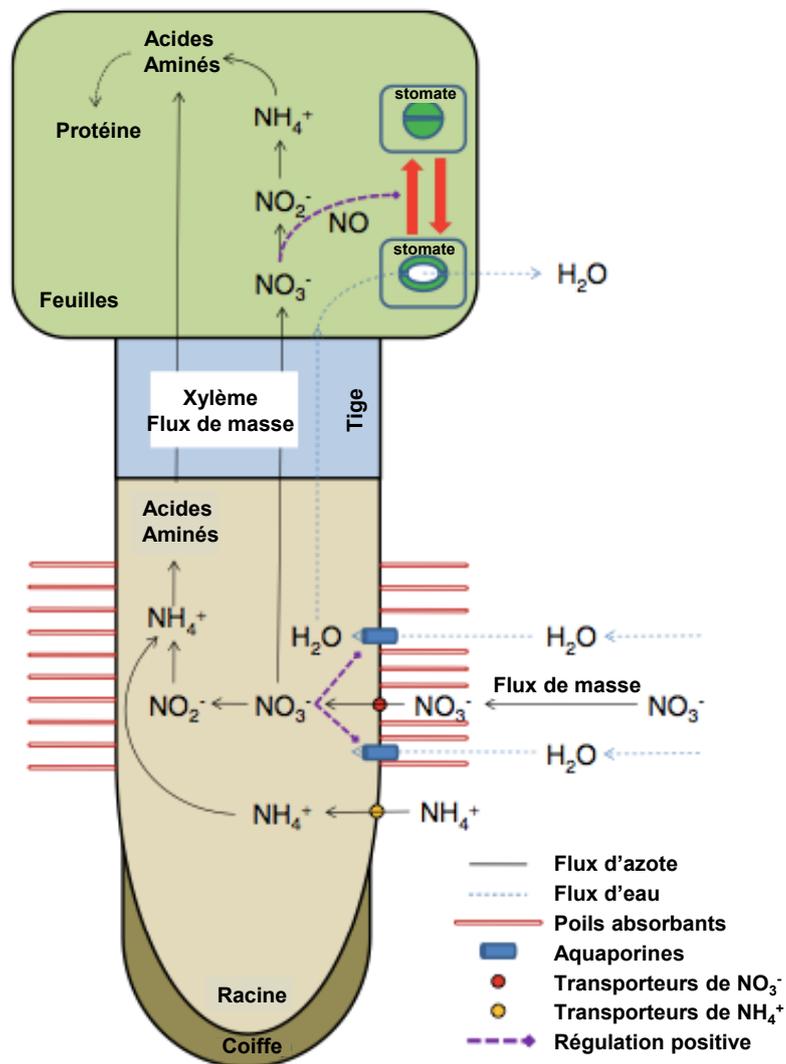


Figure II.50: Modélisation du contrôle bi-phasique du flux d'eau par le nitrate et l'ammonium. L'absorption de l'ammonium s'effectue plus près de l'apex racinaire (Bloom *et al.*, 2003). L'absorption du nitrate s'effectue conjointement à l'absorption de l'eau dans la zone où se trouve les poils absorbants (Javot and Christophe 2002). L'absorption de l'ammonium et son assimilation ne modulent pas directement le flux d'eau, ce qui induirait les "symptômes ammoniacaux". *A contrario*, le nitrate stimule l'expression et l'activité des aquaporines racinaires. Le nitrate absorbé en excès pour la capacité de la NR racinaire, est transporté dans les parties aériennes où le NO produit par la NR, induit l'ouverture des stomates (Desikan *et al.*, 2002; Neill *et al.*, 2008). Le NO_2^- produit est réduit en NH_4^+ par la NiR puis le NH_4^+ est assimilé par les acides aminés *via* l'activité de la glutamine synthétase/glutamate-2-oxo-glutarate-amino-transférase. Les flux énergétiques et carbonés ne sont pas indiqués (d'après Cramer *et al.*, 2009).

statut nutritionnel N et de l'implication fonctionnelle des transporteurs de nitrate, dans les modifications des propriétés hydrauliques en relation avec la croissance racinaire et foliaire.

En conclusion, le modèle composite du transport de l'eau dans la plante est basé sur un modèle bio-physique de type flux-force impliquant le concept de conductance et de coefficient de réflexion, mais pas celui de transporteur. **Il existe donc une vraie difficulté lorsque l'on cherche à introduire, dans ce modèle, l'activité et le fonctionnement couplés des transporteurs d'eau et de solutés en réponse à la contrainte nutritionnelle.** La difficulté provient de la méthodologie expérimentale utilisée pour valider cette loi bio-physique. En effet, l'excision racinaire employée est extrêmement invasive puisqu'elle détruit l'intégrité fonctionnelle des plantes en termes de croissance et de propriétés hydrauliques *via* les signalétiques racine-feuille et feuille-racine. En général, de façon à corréliser les mesures de flux d'eau et de solutés avec les variations d'activité et d'expression des transporteurs, les approches moléculaires sont réalisées sur racines excisées, soumises à des contraintes osmotiques (Hoarau *et al.*, 1996; Carvajal *et al.*, 1996; Lopez *et al.*, 2003). Jusqu'à présent, ce sont principalement les aquaporines plutôt que les transporteurs d'éléments minéraux qui ont retenu l'attention (Lopez *et al.*, 2003; Gorska *et al.*, 2008b). En fait, si l'on examine de près la méthodologie sur racine excisée, elle ne permet, ni de dissocier réellement, dans la fuite d'eau mesurée (exsudat), l'eau destinée à la croissance de celle destinée à la transpiration, ni de mesurer la fuite d'eau occasionnée par la rupture de l'intégrité hydraulique et signalétique de la plante (Schneider *et al.*, 1997). Ceci est particulièrement évident dans les études portant sur le flux d'eau osmotique induit par une contrainte nutritionnelle (*i.e.* nitrate, phosphate, sulfate,..). En effet, **lorsque la plante fonctionne comme un osmomètre imparfait, que peut bien représenter le flux d'eau xylémique mesuré, à partir de la racine excisée, comparé à une plante intacte?**

Sur une plante intacte et en l'absence de transpiration, il est raisonnable de supposer que le flux d'eau induit par la pression osmotique, au niveau racinaire, ne va être possible que s'il y a guttation et/ou croissance des parties aériennes. **Cela implique donc deux hypothèses préalables.** D'une part, des transporteurs spécifiques pour l'élément minéral considéré peuvent contrôler son transport racinaire et son accumulation dans le xylème et, d'autre part, cet élément minéral est capable de déclencher, après translocation, la croissance des parties aériennes pour permettre un flux d'eau. **Dans le cas du nitrate, nous ne disposons actuellement que d'une validation indirecte de ces deux hypothèses sur plante intactes, en conditions transpirantes (culture hydroponique) et non transpirantes (boîte de Pétri).** Les études réalisées sur des plantes sauvages et des mutants NR de Tabac, bien qu'elles semblent confirmer ces deux

hypothèses, n'ont malheureusement pas mesuré **les variations d'expression et d'activité des transporteurs nitrate ainsi que les flux d'eau générés par le signal nitrate pour la croissance des parties aériennes et la transpiration** (Scheible *et al.*, 1997a; Stitt et Feil, 1999). Toutefois, comme nous disposons aujourd'hui de sondes spécifiques pour les transporteurs de nitrate et d'aquaporines chez de nombreuses espèces ainsi que des méthodes d'études des flux d'eau et d'azote, il est nécessaire de réexaminer le rôle de ces transporteurs sur la croissance en relation avec les propriétés hydrauliques. **Les résultats attendus devraient permettre, dans un premier temps, de vérifier et de valider le modèle de Clarkson-Steudle (2000), avant d'approfondir, dans un deuxième temps, les signalétiques impliquées dans le couplage entre les flux d'azote et d'eau, comme cela a été suggéré dans le modèle de Cramer (2009).**

CONCLUSION ET OBJECTIFS DE TRAVAIL

L'analyse bibliographique a révélé que les études structure-fonction portant sur les relations entre l'architecture racinaire et de l'absorption du nitrate se heurtent au décalage temporel des réponses au signal nitrate. En effet, si ces réponses sont observées rapidement au niveau de la transcription et de l'activité des transporteurs racinaires de nitrate NRT1.1 et NRT2.1 (minutes-heures), elles ne peuvent être observées et mesurées que tardivement (quelques jours) dans le cas des modifications de croissance des systèmes exploratoire et absorbant (Robinson, 1994 et 1996; Remans *et al.*, 2006a et b; Walch-Liu et Forde, 2008 ; Zhang *et al.*, 1999). Un examen attentif de ces études montre que celles-ci s'effectuent, plutôt à l'échelle de l'organe racinaire qu'à celle de la plante entière, et qu'elles oublient, très souvent, le compartiment foliaire. Aborder ces études à l'échelle de la plante entière (écophysiologie) nécessite donc, non seulement de prendre en compte un autre compartiment structural, mais également deux autres fonctions : **l'absorption d'eau pour la croissance et la transpiration**. En effet, comme l'a analysé et souligné Clarkson *et al.* (2000): le stress nutritionnel pour l'azote modifie les propriétés hydrauliques de la plante (conductances hydraulique racinaire et stomatique), et comme l'a souligné Cramer *et al.* (2009): les propriétés hydrauliques (transpiration) modifiées par l'azote influent sur le flux de masse et le flux diffusif du nitrate du sol vers la racine. Bien que les modifications des propriétés hydrauliques, induites par le nitrate, aient été confirmées directement ou indirectement sur plante entière en système « split root » à court et à long terme (Schieble *et al.*, 1997a; Guo *et al.*, 2007 ; Gorska *et al.*, 2008), **aucune étude n'a encore abordé le rôle du signal nitrate et des transporteurs de nitrate dans ces réponses**. Or, négliger la question de l'effet du nitrate sur les propriétés hydrauliques, en relation avec les changements structuraux (croissance), revient à éviter la question cruciale de l'importance de la transpiration comme paramètre d'ajustement, dans les phénomènes de compensation pour l'absorption de l'azote et les liens entre l'efficacité d'utilisation de l'eau ou de l'azote au cours du cycle de culture (Brueck, 2008; Brouder et Volenec, 2008).

Par ailleurs, dans l'objectif d'améliorer l'efficacité de prélèvement de l'azote (NUpE), **la question des effets compensatoires de la structure sur la fonction, ou l'inverse, reste bien évidemment cruciale**, dans la mesure où la compréhension de ces phénomènes et de leurs relations devrait permettre d'**éviter de lancer des programmes de sélection inutiles et coûteux** sur la modification de mauvaises cibles moléculaires ou de traits structuraux erronés (Dorlodot *et al.*, 2007; Herder *et al.*, 2010 ; Kant *et al.*, 2011 ; Lynch *et al.*, 2007).

A la suite de cette analyse bibliographique, l'objectif principal de cette thèse a consisté à analyser les relations structure-fonction (variations d'architecture racinaire-absorption du nitrate) chez le Colza. En particulier, notre travail de recherche s'est focalisé sur la voie

systémique de signalisation, en situation d'apport homogène de nitrate, dans un modèle de plante simplifié: **la plantule**. Les plantules ont été cultivées sur des pas de temps de 1 à 5 jours, sur gel d'agarose. Dans les boîtes de Pétri, les plantules, soumises à forte humidité relative, ne transpirent pas ou très peu. En conséquence, **le fonctionnement des plantules est proche d'un osmomètre**. L'allocation d'eau pour la croissance des racines et des parties aériennes est donc directement contrôlée par la disponibilité en nitrate (seul facteur de variation) et le fonctionnement des transporteurs de nitrate. Dans ces conditions expérimentales, notre travail de recherche s'est organisé autour de 3 axes majeurs :

A. Relations structure-fonction de plantules de Colza soumises à un gradient de nitrate en conditions non transpirantes

Cette première étude a consisté à **vérifier, dans nos conditions expérimentales**, sur des plantules soumises à un gradient de nitrate (0,05 à 20 mM de KNO_3), **la validité du modèle hypothétique de Clarkson** (Premier chapitre de résultats) et à répondre à la question suivante :

Q1 : Lorsque la plantule fonctionne comme un osmomètre presque parfait en absence de transpiration, comment les phénomènes de croissance racinaire et foliaire s'ajustent-ils à l'absorption du nitrate et au fonctionnement des transporteurs de nitrate?

Après avoir réalisé, dans ces conditions expérimentales, la caractérisation complète au plan physiologique, biochimique et moléculaire du modèle plantule, nous avons cherché à étudier, plus particulièrement, ce modèle, en faisant varier la structure ou la fonction.

B. Effet d'une modification de l'absorption de nitrate (fonction) sur la croissance racinaire et foliaire (structures)

Cette deuxième étude a cherché à découpler expérimentalement l'activité des transporteurs nitrate NRT1.1 et NRT2.1, de façon à mesurer l'impact d'une modulation de l'absorption de nitrate sur la croissance racinaire et foliaire (Deuxième chapitre de résultats) en tentant de répondre à la question suivante :

Q2 : Comment le découplage fonctionnel des transporteurs de nitrate NRT1.1 et NRT2.1, induit par un traitement au L-glutamate, modifie-t-il l'absorption de nitrate et d'eau pour la croissance des parties racinaires et foliaires?

C. Effet d'une modification de la croissance des systèmes racinaires exploratoire et absorbant (structure) sur l'absorption de nitrate (fonction)

Cette troisième étude a consisté à se mettre dans la situation physiologique inverse, c'est-à-dire, à moduler fortement la croissance des systèmes racinaires exploratoire et absorbant, de façon à mesurer son impact sur le fonctionnement des transporteurs de nitrate (Troisième et Quatrième chapitre de résultats) et tenter de répondre à la question :

Q3: Comment les transporteurs de nitrate répondent-ils en termes d'activité et d'expression à la modulation brusque des systèmes racinaires exploratoire et absorbant?

III. RESULTATS

Pour chaque article (en anglais) présent dans la partie Résultats, un rappel en français du contexte scientifique, des principales hypothèses, de la méthodologie, et des principaux résultats, est réalisé.

Les références des articles, écrits (en anglais) et non acceptés, sont intégrées à la bibliographie du manuscrit.

**

Etude descriptive Structure – Fonction

A. Etude descriptive des réponses morphologiques, physiologiques et moléculaires des plantules de Colza en fonction de la disponibilité en nitrate en conditions non transpirante

A.1. Contexte scientifique

Dans l'analyse bibliographique, nous avons vu que les variations de la conductance hydraulique racinaire peuvent être expliquées grâce au modèle composite du transport de l'eau proposé par Steudle (Steudle, 2000; Steudle et Peterson, 1998). Cependant, les physiologistes rencontrent une difficulté majeure qui est de replacer ce modèle biophysique, validé sur racines excisées sur plante intacte. En effet, sur racines excisées, le modèle ne prend pas en compte l'eau destinée à la croissance foliaire. Par conséquent le système racinaire est sous contrainte hydrostatique ou osmotique. Cela se comprend mieux si l'on considère une plante intacte en absence de transpiration sous contrainte nutritionnelle. Dans cette situation, la plante fonctionne comme un osmomètre du fait de l'effet de la pression osmotique générée par l'accumulation de solutés dans le xylème. Le flux d'eau racinaire n'est donc possible que s'il y a croissance des parties aériennes puisque les stomates sont fermés. Cela suppose donc logiquement deux préalables. D'une part, que les transporteurs du soluté utilisent son accumulation dans le xylème et, d'autre part, que le soluté soit capable de déclencher la croissance foliaire. Dans le cas du nitrate, ceci a été démontré par les travaux de Stitt et collaborateurs à l'aide de mutants NR chez le Tabac en conditions transpirantes (culture hydroponique) et non transpirantes (boîte de Pétri) (Stitt *et al.*, 1999). Ainsi, l'augmentation de la disponibilité en nitrate du milieu permet de montrer qu'il existe une corrélation fortement significative entre les variations foliaires de nitrate, issues de son absorption et de sa translocation, avec le rapport des biomasses fraîches des feuilles et des racines. Cette corrélation est retrouvée à la fois sur les plantes sauvages et les mutants NR (Scheible *et al.*, 1997; Stitt and Feil, 1999). Si ces travaux ont démontré que le nitrate agissait comme un signal (et non pas comme un osmoticum) sur la croissance des parties aériennes, en revanche, **ils n'ont pas pris en compte les variations d'expression et d'activité des transporteurs de nitrate et leur implication dans le contrôle des propriétés hydrauliques racinaires**. Dès lors, la question scientifique que nous nous sommes posée était la suivante : **les résultats de Stitt *et al.* peuvent-ils être replacés dans le modèle hypothétique de Clarkson-Steudle (2000) qui rend compte des relations entre le statut nutritionnel et les propriétés hydrauliques sur plante intacte**. En effet, ce modèle met l'accent sur la croissance des racines et

des feuilles en réponse à la contrainte nutritionnelle qui s'exerce au niveau des transporteurs ioniques et qui influe sur les propriétés hydrauliques: conductance racinaire et conductance stomatique (Clarkson *et al.*, 2000; cf § : II.Structure-Fonction.D.4.).

A.2. Hypothèse de travail

Dans ce contexte, notre principal objectif de travail a consisté à vérifier et à valider expérimentalement le modèle hypothétique de Clarkson-Steudle. Pour y parvenir, nous avons cherché à **limiter très fortement la composante hydrostatique** établie dans la loi biophysique du flux d'eau de façon à **ne conserver que la composante osmotique**. En effet, **notre hypothèse de travail supposait que si le fonctionnement de la plante est proche d'un osmomètre, les phénomènes de croissance doivent s'ajuster à l'absorption du nitrate et, par conséquent, au fonctionnement des transporteurs de nitrate.**

A.3. Stratégies expérimentales

En conséquence, nous pouvions nous attendre à ce que dans des conditions non transpirantes, les transporteurs de nitrate jouent un rôle majeur dans l'orientation des mécanismes physiologiques et moléculaires conduisant aux différentes modifications morphologiques observées (croissance aérienne et racinaire). **Dans ce but, notre stratégie expérimentale a consisté, à placer les plantules de Colza à forte humidité relative dans une atmosphère saturante en boîte de Pétri de façon à limiter la pression hydrostatique et donc le flux hydraulique.** De même, nous avons placé les plantules sur une large gamme de concentrations de nitrate (0,05 ; 0,2 ; 0,5 ; 1 ; 2,5 ; 5, 10, 20 mM) afin que la pression osmotique à l'origine du flux osmotique d'eau soit principalement induite par le nitrate et le fonctionnement des transporteurs de nitrate.

A.4. Méthodologies utilisées

Sur des plantules entières et intactes, la mesure du flux d'eau osmotique a été déterminée indirectement. En effet, nous ne mesurons pas directement les valeurs de pressions et de flux hydrauliques. Nous obtenons cette mesure du flux d'eau osmotique par soustraction de la biomasse sèche à la biomasse fraîche des parties aériennes. Du fait de l'incompressibilité de l'eau, seules les quantités d'eau accumulées dans les tissus sont directement connectées à la croissance cellulaire des plantes.

Afin de mesurer l'activité des transporteurs de nitrate, nous avons marqué le nitrate avec l'isotope stable ^{15}N . Ce marquage nous a permis de mesurer les quantités accumulées de $^{15}\text{NO}_3^-$

sur des pas de temps de 24h et de 5 jours de traitement après analyse IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometry). Par ailleurs, un suivi journalier des évolutions de la longueur du système racinaire et de la surface foliaire a également été effectué à l'aide d'un scanner numérique, puis analysé avec le logiciel Winrhizo®.

Pour évaluer l'effet du nitrate sur la croissance, en fonction des traitements de nitrate, les variations des profils d'expression des transporteurs de nitrate intervenant de façon majeure dans l'absorption et la translocation : *Nrt1.1*, *Nrt1.5*, *Nrt2.1*, ont été suivies à l'aide d'une Q-PCR en temps réelle. L'échantillonnage des plantules a toujours été réalisé aux mêmes heures de la journée afin d'éviter d'introduire un biais dans les valeurs de transcription en raison de la variabilité nyctémérale de leur expression.

Enfin, l'évolution des teneurs racinaires et foliaires en nitrate et en acides aminés (variations des pools endogènes) a été suivie par UPLC (Ultra Performance Liquide Chromatography) et Dionex en fonction des traitements.

A.5. Article 1

In low transpiring conditions, nitrate and water fluxes for growth of *B. napus* plantlets correlate with changes in *BnNrt2.1* and *BnNrt1.1* nitrate transporter expression

Fabien Le Ny^{1,2}, Antonin Leblanc^{1,2}, Patrick Beauclair^{1,2}, Carole Deleu³, Erwan Le Deunff^{1,2*}

1 Université de Caen Basse-Normandie, UMR EVA, F-14032 Caen cedex, France

2 INRA, UMR 950, Écophysiologie Végétale & Agronomie Nutrition NCS, F-14032 Caen cedex, France

3 Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, UMR IGEPP, F-35042 Rennes cedex, France

4 INRA, UMR 1349, Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes (IGEPP)

Domaine de la Motte - BP 35327 – F-35 653 LE RHEU CEDEX France

*Corresponding author, e-mail: erwan.ledeunff@unicaen.fr;

fax: (33) (0)2 31 56 53 60.

Volume 8, issue2 February 2013

eLocation ID: e22902

Abstract

We analyzed how changes in *BnNrt* nitrate transporter gene expression induced by nitrate are associated with morphological changes in plantlets and osmotic water flow for growth. We hypothesized that in a Petri dish system, reduction in transpiration should induce conditions where nitrate and water fluxes for growth depend directly on nitrate transporter activity and nitrate signaling. Rape seedlings growing on agar plates were supplied with increasing external K^{15}NO_3 concentrations from 0.05 to 20 mM. After 5 d of treatment, morphological switches in plantlet growth were observed between 0.5 and 5 mM nitrate supply. Root elongation was reduced by 50% while the cotyledon surface area was doubled. These morphological switches were strongly associated with increases in $^{15}\text{NO}_3^-$ and water uptake rates as well as ^{15}N and water allocation to the shoot. These switches were also highly correlated with the upregulation of *BnNrt1.1* and *BnNrt2.1* in the root. However, while root expression of *BnNrt2.1* was correlated linearly with a shoot growth-associated increase in ^{15}N and water uptake, *BnNrt1.1* expression was correlated exponentially with both ^{15}N and water accumulation. In low transpiring conditions, the tight control exercised by nitrate transporters on K^{15}NO_3 uptake and allocation clearly demonstrates that they modulated the nitrate-signaling cascade involved in cell growth and as a consequence, water uptake and allocation to the growing organs. Deciphering this signaling cascade in relation to acid growth theory seems to be the most important challenge for our understanding of the nitrate-signaling role in plant growth.

Keywords: *Brassica napus*, NRT2.1 and NRT1.1 nitrate transporters, cell expansion, nitrate signaling, nitrate uptake, shoot-root allocation, water uptake

Introduction

A better understanding of N and water physiological interactions in plants is becoming more crucial for agriculture because of the worldwide increase in food demand and changes in climate variables such as the amount and distribution of precipitation, temperature levels, and CO₂ concentrations (Brouder and Volenec, 2008). However, the physiological relationships between water use efficiency (WUE) and nitrogen use efficiency (NUE) are not fully established or understood (Brueck, 2008). An important contribution of water to WUE is provided by transpiration, which is involved in micro and macronutrient transport in the soil via mass flow and diffusion (Marschner, 1995; Barber, 1995; Tinker and Nye, 2000; Gregory, 2006). A small contribution of WUE is provided by water movements from soil to root via the osmotic water flow for growth induced by macronutrients such as nitrate. In low transpiring conditions, this contribution becomes predominant and essential for ions and solutes cycling within the plants. Indeed, in well-watered conditions and in low transpiring conditions, it has been shown that transpiration is not a prerequisite for long-distance transport of mineral such as N, P and K in plants (Tanner and Beevers, 1990; Tanner and Beevers, 2001). Thus, the convective water transport in the xylem, brought about by root pressure and the resultant guttation, “growth water,” and Münch’s phloem counterflow, are sufficient for macronutrient fluxes in the xylem.

In the seventies, both components of water flow through plants were described in a general passive diffusion model (Fiscus, 1975; Fiscus and Kramer, 1975; Dalton *et al.*, 1975; Fiscus, 1977). In this model, the hydraulic water flow is built from the shoot demand for water caused by transpiration, and which increases the hydrostatic pressure difference (ΔP) between the soil and the root xylem. The osmotic water flow is built in the root by the rapid transport and accumulation of nutrient ions such as nitrate and potassium ions into the xylem ($\Delta\pi$) that induce water flux across the root via osmotic pressure. The modeling of these flows is based on the coupling of forces and fluxes of irreversible thermodynamics (Van den Honert, 1948; Dainty, 1963) and may be written as follows: $J_v = Lp (\Delta P - \sigma\Delta\pi)$

Where J_v is the volume flow density ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), Lp is the root hydraulic conductivity ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{MPa}^{-1}$) of the membrane and σ is the dimensionless reflection coefficient or osmotic factor and ΔP and $\Delta\pi$ are the differences in hydrostatic pressure and osmotic pressure, respectively (in MPa). This model has been mainly validated from biophysical experiments with excised roots and massively invasive methods (pressure chamber), but its pertinence to attached roots has been little studied and deciphered in relation to underlying mechanisms, such as the regulation of the expression and activity of nutrient transporters and nutrient signaling (Wegner and Zimmermann,

2009). Thus, it is now recognized that the contribution of nitrate in water transport is not limited to the osmotic water transport for growth. By using a split root system, it has been demonstrated that in intact plants, nitrate regulates water uptake and transpiration (Guo *et al.*, 2007; Gorska *et al.*, 2008). If these results are partially explained by changes in root hydraulic conductance induced by nitrate, (Hoarau *et al.*, 1996; Gloser *et al.*, 2007) they could also be explained by the involvement of nitrate in the regulation of stomatal opening via the nitrate transporter, AtNRT1.1, (Guo *et al.*, 2003) or by NO, which is produced by nitrate reductase (NR) activity. (Desikan *et al.*, 2002; Neill *et al.*, 2008). Accordingly, all these results indicate that in well-watered conditions, nitrate is able to control its own diffusion and mass flow in soil by regulating the hydrostatic flow (transpiration) and osmotic flow (growth). They also suggest that it would be possible to improve water use efficiency via improvement of NUE (Banziger *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2005). However, to decipher the physiological relationships between nitrate and water fluxes, at first, it is important to determine how nitrate transporters and the nitrate signaling-cascade are involved in the osmotic water flow for growth. Indeed, if changes in root hydraulic conductance are rapidly induced (min to hours) by an abrupt change in root nitrate supply from low to high nitrate concentrations, (Hoarau *et al.*, 1996; Gloser *et al.*, 2007; Gorska *et al.*, 2008) these changes do not result from an increase in the expression of aquaporin genes (Gloser *et al.*, 2007). By contrast, nitrate uptake adjustment is promoted by enhancing the activities of the two distinct nitrate transport systems, the high-affinity transport system (HATS) and the low-affinity nitrate transport system (LATS) and the expression of the main corresponding *NRT2.1* and *NRT1.1* transporter genes (Cerezo *et al.*, 2001; Forde, 2002; Orsel *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 2003). In Arabidopsis, transcriptomic studies and mutant analyses have shown that *NRT2.1* is mainly involved in the inducible component of the HATS, (Orsel *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 2003; Filleur *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2007) whereas *NRT1.1* is a dual-affinity transporter involved in HATS and LATS activities by a phosphorylation/dephosphorylation mechanism (Wang *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999; Liu and Tsay, 2003). In addition, the studies of mutants in the *NRT1.1* and *NRT2.1* genes have revealed that these nitrate transporters play a major role in nitrate sensing and root development at both high and low levels of nitrate (Little *et al.*, 2005; Remans *et al.*, 2006b; Ho *et al.*, 2009). However, until now, no study has thoroughly investigated how hydraulic and morphological responses of the root and shoot to nitrate availability could be coupled with changes in *NRT2.1* and *NRT1.1* gene expression and activity during low or high transpiring conditions in the intact plant. Likewise, the expression of *NRT1.1* in root and shoot tissues has not been questioned in terms of nitrate and water flow regulation through nitrate signaling during growth (Guo *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2002; Remans *et al.*, 2006a).

In the present study we mainly focused on the expression of the *NRT1.1* and *NRT2.1* nitrate transporter genes and the nitrate uptake and allocation in relation to water uptake for growth. To decouple the hydraulic and the osmotic water flows, we placed the plants in low transpiring conditions. Thus, the relationships observed between nitrate and water fluxes would serve as references for future comparisons with data obtained in high transpiring conditions. This non-invasive study will allow more accurate characterization of the underlying mechanisms of nitrate and water transport during osmotic flow because the hydraulic continuum between root and shoot was not broken. Hence, long distance signals involved in growth regulation can operate correctly (Christmann *et al.*, 2007; Tardieu *et al.*, 2007). To prevent transpiration and to quantify the responses of nitrate transporters, oilseed rape seedlings were grown over five days of treatment in an agar Petri dish system and subjected to a progressive and homogeneous increase in external KNO_3 concentrations. Because of the high relative humidity (HR) in the Petri dishes, this system constitutes a powerful tool to study the growth requirements of nitrate and water uptake independently of the possible effects of transpiration on the mass flow in the root media. Under these experimental conditions, the rationale and main working hypothesis were as follows: (1) In low transpiring conditions, the osmotic water flow for shoot growth is only possible if a prior shift in the shoot growth is induced by nitrate signaling; (2) This osmotic flow of water for shoot growth induced by the nitrate signal will be directly dependent on nitrate transporter expression and activity. In other words, osmotic water flow will be the consequence of the nitrate-signaling cascade on the shoot cell expansion and division, not the cause. To confirm the first hypothesis, already demonstrated in tobacco NR mutants by Stitt and colleagues in transpiring and non-transpiring conditions (Scheible *et al.*, 1997; Stitt and Feil, 1999) and to test the second hypothesis, we have analyzed the expression of *BnNRT2.1*, *BnNRT1.1* and *BnNRT1.5* nitrate transporter genes in response to nitrate availability. To gain complete insights into nitrate effects on N and C metabolism, we have also examined the impact of nitrate availability on root and shoot architectural changes in relation to water, carbon and nitrogen partitioning between the roots and shoots, and monitored the changes in the amino acid and nitrate pools.

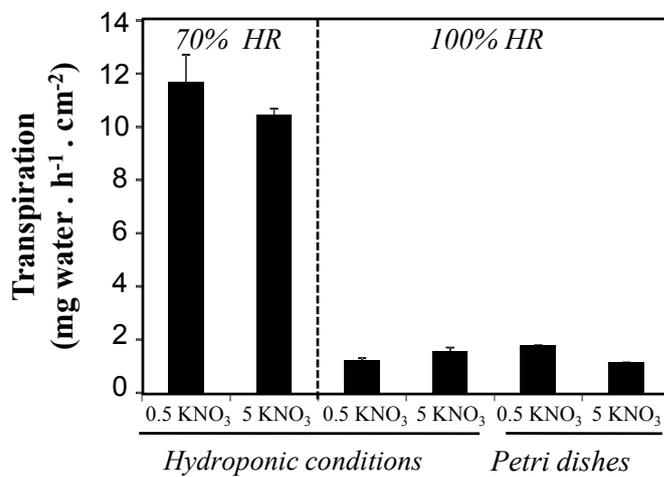


Figure III.1. Effects of NO₃⁻ availability and relative humidity on the transpiration rate in 7 and 14-d-old *Brassica napus* plantlets grown during 24 h on agar plates or hydroponic conditions, respectively. In hydroponic conditions, values are the average (\pm SE) of four repeats of three seedlings each. On the agar plates, values are the average (\pm SE) of five plates of four seedlings each.

Results

High relative humidity in agar Petri dishes strongly reduced the transpiration rate

To evaluate the transpiration rate in agar Petri dishes (100% RH), a comparison was made with plantlets grown in hydroponic conditions under high (100%) and low (70%) relative humidity (Fig. III.1; **Fig. III.S8** at PSB on line). This comparison showed that the transpiration rate of plantlets grown at 0.5 and 5 mM KNO₃ in agar Petri dishes was similar to the transpiration rate of plantlets grown in hydroponic conditions at 100% RH. However, high RH conditions strongly reduced (10 times) the transpiration rate compared with low RH (Fig. III.1). According to the volume flow density equation (eq.1), these results demonstrated that at high RH, the hydrostatic pressure involved in transpiration was strongly reduced compared with the osmotic pressure. This was confirmed and measured with a gravimetric method (see Mat and Meth). In hydroponic conditions and 100% RH, the quantity of water absorbed by residual transpiration was 1.3-fold higher than water absorbed for growth, whereas in 70% RH, the difference was ten times higher (data not shown). In contrast, in the agar Petri dish system, the hydrostatic and osmotic pressures probably reached the same order of magnitude for plant water uptake. Hence, the agar Petri dish system seems to be a convenient condition for studying the effect of KNO₃ availability on nitrate and water fluxes for growth in relation to nitrate signaling and nitrate transporter activity and expression.

In low transpiring conditions, cell and organ enlargement reflects the transition between cell expansion relative to the cell division induced by nitrate in the cotyledons

In the agar Petri dish system, high RH reduced the *B. napus* plantlet transpiration rate (Fig. III.1). In these conditions, root elongation and shoot area enlargement were examined at the organ and cellular levels in response to nitrate availability five days after uniform exposure of 7-d-old *B. napus* plantlets to nitrate concentrations ranging from 0.05 to 20 mM (Fig. III.2A-C). The leaf surface area continuously increased in response to increasing external nitrate concentrations, whereas the elongation of the exploratory root system showed contrasting responses, depending on the nitrate concentration (Fig. III.2B). Between 0.05 and 1 mM nitrate, the elongation of the exploratory root system (primary root and lateral roots) remained constant under the increase in nitrate availability. Between 1 and 5 mM nitrate, root elongation was drastically reduced, whereas under the increased nitrate concentrations of 5 to 20 mM, elongation of the whole exploratory root system was mainly caused by elongation of the primary root (Fig. III.2A and B). Comparisons of root and shoot expansion revealed that between 1 and 5 mM, the roots and shoots have an inverted

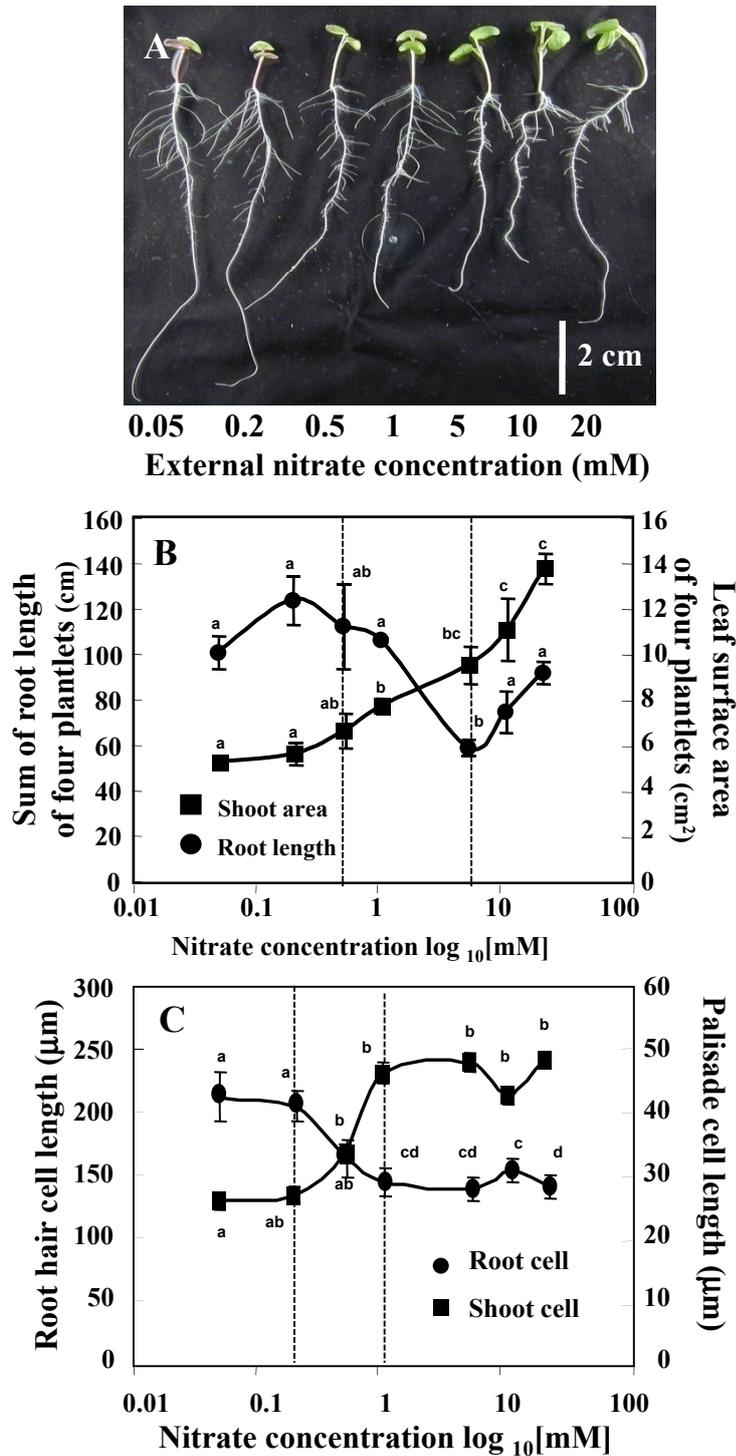


Figure III.2. Effects of NO_3^- availability on organs and cell expansion of the roots and shoots in 7-d-old *Brassica napus* plantlets grown for 5 d on agar plates. (A) Root and shoot morphological changes induced in 7-d-old *Brassica napus* seedlings treated with varying external nitrate concentrations for 5 d on agar plates. (B) Organ responses to nitrate availability of the exploratory root system (primary and lateral roots) and the shoot surface area. Values are the average (\pm SE) of four repeats of four seedlings each. (C) Cell expansion in response to nitrate availability of palisade cells in the central region of the cotyledon blade ($n = 36$ cells from 6 seedlings) and the elongation of the “Basal Length of Epidermal root Hair cell” corresponding to fully expanded root hairs after 24 h of growth of the primary root ($n = 18\text{--}20$ root cells from 6 seedlings). The dashed line indicates the nitrate concentration range where switches in organ and cell enlargement occurred.

Fig. III.2: Le Ny *et al.* (2013)
PSB

elongation in response to nitrate, whereas for the other treatment doses, root and shoot elongations were in parallel (Fig. III.2B).

The comparison of cell and organ expansion in the shoots and roots in response to nitrate showed very different development patterns (Fig. III.2B and C). At the cellular level, enlargement of palisade cells in the central region of the cotyledon blade and elongation of epidermal root hair cells along the primary root axis showed strictly opposite responses to nitrate availability between 0.2 and 1 mM (Fig. III.2C; **Fig. III.S9** at PSB on line). However, when organ and cell growth of the shoots were compared with control plantlets treated with 0.05 mM, a difference in the overall trend of organ and cell expansion was only observed above 1 mM (Fig. III.3A). Accordingly, the transition between full cell expansion in the central region of the cotyledon and induction of supernumerary cells by division during enlargement of the shoot surface area probably occurred between the 0.5 and 1 mM nitrate treatments in the cotyledon margins as previously reported (Stoynova-Bakalova *et al.*, 2002; Stoynova-Bakalova *et al.*, 2006).

The major change in the ^{15}N accumulation rate in plantlets is associated with the transition between cell and organ expansion in the cotyledons

In order to better characterize how nitrate availability modified shoot and root growth, changes in morphological responses were compared with ^{15}N accumulation in 7-d-old *B. napus* plantlets (Fig. III.3). No relationship between the total root length and the ^{15}N accumulation in the root tissue was observed (**Fig. III.S10A** at PSB on line). However, the increase in the shoot surface area was linearly correlated with ^{15}N accumulation in the shoot tissue after 5 d of treatment ($r^2 = 0.94$, $p < 0.01$; **Fig. III.S10B** at PSB on line). Likewise, the most important change in the ^{15}N accumulation rate in the plantlets between 0.5 and 1 mM (Fig. III.3B) was associated with the transition between organ and cell expansion in the shoot (Fig. III.3A). Intriguingly, above a 1 mM nitrate supply (1 and 5 mM), when the rate of ^{15}N accumulation in the plantlets remained constant (Fig. III.3B), elongation of the exploratory root system was drastically reduced (Fig. III.2B). In order to decipher the morphological responses of the shoots and roots in response to nitrate availability, both $^{15}\text{NO}_3^-$ and water uptake and partitioning were analyzed.

Morphological switches of the roots and shoots induced by nitrate are associated with a strong increase in nitrate and water uptake and BnNRT1.1 expression

Because high external nitrate concentrations are known to stimulate root hydraulic properties (root conductivity, L_{pr}) and water flow density (J_v) through the roots in well-watered conditions,

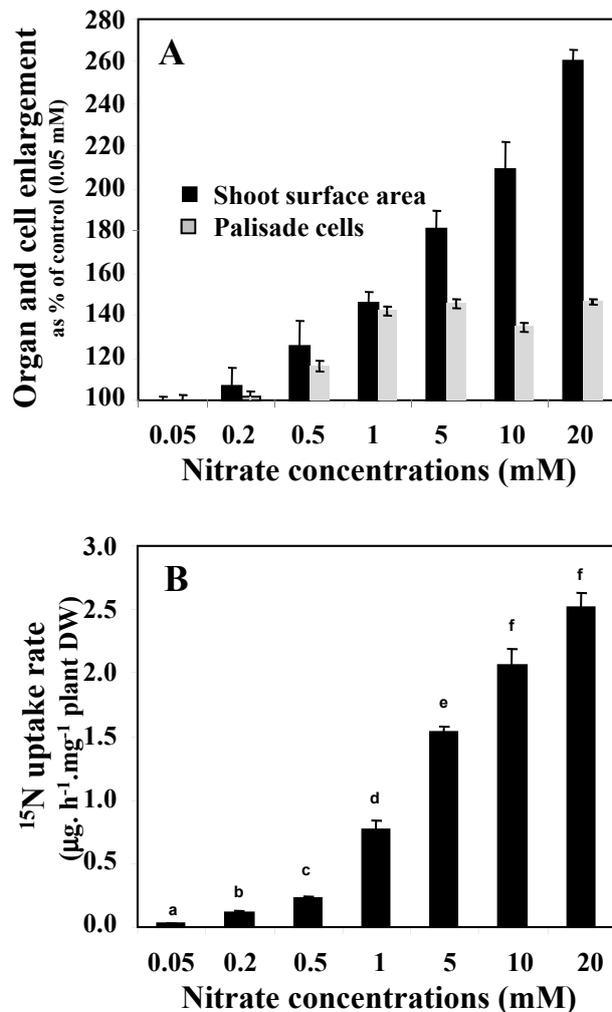


Figure III.3. Difference between organ and cell expansion in relation to the ¹⁵N accumulation rate in seedlings treated with varying external nitrate concentrations for 5 d on agar plates. **(A)** Comparison of organ and cell enlargement relative to 0.05 mM nitrate treatment. **(B)** The ¹⁵N accumulation rate in seedlings treated with varying external nitrate concentrations. Values are the average (\pm SE) of four repeats of four seedlings each.

(Hoarau *et al.*, 1996; Gloser *et al.*, 2007; Carvajal *et al.*, 1996) we examined the allometric relationship between the length of the exploratory root system and the shoot water mass. The results revealed that during the time course of the experiment a linear and allometric relationship between the shoot water mass and the root elongation of the seedlings existed (Fig. III.4A). Increasing external nitrate concentrations did not change the linear correlation but started to modify the water accumulation rate in the shoots between 1 and 5 mM corresponding to the transition between cell and organ expansion in the cotyledons (Figs. III.4A and III.3A). In particular, a large increase in the osmotic water flow needed for shoot growth was induced between 0.5 and 5 mM nitrate supply, concurrent with the greatest reduction in root elongation and the increase in shoot surface area (Figs. III.2B, III.3A and III.4A). In these low transpiring conditions, comparisons between estimated nitrate mass flow and nitrate and water uptake rates for seedling growth (expressed in centimeters of root length instead of mg of root DW) showed a parallel overall trend with a larger increase in water uptake compared with the nitrate uptake between 1 and 5 mM (Fig. III.4B). As expected, the mass flow caused by osmotic water flow remained very low and supplied a maximum of 3.6 and 10.8% of total nitrate uptake at 5 and 20 mM. This demonstrates that, in low transpiring conditions, nitrate flow to the root is mainly caused by nitrate diffusion to compensate for nitrate depletion at root level induced by nitrate active transport (Barber, 1995).

To characterize the regulation of nitrate transporter gene transcription that was associated with morphological changes and variations in water and nitrate fluxes, transcription patterns of both *BnNRT1.1* and *BnNRT2.1* were analyzed in the roots (Fig. III.4C). *BnNRT1.1* and *BnNRT2.1* transcript levels were increased 8- and 4-fold, respectively, during the greatest increase in ^{15}N and water uptake (Fig. III.4A) as well as the most drastic reduction in root elongation between the 0.5 and 5 mM nitrate treatments (Fig. III.2B).

We have also compared the transcription patterns of *BnNRT1.5* across the whole range of nitrate concentrations (**Fig. III.S11** at JXB online). Indeed, in *Arabidopsis*, *AtNRT1.5* and *AtNRT1.1* have the same localization in the pericycle and endodermis cell layers of the mature root (Huang *et al.*, 1999; Remans *et al.*, 2006a; Girin *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2008) and *AtNRT1.5* participates partially in nitrate translocation (Lin *et al.*, 2008). In our conditions, the level of *BnNRT1.5* transcripts showed a basal expression across the whole range of nitrate concentrations suggesting that it was not influenced by the changes in nitrate allocation or that its regulation took place at the posttranscriptional level.

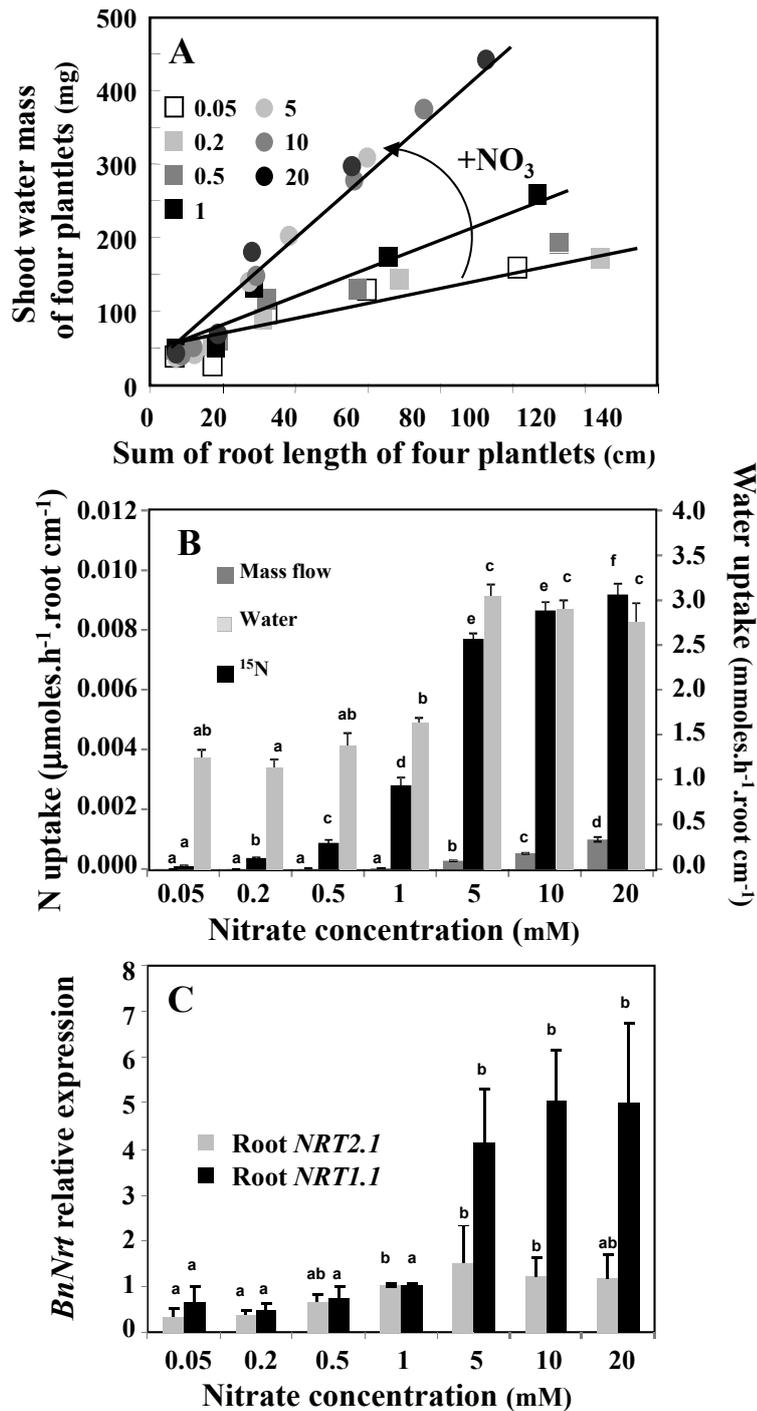


Figure III.4. Effect of nitrate availability on root water and $^{15}\text{NO}_3^-$ uptake and partitioning in *Brassica napus* seedlings treated with varying external nitrate concentrations for 5 d on agar plates. (A) Relationship between the root length and shoot water mass during the time course (5 d) of the nitrate treatments. (B) Comparison of $^{15}\text{NO}_3^-$ and water uptake expressed by root length and the estimated $^{15}\text{NO}_3^-$ uptake by mass flow. In A and B, values are the average (\pm SE) of four repeats of four seedlings each. (C) Responses of *BnNRT1.1* and *BnNRT2.1* transcript levels to nitrate availability in the root tissues. Transcript levels were assayed by quantitative PCR and were normalized to the expression level of the *18S* ribosomal gene, values are the average (\pm SE) of $n = 5\text{--}8$ repeats of four seedlings each.

Fig. III.4: Le Ny *et al.* (2013)
PSB

Daily differences in ^{15}N and water partitioning in the shoot are explained by the transition between cell and organ expansion induced by nitrate signaling

Because under low transpiration water cannot be accumulated in the tissues in the same way as nitrate, daily ^{15}N and water partitioning in the shoot were compared in order to reveal how they were both associated with morphological changes in the plantlets (Fig. III.5). The maximum level of daily ^{15}N partitioning in the shoot was reached at a 1 mM external nitrate concentration, whereas the maximum level of water partitioning was reached at 5 mM (Fig. III.5A). Thus, the growth transition between cell and organ expansion induced by nitrate in the shoot (Fig. III.3A) explained this shift in daily ^{15}N and water partitioning (Fig. III.5A and B). Accordingly, ^{15}N was accumulated and concentrated in the shoot tissues before the cotyledon surface area was enlarged by division and water accumulation in neo-formed supernumerary cells (Figs. III.3A, III.4A and III.5A). Furthermore, this discrepancy is also clearly observed when comparing daily ^{15}N and water partitioning during the time course of the experiment (Fig. III.5B and C). Taken together, all these results demonstrate that the rate-limiting resistance to water flow is the site of cell enlargement of the shoot growing tissue. The results also confirm that if the water allocation is the result of cell and organ enlargement in low transpiring conditions, nitrate accumulation and signaling are mainly the cause of the morphological changes induced in the roots and shoots as previously demonstrated by nitrate reductase (NR) mutants of tobacco (Scheible *et al.*, 1997; Stitt *et al.*, 1999).

Expression of BnNRT1.1 in the shoots and roots is associated with variations in nitrate content in the shoots

Because high ^{15}N uptake and partitioning toward the shoots were maintained at concentrations of nitrate between 1 and 5 mM (Figs. III.3B and III.5A), nitrate was not diluted, but rather was concentrated in the tissue during the water accumulation needed for shoot enlargement. This was confirmed by the evolution of nitrate concentrations in the shoot tissues (Fig. III.6A). Despite differences in the order of magnitude (note the logarithmic scale for nitrate content in Fig. 6A), variations in nitrate concentration in the shoot were parallel with ^{15}N and water partitioning ($r^2 = 0.98$, $p < 0.05$; Fig. III.4A and III.5A). Because Guo *et al.*, 2003 previously reported that *AtNRT1.1* was specifically expressed in the shoot, we monitored *BnNRT1.1* expression in the shoot. During the strongest increase in nitrate content between 0.5 and 5 mM, *BnNRT1.1* transcript levels in the shoot tissues were significantly reduced (Fig. III.6B). A closer examination of the relationships between *BnNRT1.1* expression in the

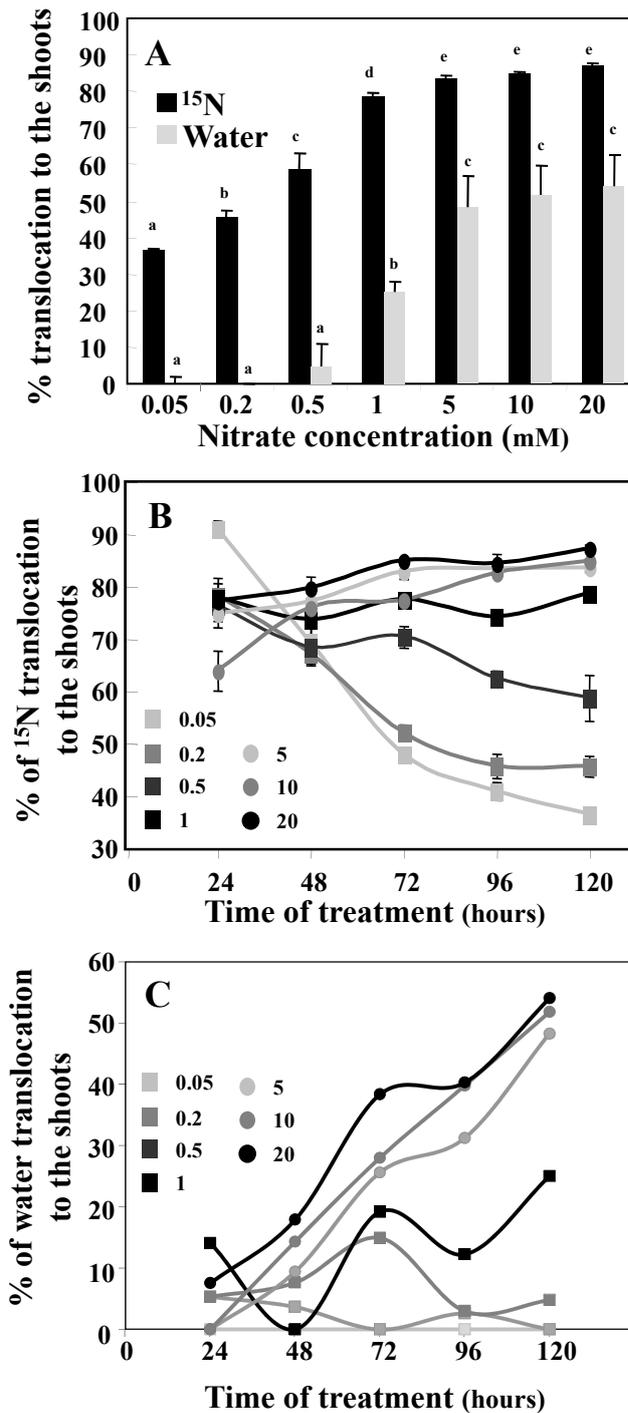


Figure III.5. Comparison of static and dynamic partitioning of ^{15}N and water to the shoot. (A) ^{15}N and water partitioning to the shoot of *Brassica napus* seedlings treated over 5 d with varying external nitrate concentrations. (B) Comparison of daily ^{15}N and water partitioning during the time course of treatment. Values are the average (\pm SE) of four repeats of four seedlings each.

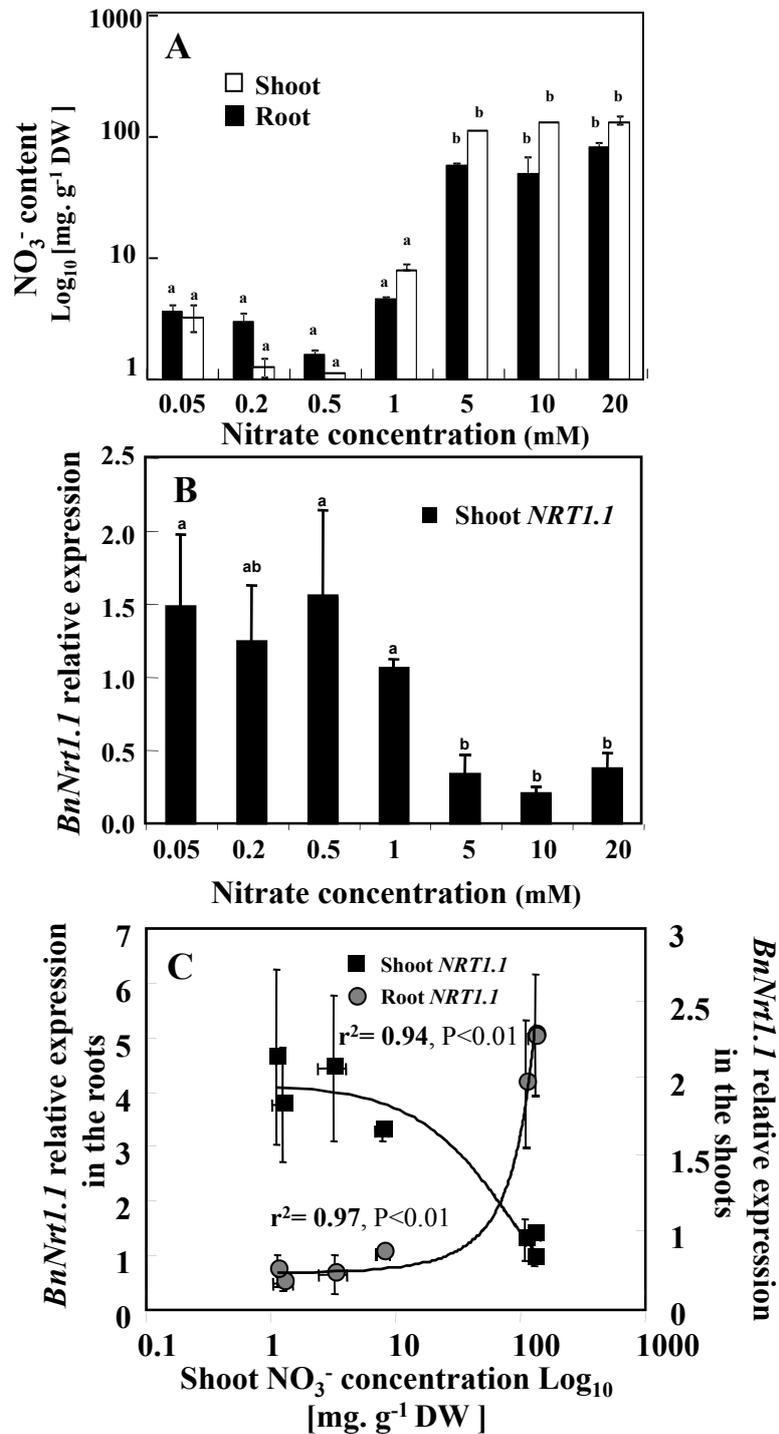


Figure III.6. Relationships between transcripts levels of *BnNRT1.1* in the shoots and roots with nitrate concentration changes in the shoots between 96 and 120 h of nitrate treatment. (A) Changes in NO₃⁻ content in the shoot after 120 h of nitrate treatment. (B) *BnNRT1.1* transcript levels in the shoot tissue in response to external nitrate concentrations. (C) Relationships between variations in *BnNRT1.1* transcript levels in the shoots and roots with changes in nitrate contents in the shoot tissues. Regression coefficients and significance for each relationship are shown. Transcript levels were assayed by quantitative PCR and were normalized to the expression level of the *18S* ribosomal gene, values are the average (\pm SE) of n = 5–8 repeats of four seedlings each.

Fig. III.6: Le Ny *et al.* (2013)
PSB

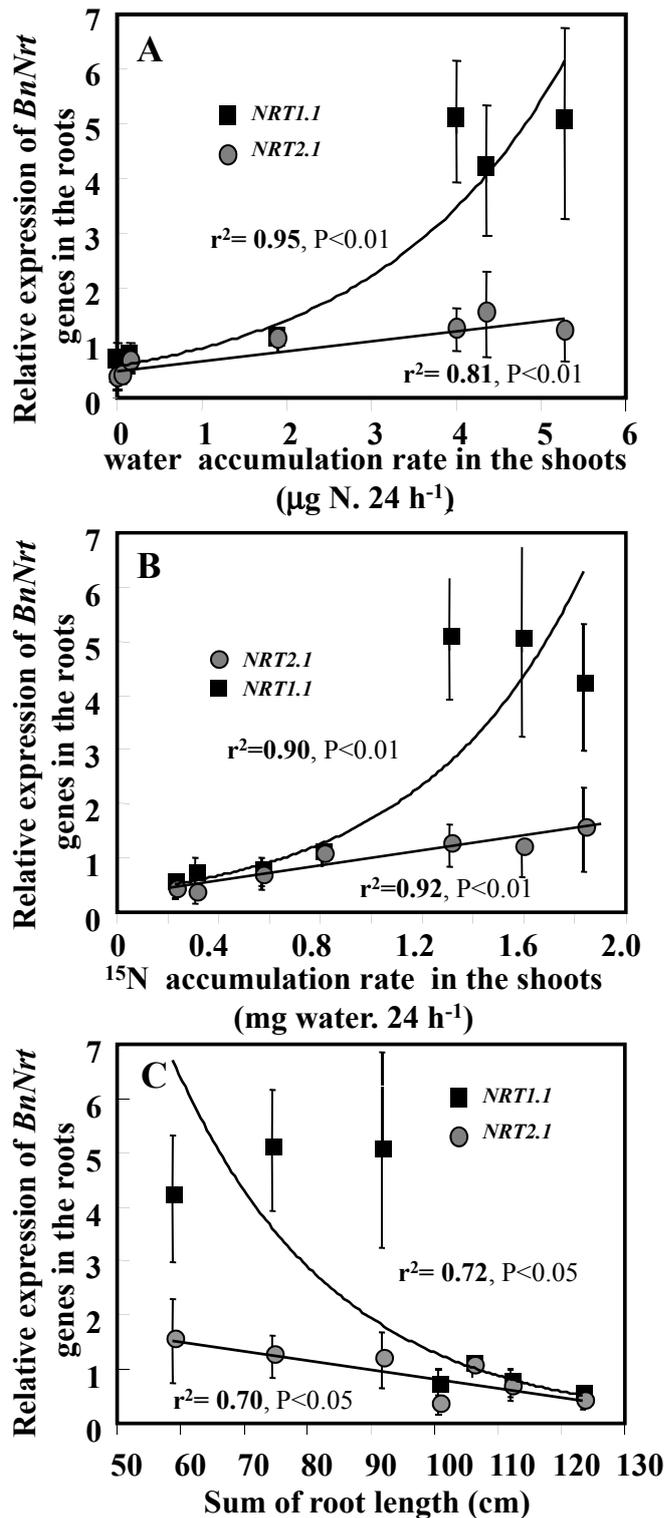


Figure III.7. Correlations between transcripts levels of *BnNRT1.1* and *BnNRT2.1* with physiological and morphological variables. (A) Relationships between *BnNRT1.1* and *BnNRT2.1* expression and the water accumulation rate in the shoots between 96 and 120 h of nitrate treatment. (B) Relationships between *BnNRT1.1* and *BnNRT2.1* expression and ^{15}N accumulation rate in the shoots between 96 and 120 h of nitrate treatment. (C) Relationships between the total root length and *BnNRT1.1* and *BnNRT2.1* expression in the roots with variations of nitrate concentrations in the shoot tissues. Regression coefficients and significance for each relationship are shown.

Fig. III.7: Le Ny *et al.* (2013)
PSB

shoots and roots and the variations of nitrate content in the shoots indicated that shoot nitrate content was exponentially and negatively correlated with *BnNRT1.1* expression in the shoot, whereas it was positively correlated with *BnNRT1.1* expression in the roots (Fig. III.6C).

Relationship between expression of *BnNRT1.1* and *BnNRT2.1* and relative accumulation of $^{15}\text{NO}_3^-$ and water in the shoot

In order to investigate the role of nitrate transporters in the accumulation of ^{15}N and water in the shoot between 96 and 120 h of nitrate treatment and their relationship to morphological changes, correlations were established systematically (Fig. III.7). This approach was first validated by linear relationships found between changes in daily accumulation of water and nitrate in the shoot during the time course of the experiment (**Fig. III.S12** at PSB on line). Surprisingly, *BnNRT2.1* expression was linearly correlated with ^{15}N and water accumulation, whereas *BnNRT1.1* expression was exponentially correlated with these variables (Fig. III.7A and B). Discrepancies in the correlative responses between *BnNRT2.1* and *BnNRT1.1* expression were always observed between 1 and 5 mM external nitrate supply during the greatest morphological changes in root tissue expansion induced by nitrate (Fig. III.2B). As expected, comparison of variations in the root length and transcript levels of both transporters revealed that *BnNRT2.1* expression was linearly correlated with the root elongation, whereas *BnNRT1.1* transporter expression was exponentially correlated with variations of the root length (Fig. III.7C).

Discussion

Previous experiments with WT and NR tobacco mutants demonstrated that accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-to-root allocation (Scheible *et al.*, 1997). In order to complete this study and to investigate the role of nitrate transporters and $^{15}\text{NO}_3^-$ uptake and partitioning in morphological responses to the nitrate signal, we used experimental conditions where osmotic water flow for seedling growth was strictly dependent on nitrate transporter activity. Indeed, at the whole plant level, the water balance requires conservation of mass and may be characterized by the following equation (Boyer, 1985).

$$A - t = G + H$$

Where A and T are the fluxes for water absorption and transpiration, G the storage flux for growth and H the storage flux for re-hydration (or dehydration) corresponding to tissue capacitances. In the agar Petri dish system the transpiration rate was strongly reduced and water absorption was mainly caused by the osmotic water flux for growth (See equations 1 and 2). Accordingly, the signaling effect of nitrate on shoot organ enlargement induced by increasing external nitrate concentrations depends on root nitrate transport and partitioning to the shoots. These plant culture conditions allow a better understanding of involvement of the NRT1.1 and NRT2.1 nitrate transporters in nitrate signaling during osmotic water flow-associated growth by characterizing structural and functional relationships that respond to nitrate availability in *B. napus* plantlets.

In low transpiring conditions, the switch in the osmotic water flow for growth is caused by root and shoot morphological changes induced by nitrate

In the Petri dish experimental system, low transpiring conditions induced tight correlations between water and nitrate uptake and allocation as expected by the composite water transport model proposed by Steudle (Steudle, 2000a; Steudle, 2000b) and the water balance required for water mass conservation at the whole plant level (Boyer, 1985). Three major physiological switches were induced when external nitrate concentrations were between 0.5 and 5 mM: (1) A decrease by 2-fold in the root hydraulic resistance, which was indirectly measured by the shoot water flow needed for growth; (2) A reduction by 2-fold in the total root length; and (3) the increase by 2-fold in the shoot water mass. The similarity in the order of magnitude of these three concomitant processes between 0.5 and 5 mM confirms previous results that the nitrate signal controls root and shoot morphological changes (Scheible *et al.*, 1997). This in turn affects root

hydraulic properties through water accumulation during shoot growth. As previously demonstrated, in low transpiring conditions the rate-limiting resistance to water flow is the site of cell enlargement of the growing tissue due to the hydraulic resistance of the roots being smaller (Boyer, 1985). Thus, we can reasonably argue that without a high water demand for shoot growth via shoot cell expansion and division, the increase in the osmotic pressure caused by potassium nitrate accumulation in the xylem and/or the shoot tissues will have no effect on the osmotic water transport across the root. Furthermore, the decrease in the root water resistance is probably not caused by a change in root hydraulic conductivity. Indeed, the opposite volumetric changes in root and shoot cells between 0.5 and 1 mM and root and shoot tissues between 1 and 5 mM argue in favor of an increase water flow caused by the shoot enlargement. Moreover, the discrepancy observed between daily ^{15}N and water uptake and translocation between 0.5 and 5 mM external nitrate concentrations are also consistent with this assumption.

Water fluxes to the growing organs are the consequence of a nitrate-signaling cascade involved in shoot cell growth

A closer examination of the results clearly indicates that the water fluxes within the plantlets in response to nitrate availability probably depend more on hydrostatic factors induced by the nitrate signaling cascade during shoot cell growth than on dynamic factors. It seems clear from the correlation found between root and shoot cell expansion measurements in response to nitrate that the mechanical resistance of the cell walls in growing tissues limits water flow. We can reasonably assume that for a given total water potential of the shoots, higher nitrate concentration should result in lower osmotic potential, and hence higher turgor that should trigger shoot growth. Moreover, this does not rule out a possible role for K^+ as a companion osmolyte (see below) even if K^+ is not involved in morphological and NRT expression responses as demonstrated by several studies (Drew, 1975; Armengaud *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2009). In fact, our study and the previous studies of Stitt and colleagues raise one of the crucial questions: how nitrate signal is perceived then transduced for cell growth?

Does the nitrate-signaling cascade modify the osmotic behavior of growing tissues via regulation of H^+ -ATPases?

Although the link between nitrate and plant growth has been established for a long time at physiological and agronomical levels, little is known about the effect of the nitrate signal on key cellular events during cell growth (Crawford, 1995). Indeed, recent transcriptomic studies have established lists of genes induced in short-term treatment by nitrate but they have not enabled

determination of the short-term chronology in the key physiological events of cellular growth induced by the nitrate signal (Nero *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004). Up to the present time, the acid growth theory⁶² seems to be the sole physiological theory of growth recognized by the plant scientific community. According to this theory, the synthesis of H⁺-ATPases induced by an auxin signal constitutes the center of coordination for cellular growth because it energises ion transport through a variety of secondary transporters and channels. Thus, the extrusion of H⁺ ions by H⁺-ATPases acts on the plasticity of the wall, the absorption of K⁺ and the uptake of nitrogen and carbon solutes such as NO₃⁻, amino acids and sugars. The H⁺-ATPases are also involved in pH homeostasis via the synthesis of a corrective acid: malate, which is also implied in cell turgor (Rayle and Cleland, 1992; Haschke and Lutttge, 1975; Luthen *et al.*, 1990; Scherer, 2011). Even though our results have not deciphered the nitrate signal cascade involved upstream of the auxin signal in cell and organ growth, they have revealed distinct roles for the *BnNRT2.1* and *BnNRT1.1* nitrate transporters in coordination and integration of the nitrate signal for growth at the whole plant level. They are also consistent with recent studies showing that the nitrate signal is involved in the osmotic behavior of cells in growing tissues via regulation of H⁺-ATPases. As has been reported, 14-3-3 proteins induced by nitrate are able to bind and to regulate H⁺-ATPases, sucrose phosphates synthase (SPS) and nitrate reductase (NR) at the posttranscriptional level (Moorhead *et al.*, 1996; Moorhead *et al.*, 1999; Toroser *et al.*, 2000; Fuglsang *et al.*, 1999; Fuglsang *et al.*, 2007; Shung *et al.*, 1999).

The switches in *BnNRT1.1* expression in the roots and shoots are induced by an increase in nitrate concentrations and represent key indicators of seedling morpho-physiological changes

Since the experimental conditions used created a situation where root water flows and morphological changes depended strictly on nitrate availability and the functioning of nitrate transporters, we examined how these conditions affected the regulation of the *BnNRT1.1* and *BnNRT2.1* nitrate transporter genes. It is known that both transporters are mainly expressed in the roots after nitrate induction (Orsel *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 2003). Our findings demonstrated that *BnNRT1.1* was the only nitrate transporter gene showing large switches in expression in the roots and shoots when ¹⁵NO₃⁻ and water uptake rates and accumulation reached their maximum levels in the shoot. The order of magnitude changes in *BnNRT1.1* expression, ¹⁵N accumulation and root nitrate content during the greatest root reduction between 1 and 5 mM nitrate showed an increase of 4-, 2- and 12 -fold, respectively. This suggests that the opposing but concomitant switches in *BnNRT1.1* expression in the roots and shoots strongly depend on changes in the

endogenous root nitrate concentration and the signaling effects that this has on shoot and root growth (Fig. III.7). Furthermore, exponential coupling between *BnNRT1.1* expression and the relative ^{15}N and water accumulation between 1 and 5 mM nitrate during the greatest reduction in root length suggests a specific role or regulation of the NRT1.1 transporter during morphological changes in the plantlets. Because expression of the dual-affinity nitrate transporter gene, *NRT1.1*, is induced by auxin in both shoots and roots of Arabidopsis seedlings, (Guo *et al.*, 2002) it is reasonable to assume that auxin could have been the cause of the switches in *NRT1.1* expression in these experiments during the strongest nitrate accumulation and morphological changes in the roots and shoots. This assumption is also consistent with recent transcriptomic studies reporting that in short-term experiments (min to hours), N availability simultaneously induces the expression of NRT1.1 and NRT2.1 nitrate transporter genes as well as genes responsible for hormone synthesis such as auxin (Nero *et al.*, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2007; Krouk *et al.*, 2009). This assumption is also reinforced by the recent discovery that the NRT1.1 nitrate transporter also acts as an auxin transporter in the roots and facilitates auxin transport and its fine-tuning via nitrate (Krouk *et al.*, 2010).

The upregulation of BnNrt2.1 expression is strongly linked to BnNRT1.1's induction

It is generally accepted that *NRT2.1* expression is regulated by two mechanisms: induction by NO_3^- and repression by downstream N metabolites (Forde, 2002; Crawford and Glass, 1998; Gansel *et al.*, 2001). A study by Girin *et al.*, 2007 using *AtNRT2.1* promoter deletion and GUS expression revealed that this regulation also operates at the promoter level. In several plant species, studies have shown that NH_4^+ or amino acids such as glutamine could be involved in the downregulation of *Nrt2.1* expression via systemic translocation, ensuring feedback control of NO_3^- uptake by the N status at the whole plant level (Muller and Touraine, 1992; Vidmar *et al.*, 2000; Beuve *et al.*, 2004). In addition, the recent work of Krouk *et al.* has shown that at low levels of NO_3^- (0.5 mM) and high concentrations of NH_4^+ or Gln (> 1 mM), *NRT2.1* are upregulated in Arabidopsis. Because the *AtNrt1.1* mutant lacks *AtNRT2.1* repression in these experimental conditions, this contradictory situation led to the building of a new regulatory model where root *AtNRT1.1* is involved in the repression of *AtNRT2.1* (Krouk *et al.*, 2006). Our findings are consistent with these results. Indeed, increasing levels of Gln or NH_4^+ in roots are not responsible for the downregulation of the *BnNRT2.1* expression (Fig. III.4C; **Fig. III.S13** at PSB online). In fact, the increased *BnNRT2.1* expression seen in 1 to 5 mM nitrate treatments (Fig. 4C) occurred alongside the largest increase in Gln and NH_4^+ in the root tissues (**Fig. III.S13** at PSB online). Moreover, the slight decrease in *BnNRT2.1* expression between 5 and 20 mM nitrate treatments

was observed during the decrease in Gln concentrations in the roots and shoots and the increase in root *BnNRT1.1* expression (Fig. III.4C; **Fig. III.S13** at PSB on line).

Changes in BnNRT2.1 expression are associated with variations in the root length induced by nitrate

While the nonlinear coupling (exponential relationships) between *BnNRT1.1* expression and morpho-physiological variables is particularly striking, the linear correlations found between these variables and *BnNRT2.1* expression are more intriguing. It was reported in Arabidopsis that, *AtNRT2.1* expression was strongly inducible by nitrate and known to be involved in compensating mechanisms for nitrate uptake during split root experiments (Gansel *et al.*, 2001). Hence, this demonstrates that during homogenous nitrate supply to the roots in long-term experiments (days to weeks), *BnNRT2.1* expression strictly responds to the changes in the exploratory root length and adapts the nitrate uptake to seedling growth (N demand) and nitrate availability. Similar results have been obtained in a previous study where the reduction in the exploratory root system (primary root and lateral roots) by pharmacological modulation of ethylene biosynthesis under a 1 mM nitrate supply was compensated by a linear increase in *BnNRT2.1* expression (Stoynova-Bakalova *et al.*, 2002). In addition, this result is also strongly consistent with the localization of NRT2.1 activity in epidermal and cortical cell layers of the mature root, (Girin *et al.*, 2007) suggesting that NRT2.1 is directly dependent on growth of the exploratory root surface.

In conclusion, low transpiring conditions provided a physiological situation where nitrate and water fluxes for growth were coupled. Hence, root and shoot allometric relationships and correlations found between nitrate and water fluxes with the expression of the *BnNRT2.1* and *BnNRT1.1* nitrate transporters complement the pioneering work of Stitt and Coll on nitrate signaling effects on growth in NR mutants of tobacco (Scheible *et al.*, 1997; Stitt *et al.*, 1999). These results will serve as references for future comparisons with data obtained in high transpiring conditions. Our results also suggest that changes in *BnNRT1.1* transporter expression in the shoots and roots reflect the action of an integrated and coordinated system for growth controlled by the nitrate signal through the action of the *BnNRT1.1* and *BnNRT2.1* nitrate transporters. Because the NRT2.1 transporter, localized to the epidermal and cortical root cell layers, (Girin *et al.*, 2007) is also strongly involved in nitrate uptake and is linearly correlated with morpho-physiological variables, the next study should examine the respective contribution of the BnNRT2.1 transporter and its interaction with BnNRT1.1 in nitrate and water uptake and partitioning in low transpiration conditions.

Materials and Methods

Plant material and growth conditions

The *Brassica napus* L. seeds used in this study were the winter oil seed rape cultivar Capitol. The seeds were treated for germination according to Leblanc *et al.*, 2008. After 48 h of germination in the dark at room temperature, four seedlings were selected by their radicle length (5–6 mM), and were transferred to new Petri dishes (12x12 cm) filled with 50 mL of agar culture medium. Basic medium contained 0.4 mM KH_2PO_4 , 0.15 mM K_2HPO_4 , 1 mM K_2SO_4 , 0.5 mM MgSO_4 , 3 mM CaCl_2 , 0.2 mM Fe-Na EDTA, 14 mM H_3BO_3 , 5 mM MnSO_4 , 3 μM ZnSO_4 , 0.7 μM CuSO_4 , 0.7 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ and 0.1 μM CoCl_2 and was solidified with 0.8% (W/V) agar (Sigma A-7002), pH 6.75. This basic medium was supplemented with KNO_3 as the sole nitrogen source at the concentrations indicated for each individual experiment (from 0.05 to 20 mM). Then, the dishes were placed vertically in a growth chamber for 5 d at 22°C under a 16h light/8h dark photoperiod at a photosynthetic photon flux density of 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. To avoid the Petri dishes opening during the experiment, agar plates were half sealed with adhesive tape.

Morphometric analyses of epidermal root hair cells and palisade cells

The “Length of the first Epidermal cell with visible root Hair bulge” (LEH) was defined by Le *et al.*, 2001 as a parameter to study root elongation at the cell level. Similarly, we have defined the “Basal Length of the Epidermal root Hair cell” (BLEH), which corresponds to fully expanded root hairs after 24 h of growth. The BLEH was measured under a Leica CME light microscope on neo-elongated primary roots between 48 and 72 h after sowing according to Leblanc *et al.* Among the 24 treated plantlets, only six plantlets showing the mean value of for primary root elongation after treatment with different concentrations of KNO_3 (from 0.05 to 20 mM) were chosen to study the root elongation effect of nitrate on the BLEH parameter. From the six plantlets, the length of 20–30 cells was measured. After the nitrate treatments, fully expanded cotyledons of plantlets were fixed and cleared according to Young *et al.*, 1979. Palisade cells present in the middle of the cotyledon blade were then measured at 40× magnification under a Nikon Optiphot 2 Nomarski microscope (Nikon, Japan) equipped with a camera (JVC, TK-C1481BEG) and video imaging system (Sony Trinitron, PVM-20L1).

Exploratory root system and cotyledonary surface analyses

To quantify the effects of nitrate treatments, modifications of the exploratory root system (primary and lateral roots), shoot area, and net uptake of NO_3^- were measured every day for 5 d.

For each nitrate treatment, four replicates corresponding to four different agar plates containing 4 seedlings were harvested. The root and shoot parts of the seedlings were excised. Seedling roots were washed in 1 mM CaSO₄ solution for 1 min at room temperature before being placed in a demineralized water solution and analyzed by the WinRHIZO scan system (Regent Instruments Inc.). Each shoot was placed on a transparent slide and photocopied (Kyocera Mita, KM-2030), and the leaf area was quantified using the image and the WinRHIZO scan system. After these analyses, the roots were dried on tissue paper and the roots and shoots placed into 2 mL Eppendorf tubes. The tubes were weighed to get root and shoot fresh weight, dried in an oven for 72 h at 60°C and then weighed to quantify the root and shoot dry weight.

Nitrate mass flow, net K¹⁵NO₃⁻ uptake and isotope analysis

The amount of nitrate movement by mass flow is calculated per cm of root length by multiplying the rate of water entry (μL. h⁻¹.cm⁻¹) with the nitrate concentration in the medium solution, according to Bath *et al.*, 1979.

Net uptake of NO₃⁻ was obtained by a continuous and homogeneous labeling with K¹⁵NO₃ (atom % ¹⁵N: 1%) over 120 h. The same ¹⁵NO₃⁻/¹⁴NO₃⁻ was used for the different KNO₃ concentration treatments (from 0.05 to 20 mM). At each time point (24, 48, 72, 96 and 120 h), seedlings were harvested and ¹⁵N accumulated within the tissues analyzed by Isotope Ratio Mass Spectrometry. Before isotope analyses, the dried matter of the shoots and roots were ground separately for 2 min to a fine powder with 5 mm diameter inox beads in an oscillating grinder (Retsch mixer mill, MM301). Then the total amount of ¹⁵N was determined for roots and shoots, and net uptake of nitrate was calculated as μmol¹⁵N.h⁻¹.mg⁻¹ DW or μmol¹⁵N.h⁻¹.cm⁻¹ root length. The ¹⁵N analyses were performed using an analyzer (EA 3000, Eurovector) coupled with an isotopic mass spectrometer (Isoprime X, GV instrument).

Daily ¹⁵N and Water partitioning

The percentages of daily ¹⁵N partitioning for the different nitrate treatments were calculated from the ratio between the amount of ¹⁵N in the shoot and total amount of ¹⁵N present in the shoots and roots of the seedling by the following equation:

$$[^{15}\text{N}_{\text{shoot}} / (^{15}\text{N}_{\text{shoot}} + ^{15}\text{N}_{\text{root}})] * 100$$

Daily water translocation to the shoot induced by nitrate treatments during the time course of the experiment was measured as the difference in water mass between the shoot and root divided

by the total mass of water accumulated within seedlings during growth. The volumetric shoot and root water mass were estimated from the difference between fresh and dry weights. Changes in water partitioning to the shoot were calculated on the basis of volumetric expansion of the shoot and root from the 0.05 mM nitrate treatment ($W_{\text{root } 0.05}$ and $W_{\text{shoot } 0.05}$). To account for root elongation changes induced by nitrate treatments, which increase or reduce water volumetric difference between shoots and roots, we subtracted W_{root} water mass from $W_{\text{root } 0.05}$ at a given nitrate concentration. In contrast, because increasing nitrate concentrations always induced shoot expansion, we subtracted $W_{\text{shoot } 0.05}$ from W_{shoot} water mass. Accordingly, the calculation of changes in water partitioning was as follows:

$$[(W_{\text{root } 0.05} - W_{\text{root}}) + (W_{\text{shoot}} - W_{\text{shoot } 0.05})] / (W_{\text{shoot}} + W_{\text{root}}) * 100$$

Estimation of transpiration rate

In hydroponic and agar Petri dish culture conditions, the transpiration rate was estimated by gravimetric methods. In hydroponic conditions, the transpiration rate was measured with the method of Van Ieperen and Mardery (1993). To modulate transpiration, plantlets were placed in high relative humidity (100% R) in closed chambers or in ambient atmosphere (65% HR). In the agar Petri dish system (100% RH), the transpiration rate was measured by the difference in water loss by agar plates without plantlets (control) and with plantlets (see **Fig. III.S8** on PSB online).

RNA isolation and quantitative RT-PCR analysis

For gene expression analysis, total RNA was extracted from 4 seedlings (200–400 mg of fresh root tissue). For each of the external nitrate concentration tested, five to eight replicates of 4 seedlings were used for quantitative RT-PCR analyses. Fresh root samples frozen in 2 mL Eppendorf tubes in liquid nitrogen were ground for 1.5 min with 4 mm diameter inox beads in an oscillating grinder (Retsch mixer mill MM301). Total RNA was extracted using the RNeasy plant mini kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen) and quantified before RT-PCR analyses by a spectrophotometer at 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf). RT was performed according to Leblanc *et al.*, 2008. For RT, 1 µg of total RNA was converted to cDNA with an iScript cDNA synthesis kit using the manufacturer's protocol (Bio-Rad). Gene expression was determined by quantitative real-time PCR on a PTC-200 DNA Engine cycler. The primers used to amplify the gene specific sequences were: for *PIP1b* (F, 5'-aggtggagccaacaccatag and R, 5'-ggggatggttgctaagtga), for *BnNRT2.1* (F, 5'-tggtggaataggcggctcgagttg and R, 5'-gtatagtttgggtcattgccat; AJ293028), and for *BnNRT1.1* (F, 5'-atggaaccgaagtgccttg and R, 5'-

tgattccagctgttgaagc, AJ278966), *NRT1.5* (F, 5'-cgggccaatgggttgctg; R, 5'-ctcgaccccagatgaatcg). The expression levels of genes were normalized to the expression level of the *18S* ribosomal gene (F, 5'-cggataaccgtagtaattctag R, 5'-gtactcattccaattaccagac).

Nitrate analyses

Anions such as nitrate and sulfate were extracted from freeze-dried shoot and root tissues of 8 seedlings treated with different nitrate concentrations for five days. Extraction was performed twice on 15 mg of dry weight suspended in 1 mL of extraction buffer [H₂O/50% alcohol (1V/1V)] then extracted at 40°C for 30 min. After centrifugation (1000 g for 20 min), the supernatant was removed and the pellet was re-extracted in the same way. Then the pellet was extracted twice in 1 mM of milliQ water for 30 min at 95°C. After centrifugation, all the supernatants were pooled and dried under vacuum before being suspended in 600 μL of milliQ water. Sample concentration was optimised in 300 μL aliquots prior to analysis by ion chromatography using an ICS3000 analyzer (Dionex) with a hydroxide-selective anion exchange column (IonPac AS17). The EG40 Eluent Generator electrolytically produces high purity potassium hydroxide eluent from water, using a range of concentrations from 12 to 40 mM. In comparison to non-suppressed ion chromatography, electrolytic and chemical suppression (ASRS300 4 mm) greatly enhanced sensitivity (signal-to-noise ratio) by decreasing the background conductivity of the eluent while simultaneously increasing the response of analytes.

Amino acid profiling

Amino acid profiling was performed on shoot and root material, using an ACQUITY Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) separation system (Waters Corp). Plant tissues were collected, freeze-dried, and homogenized with 4 mm diameter steel beads for 1 min at 30/s frequency. Methanol-chloroform-water-based extractions were made on 10 mg of the resulting dry powder. The powder was suspended in 400 μL of methanol containing 200 μM DL-3-aminobutyric acid (BABA) as an internal standard and agitated at 1,500 rpm for 15 min at room temperature. 200 μL of chloroform were then added and samples were agitated at 1,500 rpm for 5 min at room temperature. Finally, 400 μL of ultra-pure water were added and samples were vigorously mixed and then centrifuged at 13,000 g for 5 min at 4°C. The upper phase, containing amino acids, was transferred to a clean microtube, dried under vacuum, and the dry residue was resuspended in 600 μL of ultra-pure water. A 5 μL aliquot of the resulting extract was used for derivatisation according to the AccQ•Tag Ultra Derivatization Kit protocol (Waters Corp.) and then derivatised amino acids were analyzed using an ACQUITY UPLC[®] system (Waters Corp.). 1

μL of the reaction mix was injected onto an ACQUITY UPLC BEH C18 $1.7 \mu\text{m}$ $2.1 \times 100 \text{ mm}$ column heated to 55°C . Elution of amino acids was performed with a mix of 10-fold diluted AccQ•Tag Ultra Eluent (A) and acetonitrile (B) at $0.7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ flow according to the following gradient: initial, 99.9% A ; 0.54 min, 99.9% A ; 6.50 min, 90.9% A, curve 7 ; 8.50 min, 78.8% A, curve 6 ; 8.90 min, 40.4% A, curve 6 ; 9.50 min, 40.4% A, curve 6 ; 9.60 min, 99.9% A, curve 6 ; 10.10 min, 99.9% A. Amino acids were detected at 260 nm using a photo diode array detector and were subsequently identified and quantified with the individual external standard calibration curves. The content of individual amino acids was expressed in μmoles per g of dry weight by reference to the BABA internal standard and to external calibration curves of amino acids.

Supplemental Material

Figure III.S8, Figure III.S9, Figure III.S10, Figure III.S11, Figure III.S12, Figure III.S13

Acknowledgements

We would like to thank the two reviewers for their insightful suggestions. We are grateful to Drs. C. Moore of the University of Wisconsin-Madison and P. Malagoli of UMR PIAF for critical reading of this manuscript. The authors are grateful to J. Pichon and M-P Bataillé for their technical assistance during seedling harvest and ^{15}N analyses.

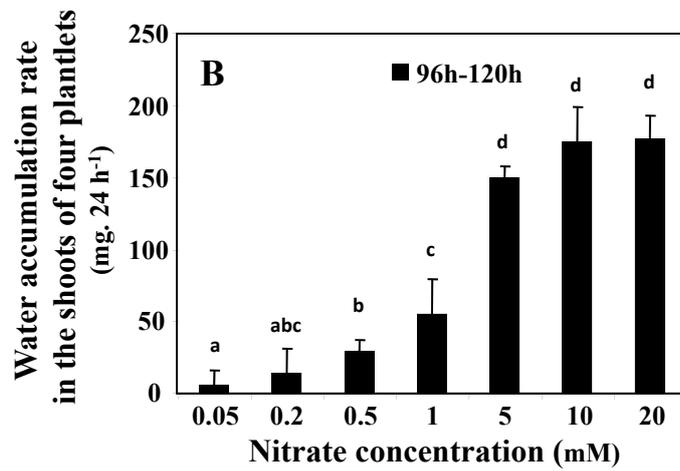
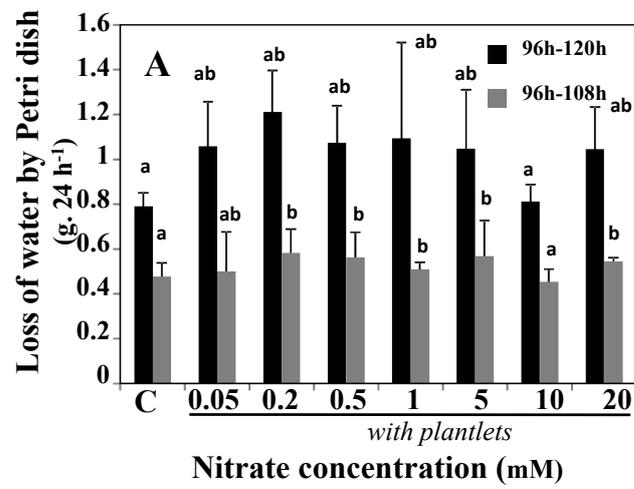


Figure III.S8 LeNy *et al.* (2013)
PSD

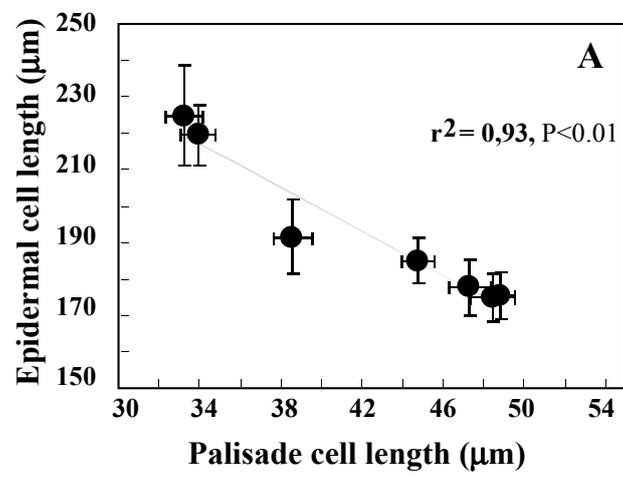


Figure III.S9 LeNy *et al.* (2013)
PSD

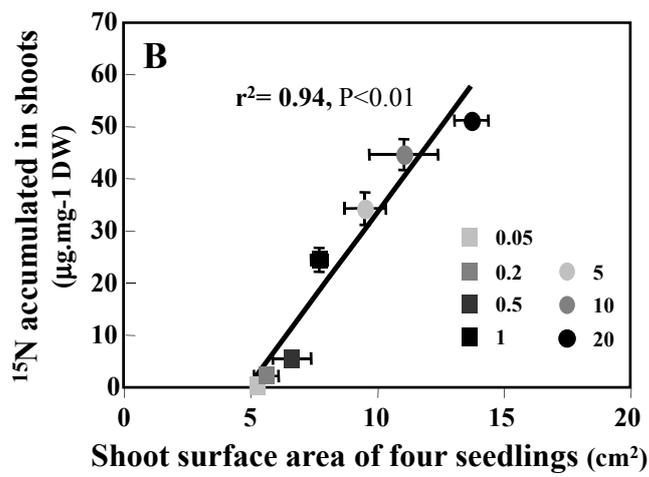
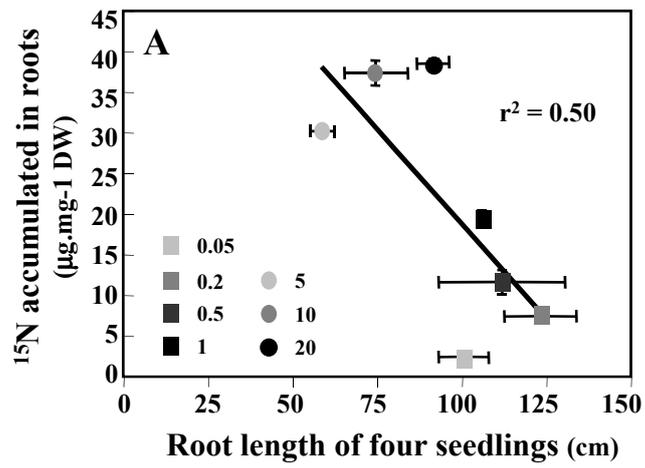


Figure III.S10: LeNy *et al.* (2013)
PSD

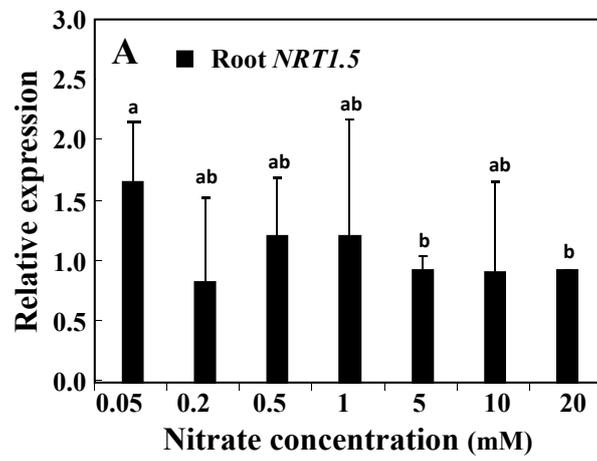


Figure III.S11 : LeNy *et al.* (2013)
PSD

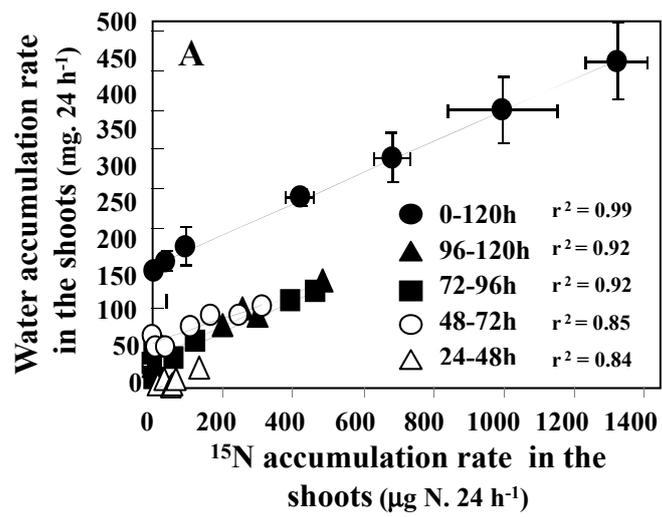


Figure III.S12: LeNy *et al.* (2013)
PSD

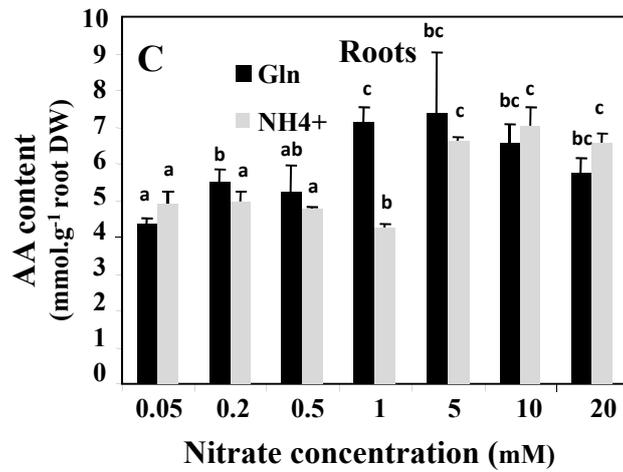
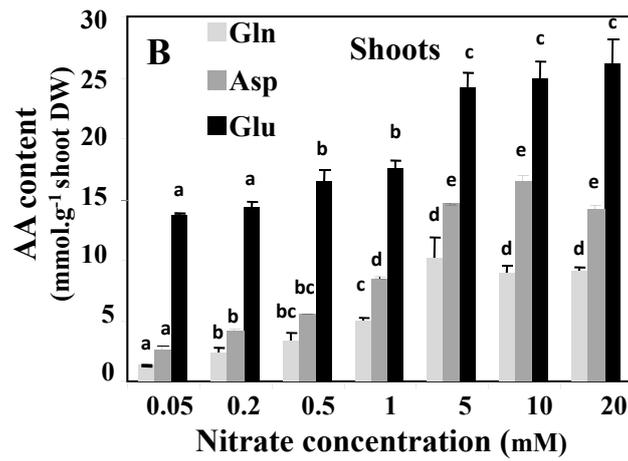
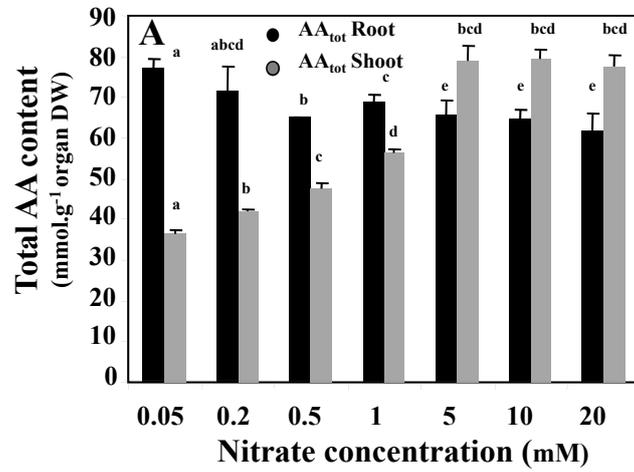


Figure III.S13 LeNy *et al.* (2013)
PSD

A.6. Principaux résultats obtenus

A.6.1. En condition non transpirante, il existe un parallèle étroit entre l'absorption d'eau pour la croissance des parties aériennes et l'absorption de $^{15}\text{NO}_3^-$

La corrélation observée en condition non transpirante ($r^2 = 0,9$ $p < 0,05$) confirme notre hypothèse de travail. **Lorsque la plante fonctionne presque comme un osmomètre commandé uniquement par les variations des concentrations externes de nitrate, les phénomènes de croissance liés au flux osmotique d'eau s'ajustent à l'absorption du nitrate.** Sur le gradient de concentration de nitrate utilisé de (0,05 à 20 mM), les plus fortes augmentations d'absorption d'eau et de nitrate ont été observées entre 1 et 5 mM.

A.6.2. Le flux osmotique d'eau pour la croissance des parties aériennes induit par la disponibilité en nitrate est lié à une bascule morphologiques des racines et des parties aériennes

Les plus fortes variations morphologiques racinaires et foliaires sont observées entre 1 et 5 mM. Ainsi, pour ces concentrations de 1 et 5 mM, la surface des parties aériennes augmente d'un facteur deux environ alors que la longueur racinaire décroît d'un même facteur deux. L'accumulation d'eau dans les parties aériennes est étroitement corrélée à l'augmentation de la surface foliaire ($r^2 = 0,9$; $p < 0,05$) et aux quantités de ^{15}N accumulées ($r^2 = 0,9$; $p < 0,05$). Les bascules morphologiques racinaires et foliaires sont donc associées aux bascules physiologiques : absorption de nitrate et d'eau. **L'augmentation de la conductance hydraulique racinaire entre 1 et 5 mM, mesurée indirectement par l'augmentation de l'absorption d'eau pour la croissance, est donc causée par une forte augmentation des capacités d'absorption du fait de la réduction de la longueur racinaire et de l'augmentation de la surface foliaire d'un facteur deux.**

A.6.3. Le signal nitrate induit l'expansion cellulaire et tissulaire des parties aériennes et réduit l'élongation racinaire

Les mesures d'élongation et d'expansion cellulaires des cellules épidermiques racinaires matures et des cellules palissadiques du limbe foliaire ont montré un comportement opposé en

réponse à l'augmentation des concentrations externes de nitrate ($r^2 = 0,9$; $P < 0,05$). En effet, entre 0,05 et 1 mM, le nitrate induit l'expansion cellulaire des cellules palissadiques et inhibe l'élongation des cellules épidermiques racinaires. Au delà de 1 mM, l'accroissement de la surface foliaire ne peut s'expliquer que par une augmentation des divisions et de l'expansion cellulaire dans les marges cotylédonaire correspondant aux zones. Cette hypothèse est confirmée par la comparaison des évolutions de l'expansion des cellules palissadiques et de la surface foliaire rapportée à la dose de 0.05 mM de nitrate. Ces résultats sont aussi confirmés par la dynamique journalière d'allocation du ^{15}N et de l'eau en réponse à la disponibilité en nitrate. En effet, l'expansion maximale des cellules palissadiques est concomitante avec l'augmentation du taux de répartition du ^{15}N dans les parties aériennes qui passe de 40 à 80% entre 0,05 et 1 mM nitrate. Au delà de 1 mM, lorsque le taux de répartition du ^{15}N reste stable (80%), seule une expansion tissulaire peut expliquer l'augmentation de la surface foliaire comme l'indique la multiplication par deux de la translocation d'eau vers les parties aériennes. A la différence du ^{15}N , l'eau ne pouvant ni se concentrer dans les tissus ni fuir par transpiration, il y a donc forcément eu expansion tissulaire. **Ces résultats montrent que le signal nitrate déclenche la croissance cellulaire et tissulaire des parties aériennes et que le flux osmotique d'eau nécessaire à la croissance foliaire rend compte de cette expansion. Il n'est donc que la conséquence de la signalisation nitrate sur la croissance foliaire.**

A.6.4. Les bascules morpho-physiologiques sont corrélées à l'augmentation de l'expression des transporteurs NRT1.1 et NRT2.1

Afin de déterminer si les variations d'absorption du nitrate et du flux osmotique d'eau pour la croissance sont liées aux variations de transcription des deux transporteurs racinaires majeurs de nitrate (NRT1.1 et NRT2.1), des analyses d'expression ont été réalisées en fonction de la disponibilité en nitrate. Ces analyses révèlent que les fortes variations d'expression de ces transporteurs sont corrélées aux bascules morpho-physiologiques entre 1 et 5 mM nitrate mesurées soit par l'accumulation d'eau, l'accumulation de ^{15}N ou les variations de longueurs racinaires. Cependant, l'expression de *Nrt1.1* est corrélée de façon exponentielle à ces variables alors que l'expression de *Nrt2.1* est corrélée de façon linéaire. Bien que les gènes *Nrt1.1* et *Nrt2.1* présentent un profil d'expression similaire en réponse au nitrate, les différences dans les niveaux d'expression entre 1 et 5 mM suggèrent une régulation différente de *Nrt1.1* et *Nrt2.1*. **Ainsi, on peut supposer que l'expression du transporteur NRT2.1 est capable de s'adapter avec les**

variations de longueur et de surface absorbante du système racinaire, ce qui est cohérent avec son activité de transporteur nitrate à forte affinité et sa localisation dans les assises corticales et épidermiques de la racine mature. L'expression plus forte du transporteur NRT1.1 pourrait dépendre, quant à elle, d'une régulation différente en lien avec les changements morphologiques induits par les hormones comme l'auxine. En effet, il est acquis que le transporteur NRT1.1 à la différence du transporteur NRT2.1 est régulé par l'auxine (Guo *et al.*, 2002).

A.7. Conclusions et perspectives de recherches

Les résultats que nous avons obtenus lors de cette étude montrent que lorsque la plante se comporte presque comme un osmomètre commandé par la seule disponibilité en nitrate, les propriétés hydrauliques dépendent de la croissance foliaire et sont sous le contrôle des transporteurs racinaires de nitrate. Nos données confirment également les résultats de Stitt et coll. (1997a et b, 1999), à savoir que le nitrate exerce un effet signalétique plutôt qu'osmotique sur le déclenchement de la croissance des parties aériennes. **Par ailleurs, en dépit d'une différence d'intensité, la co-régulation de l'expression de *Nrt1.1* et *Nrt2.1* entre 1 et 5 mM au cours des bascules morpho-physiologiques pose la question d'un couplage ou d'une coordination possible entre ces deux transporteurs en réponse au nitrate.** En effet, il a été montré d'une part que le transporteur NRT1.1 régule l'expression du gène *Nrt2.1* (Krouk *et al.*, 2006) et, d'autre part que ces deux transporteurs ont une **localisation complémentaire dans les différentes assises cellulaires de la racine mature d'*Arabidopsis*** (Girin *et al.*, 2007 ; Remans *et al.*, 2006b). Afin de vérifier cette hypothèse et d'établir le rôle respectif du transporteur NRT2.1 et NRT1.1 dans l'absorption du nitrate et de la croissance foliaire, nous avons cherché à découpler l'activité de chacun de ces deux transporteurs. **De façon à éviter les phénomènes de compensation fonctionnelle dus à la redondance des gènes de la famille NRT1 et NRT2, nous avons choisi une approche pharmacologique à l'aide du L-Glutamate.**

**

Modification pharmacologique de la Fonction d'absorption

B. Apport des traitements pharmacologiques à l'étude des transporteurs de nitrate BnNRT2.1 et BnNRT1.1 : Le glutamate induit-il une modification de l'absorption du nitrate et de l'eau impliqués dans la croissance ?

B.1. Contexte scientifique

Chez *Arabidopsis*, les analyses moléculaires récentes ont montré que les transporteurs NRT1.1 et NRT2.1 sont localisés de façon complémentaire et en parallèle dans les différentes assises cellulaires de la racine mature. Le transporteur NRT2.1 est situé dans les couches cellulaires épidermiques et corticales alors que le transporteur NRT1.1 est localisé dans les tissus de la stèle : endoderme et péricycle (Chopin *et al.*, 2007 ; Orsel *et al.*, 2007 ; Guo *et al.*, 2001a). En terme de structure-fonction (localisation-transport), cette disposition bouscule l'idée précédemment admise d'une disposition en série des différents types de transporteurs nitrate sur la membrane épidermique racinaire (Crawford et Glass, 1998). En effet, elle suggère **une coordination ou un couplage possible** entre de ces deux transporteurs dans l'absorption du nitrate par la racine mature. Cette hypothèse a déjà été partiellement validée par une étude à l'aide du mutant *nrt1.1*. Cette étude a révélé que le transporteur NRT1.1 est nécessaire pour réprimer l'expression du gène *Nrt2.1* à fortes concentrations externes de nitrate et pour induire la transcription du gène *Nrt2.1* à faibles concentrations de nitrate en présence d'ammonium (Krouk *et al.*, 2006). Une autre étude a également montré que l'induction du gène *Nrt2.1* est réduite de plus de 50% chez le mutant du transporteur NRT1.1 sauf après deux heures de privation où le potentiel d'induction de *Nrt2.1* par le nitrate est restauré (Wang *et al.*, 2009). Par ailleurs, nous avons montré précédemment que si les gènes *Nrt1.1* et *Nrt2.1* sont co-induits en réponse au nitrate lors des changements morpho-physiologiques les plus significatifs entre 1 et 5 mM, en revanche les différences dans leur niveau d'expression suggèrent une régulation différente des deux gènes en relation avec la croissance racinaire. (cf. : III.A.6.4)

Bien que les transporteurs NRT1.1 et NRT2.1 soient tous les deux induits par le nitrate, ils répondent néanmoins de façon différente au statut N (Lejay *et al.*, 1999). En effet, les acides aminés inhibent l'expression du gène *Nrt2.1* mais n'ont aucun effet sur l'expression du gène *Nrt1.1* alors que le nitrite inhibe l'expression de *Nrt1.1* mais n'a aucun effet sur l'expression de *Nrt2.1* (Lejay *et al.*, 1999 ; Loqué *et al.*, 2003). En conséquence, **les traitements pharmacologiques par le nitrite ou les acides aminés apparaissent comme des outils expérimentaux permettant potentiellement le découplage des activités des transporteurs**

AtNRT1.1 et AtNRT2.1. Parce que les acides aminés agissent non seulement sur la transcription mais aussi sur l'activité du système de transport HATS, ils apparaissent comme des outils privilégiés par rapport au nitrite (Vidmar *et al.*, 2000). **De plus, chez une espèce amphidiploïde comme le Colza où la redondance fonctionnelle des gènes de la famille NRT2 est amplifiée par une redondance des génomes, l'approche pharmacologique à l'aide des acides aminés semble la plus pertinente pour éviter les phénomènes de compensation pour l'absorption du nitrate.** En effet, les approches mutants des gènes *Nrt2.1* et *Nrt2.2* (mutant *atnrt2a*) ont montré l'existence de phénomènes de compensation pour l'absorption du nitrate aux fortes concentrations de nitrate externes (Orsel *et al.*, 2004).

B.2. Objectif et hypothèse de travail

Dans ce contexte, notre principal objectif de travail a consisté à découpler (par une approche pharmacologique à l'aide du glutamate), l'activité des transporteurs BnNRT2.1 et BnNRT1.1 au cours des deux phases d'équilibre des variables morpho-physiologiques avant et après les bascules induites entre 1 et 5 mM de nitrate. En effet, **notre hypothèse de travail supposait que, dans la racine mature, le transporteur NRT2.1 localisé sur l'assise épidermique intervient principalement dans l'absorption du nitrate de façon coordonnée avec le transporteur NRT1.1 et qu'en cas de baisse d'activité du transporteur NRT2.1, le transporteur NRT1.1 peut compenser cette perte d'activité.**

B.3. Stratégies expérimentales et méthodologiques

Les plantules de Colza ont été cultivées sur gel d'agarose de façon à les faire fonctionner comme des osmomètres et à coupler le fonctionnement des transporteurs nitrate avec la croissance.

De façon à découpler l'activité des transporteurs BnNRT2.1 et BnNRT1.1, nous avons utilisé le K-L-glutamate car il induit chez l'Orge avec l'aspartate la plus forte inhibition (79%) de l'absorption du système HATS (Vidmar *et al.*, 2000). De façon à moduler le découplage et/ou les phénomènes de compensations entre les transporteurs BnNRT2.1 et BnNRT1.1 et à évaluer leur rôle respectif dans l'absorption du nitrate, nous avons fait varier les concentrations externes en K-glutamate de 0,5 à 10 mM.

Dans ces conditions de culture, la conductance racinaire pour le nitrate a été modulée à l'aide d'une augmentation des concentrations externes en K-glutamate dans la solution nutritive en présence de 1 et 5 mM nitrate. De façon à mesurer l'absorption de nitrate mais également de glutamate sur l'accumulation de l'azote au cours des différents traitements, un marquage séparé à

l'aide du $K^{15}NO_3$ et du $K^{15}N$ -glutamate a été réalisé. Ceci nous a donc amené à dupliquer chaque traitement aux deux concentrations de nitrate utilisées : **1 mM ou 5 mM $K^{15}NO_3$ + 0,5 à 10 mM K-Glu et 1 mM ou 5 mM KNO_3 + 0,5 à 10 mM $K^{15}NGlu$.**

B.4. Méthodologies utilisées

Sur des plantules entières et intactes, la mesure du flux d'eau osmotique nécessaire à la croissance est déterminée indirectement par soustraction de la biomasse sèche à la biomasse fraîche des parties aériennes. Du fait de l'incompressibilité de l'eau, seules les quantités d'eau accumulées dans les tissus sont directement connectées à la croissance cellulaire des plantules lorsque celles-ci fonctionnent presque comme des osmomètres.

L'absorption de nitrate et de glutamate (activité des transporteurs) est mesurée par analyse IRMS à partir des quantités de ^{15}N accumulées sur un pas de temps de cinq jours de traitement. Par ailleurs, l'évolution de la longueur du système racinaire en fonction des traitements a également été suivie à l'aide d'un scanner numérique, puis analysée avec le logiciel Winrhizo[®].

Les variations des profils d'expression en fonction des traitements des transporteurs de nitrate intervenant de façon majeure dans l'absorption et la translocation : NRT1.1, NRT1.5, NRT2.1 ont été obtenues à l'aide d'une Q-PCR en temps réel. L'échantillonnage des plantules a toujours été réalisé aux mêmes heures de la journée afin d'éviter d'introduire un biais dans les valeurs de transcription due à la variabilité nyctémérale de l'expression des transporteurs nitrate.

L'évolution en fonction des traitements des teneurs racinaires et foliaires en nitrate et en acides aminés libres (variations des pools endogènes) ont été suivie par UPLC (ultra performance liquide chromatography) et Chromatographie ionique (Dionex)

B.5. Article 2

In low transpiring conditions, uncoupling the *BnNrt2.1* and *BnNrt1.1* NO₃⁻ transporters by glutamate treatment reveals the essential role of *BnRT2.1* for nitrate uptake and the nitrate-signaling cascade during growth

Antonin Leblanc¹, Raphaël Segura¹, Carole Deleu², Erwan Le Deunff^{1*}

¹INRA, UMR 950, Écophysiologie Végétale & Agronomie Nutritions NCS, F-14032 Caen, France

²INRA, UMR 118 INRA, Agrocampus Ouest, Université de Rennes 1, Amélioration des Plantes et Biotechnologies Végétales, Campus de Beaulieu, bat 14A, 35042 Rennes Cedex, France

*Corresponding author; e-mail: erwan.ledeunff@unicaen.fr; fax: (33) (0)2 31 56 53 60.

Volume 8, Issue 2 February 2013

eLocation ID: e22904

Abstract

In plants, the nitrate transporters, NRT1.1 and NRT2.1, are mainly responsible for nitrate uptake. Intriguingly, both nitrate transporters are located in a complementary manner in different cells layers of the mature root suggesting that their coordination should occur during nitrate uptake and plant growth. This hypothesis was examined on 5-d-old rape seedlings grown on agar medium supplemented with 1 or 5mM nitrate. Seedlings were treated with increasing potassium glutamate concentrations in order to uncouple the two nitrate transporters by inhibiting BnNRT2.1 expression and activity specifically. In both nitrate treatments, increasing the glutamate concentrations from 0.5 to 10mM induced a reduction in $^{15}\text{NO}_3^-$ uptake and an inhibition of N assimilation. The decrease in $^{15}\text{NO}_3^-$ uptake was caused by downregulation of *BnNRT2.1* expression but surprisingly it was not compensated by the upregulation of *BnNRT1.1*. This created an unprecedented physiological situation where the effects of the nitrate signal on shoot growth were solely modulated by nitrate absorption. In these conditions, the osmotic water flow for volumetric shoot growth was mainly dependent on active nitrate transport and nitrate signaling. This behavior was confirmed by the allometric relationships found between changes in the root length with ^{15}N and water accumulation in the shoot. These findings demonstrate that the *BnNRT2.1* transporter is essential for nitrate uptake and growth, and renew the question of the respective roles of the NRT2.1 and NRT1.1 transporters in nitrate uptake and sensing at the whole plant level.

Keywords: *Brassica napus*, NRT2.1 and NRT1.1 nitrate transporters, cell expansion, nitrate signaling, nitrate uptake, organ growth, water uptake

Introduction

Central questions regarding the coordination between nitrate transporters and water fluxes for growth in intact plants deserve more attention in order to improve relations between water use efficiency (WUE) and nitrogen use efficiency (NUE) (Brouder and Volenec, 2008; Brueck, 2008). One puzzle concerns the relationship between the coordination and the functional overlap in expression and activities of nitrate transporters and the developmental changes in the root and shoot during water flow for growth and transpiration. In the 1970s a model based on a flux-force relationship with two flow components and two compartments was proposed to account for water flows for growth and transpiration in relation to solute fluxes through the roots (Dainty, 1963; Fiscus and Kramer, 1975). This model has been intensively tested and validated in excised roots of herbaceous and woody species using invasive methods such as pressure chambers (Kramer, 1983; Steudle and Peterson, 1998). Thus, it has been demonstrated that water transport in plants results from two mechanisms: the hydraulic water flow in rapidly transpiring plants and the osmotic water flow in slowly transpiring plants driven by solute accumulation in the xylem (Kramer, 1983; Steudle, 2000; Steudle 2000). However, it is possible to create non-invasive experimental conditions on intact plants in order to dissociate hydraulic flow from osmotic flow so that the role of nitrate transporters in osmotic water flow during growth can be studied. Indeed, at the whole plant level, the water balance requires conservation of mass and may be characterized by the following equation (Boyer, 1985):

$$A-t = G + H$$

Where A and T are the fluxes for absorption and transpiration, G is the storage flux for growth and H is the storage flux for re-hydration (or dehydration) corresponding to tissue capacitance. This relationship may be simplified depending on experimental conditions. For example, transpiration modifies water potential of plant tissues and modulates cell enlargement by turgor (Cosgrove, 2005). Accordingly, when transpiration is high, growth is reduced to zero and in such cases: $A = T$

During the night, when transpiration is strongly reduced, water status of the plant is constant and capacitance is low and constant because of the absence of large variations in hydrostatic pressure; accordingly:

$$A-t = G$$

This experimental condition, in which osmotic water flow is predominant, has already been tested in relation to mineral nutrients by supplying plants only during the night (Tanner and Beevers, 1990; Tanner and Beevers, 2001; Macduff and Bakken, 2003). Unfortunately these studies failed to examine the changes in activity and transcription of nutrient transporters such as nitrate transporters.

Furthermore, in very low or non-transpiring conditions, the relationship can be further simplified; in this case:

$$A = G$$

In this condition, the rate-limiting resistance to water flow was the site of cell enlargement of the growing tissue because hydraulic resistance of the roots was smaller (Boyer, 1985). In a previous study we have created this physiological situation by using an agar Petri dish system and by supplying oil seed rape plantlets with a large range of external nitrate concentrations (Le Ny *et al.*, 2013). As expected, both the NRT1.1 and NRT2.1 nitrate transporters, which are involved predominantly in nitrate uptake by plant roots, responded differently to changes in root and shoot growth in response to nitrate availability (Guo *et al.*, 2001; Orsel *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 2003; Filleur *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2007). Expression levels of *BnNrt2.1* were linearly correlated with variations in root length, suggesting that NRT2.1 expression adapts the nitrate uptake to plantlet growth (Le Ny *et al.*, 2013). In contrast, expression levels of *BnNrt1.1* in the root and shoot were strongly increased during growth changes of the root and shoot that were induced by increasing external nitrate concentrations. Thus, at a nitrate supply of between 1 and 5mM, the shoot surface area was increased by two, whereas the root length was reduced 2-fold. At the same time, osmotic water flow for shoot growth was increased twice. These results were consistent with recent evidence that the NRT1.1 transporter is not a nitrate transporter alone, but is also involved in nitrate sensing (Ho *et al.*, 2009) and root growth via auxin transport (Krouk *et al.*, 2010). Taken together, these findings raise questions of whether the NRT2.1 transporter is implicated in the regulation of osmotic water flow for growth during low transpiration conditions through regulation of nitrate uptake. Indeed, localization studies with GFP and GUS activities have revealed in rice and Arabidopsis that NRT1.1 and NRT2.1 are complementary and localized in different cell layers of the mature root. NRT1.1 is mainly expressed in the vascular cylinder in the endodermal and pericycle cell layers (Guo *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2002; Remans *et al.*, 2006a; Remans *et al.*, 2006b) whereas NRT2.1 is specifically expressed in epidermal and cortical cell layers (Girin *et al.*, 2007; Orsel *et al.*, 2007; Chopin *et al.*, 2007). Because NRT2.1 has a high

nitrate affinity and is inducible by nitrate, the lack of large changes in NRT2.1 transcription compared with NRT1.1 in low transpiring conditions when water for volumetric expansion and nitrate inflows reached their maximum level is very intriguing and deserves more attention (Le Ny *et al.*, 2013).

In order to analyze whether the NRT2.1 transporter is involved in the regulation of osmotic water flow for volumetric growth during low transpiration conditions through regulation of nitrate uptake and signaling, we created a new experimental situation in which the activity and transcription of NRT2.1 were uncoupled from those of NRT1.1. This physiological condition was obtained by co-treating plantlets over five days with increasing potassium glutamate concentrations in the presence of 1 and 5mM nitrate. Indeed, it is well demonstrated that amino acids (AA) such as glutamate (Glu) specifically inhibited NRT2.1 at the transcription and activity levels (Vidmar *et al.*, 2000; Beuve *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2010) without modifying NRT1.1 activity and transcription (Lejay *et al.*, 1999; Loqué *et al.*, 2003). Because Glu is the central compound of nitrogen (N) metabolism in plants, such a pharmacological treatment is questionable with regard to possible side effects on N metabolism. However, we can assume that compared with NRT2.1 mutant analysis, such treatment may avoid compensation mechanisms in nitrate uptake by inhibiting the other redundant genes of the NRT2 family (Orsel *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 2003; Orsel *et al.*, 2004). Both 1 and 5mM nitrate external concentrations were chosen because significant changes in root morphology, hydraulic conductivity and *Bn*NRT1.1 transcription levels were previously observed at these concentrations (Le Ny *et al.*, 2013). We also used a differential ¹⁵N labeling of nitrate and Glu in order to measure the uptake of nitrate and Glu, to quantify the final N status obtained by the nitrate or nitrate-Glu combined treatments and to analyze the compensation mechanisms for the ¹⁵N uptake and accumulation from both N forms. Nitrate accumulation in both treatments was also measured by ion chromatography analyzes (Dionex). Nitrogen assimilation was evaluated by quantification of individual amino acids using ultra performance liquid chromatography (UPLC)-based amino acid profiling.

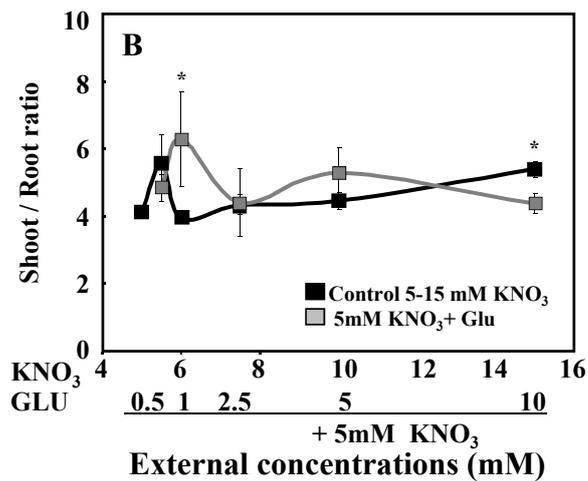
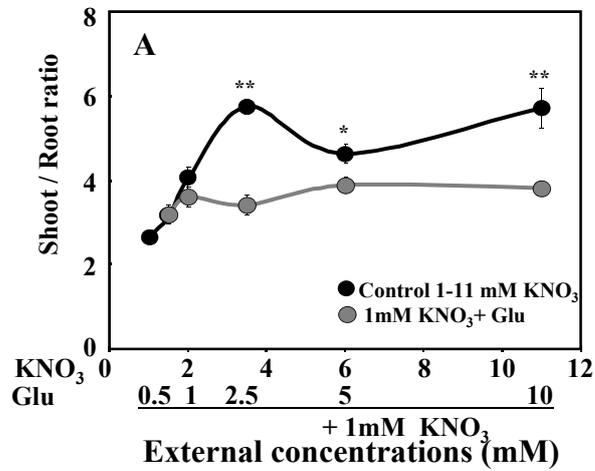


Figure III.14. Comparison of the fresh weight shoot:root ratio in *Brassica napus* seedlings treated with nitrate and nitrate-Glu for 5 d on agar plates. (A) Effect of increasing Glu concentration on the shoot:root ratio in 1mM nitrate treated seedlings and control seedlings supplied with increasing NO₃⁻ concentration. (B) Effect of increasing Glu concentration on the shoot:root ratio in 5mM nitrate treated seedlings and control seedlings supplied with increasing NO₃⁻ concentration. Values are the average (\pm SE) of 3–4 replicates of four seedlings each. Significant differences between control seedlings treated with 1 or 5mM nitrate and nitrate-Glu treated seedlings are given for * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (t test).

Fig. III.14: Leblanc *et al.* (2013)
PSB

Results

Chronic glutamate treatment strongly inhibits root growth and to a lesser extent the shoot growth of *B. napus* seedlings

Under agar plate growth conditions, *Brassica napus* seedlings supplied with a large range of external KNO_3 concentrations from 1 to 11 mM over five days exhibited a switch in the shoot growth relative to root growth between 1 and 5mM (Fig. III.14A; **Fig. III.S20** at PSB online). Beyond 5mM nitrate treatment, the shoot:root ratio remained stable (Fig. III.14B). These results were consistent with previous data obtained in the same growing conditions (Le Ny *et al.*, 2013). This led us to choose 1 and 5mM nitrate concentrations as threshold values of nitrate treatment to characterize the effects of Glu on nitrate and osmotic water fluxes for growth. Therefore the seedlings were co-treated over 5 d with 1 or 5mM nitrate and increasing potassium Glu concentrations. The co-treated seedlings with varying Glu concentrations in the presence of 1mM nitrate showed a reduction in the shoot:root ratio (Fig. III.14A), whereas the shoot:root ratio of seedlings co-treated with 5mM nitrate was maintained (Fig. III.14B). In both nitrate treatments, Glu induced growth inhibition of the shoots and roots (Fig. III.15A **and** B) and caused a chlorotic phenotype compared with control seedlings (data not shown). However, whatever the nitrate treatment (1 or 5mM), Glu-induced inhibition was more significant in the roots than in the shoots (Fig. III.15A-C). The reduction in root elongation was detectable for both nitrate treatments with the 1 mM Glu supply (Fig. III.15C). However, the root growth inhibition was more pronounced in the nitrate–Glu co-treatment with 5mM nitrate (Fig. III.15C).

Differential ^{15}N labeling of nitrate and glutamate demonstrates that glutamate-induced growth inhibition is not caused by a major change in N status of the seedlings

In order to analyze the effects of the Glu and nitrate nitrogen sources on N uptake and N status of the seedlings, differential ^{15}N labeling of nitrate and Glu was performed. Calculation of the relative ^{15}N accumulation rate via K^{15}NO_3 uptake (expressed as $\mu\text{g } ^{15}\text{N}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{root length cm}^{-1}$) compared with control seedlings was examined for 1 and 5mM nitrate treated seedlings (Fig. III.16). The ^{15}N accumulation rate was low and constant under increasing Glu concentrations in seedlings treated with 1mM nitrate (Fig. III.16A). Because of Glu inhibition of the nitrate influx (Beuve *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2010) and the root elongation, (Leblanc *et al.*, 2008; Walch-Lui and Forde, 2008) these results did not exclude regulation of $^{15}\text{NO}_3^-$ uptake at both the functional and structural levels. In seedlings treated with 5mM nitrate, the nitrate uptake rate was significantly reduced between the Glu concentrations of 2.5 to 10mM (Fig. III.16B). However, a

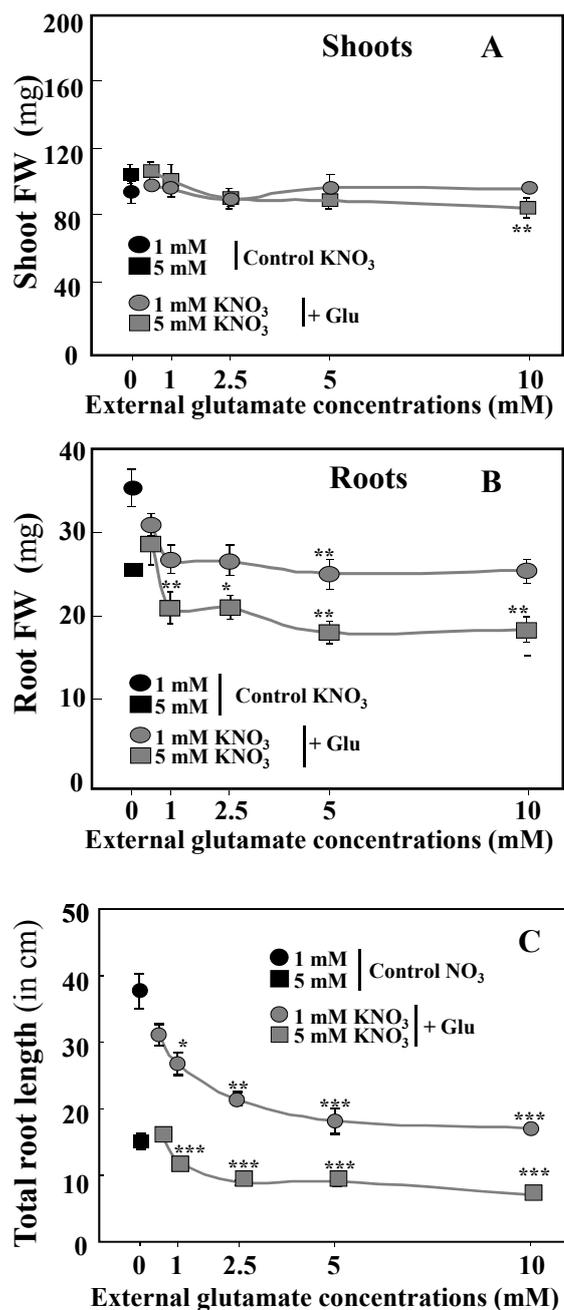


Figure III.15. Changes in root and shoot fresh weights in *Brassica napus* seedlings treated with nitrate-Glu for 5 d on agar plates. (A) Effect of increasing Glu concentration in 1 and 5mM nitrate treated seedlings on shoot fresh weight. (B) Effect of increasing Glu concentration in 1 and 5mM nitrate treated seedlings on the root fresh weight. (C) Effect of increasing Glu concentration in 1 and 5mM nitrate treated seedlings on root elongation. Values are the average (\pm SE) of four replicates of four seedlings each. Significant differences between control seedlings treated with 1 or 5mM nitrate and nitrate-Glu treated seedlings are given for * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (t test); *** $p < 0.001$ (t test).

Fig. III.15: Leblanc *et al.* (2013)
PSB

significant reduction in the amount of ^{15}N accumulated per plantlet under 2.5 to 10mM Glu was observed for both nitrate treatments in spite of the reduction in the root length (**Fig. III.S21** at PSB online). This low level of the $^{15}\text{NO}_3^-$ uptake rate was compensated by a significant increase in the $^{15}\text{NGlu}$ uptake rate (Fig. III.16A **and** B). This compensation mechanism for the ^{15}N accumulation rate between nitrate and Glu ensured the maintenance of a high N status in glutamate-treated seedlings compared with seedlings treated with increasing concentrations of nitrate. Hence, the results indicated that the inhibition of the shoot and root growth induced by Glu (Fig. III.15A **and** B) was not caused by a quantitative change in the N status expressed as total ^{15}N accumulation, but more probably by a qualitative change in the N status. This raises the question of how nitrate and Glu might exert a control on the root and shoot growth.

In nitrate-glutamate treated seedlings, inhibition of nitrate uptake and assimilation corresponds to distinct but concomitant mechanisms

To further understand the effects of Glu on the root and shoot growth inhibition of the seedlings, we analyzed the nitrate accumulation and assimilation in the root and shoot tissues. Nitrate concentrations in the shoots and roots were strongly reduced in nitrate-Glu co-treated seedlings at high external Glu concentrations compared with control plants (Fig. III.17A **and** B). In 1 and 5 mM nitrate-Glu co-treated seedlings, a significant decrease in nitrate concentrations took place with a Glu supply of 2.5 mM and higher (Fig. III.17A **and** B). In addition, the nitrate assimilation rate in the roots and shoots was also estimated from the nitrate concentrations and the ^{15}N accumulation derived from $^{15}\text{NO}_3$ uptake (Fig. III.17C **and** D). The data clearly indicated that in control seedlings the nitrate assimilation mainly occurred in the shoots (Fig. III.17C **and** D). The rate of assimilation strongly increased from 0.5 to 5mM nitrate and then remained stable beyond 5mM (Fig. III.17C **and** D). However, in nitrate-Glu co-treated plants, assimilation dropped with a Glu supply of between 0.5 and 2.5mM (Fig. III.17C **and** D). Comparison of the nitrate-Glu co-treatments at 1 and 5mM nitrate showed that this collapse was stronger in the shoots of seedlings growing on 5mM nitrate than in those grown on 1mM nitrate (Fig. III.17C **and** D). This was probably because endogenous nitrate concentrations were five times higher in 5mM nitrate treated seedlings than in those grown at 1mM nitrate (Fig. III.17B **and** D). Taken together, all these results demonstrated that the inhibition by Glu of nitrate uptake and assimilation corresponds to distinct but concomitant mechanisms.

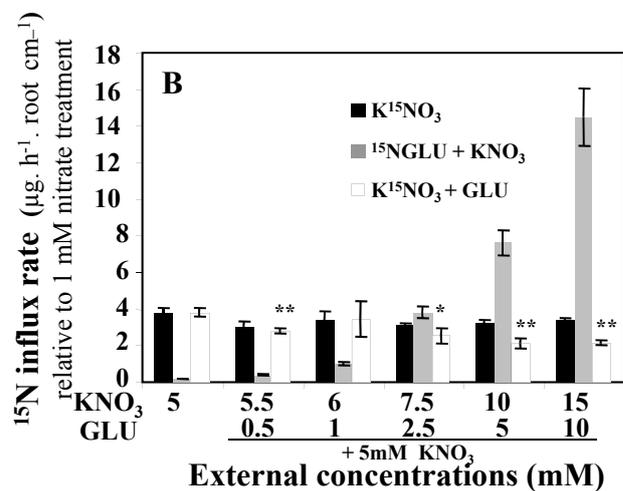
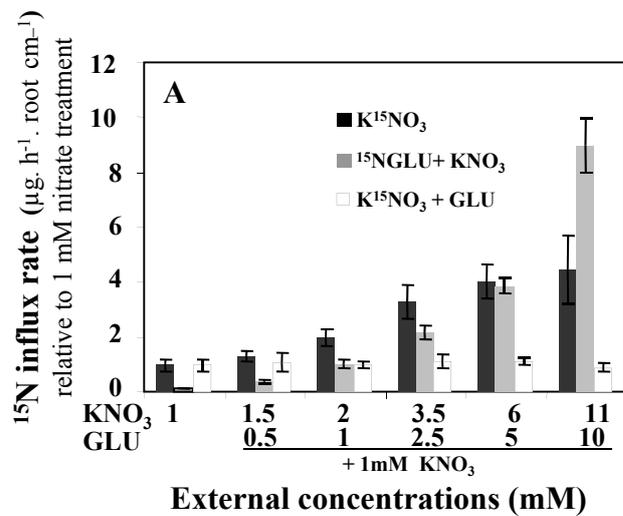


Figure III.16. ¹⁵N accumulation in *Brassica napus* seedlings after differential labeling with K¹⁵NO₃ and ¹⁵NGLu in nitrate and nitrate-Glu treated plants grown for 5 d on agar plates. (A) Comparison of ¹⁵N accumulation in seedlings treated with increasing nitrate concentrations and with increasing Glu concentrations in the presence of 1mM nitrate. (B) Comparison of ¹⁵N accumulation in seedlings treated with increasing nitrate concentration and with increasing Glu concentration in the presence of 5mM nitrate. Values are the average (\pm SE) of four batches of four seedlings each. Data were analyzed by the nonparametric test of Kruskal Wallis, then Mood's median test was used to compare means or medians. Bars sharing different letters are significantly different at $p = 0.05$. Significant differences between control seedlings treated with 1 or 5mM nitrate and nitrate-Glu treated seedlings are given for * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; (t test).

Fig. III.16: Leblanc *et al.* (2013)
PSB

The growth inhibition induced by glutamate treatment was associated with an increase in the amounts of amino acids, NH_4^+ and other forms of N and a decrease in NO_3^-

In order to characterize the qualitative and quantitative effects of Glu treatment on the seedling N status, partitioning of the N forms between the different nitrogen compounds was analyzed from UPLC and ^{15}N IRMS analyzes between treatments (Table III.1). In 1 mM nitrate-Glu co-treated seedlings, the amounts of ^{15}N in the different N forms revealed that compared with control, nitrate-Glu co-treatments induced a significant accumulation of free amino acids, NH_4^+ and other N compounds. However, NO_3^- increased up to the 2.5mM Glu treatment then decreased at higher external concentrations (Table 1). The nitrate-Glu co-treated seedlings at 5mM nitrate showed an increase in amino acids and NH_4^+ but a progressive decline in NO_3^- during the increase in external Glu concentrations (Table III.1). The discrepancy in endogenous nitrate concentrations between the 1 and 5mM nitrate treatments is explained by the differential decrease induced by Glu between nitrate assimilation and nitrate uptake (Figs. III.17A and C, III.16A). Indeed, inhibition of the nitrate assimilation rate in the roots and aerial parts when increasing the concentration of exogenous Glu was less pronounced at 1mM than at 5mM nitrate (Fig. III.17A and C).

Moreover, a closer examination of the AA profiling data showed that treatment with 10 mM external Glu increased the endogenous Glu concentrations 1.8 times while it increased the level of Gln 10 times (Figs. III.S22 and III.S23 at PSB online). This strong Gln accumulation was observed with Glu supplies of 2.5 mM and higher (Fig. III.S24 at PSB online) and suggested that inhibition of nitrate assimilation caused by Glu probably occurred during its conversion from Gln by glutamine amino transferase enzymes (GOGAT) rather than glutamine synthase (Fig. III.S23 at PSB online). Indeed, these results are consistent with previous studies in Arabidopsis, barley and tobacco with Fd-glutamine amino transferase enzyme (Fd-GOGAT) mutants or antisense lines showing an accumulation of Gln and a reduction in Glu levels (Blackwell *et al.*, 1988; Leegood *et al.*, 1995; Ferrario-Mery *et al.*, 2002; Kissen *et al.*, 2010).

The treatment with glutamate upregulated BnNRT1.1 and downregulated BnNRT2.1 expression in the roots

To further characterize the effect of Glu on nitrate uptake, the mRNA abundance of both the *BnNRT1.1* and *BnNRT2.1* nitrate transporter genes were analyzed in seedlings treated for 5 d with nitrate and nitrate-Glu (Fig. III.18). In nitrate treated seedlings, *BnNRT2.1* and *BnNRT1.1* transcript levels showed similar expression patterns to those previously reported by Le Ny *et al.*,

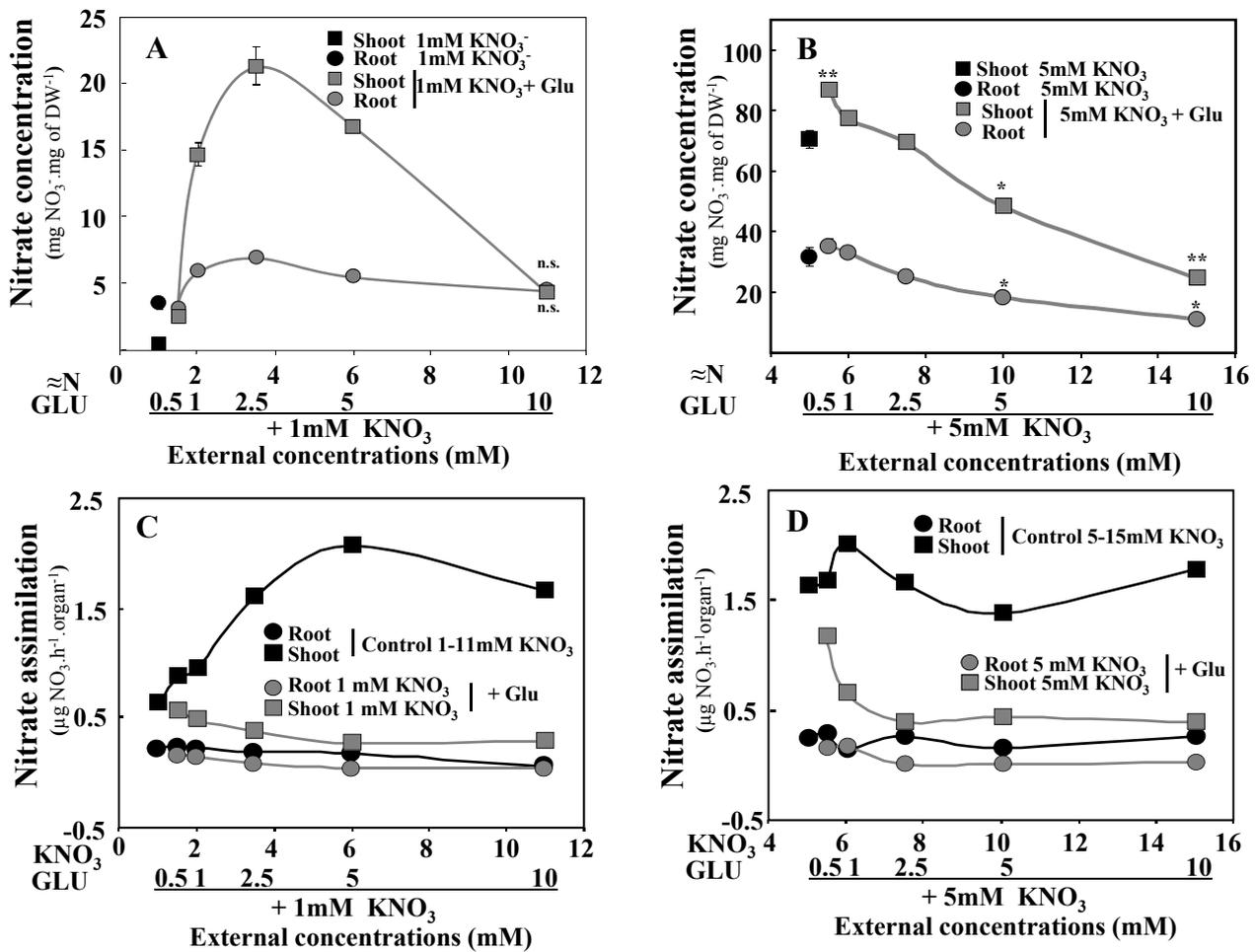


Figure III.17. Nitrate accumulation and estimated nitrate assimilation rate in the shoots and roots of *Brassica napus* seedlings supplied with nitrate and nitrate-Glu for 5 d on agar plates. Effects of increasing nitrate concentration and increasing Glu concentration in plants supplied with 1 mM (A) and 5mM nitrate (B) on the shoot and root nitrate concentrations. Effect of increasing nitrate concentration and increasing Glue concentration in plants supplied with 1 mM (C) and 5mM nitrate (D) on the shoot and root N assimilation rate. Values are the average (\pm SE) of 4 replicates of four seedlings each. Significant differences between control treatments with 1 or 5mM nitrate and nitrate-Glu treatments are given for * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; (t test). ns, not significant.

Fig. III.17: Leblanc *et al.* (2013)
PSB

in the same growing conditions. Both genes were upregulated between nitrate concentrations of 1 and 3.5mM (Fig. III.18A). Then, between the 6 and 15 mM external nitrate concentrations, *BnNRT2.1* expression was downregulated while *BnNRT1.1* expression remained higher (Fig. III.18A). Moreover, nitrate induction of *BnNRT1.1* transcript levels was always 3 to 10-fold higher than *BnNRT2.1* for all nitrate concentrations used (Fig. III.18A).

A comparison of seedlings treated either with nitrate or nitrate-Glu indicated that Glu treatment downregulated *BnNRT2.1* expression but strongly upregulated *BnNRT1.1* expression (Fig. III.18A and B). Because the Glu supply induced a large increase in endogenous Gln concentrations (Fig. III.S23 at PSB online) we cannot determine which of the amino acid pools (e.g., exogenous increase of the Glu supply or endogenous increase of Gln concentrations) was responsible for downregulation of *BnNRT2.1* expression. However, these results demonstrated that chronic treatment with high Gln concentrations allows uncoupling of the *BnNRT2.1* and *BnNRT1.1* transporters at the transcriptional level. Moreover, comparison of *BnNRT2.1* nitrate transporter expression and the ¹⁵N nitrate uptake rate indicated that beyond 2.5mM, Glu treatment probably repressed both the activity and transcription of *BnNRT2.1* (Figs. III.16 and III.18; Fig. III.S21 at PSB online). Indeed, inhibition of the nitrate uptake rate was observed when a large increase in Gln concentrations occurred (Figs. III.16 and III.18; Fig. III.S23 at PSB online). These results were consistent with the fact that NRT2.1 transporter activity is inhibited by endogenous or exogenous Gln concentrations (Beuve *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2010). Likewise, a closer examination of seedlings treated either with nitrate or nitrate-Glu revealed that nitrate and Glu upregulated *BnNRT1.1* expression. However, if the effects have the same intensity level, they are completely different in nature because the effectors are not the same (Fig. III.18A and B).

The impairment of the nitrate-signaling cascade by chronic glutamate treatment reduces the osmotic water flow and ¹⁵N accumulation during shoot growth

In low transpiring conditions, plantlets submitted to increasing external nitrate concentrations have revealed that the osmotic water flow for growth is solely driven by nitrate signaling via nitrate transporter activity (Le Ny *et al.*, 2013). In order to determine if Glu treatment can modify this behavior by impairment of the nitrate-signaling cascade through *BnNRT2.1* inhibition, we examined the effects of nitrate-Glu co-treatments on allometric relationships between shoot variables (¹⁵N and water accumulation) and the root length (Fig. III.19). Comparison of these relationships between all the treatments confirmed the essential role of *BnNRT2.1* nitrate transporters when large changes in nitrate accumulation occurred in the shoot (Figs. III.17A and

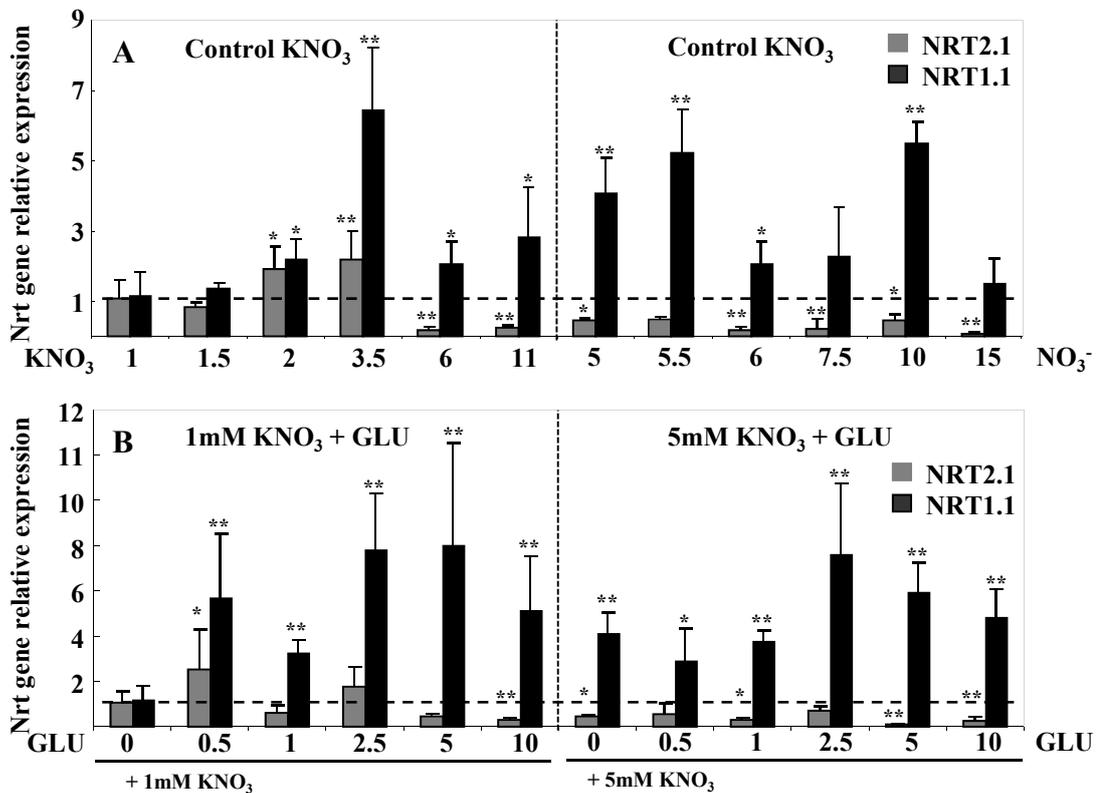


Figure III.18. Changes in the expression patterns of *BnNRT2.1* and *BnNRT1.1* transcripts in the roots of *Brassica napus* seedlings treated with nitrate and nitrate-Glu for 5 d on agar plates. **(A)** Effect of increasing nitrate concentration on *BnNRT2.1* and *BnNRT1.1* transcript levels. **(B)** Effect of increasing Glu concentration in the presence of 1 and 5 mM nitrate on *BnNRT2.1* and *BnNRT1.1* transcript levels. Values are the average (\pm SE) of 3–5 replicates of four seedlings each. Significant differences between control seedlings treated with 1 or 5mM nitrate and nitrate-Glu treated seedlings are given for * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; (t test).

Fig. III.18: Leblanc *et al.* (2013)
PSB

Table III.1. Comparison of ¹⁵N shoot partitioning in the different N nitrogen forms in *Brassica napus* seedlings treated with nitrate and nitrate-Glu for 5 d on agar plates

Treatments KNO ₃ 1mM KNO ₃ +Glu		AAtot KNO ₃ KNO ₃ +Glu		NH ₄ ⁺ KNO ₃ KNO ₃ +Glu		NO ₃ ⁻ KNO ₃ KNO ₃ +Glu		Other N forms KNO ₃ KNO ₃ +GLU	
(mM)	Glu (mM)	µg. shoot ⁻¹							
1		30.6 ± 1.2 -		0.7 ± 0.2 -		0.03 ± 0.02 -		45.8 -	
1.5	(0.5)	29.1 ± 1 (22.6 ± 2.2)		0.3 ± 0.001 (0.5 ± 0.02)		0.4 ± 0.1 (0.1 ± 0.0)		80.6 (50.4)	
2	(1)	25.3 ± 1.9 (22.7 ± 1.2)		0.5 ± 0.1 (0.5 ± 0.03)		2.3 ± 0.2 (0.6 ± 0.1)		112.3 (59.8)	
3.5	(2.5)	23.8 ± 0.6 (19 ± 0.7)		0.3 ± 0.01 (0.4 ± 0.01)		1.7 ± 0.2 (1.0 ± 0.1)		185.4 (74.3)	
6	(5)	19.7 ± 0.9 (34 ± 4)		0.4 ± 0.04 (0.8 ± 0.1)		1.9 ± 0.04 (0.7 ± 0.1)		249.6 (86.1)	
11	(10)	23.5 ± 16.5 (85 ± 16.5)		0.3 ± 0.1 (0.7 ± 0.1)		3.1 ± 0.5 (0.2 ± 0.1)		209.9 (125.2)	
Treatments KNO ₃ 5mM KNO ₃ +Glu		AAtot KNO ₃ KNO ₃ +Glu		NH ₄ ⁺ KNO ₃ KNO ₃ +Glu		NO ₃ ⁻ KNO ₃ KNO ₃ +Glu		Other N forms KNO ₃ KNO ₃ +GLU	
(mM)	Glu (mM)	µg. shoot ⁻¹							
5		11 ± 0,4 -		0.12 ± 0.003 -		3.1 ± 0.4 -		222.2 -	
5.5	(0.5)	9.6 ± 0,2 (11.3 ± 0,3)		0.11 ± 0.01 (0.1 ± 0.01)		4.1 ± 0.2 (4.1 ± 0.1)		236.1 (182.9)	
6	(1)	10.6 ± 0,7 (11.7 ± 0,1)		0.11 ± 0.004 (0.11 ± 0.01)		2.0 ± 0.3 (3.8 ± 0.5)		233.3 (130.5)	
7.5	(2.5)	10.7 ± 0,7 (13.4 ± 0,6)		0.11 ± 0.01 (0.12 ± 0.002)		3.7 ± 0.3 (3.2 ± 0.1)		233.0 (121.6)	
10	(5)	9.8 ± 0,4 (26.3 ± 1,7)		0.12 ± 0.01 (0.44 ± 0.05)		3.3 ± 0.5 (2.2 ± 0.1)		195.0 (157.1)	
15	(10)	10.9 ± 0.2 (55.6 ± 9)		0.11 ± 0.002 (0.61 ± 0.1)		4.8 ± 0.5 (1.1 ± 0.2)		259.4 (210.5)	

Tab. III.1: Leblanc *et al.* (2013)
PSB

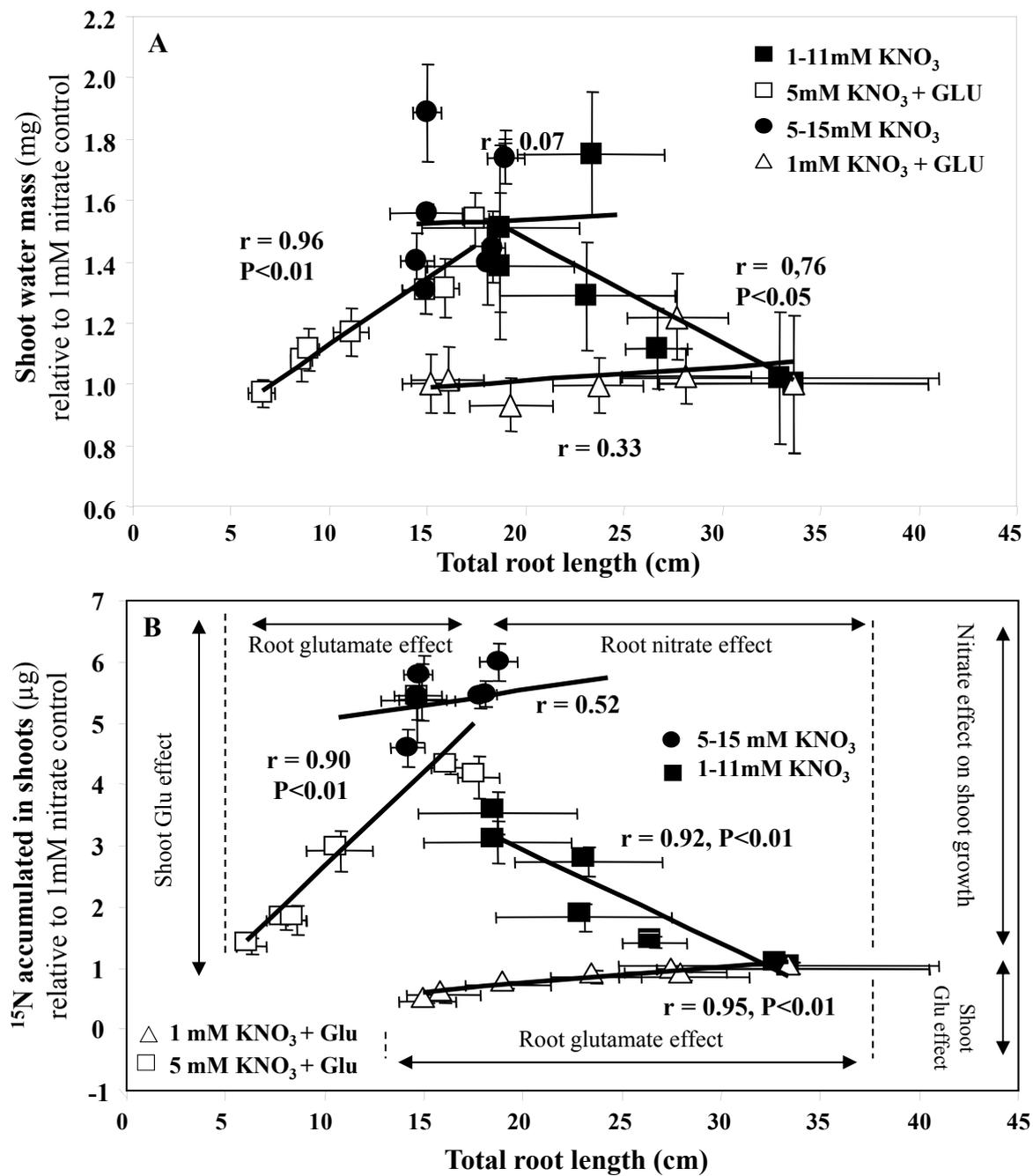


Figure III.19. Relationships between water, ¹⁵N and nitrate accumulation in the shoots of *Brassica napus* seedlings treated with nitrate and nitrate-Glu for 5 d on agar plates. Effect of increasing nitrate concentration and increasing Glu concentration in plants supplied with 1 or 5 mM nitrate on the relationship between the root length and water accumulation (A), ¹⁵N accumulation (B). Values are the average (± SE) of 4 replicates of four seedlings each. The regression coefficient and significance for each relationship are shown.

Fig. III.19: Leblanc *et al.* (2013)
PSB

B, III.19). This behavior is perfectly illustrated by the geometric relationship (isosceles triangle) obtained between water accumulation in the shoot and the root length (Fig. III.19A). This was particularly striking in control seedlings treated with increasing external nitrate concentrations from 1 to 11mM. In this physiological situation, the accumulation of water and ^{15}N were strongly correlated (Fig. III.19A **and** B; **Fig. III.S24** at PSB online). This behavior was also observed in the nitrate-Glu co-treatment with 5mM nitrate where reduction in nitrate concentrations in the shoot (Fig. III.17A **and** B) was associated with the decline in ^{15}N and water accumulation in the tissue (Fig. III.19A **and** B). However, this plantlet behavior disappeared when the relationships between water and ^{15}N were lost, as observed for high nitrate concentrations from 5 to 15mM (Fig. III.19A **and** B; **Fig. III.S24** at PSB online). Finally, this geometric behavior (isosceles triangle) was caused by two Glu effects as indicated in Figure III.19B: the specific inhibition by Glu of root elongation and the modulation of nitrate-signaling cascade necessary for the shoot expansion through the Glu-induced reduction of BnNRT2.1 nitrate absorption (Fig. III.16) and nitrate assimilation (Fig. III.17).

Discussion

The aim of Glu treatment was to examine in low transpiring conditions the interaction of *BnNRT2.1* and *BnNRT1.1* nitrate transporters in the mature root in order to measure the effects of coupled nitrate and osmotic water flow in plantlet growth. In our experimental conditions the hydraulic water flow caused by the transpiration stream was experimentally dissociated from the osmotic water flow induced by nitrate availability by using an agar Petri dish system. Indeed, the high relative humidity in the Petri dishes prevents transpiration, thus allowing transpiration and nitrate uptake to be separated (Le Ny *et al.*, 2013). Two homogeneous external concentrations of 1 and 5mM nitrate were used to analyze the effect of increasing external Glu concentrations on the relationship between NRT1.1 and NRT2.1 transporters in nitrate and osmotic water flow. Indeed, we have previously shown that both of the external nitrate concentrations used correspond to concentrations where significant changes in root and shoot morphology, root hydraulic conductivity and *BnNRT2.1* and *BnNRT1.1* transcription levels were observed (Le Ny *et al.*, 2013).

Chronic glutamate treatment inhibits root elongation through a specific effect that is distinct from the nitrate signaling effect

Our findings revealed that Glu inhibition of nitrate uptake was compensated by a strong ¹⁵N-Glu uptake. Although this compensation mechanism maintained a high N status in the seedlings, Glu-treated seedlings were strongly impaired in their root elongation and shoot growth. Intriguingly, the homeostasis for Glu was preserved in the roots and shoots (**Fig. III.S22** at PSB on line) but seedlings were unable to use this N source instead of nitrate to restore seedling growth. These results were consistent with previous studies where the Glu pool in the root is relatively unaffected by exogenously applied Glu (Li *et al.*, 2010; Stitt *et al.*, 2002; Forde and Lea, 2007). In our long-term experiment, the reduction in nitrate uptake and nitrate assimilation suggested that Glu inhibits specifically the enzymatic activities of glutamate synthase (GOGAT) and nitrate transporters (Beuve *et al.*, 2004; Kissen *et al.*, 2010; Stitt *et al.*, 2002). This did not discount the possibility that Glu could also act as an exogenous signal to modulate root growth through a possible interaction between Glu and auxin signaling (Walch-Liu *et al.*, 2006). Indeed, the sensitivity of root elongation in response to L-Glu treatment showed large differences between auxin mutants (Walch-Liu *et al.*, 2006). Because NRT1.1 expression is regulated by auxin, and NRT1.1 acts also as an auxin carrier, all these results could explain the upregulation of NRT1.1 expression induced by Glu that was observed in our experiments (Krouk *et al.*, 2010; Remans *et*

al., 2006b) However, whatever the signaling effects of Glu involved in NRT1.1 expression, our findings clearly demonstrated that the inhibition of root elongation by Glu was a specific process distinct from the reduction in root elongation induced by nitrate (**Fig. III.S24** at PSB online). This observation is also consistent with the stimulation by Glu of radial expansion of the root and the slender-root phenotype observed in rice *GLR3.1* T-DNA mutant seedlings (Li *et al.*, 2006; Sivaguru *et al.*, 2003). Moreover, our findings contrast with a previous study reporting that nitrate signaling mediated by the NRT1.1 nitrate transporter antagonizes Glu-induced changes in the primary root elongation of *Arabidopsis* seedlings (Walch-Liu *et al.*, 2008). Indeed, in our experimental conditions, Glu reduced root elongation in low (1 mM) and high (5 mM) external nitrate concentrations and in both cases the Glu effect was distinct and additive to the nitrate effect, which contrasts with previous results and conclusions (**Fig. III.S24** at PSB online). Furthermore, NRT1.1 transcription was significantly induced instead of being reduced by nitrate-Glu treated seedlings.

Glutamate-induced reduction in nitrate uptake modulates nitrate signaling effects on shoot growth and accordingly reduces osmotic water flow

The co-treatments with nitrate and Glu created an unprecedented physiological situation where endogenous nitrate concentrations were modulated by inhibition of the nitrate uptake rate and nitrate assimilation in relation to nitrate availability. Indeed, the Glu treatments reduced not only the nitrate uptake and accumulation but also strongly inhibited nitrate assimilation. This physiological situation was complementary to the pioneer works of Mark Stitt and collaborators using nitrate reductase-transformants of tobacco plants submitted to varying external nitrate concentrations (Scheible *et al.*, 1997a; Scheible *et al.*, 1997b; Stitt and Feil, 1999). Indeed, in our experimental conditions, the modulation of nitrate fluxes and endogenous nitrate concentrations by nitrate-Glu treatments leads to better characterization of the role of nitrate transporters and nitrate signaling in both shoot and root growth. This was demonstratively illustrated by the changes in the allometric relationships between accumulation of nitrate, ^{15}N , and water with changes in the root length. The results revealed that BnNRT2.1 plays an essential role in the coordination of nitrate transporters that is involved in the nitrate-signaling cascade during shoot growth. According to previous results, in low transpiring conditions shoot cell and organ enlargement is the greatest rate-limiting resistance site to osmotic water flow (Boyer, 1985; Le Ny *et al.*, 2013). In our experimental conditions, shoot growth mainly depends on nitrate signaling, (Le Ny *et al.*, 2013; Stitt and Feil, 1999) and this confirms that the cell and organ enlargement in shoots induced by nitrate is the rate-limiting step for the osmotic water flow. Indeed, as already

shown, it is the growth processes in the cell wall that constrain turgor pressure and water status (Bressan *et al.*, 1982; Zhu and Boyer, 1992; Proseus *et al.*, 2000; Maggio *et al.*, 2006). Taken together, all these results corroborated the conclusion that nitrate acts at first as a signal to regulate shoot and root growth, probably via hormonal regulation rather than turgor pressure (Le Ny *et al.*, 2013; Scheible *et al.*, 1997a). This conclusion fits well with the acid-growth theory of cell elongation, where auxin causes an excretion of protons in the apoplast causing wall loosening and cell expansion (Rayle and Cleland, 1992). H⁺-ATPase energizes ion transport through a variety of secondary transporters and channels such as nitrate transporters, but also potassium transporters (Palmgren, 2001; Perrot-Rechenmann, 2012). If nitrate is involved in primary metabolism activation, K⁺ accumulation leads to malate synthesis in order to increase osmoticum for cell water uptake (Haschke and Lutge, 1975). Hence, with potassium Glu treatment, reduction in endogenous nitrate concentrations was not compensated by the presence of high concentrations of K⁺, suggesting that the osmoticum function of K⁺ in cell enlargement cannot be exerted without the prior effects of nitrate signaling on shoot growth. Furthermore, this conclusion is also consistent with transcriptomic analyzes in *Arabidopsis* showing that the synthesis and transport of hormones such as auxin, ABA and cytokinins may be directly regulated by nitrate or may act as an enhancer of nitrate signaling/induction in developmental changes of the shoot and root cells (Gutiérrez *et al.*, 2007; Nero *et al.*, 2009; Krouk *et al.*, 2009). In addition, the recent discovery that the NRT1.1 nitrate transporter also acts as an auxin transporter in the root and facilitates auxin transport and fine-tuning of auxin transport by nitrate is also in line with this conclusion (Krouk *et al.*, 2010).

In low transpiring conditions, the inhibition of BnNRT2.1 by glutamate treatment reveals that BnNRT2.1 plays a major role in nitrate uptake and seedling growth

A better understanding of coupling between *BnNRT2.1* and *BnNRT1.1* transporters in terms of structure-function related to plant growth is becoming more crucial because of recent localization and functional data on NRT1.1 and NRT2.1 nitrate transporters. Indeed, it has been shown by using pNRT::GUS and pNRT::GFP transgenic *Arabidopsis* and rice seedlings that NRT2.1 activity is mainly expressed in the epidermis and cortical layers, (Remans *et al.*, 2006a; Orsel *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2011) whereas NRT1.1 activity is mainly expressed in the cellular layers of the vascular cylinder in the mature root (Guo *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2002; Remans *et al.*, 2006b; Chopin *et al.*, 2007). It has also been clearly demonstrated that nitrate absorption takes place at the mature root level and not at the root tip where the vascular system is still immature (Lazof *et al.*, 1992; Taylor and Bloom, 1998; Colmer and Bloom, 1998). In this context, because

NRT1.1 is not under the control of feedback regulation exerted by downstream metabolites such as amino acids, (Lejay *et al.*, 1999; Loqué *et al.*, 2003) the aim of the Glu treatment was to inhibit specifically the *BnNRT2.1* transporters in order to examine the interactions between *BnNRT2.1* and *BnNRT1.1* in nitrate uptake during seedling growth. Compared with the mutant approach, we can assume that the use of this pharmacological strategy prevents compensatory mechanisms for nitrate uptake caused by other transporters of the NRT2 family such as NRT2.2 (Filleur *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2007; Orsel *et al.*, 2004). Furthermore, in amphidiploid species such as *Brassica napus* where the number of NRT2 genes is probably twice that of *Arabidopsis* (e.g., 14 genes), in the first instance a pharmacological strategy was the most convenient. Our findings revealed the essential role of the BnNRT2.1 nitrate transporter in nitrate uptake and accordingly, osmotic water flow during shoot growth. Several lines of evidence support this assumption. First, although NRT1.1 expression was upregulated by Glu treatment, no compensatory effect for nitrate uptake was observed. This result is consistent with the localization of NRT1.1 in the cellular layers of the vascular cylinder (Guo *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2002; Remans *et al.*, 2006b) and suggests that the NRT2.1 transporter will be the first involved in nitrate sensing and transport at the epidermal cell level in the mature root (Remans *et al.*, 2006a; Little *et al.*, 2005). The high-affinity character of the NRT2.1 transporter and the linear correlations found between induced changes in total root length and *BnNRT2.1* expression reinforced this assumption (Le Ny *et al.*, 2013; Leblanc *et al.*, 2008; Faure-Rabasse *et al.*, 2002). Second, changes in the allometric relationships found between the root length and ^{15}N or water accumulation in the shoot clearly demonstrated that inhibition of NRT2.1 expression and activity by chronic Glu treatment modifies the water status through nitrate uptake and nitrate signaling effects on shoot growth. Third, studies with NRT1.1 transporter mutants showed a deregulation of NRT2.1 suggesting that coordination between both of these transporters is essential for seedling growth in response to nitrate availability (Krouk *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009). Fourth, our results confirmed the previous work of Orsel *et al.*, 2004 who reported that disruption of the nitrate transporters, *AtNRT2.1* and *AtNRT2.2*, restricts growth at low external nitrate concentrations.

It remains to be elucidated why the strong expression of the *NRT1.1* gene induced by Glu treatment could not compensate for nitrate uptake when the NRT2.1 transporter failed to function. Indeed, this suggested either that the NRT1.1 transporter is inhibited at the posttranscriptional level or that Glu treatment also inhibits other members of the NRT2 family involved in compensatory mechanisms for nitrate uptake (Guo *et al.*, 2001; Orsel *et al.*, 2004). Hence, a pharmacological study with nitrite, a specific inhibitor of NRT1.1 transcription and activity, (Loqué *et al.*, 2003) should provide complementary information on the coordination or

compensation mechanisms between NRT1.1 and NRT2.1 transporters for nitrate and water fluxes during growth and a better understanding of the relationships between nitrogen and water use efficiencies for the improvement of crop species under low N fertilization input.

Materials and Methods

Plant material and growth conditions

The *Brassica napus* L. seeds used in this study were the winter oil seed rape cultivar, Capitol. The seeds were treated for germination according to Leblanc *et al.*, 2008 and transferred to Petri dishes (12x12 cm) filled with 50 mL of solidified agar (0.8% W/V, Sigma A-7002) culture medium. Basic medium used for seedling culture contained 0.4 mM KH₂PO₄, 0.15 mM K₂HPO₄, 1 mM K₂S₂O₄, 0.5 mM MgSO₄, 3 mM CaCl₂, 0.2 mM Fe-Na EDTA, 14 µM H₃B₃O₃, 5 µM MnSO₄, 3µM ZnSO₄, 0.7 µM CuSO₄, 0.7µM (NH₄)₆ Mo₇O₂₄ and 0.1 µM CoCl₂, pH 6.75. For control treatments, this basic medium was supplemented with KNO₃ as the sole nitrogen source at the concentrations indicated for each individual experiment (from 1 to 15 mM). For Glu treatments, this basic medium was used with 1 or 5 mM KNO₃ and supplemented with increasing potassium Glu concentrations (Sigma G-1501) from 0.5 to 10 mM in order to maintain a constant molarity in N supply compared with control treatments. The Petri dishes were half sealed with adhesive tape and placed vertically in a growth chamber at 22°C under a 16/8 light/dark regimen with a light intensity of 200 µmol m⁻² s⁻¹.

Exploratory root system analyzes

Effects of nitrate and Glu treatments on the elongation of the exploratory root system (primary and lateral roots) were measured after 5 d of each treatment. During harvest, the root and shoot parts of four seedlings corresponding to one replicate (one agar plate) were excised. Then, seedlings roots were washed in 1 mM CaSO₄ solution for 1 min at room temperature before being placed in demineralized water and analyzed by a WinRHIZO scan system (Regent Instruments Inc., Canada). The mean of the total root length for each treatment was estimated from 4 replicates of 4 seedlings. The root and shoot parts of each replicate were then dried in an oven over 72h and ground to a fine powder in an Eppendorf tube with 4mm diameter inox beads in an oscillating grinder (MM301 Mixer Mill, Retsch, Haan, Germany) before stable isotope analysis by mass spectrometry.

¹⁵NO₃⁻ and ¹⁵NGlutamate analyzes

N accumulation in $K^{15}NO_3^-$ and $^{15}NGlu$ treated seedlings was measured by ^{15}N labeling and analyzed by stable isotope mass spectrometry (IRMS). The culture medium was supplemented with $K^{15}NO_3$ or $^{15}NGlu$ (atom % ^{15}N : 1%). The same ratio of $^{15}NO_3^-/^{14}NO_3^-$ or $^{15}NGlu/^{14}NGlu$ was used for the different KNO_3 or Glu concentration treatments (from 0 to 10 mM). The total ^{15}N amount was determined for the roots and shoots. The analyzes were performed using an analyzer (EA 3000, Eurovector, Milan, Italy) coupled with an isotopic mass spectrometer (Isoprime X, GV Instruments, Manchester, UK).

Nitrate analyzes

Anions such as nitrate and sulfate were extracted from freeze-dried shoot and root tissues of 5 d-old seedlings treated with the different nitrate and Glu concentrations. Fifteen mg dry weight of the freeze-dried tissues were resuspended at room temperature in 1 mL of extraction buffer (H_2O /alcohol (1V/1V) then extracted at $40^\circ C$ over 30 min. After centrifugation (1000 g for 20 min), the supernatant was removed and the pellet was re-extracted under the same conditions. Then the pellet was re-extracted 2 more times in 1 mL of milliQ water over 30 min at $95^\circ C$. After the centrifugation, all the supernatants were pooled and dried under vacuum before being suspended in 600 μL milliQ water. The sample concentration was optimized in 300 μL before analysis by ion chromatography using an ICS3000 analyzer (Dionex, Jouy en Josas, France) with an IonPac AS17 hydroxide-selective anion exchange column (Dionex). The EG40 Eluent Generator electrolytically produces high purity potassium hydroxide eluent from water, using a gradient from 12 to 40mM. Electrolytic and chemical suppression (ASRS300 4mm) greatly enhanced sensitivity (signal-to-noise ratio) by decreasing the background conductivity of the eluent while simultaneously increasing the analyte response, compared with non-suppressed ion chromatography.

Amino acid profiling

Amino acid profiling was performed on shoot and root material according to Beauclair *et al.*, 2009 and Renault *et al.*, 2010 After extraction of amino acids with methanol-chloroform-water and derivatization according to the AccQ•Tag Ultra Derivatization Kit protocol (Waters corp., Milford, USA), amino acids were analyzed with an ACQUITY UltraPerformance LC (UPLC) separation system (Waters corp., Milford, USA). The amount of individual amino acid was expressed in $\mu moles$ per g of dry weight by reference to internal standard BABA and to an external calibration curve for amino acids.

Calculation of the nitrate assimilation rate and the redistribution of different forms of N

The assimilation rate of nitrate was determined from the free nitrate concentrations and ^{15}N accumulation for each treatment. ^{15}N accumulated in the shoot corresponded to both free and structural N. The amount of nitrate assimilated with or without Glu treatment was calculated by subtracting the amounts of ^{15}N accumulated in the root and shoot tissues from $^{15}\text{NO}_3^-$ treatments and the free nitrate accumulated in these organs as follows: Assimilated $^{15}\text{NO}_3^-$ ($\mu\text{g NO}_3^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{seedling}^{-1}$) = [amount of $^{15}\text{NO}_3^-$ accumulated ($\mu\text{g} \cdot \text{seedling}^{-1}$) – amount of free NO_3^- ($\mu\text{g} \cdot \text{seedling}^{-1} \times 0.23$)]/120 h, with the 0.23 factor corresponding to the proportion of N in the molecular mass of NO_3^- .

^{15}N Glu utilization in the shoot was calculated from ^{15}N Glu uptake and ^{15}N accumulation in the shoot as well as the Glu concentrations estimated from UPLC analysis. The quantities of the different N forms such as AA, NO_3^- and NH_4^+ in the roots and shoots were calculated as follows: Amount of N form ($\text{g N} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{seedling}^{-1}$) = [$\mu\text{moles} \cdot \text{g DW}^{-1}$ of N form \times root or shoot DW (g) \times molecular mass of each AA or NH_4 or NO_3^- ($\text{g} \cdot \text{mole}^{-1}$) \times proportion of N in the molecular mass]/[120h \times Number of seedlings]

RNA isolation and quantitative real-time PCR analysis

For gene expression analysis, after 5 d of treatment with the different nitrate or Glu concentrations the total RNA of each experiment was extracted purified and analyzed according to Leblanc *et al.*, 2008 For RT, 1 μg of total RNA was converted to cDNA with an “iScript cDNA synthesis kit” using the manufacturer's protocol (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). Expression levels of genes were normalized to the expression level of the *18S* house-keeping gene (F, 5'-cggataaccgtagtaattctag and R, 5'-gtactcattccaattaccagac). The primers used to amplify the gene specific sequences for *BnNRT2.1* were F, 5'-T ggtggaataggcggctcgagttg and R, 5'-gtatacgttttgggtcattgcat (AJ293028); and for *BnNRT1.1* were F, 5'-atgtaaccgaagtgccttg and R, 5'-tgattccagctgttgaagc (AJ27896).

Supplemental material

Figure III.S20, Figure III.S21, Figure III.S22, Figure III.S.23, Figure III.S24

Acknowledgements

This work was financially supported by the French Ministry of National Education, Research and Technology (MENRT) and the Regional Council of Basse-Normandie. The authors are grateful to Josiane Pichon and Julien Lecourt for their technical assistance during seedling harvest and Sandrine Rezé for help in Q-PCR analyzes.

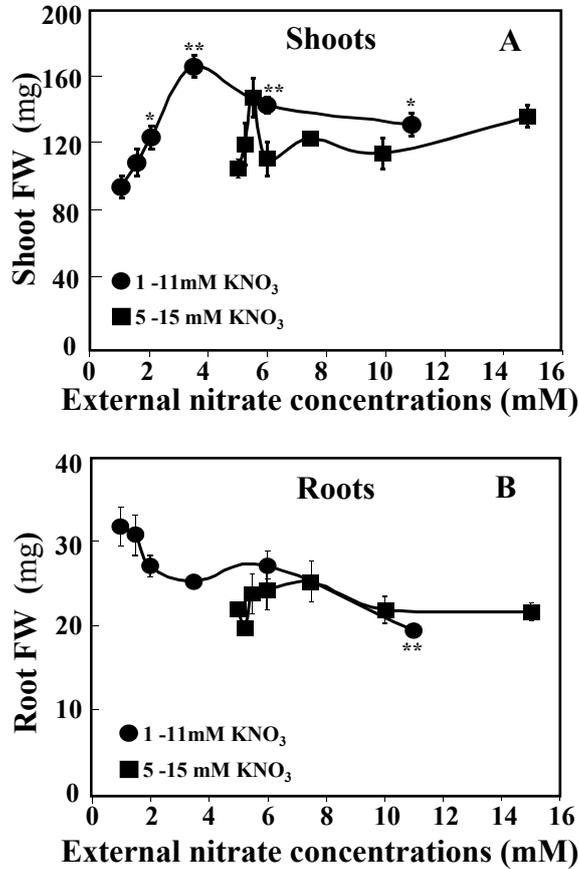


Figure III.S20: Changes in root and shoot fresh weights in *Brassica napus* seedlings treated with increasing nitrate concentrations for 5 days in agar plates. **a)** Effect on shoot fresh weight of increasing the nitrate concentration from 1 to 11mM and 5 to 15mM. **b)** Effect on root fresh weight of increasing the nitrate concentration from 1 to 11mM and 5 to 15mM. Values are the average (\pm SE) of 3-4 replicates of four seedlings each. Significant differences between control seedlings treated with 1 or 5mM nitrate and other nitrate concentrations are given for * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; (t test).

Figure III.S20: Leblanc *et al.*. (2013)
PSB

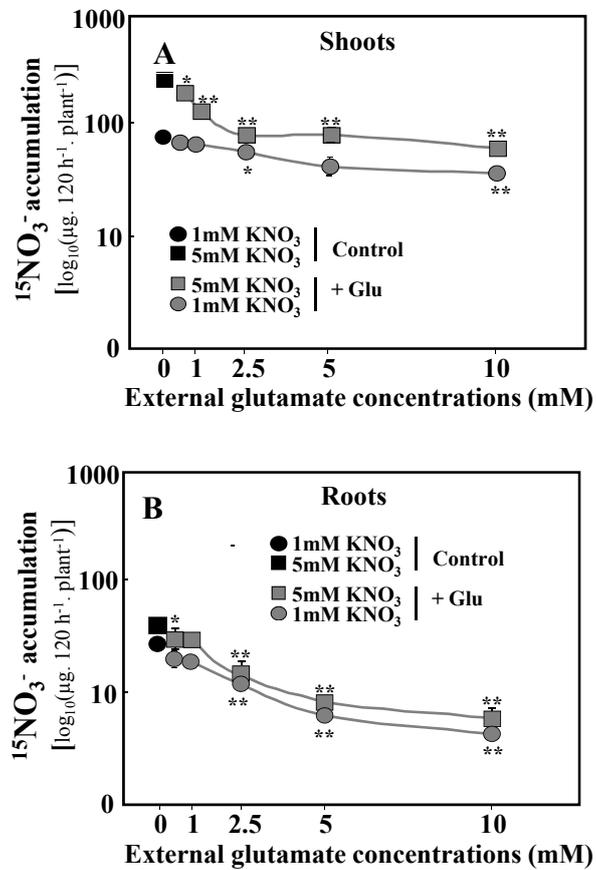


Figure III.S21: Comparison of ^{15}N partitioning in nitrate and nitrate-glutamate treated seedlings. Comparison of $^{15}\text{NO}_3^-$ accumulation after treatment with increasing concentrations of glutamate in the presence of 1 or 5mM nitrate in the shoots **a)** and in the roots **b)**. Values are the average (\pm SE) of 3-4 replicates of four seedlings each. Significant differences between control seedlings treated with 1 or 5mM nitrate and other nitrate concentrations are given for * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; (t test).

Figure III.S21: Leblanc *et al.* (2013)
PSB

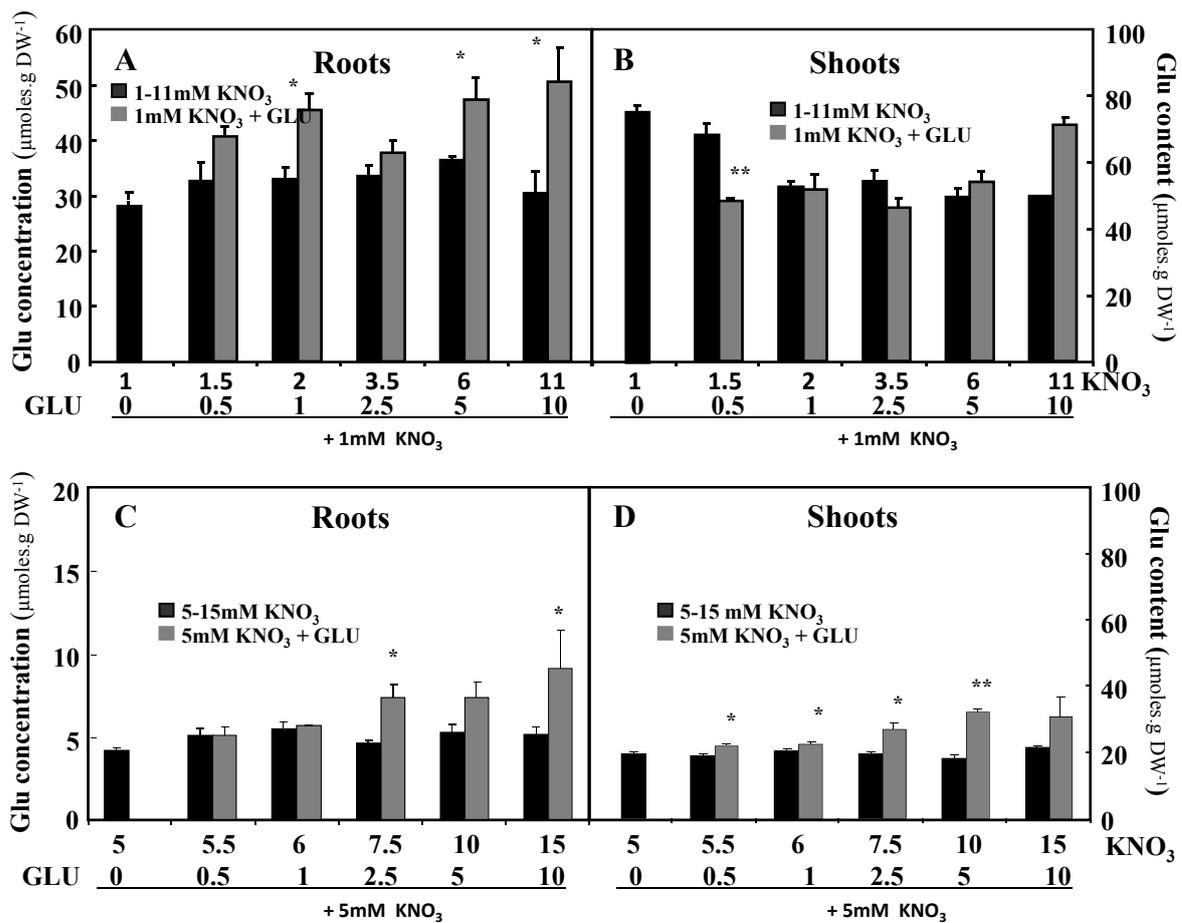


Figure III.S22: Changes in the glutamate content in the roots and shoots of *Brassica napus* seedlings treated with nitrate and nitrate-glutamate for 5 days on agar plates. **a-b)** Effect of increasing the Glu concentration on the glutamate content in 1mM nitrate treated seedlings and control seedlings supplied with increasing NO_3^- concentration. **c-d)** Effect of increasing Glu concentration on N assimilation in the shoots and roots of 5mM nitrate treated seedlings and control seedlings supplied with increasing NO_3^- concentrations. Values are the average (\pm SE) of 3 replicates of four seedlings each. Differences are statistically significant at * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (t test).

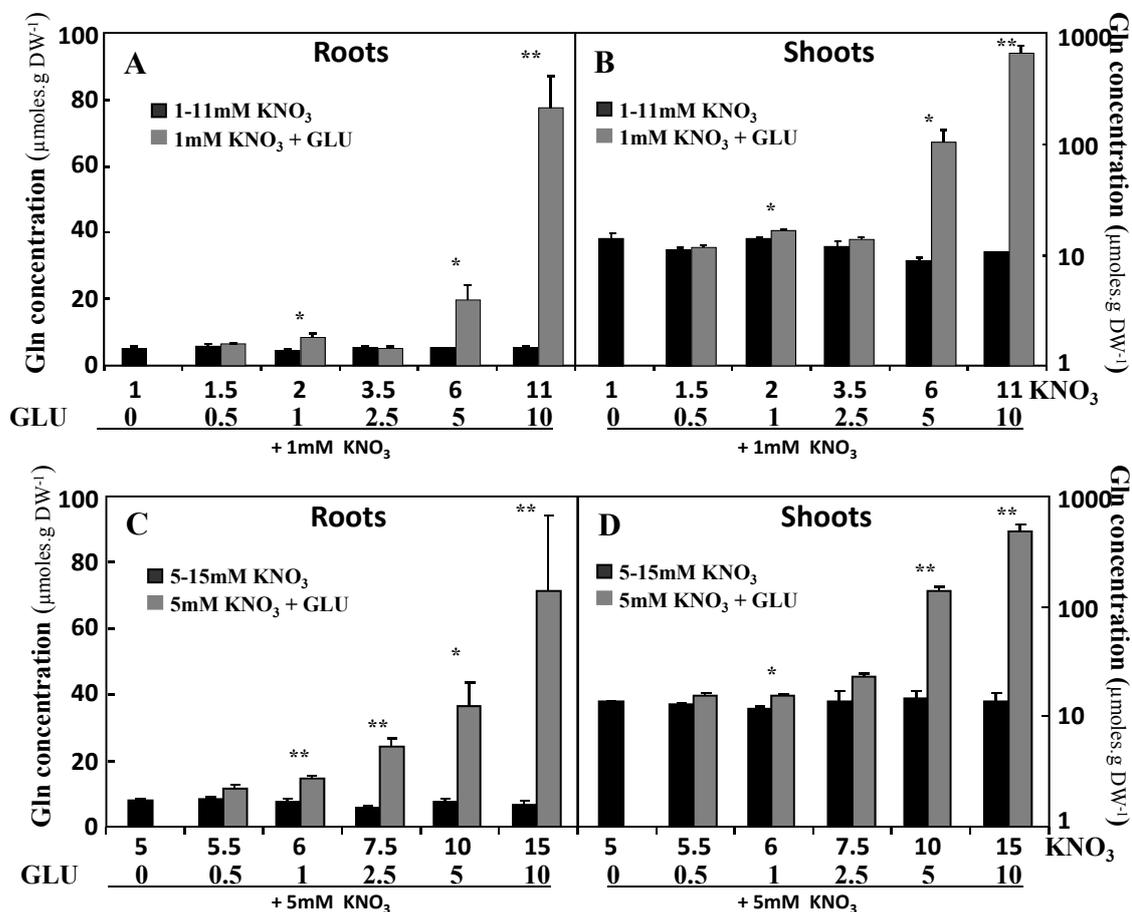


Figure III.S23: Changes in the glutamine contents in the roots and shoots of *Brassica napus* seedlings treated with nitrate and nitrate-glutamate for 5 days on agar plates. **a-b)** Effect of increasing glutamine concentration on glutamine content in 1mM nitrate treated seedlings and control seedlings supplied with increasing NO₃⁻ concentrations. **c-d)** Effect of increasing glutamine concentration on glutamine content in 5mM nitrate treated seedlings and control seedlings supplied with increasing NO₃⁻ concentrations. Values are the average (±SE) of 3 replicates of four seedlings each. Differences are statistically significant at *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 (t test).

Figure III.S23: Leblanc *et al.* (2013)
PSB

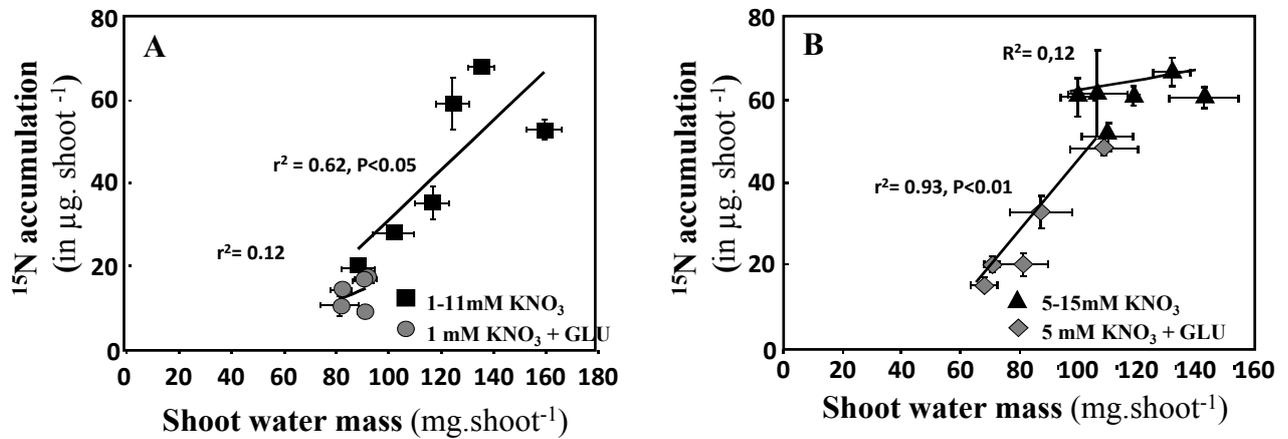


Figure III.S24: Relationship between shoot water mass and ¹⁵N accumulation in the shoots of *Brassica napus* seedlings treated with nitrate and nitrate-glutamate for 5 days on agar plates. **A)** Relationships between shoot water mass and ¹⁵NO₃⁻ accumulation in *Brassica napus* seedlings treated with increasing glutamate concentrations in the presence of 1 mM nitrate or with increasing nitrate concentrations from 1 to 11mM. **B)** Relationships between shoot water mass and ¹⁵NO₃⁻ accumulation in *Brassica napus* seedlings treated with increasing glutamate concentrations in the presence of 5 mM nitrate or with increasing nitrate concentrations from 5 to 15mM. Values are the average (± SE) of 3-4 replicates of four seedlings each. Regression coefficients and significance for each relationship are shown.

B.6. Principaux résultats obtenus

B.6.1. L'absorption du nitrate est inhibée par le traitement glutamate

L'inhibition progressive de l'absorption du $^{15}\text{NO}_3^-$ dans les plantules est corrélée à l'augmentation des concentrations externes de glutamate de 0,5 à 10 mM quelques soient les concentrations de nitrate présentes dans le milieu de culture (1 et 5 mM). **Ce résultat implique que l'activité des transporteurs responsables de l'absorption du nitrate est inhibée sans qu'il y ait de phénomène de compensation à 1 ou à 5 mM nitrate.**

B.6.2. Le glutamate inhibe l'expression du gène *BnNrt2.1* et induit l'expression du gène *BnNrt1.1*

Ensuite nous avons cherché à mesurer l'impact du traitement glutamate sur les profils d'expression des deux principaux transporteurs de nitrate *BnNRT2.1* et *BnNRT1.1* de façon à vérifier notre hypothèse de travail. L'analyse des profils d'expression des gènes *BnNrt2.1* et *BnNrt1.1* montre que l'augmentation des concentrations glutamate de 0,5 à 10 mM inhibe l'expression du gène *BnNrt2.1* mais induit la surexpression du gène *BnNrt1.1* en présence de 1 ou 5 mM de nitrate. **Ces résultats confirment que le traitement glutamate permet bien un découplage de l'expression du gène *BnNrt2.1* par rapport à l'expression du gène *BnNrt1.1* (Lejay *et al.*, 1999 ; Loqué *et al.*, 2003). Ils valident également notre stratégie expérimentale visant à inhiber non seulement l'activité et la transcription du transporteur NRT2.1 mais également l'activité des autres transporteurs de la famille NRT2 pour éviter les phénomènes de compensation pour l'absorption du nitrate.**

B.6.3. La surexpression du gène *BnNrt1.1* induit par le traitement glutamate ne permet pas une compensation pour l'absorption du nitrate

Malgré la surexpression du gène *BnNrt1.1* et la forte réduction de l'élongation racinaire induite par le traitement glutamate, aucune compensation pour l'absorption du nitrate n'est observée. En terme fonctionnel, deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ce résultat : (i) seule l'activité du transporteur *BnNRT1.1* est inhibée par le glutamate, mais pas sa transcription, (ii) l'activité du transporteur *BnNRT1.1* n'est pas inhibée par le glutamate mais sa localisation interne dans les tissus de la stèle (endoderme et péricycle) de

la racine mature rend impossible un rôle compensatoire de BnNRT1.1 pour l'absorption.

Dans cette deuxième hypothèse, l'activité du transporteur BnNRT1.1 serait obligatoirement couplée avec celle du transporteur NRT2.1 pour permettre l'absorption et la translocation du nitrate vers les parties aériennes. Cette hypothèse est corroborée par plusieurs résultats expérimentaux : (i) le transporteur AtNRT1.1 n'est pas affecté comme le transporteur AtNRT2.1 par le 'statut N' et plus précisément par les produits de l'assimilation du nitrate comme le NH_4^+ et les acides aminés (Lejay *et al.*, 1999 ; Loqué *et al.*, 2003), (ii) chez *Arabidopsis* le transporteur AtNRT1.1 est localisé dans les tissus de la stèle (endoderme et péricycle) alors que le transporteur AtNRT2.1 est localisé sur les assises épidermiques et corticales de la racine mature (Guo *et al.*, 2001 et 2002; Remans *et al.*, 2006b ; Girin *et al.*, 2007) et (iii) le transporteur AtNRT1.1 contrôle l'expression du gène *AtNrt2.1* en relation avec le statut N (Krouk *et al.*, 2007). Dans cette hypothèse, le transporteur NRT2.1 serait donc absolument indispensable pour l'absorption du nitrate exogène ce que confirme la corrélation linéaire établie entre son expression et la longueur du système racinaire (Le Ny *et al.*, 2013).

Ces deux hypothèses fonctionnelles sur le rôle du transporteur BnNRT1.1 dans l'absorption n'excluent pas l'hypothèse d'un rôle du transporteur BnNRT1.1 sur l'architecture racinaire. En effet, la réduction de l'élongation racinaire induite par l'augmentation des concentrations de glutamate ou de nitrate est toujours associée avec la surexpression du transporteur BnNRT1.1. Des résultats récents sont en faveur de cette troisième hypothèse. Ils montrent en effet, que le transporteur NRT1.1 intervient dans la croissance des racines latérales, qu'il est induit par l'AIA et intervient dans le transport de l'AIA dans les primordia des méristèmes des racines latérales (Guo *et al.*, 2002 ; Remans *et al.*, 2006b ; Krouk *et al.*, 2010).

B.6.4. Le traitement glutamate inhibe l'assimilation du nitrate via l'activité de la GOGAT

L'augmentation des concentrations externes de glutamate induit une très forte accumulation (multiplication par 50 avec 1 mM de nitrate et 36 avec 5 mM) de glutamine dans les tissus racinaire et foliaire. Par ailleurs, la détermination de la part d'azote assimilé provenant du nitrate à partir des teneurs endogènes de nitrate et des quantités de ^{15}N accumulées dans les tissus a permis de mettre en évidence que le glutamate inhibe l'assimilation du nitrate. Ces résultats suggèrent donc que le traitement glutamate inhibe spécifiquement l'étape d'assimilation correspondant à l'activité de la glutamate synthétase (GOGAT). En effet, ces observations corroborent les résultats

obtenus sur les mutants *Fd-GOGAT* d'*Arabidopsis* et les études portant sur l'effet du glutamate sur l'assimilation et les teneurs endogènes en acides aminés libres (Ferrario-Mery *et al.*, 2002; Kissen *et al.*, 2010). **L'inhibition par le glutamate de l'activité de la GOGAT et du transporteur NRT2.1 crée donc une situation expérimentale inédite dans la mesure où le traitement glutamate module à la fois l'absorption du nitrate et son assimilation.**

B.6.5. Le nitrate est une molécule signal pour la croissance foliaire

Dans ces conditions physiologiques particulières, le marquage séparé sur le nitrate et le glutamate a permis de déterminer les quantités d'azote accumulées provenant du glutamate ou du nitrate absorbé et leurs effets sur la croissance. Le marquage par le ¹⁵N-glutamate a montré que le glutamate est d'autant plus absorbé que les concentrations en glutamate exogène augmentent que ce soit en présence de 1 ou 5 mM de nitrate. Ces analyses indiquent également que les quantités totales de ¹⁵N accumulées sont similaires qu'elles proviennent du nitrate ou du glutamate. Dans ces conditions expérimentales, une absorption compensatoire de glutamate semble privilégiée sur celle du nitrate en dépit des effets négatifs du glutamate sur la croissance. En effet, la modulation de l'absorption et de l'assimilation du nitrate par le glutamate modifie l'effet du nitrate sur la croissance foliaire. Ces résultats confirment les résultats antérieurs de Stitt et coll. (Scheible *et al.*, 1997 a et b ; Stitt et Feil, 1999) sur les mutants NR chez le Tabac montrant que le nitrate agit comme signal et non comme un osmoticum sur la croissance des parties aériennes.

B.7. Conclusions et perspectives

Le traitement glutamate permet de découpler l'expression et l'activité des deux transporteurs BnNRT1.1 et BnNRT2.1. Cette stratégie originale a révélé que l'activité des transporteurs de la famille NRT2 et, en particulier, le transporteur BnNRT2.1 est indispensable pour l'absorption du nitrate. En effet, bien que le traitement glutamate induise une surexpression du transporteur NRT1.1 celle-ci ne se traduit pas par une compensation pour l'absorption du nitrate. En conséquence, il semble bien exister une relation entre la localisation des transporteurs NRT2.1 et NRT1.1 dans la racine mature et l'absorption du nitrate exogène. Cependant, les résultats ne nous permettent pas d'affirmer que l'activité du transporteur NRT1.1 n'est pas inhibée par le traitement glutamate. L'ensemble des résultats pose tout de même la question du rôle du transporteur NRT1.1 dans la chaîne de transport racinaire du nitrate : **NRT1.1 intervient-il de façon complémentaire et coordonnée avec le transporteur NRT2.1 ou intervient-t-il sur la croissance racinaire?**

Une autre façon de répondre à cette question consiste à étudier l'impact d'une modification de l'architecture racinaire (structure) sur l'expression des transporteurs NRT1.1 et NRT2.1 et l'absorption du nitrate (fonction). Nous avons donc cherché à modifier l'architecture racinaire à l'aide **d'une stratégie pharmacologique en modulant la biosynthèse de l'éthylène et de l'AIA.** En effet, l'éthylène intervient sur la synthèse, le transport et la répartition de l'AIA au sein de la racine chez *Arabidopsis* et modifie de façon très significative les systèmes racinaires exploratoire et absorbants à très court terme (minutes - heures) (Ruzicka *et al.*, 2007 ; Stepanova *et al.*, 2005 ; Swarup *et al.*, 2007). Cette stratégie permet également d'étudier indirectement l'effet de l'AIA sur l'expression et l'activité du transporteur NRT1.1 (Guo *et al.*, 2001 et 2002).

**

Modification pharmacologique de la Structure racinaire

C. Quel est l'impact d'un changement de la surface racinaire sur l'absorption de $K^{15}NO_3$ en réponse aux modifications d'élongation induites par la modulation de la synthèse d'éthylène à l'aide de l'AVG et de l'ACC?

C.1. Contexte scientifique

Dans le cas de l'absorption du nitrate, de nombreux travaux font état des modifications à long terme (jours-semaines) des systèmes racinaires exploratoire et absorbant en réponse à la disponibilité en nitrate (Drew et Saker, 1975 ; Scheible *et al.*, 1997a et b ; Tableau III.2). Dans ce cas, les modifications d'architecture racinaire ne sont pas imposées mais sont la conséquence des variations de la concentration de nitrate disponible dans le milieu de culture. A contrario, il n'existe, à notre connaissance, aucune étude qui ait examiné sérieusement l'impact d'une modification imposée de l'architecture racinaire (structure) sur l'absorption du nitrate (fonction). Seules les études à l'aide du dispositif « split-root » rendent compte, de façon indirecte et pour une partie seulement du système racinaire, des effets d'une variation brusque de la structure (nombre de racines au contact du nitrate) sur les variations compensatoires de l'absorption de nitrate (fonction).

Dans notre étude bibliographique, nous avons montré qu'aucun des mutants présentant des modifications de l'architecture racinaire et identifiés à ce jour ne correspond à des gènes codant un transporteur ou des enzymes liées au métabolisme d'un élément minéral particulier. **La très grande majorité des mutants identifiés de l'architecture racinaire affecte le métabolisme hormonal et en particulier la synthèse, le transport et la signalétique de l'auxine et de l'éthylène.** Bien que Krouk *et al.* (2010) aient montré récemment que le transporteur de nitrate AtNRT1.1 est également un transporteur d'auxine, le mutant *chl1.10* n'exprime un phénotype racinaire que dans une situation physiologique très particulière. En effet, c'est à l'aide « d'un système split root » en gel d'agarose et dans la partie fortement alimentée en nitrate (10 mM) que les mutants *chl1.10* montrent au bout de seulement 9 jours de traitement une réduction significative de l'élongation du système racinaire (Remans *et al.*, 2006b). De la même façon, le mutant *Atnrt2.1-1* correspondant au transporteur de nitrate AtNRT2.1 ne montre une diminution de l'initiation des racines latérales qu'après une carence imposée de 6 jours après 6 jours de traitement sur 10 mM de nitrate (Remans *et al.*, 2006a). **Il est donc évident que les temps de réponse nécessaires aux modifications d'architecture racinaire induites par le nitrate sur les mutants des transporteurs de nitrate (jours – semaines) contrastent fortement par leur**

durée avec les temps de réponse mesurés (minutes – heures) chez les mutants de la signalisation auxine et éthylène ou lors des traitements pharmacologiques à l'aide d'AIA ou d'éthylène (Stepanova *et al.*, 2005 ; Swarup *et al.*, 2007 ; Ruzicka *et al.*, 2007).

En conséquence, de façon à pouvoir étudier l'impact d'une modification rapide et significative de l'architecture racinaire (structure) sur l'absorption du nitrate (fonction) et d'apporter des éléments nouveaux sur ces aspects structure-fonction, nous avons choisi une stratégie expérimentale de type pharmacologique. Celle-ci a consisté à moduler la synthèse de l'éthylène à l'aide d'un inhibiteur et d'un activateur des deux principales enzymes de cette voie de biosynthèse: l'ACC synthétase et l'ACC oxydase. En effet, il est aujourd'hui clairement démontré que l'éthylène intervient sur la croissance des systèmes exploratoire et absorbant, seul ou en interaction avec l'auxine, en modifiant la synthèse, le transport et la répartition de l'AIA le long de la racine (Stepanova *et al.*, 2005 ; Swarup *et al.*, 2007 ; Ruzicka *et al.*, 2007). Comparée à une approche mutant, cette approche pharmacologique permet d'inhiber ou d'activer l'ensemble des enzymes de la voie de biosynthèse de l'éthylène et évite ainsi les phénomènes de compensation liés à la redondance fonctionnelle des gènes codant l'ACC synthétase et l'ACC oxydase. Chez *Arabidopsis*, l'ACC synthétase et l'ACC oxydase appartiennent à deux familles multigéniques dont les membres sont fortement exprimés dans les racines (Tsuchisaka et Theologis, 2004). Dès lors, il est raisonnable de supposer que cette redondance fonctionnelle peut être encore amplifiée chez une espèce amphiploïde comme *B. napus* ce qui justifie pleinement la stratégie expérimentale entreprise.

C.2. Hypothèse de travail

Dans ce contexte, notre principal objectif de travail a consisté à examiner quels étaient les impacts d'une modification de la structure racinaire (variation de la surface absorbante) sur la fonction (absorption du nitrate). Nous avons donc cherché à mettre en évidence **si des mécanismes inhibiteurs ou compensatoires** pour l'absorption de nitrate étaient induits lors d'une réduction ou d'une augmentation significative du nombre de poils absorbants sur le système racinaire exploratoire. En particulier, nous nous sommes intéressés aux réponses des deux principaux transporteurs racinaires de nitrate: NRT2.1 et NRT1.1. En effet, **notre hypothèse de travail supposait que toute modification importante de la surface racinaire absorbante devrait modifier l'absorption du nitrate via des changements d'expression spécifiques des transporteurs NRT2.1 et NRT1.1.**

C.3. Stratégies expérimentales

Afin de vérifier cette hypothèse, notre stratégie expérimentale a consisté dans un premier temps à modifier la croissance du système racinaire (système exploratoire : racine I et II et système absorbant : poils absorbants) en modulant le métabolisme de l'éthylène par une approche pharmacologique. L'activité de l'ACC synthétase, première enzyme de la voie de biosynthèse qui produit l'ACC à partir de S-adénosylméthionine (SAM), a été inhibée à l'aide de l'aminooéthoxyvinylglycine (AVG). L'ACC oxydase, deuxième enzyme de la voie de biosynthèse de l'éthylène a été activée à l'aide de son substrat : l'acide aminocyclopropane carboxylique (ACC), précurseur de l'éthylène. Pour chaque traitement, les modifications induites du système racinaire exploratoire et absorbant ont été caractérisées sur une gamme de concentration variant de 0,1 à 10 μM . A l'issue de cette étude, les doses de 10 μM d'AVG et d'ACC ont été retenues pour les études structure-fonction.

Dans un deuxième temps, des mesures d'absorption du nitrate ont été réalisées sur des pas de temps de 24h pendant cinq jours sur les plantules cultivées en gel d'agarose et traitées par 10 μM d'AVG et d'ACC en présence de 1 mM de nitrate. Le nitrate était marqué par le ^{15}N (1% d'atome de ^{15}N).

C.4. Méthodologies utilisées

De même que pour les précédentes expérimentations, les mesures d'absorption du nitrate sont réalisées à l'aide d'un marquage du nitrate avec l'isotope stable ^{15}N en utilisant un analyseur élémentaire (EA 300; Eurovector) couplé avec un spectromètre de masse (isoprime mass spectrometer; GV Instrument).

Les mesures de l'évolution de la longueur du système racinaire en fonction des traitements ont été réalisées à l'aide d'un curvimètre (Wado, Germany).

Les variations des profils d'expression en fonction des traitements des gènes codant les transporteurs de nitrate intervenant de façon majeure dans l'absorption de nitrate: BnNRT1.1 et BnNRT2.1 ont été analysées à l'aide d'une Q-PCR en temps réel. L'échantillonnage des plantules a toujours été réalisé aux mêmes heures de la journée afin d'éviter d'introduire un biais dans les valeurs de transcription due à la variabilité nyctémérale de l'expression des transporteurs nitrate.

C.5. Article 3

Elongation Changes of Exploratory and Root Hair Systems Induced by Aminocyclopropane Carboxylic Acid and Aminoethoxyvinylglycine Affect Nitrate Uptake and *BnNrt2.1* and *BnNrt1.1* Transporter Gene Expression in Oilseed Rape^[W]

Antonin Leblanc, Hugues Renault, Julien Lecourt, Philippe Etienne, Carole Deleu, and Erwan Le Deunff*

INRA, UMR 950, Laboratoire d'Ecophysiologie Végétale, Agronomie et Nutrition NC&S, Université de Caen Basse-Normandie, F-14000 Caen, France (A.L., J.L., P.E., E.L.D.); and INRA, UMR 118, Laboratoire d'Amélioration des Plantes et Biotechnologies Végétales, Université de Rennes, F-35000 Rennes, France (H.R., C.D.)

*Corresponding author, e-mail: erwan.ledeunff@unicaen.fr;

fax: (33) (0)2 31 56 53 60.

Received September 18, 2007; accepted February 1, 2008; published February 20, 2008.

Abstract

Ethylene is a plant hormone that plays a major role in the elongation of both exploratory and root hair systems. Here, we demonstrate in *Brassica napus* seedlings that treatments with the ethylene precursor, aminocyclopropane carboxylic acid (ACC) and the ethylene biosynthesis inhibitor, aminoethoxyvinylglycine (AVG), cause modification of the dynamic processes of primary root and root hair elongation in a dose-dependent way. Moreover, restoration of root elongation in AVG-treated seedlings by 1 mM L-glutamate suggested that high concentrations of AVG affect root elongation through nonoverlapping ethylene metabolic pathway involving pyridoxal 5'-P-dependent enzymes of nitrate (N) metabolism. In this respect, treatments with high concentrations of ACC and AVG (10 mM) over 5 d revealed significant differences in relationships between root growth architecture and N uptake capacities. Indeed, if these treatments decreased severely the elongation of the exploratory root system (primary root and lateral roots) they had opposing effects on the root hair system. Although ACC increased the length and number of root hairs, the rate of N uptake and the transcript level of the N transporter *BnNrt2.1* were markedly reduced. In contrast, the decrease in root hair length and number in AVG-treated seedlings was overcompensated by an increase of N uptake and *BnNrt2.1* gene expression. These root architectural changes demonstrated that *BnNrt2.1* expression levels were more correlated to the changes of the exploratory root system than the changes of the root hair system. The difference between treatments in N transporters *BnNrt1.1* and *BnNrt2.1* gene expression is discussed with regard to presumed transport functions of *BnNrt1.1* in relation to root elongation.

Introduction

In higher plants, root nitrate (N) absorption has to be considered as a function of the number of transporters and their activity per root surface. Until now, the first term in the equation has only been intensively investigated and many positive or negative effectors implicated in regulation of N transporter transcription and/or activity and have been recognized (Touraine *et al.*, 2001; Forde, 2002; Beuve *et al.*, 2004). Recent studies have brought some new insights into the modulation of the root surface equation for terms related to different macronutrients such as N, sulfate (S), and phosphate (P; Lopez-Bucio *et al.*, 2002). The root surface depends on root architecture development and can be divided into two structural components; the exploratory root system component, which is composed of primary roots and lateral roots (LRs) of different orders, and the root hair system component, which is composed of root hair cells. These two components are built progressively over time and composed of the whole root absorbing surface. The exploratory root system requires differentiation of new LR primordia followed by their activation and elongation (Malamy and Benfey, 1997; Casimiro *et al.*, 2003). The root hair system is initiated from files of elongated epidermal root hair cells issued from the functioning of primary and LR meristems (Schiefelbein, 2000; Carol and Dolan, 2002; Ringli *et al.*, 2005).

The LR primordium is initiated after the activation of pericycle cells that are in a specific position with respect to the protoxylem pole within primary root (Casimiro *et al.*, 2003). Genetic approaches have shown that LR initiation was under the control of the auxin transport and signaling pathway but also cell-cycle events (Malamy and Benfey, 1997; Hobbie, 1998; Casimiro *et al.*, 2003). Despite the fact that macronutrients such as N, S, and P also have an important impact on LR development (Lopez-Bucio *et al.*, 2002), it is surprising that no mutants of macronutrient transport have been found to be directly involved in this differentiation process. However, recent studies have reported that the building of the exploratory root system might also depend on a N signaling pathway (Zhang *et al.*, 1999; Little *et al.*, 2005; Remans *et al.*, 2006a, 2006b). Indeed, mutants of the *AtNrt1.1* and *AtNrt2.1* N transporters seemed to demonstrate that these transporters were involved in LR initiation independently of any nutritional effect. This assumption, in the case of the *AtNrt1.1* N transporter, was supported by several lines of evidence. First, the *atnrt1.1* mutant showed a reduced LR growth within the N-rich patch. Secondly, the LR growth of the *atnrt1.1* mutant was not due to a decrease in root N uptake activity. Thirdly, the phenotype of the *atnrt1.1* mutant was associated with an altered number of LRs. However, these reports failed to distinguish between: (1) the impacts of *AtNrt2.1* and *AtNrt1.1* mutations on differentiation of LR and root hair; (2) the impacts of *AtNrt2.1* and *AtNrt1.1* mutations on

elongation events during root development; (3) the relationships of hormones and nutrients metabolisms during root development.

In this study, we are mainly interested in the growth/elongation component of root development (ultimately moving toward a root hair system building) in relation to N uptake. Indeed, the modulation of root elongation by pharmacological treatments on ethylene biosynthesis with aminocyclopropane carboxylic acid (ACC; ethylene precursor) and aminoethoxyvinyl-Gly (AVG; ethylene biosynthesis inhibitor) have been recognized for a long time (Smalle and Van Der Straeten, 1997; Schiefelbein, 2000; Casson and Lindsey, 2003). Thus in *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), ACC treatment has been shown to induce a reduction of primary and LR elongation (Jackson, 1991; Rodriguez-Pousada *et al.*, 1993; Clark *et al.*, 1999) and the increase of root hair length (Tanimoto *et al.*, 1995; Masucci and Schiefelbein, 1994, 1996; Pitts *et al.*, 1998; Schiefelbein, 2000). On the other hand, the use of AVG, an inhibitor of ACC synthase (ACS; a pyridoxal 5'-P [PLP] amino transaminase that catalyzes the rate-limiting step of ethylene biosynthesis) has been shown to induce a significant increase in primary root elongation and the reduction of root hair length (Abeles and Wydoski, 1987; Satoh and Yang, 1989; Locke *et al.*, 2000; Le *et al.*, 2001).

However, until now these physiological ethylene induced cell root responses have not been questioned either in relation to shoot versus root N allocation for growth nor in terms of compensatory mechanisms to maintain minimal absorbing surfaces and/or transporter activity for the uptake of nutrients such as N. Our first working hypothesis assumes that metabolic regulation of ethylene biosynthesis by AVG and ACC pharmacological treatments in short-term experiments must contribute to the alteration of root architecture mainly in its elongation component. Our second working hypothesis supposes that in long-term experiments the contrasting modifications to absorbing surfaces (exploratory and root hair systems) via reduction of their elongation must affect N uptake.

In this article, we have first characterized the dose effects of AVG and ACC pharmacological treatments on oilseed rape (*Brassica napus*) root elongation during 72 h and showed that high concentrations of ACC and AVG affect root system growth through nonoverlapping metabolic pathways.

Secondly, we have determined, during 5 d of treatment, the impact of elongation architectural changes induced by an optimal dose of each treatment on the variations of the net N uptake rate, N translocation from root to shoot, and expression of the N transporter genes *BnNrt2.1* and *BnNrt1.1*.

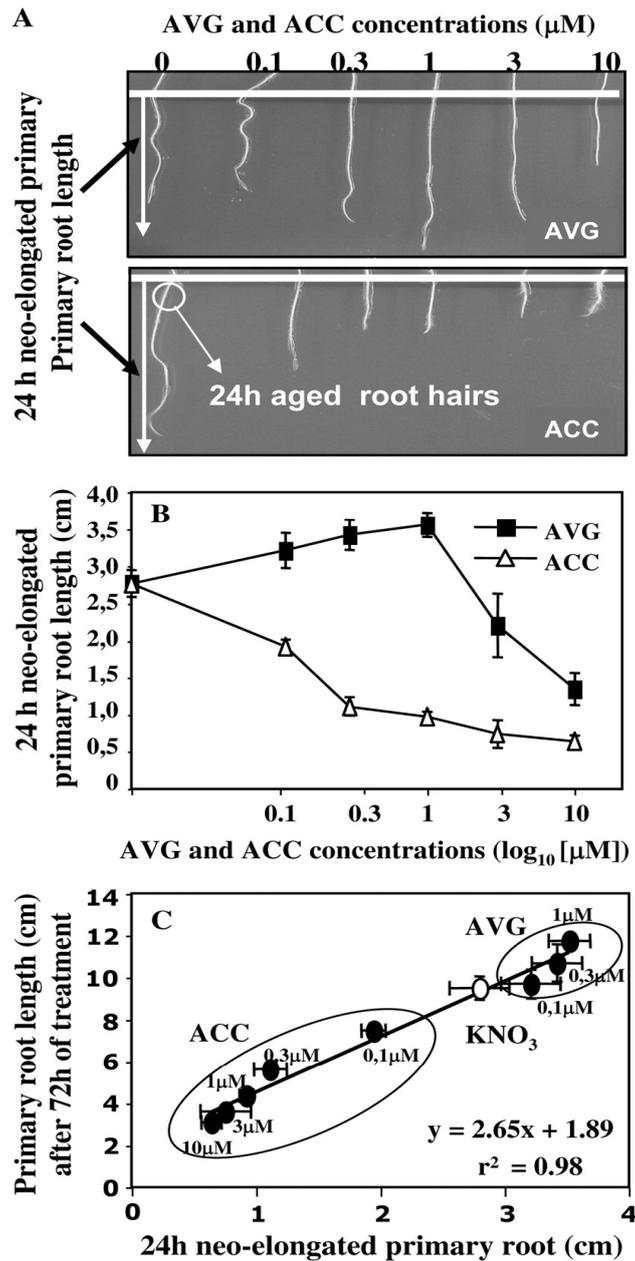


Figure III.25. Impacts of ACC and AVG treatments on dynamic elongation process in primary roots of oilseed rape under homogeneous feeding of N (1 mm) on agarose gel. A, The experimental procedure to measure 24-h-old neo-elongated primary root and root hair lengths after treatments. Root tips of seedlings growing in agarose gel for 48 h were marked (white line) to determine the extent of root elongation between 48 and 72 h of treatment. B, Dose-response curves of ACC or AVG treatments on 24-h neo-elongated primary roots. C, Effects of AVG and ACC treatments on the correlation established between primary root length and 24-h neo-elongated primary roots. Each bar represents the average length per treatment \pm se for $n = 20$ seedlings.

Fig. III.25: Leblanc *et al.* (2008)
Plant Physiology

Results

Dose-Response Curves of Increasing ACC and AVG Concentrations on Primary Root Tip Elongation in Oilseed Rape

Changes in root architecture in oilseed rape seedlings were examined on vertical agar plates under a homogeneous supply of 1 mM N with different concentrations of the precursor (ACC) or inhibitor (AVG) of ethylene biosynthesis. Optimal pharmacological concentrations for ACC and AVG treatments were first tested for their contrasting effects on primary and root hair systems when compared to KNO₃-treated seedlings (control) during 72 h of treatment (Fig. III.25, A and B). Neo-elongated primary root length was measured after 24 h of treatments in 2-d-old treated seedlings as shown by the white arrow in Figure 1A. AVG- and ACC-treated seedlings exhibited opposing effects on primary root development up to the 1 μ M dose when compared to the control (Fig. III.25, B and C). These results of long-term treatment effects (days) in oilseed rape were in agreement with the results of short-term treatment effects (hours) obtained by Le *et al.* (2001) in *Arabidopsis*. In our study, under the 1 μ M AVG treatment, seedlings showed an increase of 28.5% in neolongated root length whereas seedlings treated with 1 μ M ACC showed a decrease of 65% in root length compared to the control.

These opposing effects were clearly illustrated by the linear correlation found between the 24-h primary neo-elongated root length and full primary root length (Fig. III.25C). This correlation was drawing in opposite direction by AVG doses (0.1–1 μ M) and ACC doses (0.1–10 μ M) demonstrating that endogenous ethylene levels play a major role in the dynamic process of root elongation (Fig. III.25C). Beyond the 1 μ M level, AVG-treated seedlings showed a drastic decrease in primary root length by 51.4% for 10 μ M compared to the control (Fig. III.25B). This unexpected reduction of root elongation suggested that for increasing concentrations, AVG had an inhibitory effect on other metabolic targets that have been implicated in molecular root elongation mechanisms.

Effects of Increasing ACC and AVG Concentrations on the Root Hair System in Oilseed Rape

It is well known in *Arabidopsis* that modifications of ethylene biosynthesis by high ACC treatments promote root hair elongation (Tanimoto *et al.*, 1995; Pitts *et al.*, 1998) and increase in root hair frequency by the induction of ectopic root hair formation in normally atrichoblastic cells (Tanimoto *et al.*, 1995). The role of ethylene biosynthesis in regulation of root hair development was illustrated by AVG treatments, an ACC synthase inhibitor, that blocked root hair formation

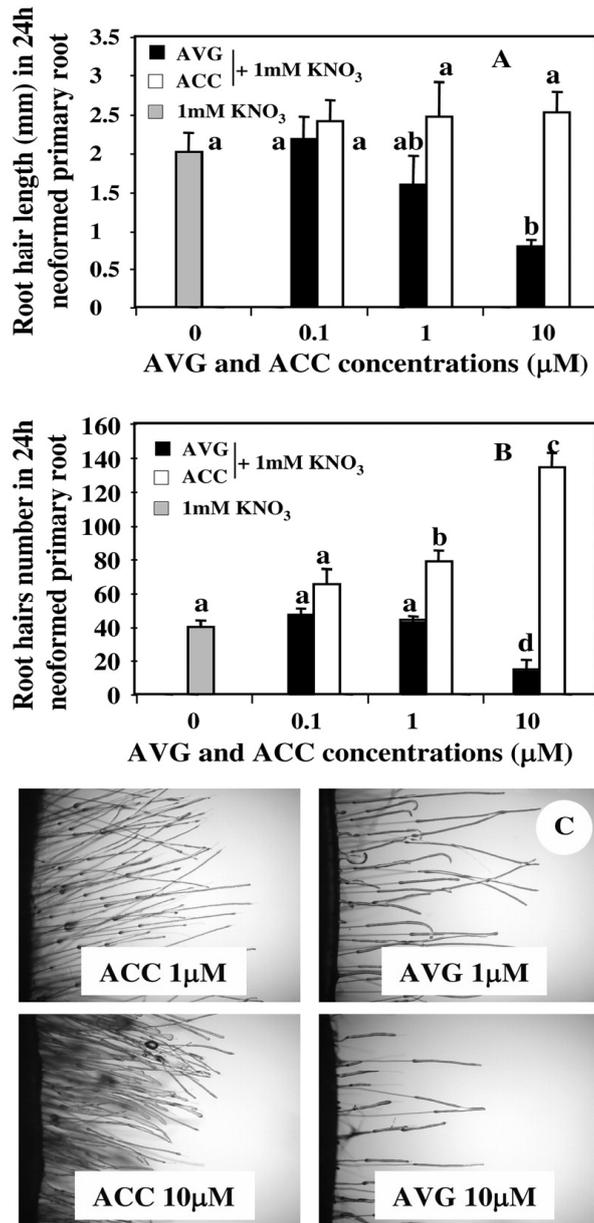


Figure III.26. A and B, Dose effects of AVG and ACC root treatments on root hair length (A) and number (B) of oilseed rape seedlings under homogeneous feeding of N (1 mm). C, Morphological changes in root hairs induced by 1 to 10 μM ACC or AVG doses of treatments. Data points represent the mean of the 12 longest and oldest root hairs from six different seedlings ($n = 6 \times 12 = 72$) in the uppermost 3-mm section of 24-h-old neo-elongated primary roots (see white circle in Fig. 1A). Data were analyzed by the nonparametric test of Kruskal Wallis. Then, Mood median tests were used to compare means or medians; bars sharing different letters are significantly different at $P = 0.05$ (Sokal and Rohlf, 2003).

Fig. III.26: Leblanc *et al.* (2008)
Plant Physiology

and elongation at high treatment concentrations ($>1 \mu\text{M}$; Masucci and Schiefelbein, 1996; Berger *et al.*, 1998). Our results in oilseed rape confirm these previous results obtained in *Arabidopsis* (Fig. III.26, A and B). Up to the level of $1 \mu\text{M}$ AVG and ACC, root hairs in the upper part of a 24-h neo-elongated primary root (Fig. III.25A) were not significantly different in terms of length and frequency between treatments (Fig. III.26, A and B). By contrast, seedlings treated with ACC and AVG at doses $>1 \mu\text{M}$ showed a significant increase or decrease in root hair length and number. As illustrated in Figure III.26C, treatments with AVG ranging from 1 to $10 \mu\text{M}$ doses showed a drastic reduction in root hair length and number whereas ACC-treated plants exhibited a significant increase in root hair length and number (Fig. III.26, A and B).

Ability of L-Glu Treatment to Recover AVG Root Elongation Inhibition

To test if the unexpected reduction of root elongation beyond $1 \mu\text{M}$ dose of AVG was due to an inhibitory effect on other metabolic targets than ACS protein, we have blocked the second step of the ethylene biosynthesis pathway at the level of ACC oxidase with α -aminoisobutyric acid (AIBA): a structural analog of ACC (Sato and Esashi, 1982). Comparison of root elongation inhibition induced by AIBA and AVG treatments showed that up to the level of $1 \mu\text{M}$, AVG induced a more drastic inhibition than AIBA bringing convincing evidence that AVG inhibited more targets than ACS protein (Fig. III.27A). Due to AVG being considered as a potential suicide inhibitor of many PLP (or vitamin B6)-dependent enzymes (enzymes closely related to the subgroup of I aminotransferases such as ACC synthetase; Werck-Reichhart *et al.*, 1988; Bagh *et al.*, 2004), we have examined whether the root supply of L-Glu (the main product of N assimilation) was able to recover AVG primary and root hair growth inhibition during 3 d of treatment. Indeed, key enzymes of N metabolism such as Gln synthase and transaminases involve PLP as a cofactor and use L-Glu as a substrate or as a product. Moreover, it has been recently demonstrated that L-Glu is implicated in both mitotic activity in the apical meristem (Walch-Liu *et al.*, 2006) and dynamic elongation of root cell files via the microtubule cytoskeleton (Sivaguru *et al.*, 2003). Our results showed that the cotreatment of seedlings with different doses of AVG and 1 mM of L-Glu restores primary root elongation beyond $1 \mu\text{M}$ AVG treatment (Fig. III.27B). This restoration of primary root length was also accompanied by a restoration of root hair length (Fig. III.27C).

L-Glu Recovery Effect Is Metabolic and Not Due to an N Nutritional Effect

To test if L-Glu recovery effect was metabolic and was not due to an N nutritional effect on root growth induced by L-Glu α amino group, we have compared the effects of treatments on root architecture in the same millimolar range of N supply than the $10 \mu\text{M}$ AVG + 1 mM Glu + 1 mM

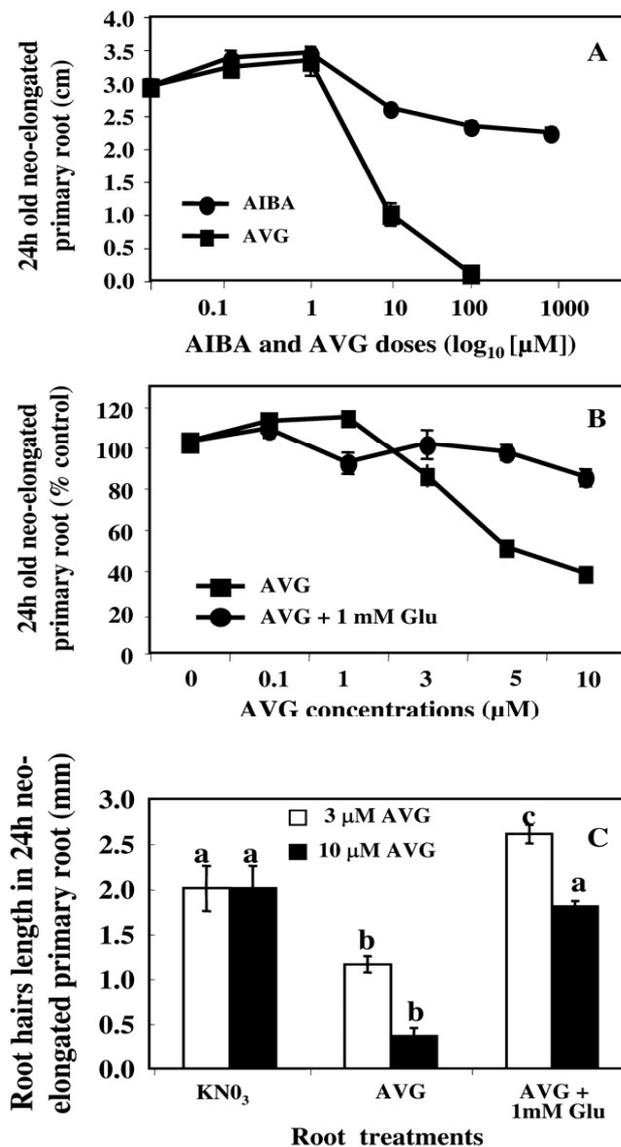


Figure III.27. A and B, Twenty-four-hour elongation responses of primary roots of oilseed rape seedlings treated with different doses of AIBA or AVG ($n = 12-16$ seedlings; A) or cotreated with different doses of AVG or AVG + 1 mM Glu under homogeneous feeding of 1 mM N ($n = 1-4$ experiments of $n = 12-16$ seedlings; B). C, Restoration effects of 72-h cotreatments with 3 μ M AVG + 1 mM Glu or 10 μ M AVG + 1 mM Glu on root hair lengths in 24-h neo-elongated primary root between 48 and 72 h of treatment ($n = 72$; see experimental procedure in Fig. 1A). Each bar indicates \pm se when larger than the symbol. Mood median tests were used to compare means or medians; bars sharing different letters are significantly different at $P = 0.05$ (Sokal and Rohlf, 2003).

Fig. III.27: Leblanc *et al.* (2008)
Plant Physiology

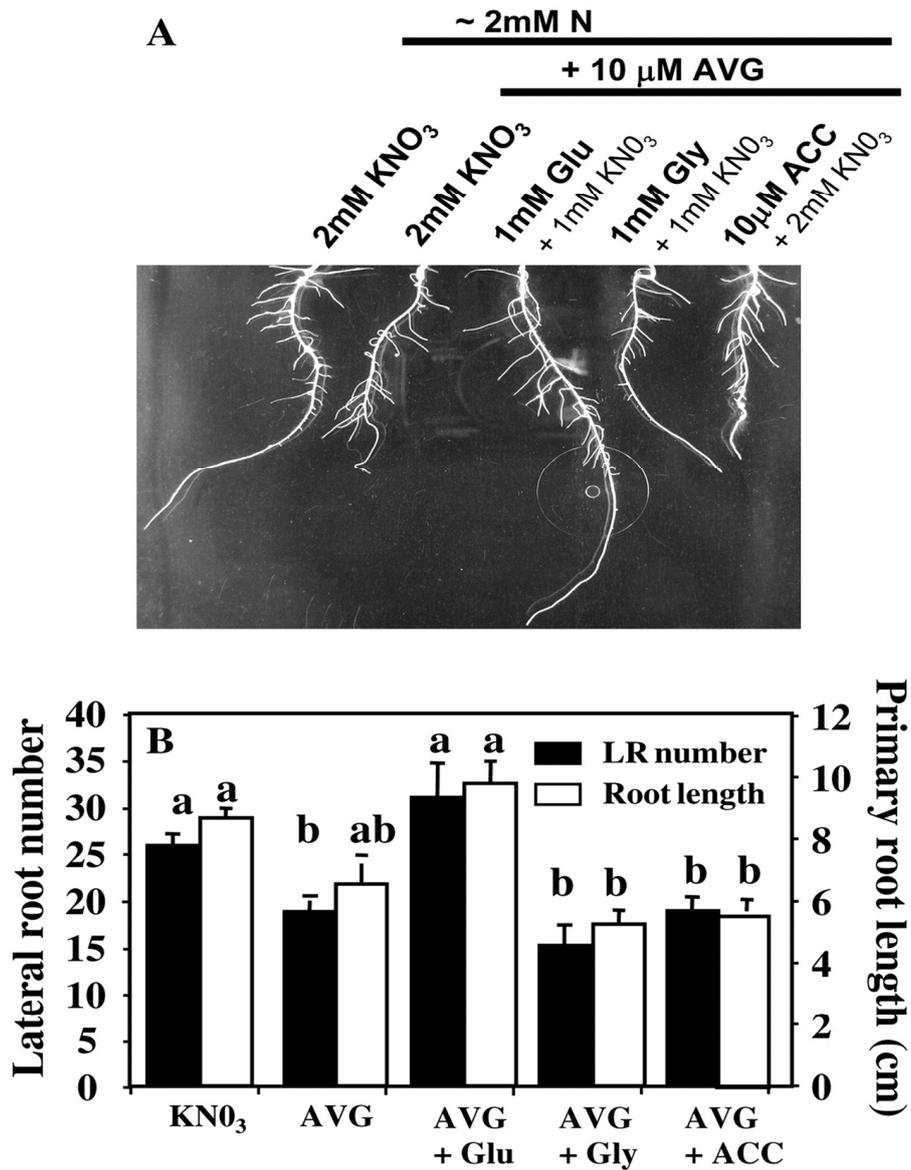


Figure III.28. Restoration effects of amino acid treatment on exploratory root system in 10 μ m AVG-treated seedlings. A, Root architectural changes induced in seedlings cotreated over 120 h with 10 μ m AVG plus 1 mM l-Glu, 1 mM Gly, or 10 μ m ACC under homogeneous feeding of N (approximately 2 mM). Control- and ACC-treated plants were fed with 2 mM of N to bring similar amounts of N (approximately 2 mM) between treatments. B, Restoration effects of pharmacological cotreatments on LR number and primary root length. Each bar indicates \pm se for $n = 20$ when larger than the symbol.

Fig. III.28: Leblanc *et al.* (2008)
Plant Physiology

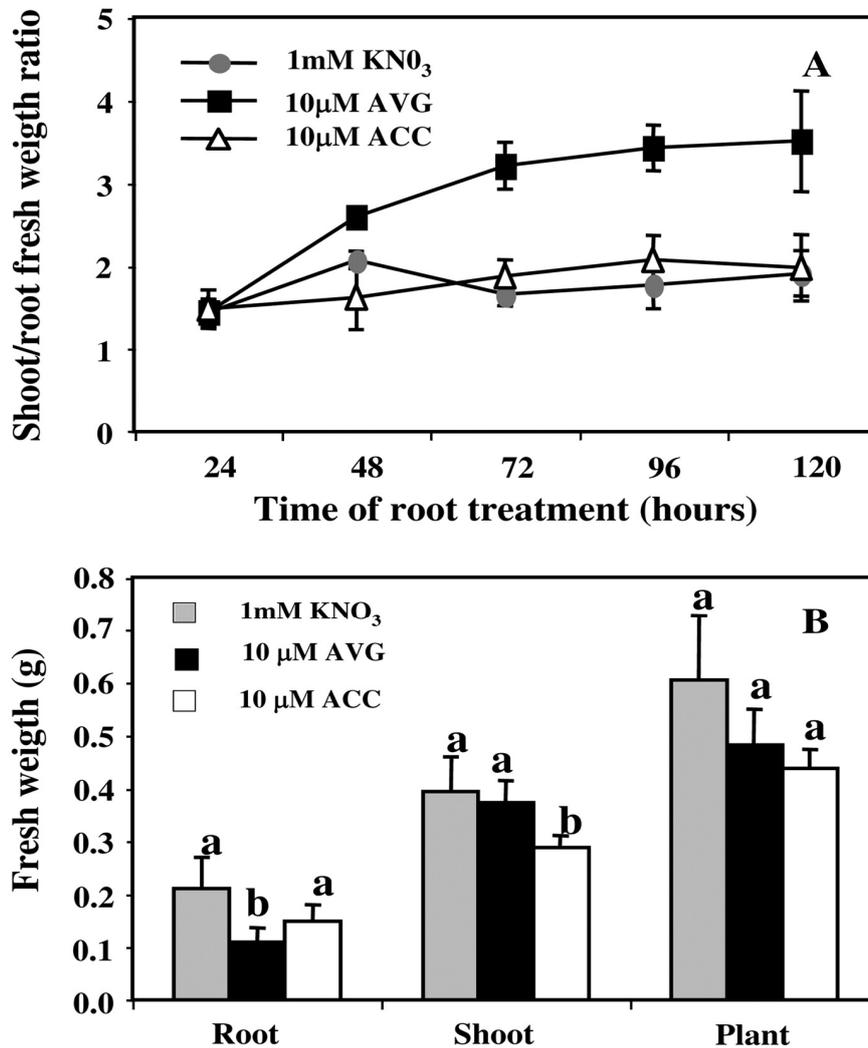


Figure III.29. A and B, Changes in shoot-root fresh biomass ratio (A) and FW (B) in oilseed rape seedlings treated for 120 h with 10 μm ACC and 10 μm AVG under homogeneous feeding of N (1 mm). Vertical bars indicate average values \pm se of $n = 3$ to 15 repeats of the sum of four seedlings each when larger than the symbol. Data were analyzed by the nonparametric test of Kruskal Wallis. Then, Mood median tests were to compare means or medians; bars sharing different letters are significantly different at $P = 0.05$ (Sokal and Rohlf, 2003).

KNO₃ treatment corresponding to 2 mM supply of N (Fig. III.28, A and B). In addition, the time course of experiment was increased from 3 to 5 d to measure the L-Glu effect at the whole root system (primary root and LRs). Comparison of the treatments showed that the L-Glu restoration effect on primary root elongation was not nutritional because AVG control treatment (2 mM KNO₃ + 10 μM AVG) was not able to rescue root elongation. Likewise, lack of restoration after 10 μM AVG + 1 mM Gly + 1 mM KNO₃ treatment argued in favor of a specific metabolic effect of L-Glu (Fig. III.28B). Contrary to L-Glu, ACC treatment was unable to restore root growth of AVG-treated plants.

Effects of High Concentrations of ACC and AVG on Readjustment of Seedling Growth Parameters and Root System Components

We have investigated how 5 d of treatment with 10 μM ACC and 10 μM AVG treatments might readjust seedling growth parameters and exploratory root architecture. AVG treatment significantly increased the shoot-root fresh weight (FW) ratio (Fig. III.29A) compared to ACC- and control (KNO₃)-treated plants. This result was explained by a significant decrease in the root FW of AVG-treated plants (Fig. III.29B) suggesting that, contrary to ACC, AVG exercised probably its action via modifications of nutrient allocation within the plants. The evolution patterns of primary root length, exploratory root length, and lineic root biomass (defined as the ratio between root FW and the sum of primary root and LR lengths) were measured for the sum of four seedlings (Fig. III.30, A–C). The sum of the primary root lengths of four seedlings was more impaired by 120 h of ACC treatment than AVG treatment (Fig. III.30A). Likewise, the exploratory root system was severely affected by ACC and AVG treatments (Fig. III.30B) as demonstrated by the significant decrease in mean LR length and number between treatments (see below; Fig. III.31, A and B). Relative to root FW, the length of the exploratory root system expressed as root lineic FW showed a similar overall decrease for all the treatments (Fig. III.30C). This demonstrated that to maintain or increase their shoot-root ratio during growth (Fig. III.29A) without impediment of their capacity to explore soil for N resources, seedlings decrease their root lineic biomass and create lighter primary and LRs (Fig. III.30C). These biomass readjustments were particularly significant between treatments from 48 to 96 h suggesting that these treatments affect at early stages of development nutrient allocation between root and shoot. Consequently, correlations between shoot FW and exploratory root components were systematically sought. Three significant correlations were found between shoot FW and exploratory root components (Fig. III.30, D–F). In comparison to the control plants, ACC and AVG treatments did not impair these correlations but impaired the early amplitude of the architectural root components and affected the overall trends of these correlations. Another linear correlation, found between

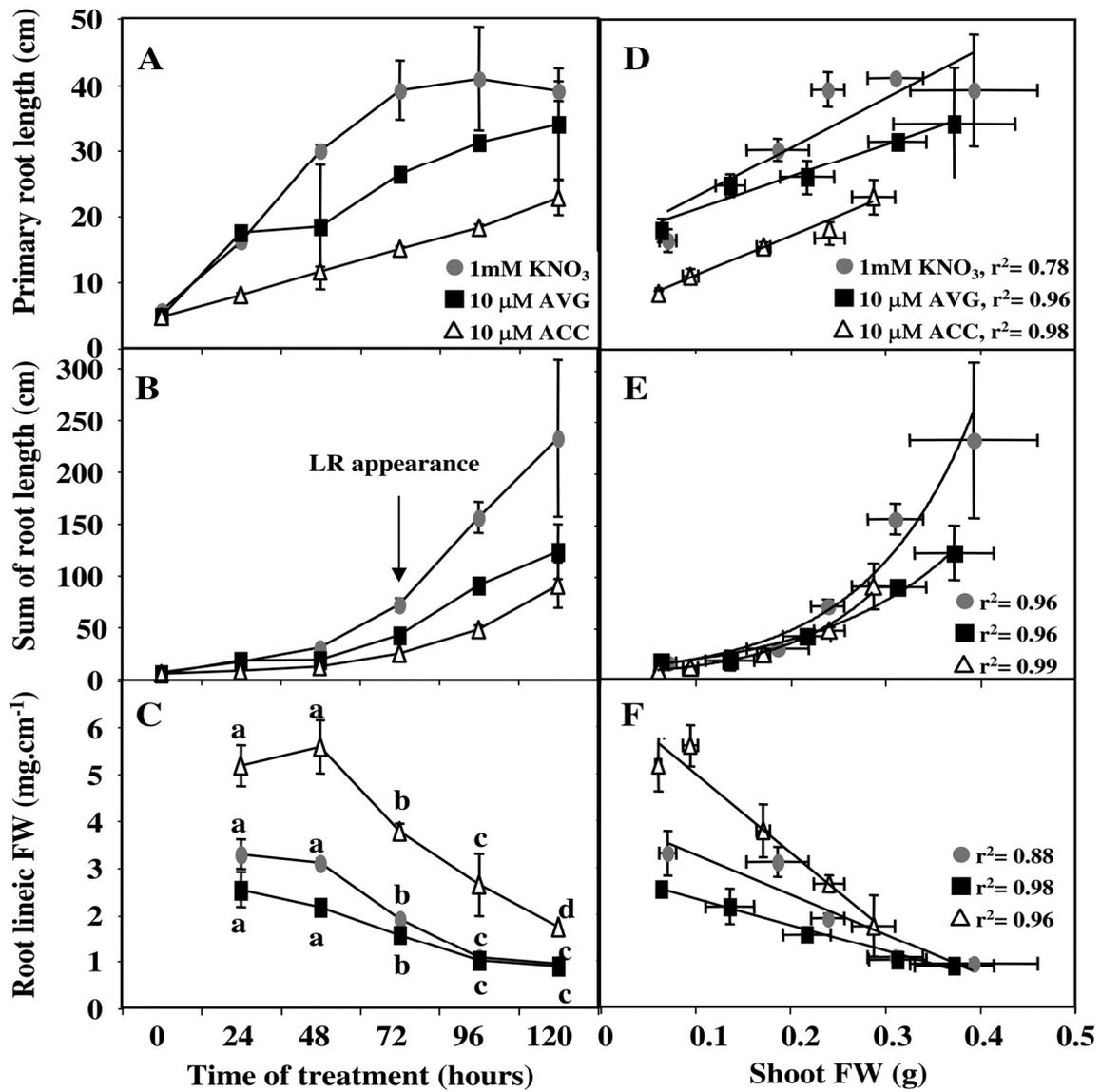


Figure III.30. A to C, Changes in primary root (A), sum of root length (B), and root lineic fresh biomass (C) in oilseed rape seedlings treated with 10 μM ACC and 10 μM AVG under homogeneous feeding of N (1 mm). D to F, Linear and exponential correlations established between primary root (D), sum of root length (E), and root lineic fresh biomass (F) and shoot FW. Vertical bars indicate average values \pm se for $n = 3$ to 15 repeats of the sum of four seedlings each when larger than the symbol.

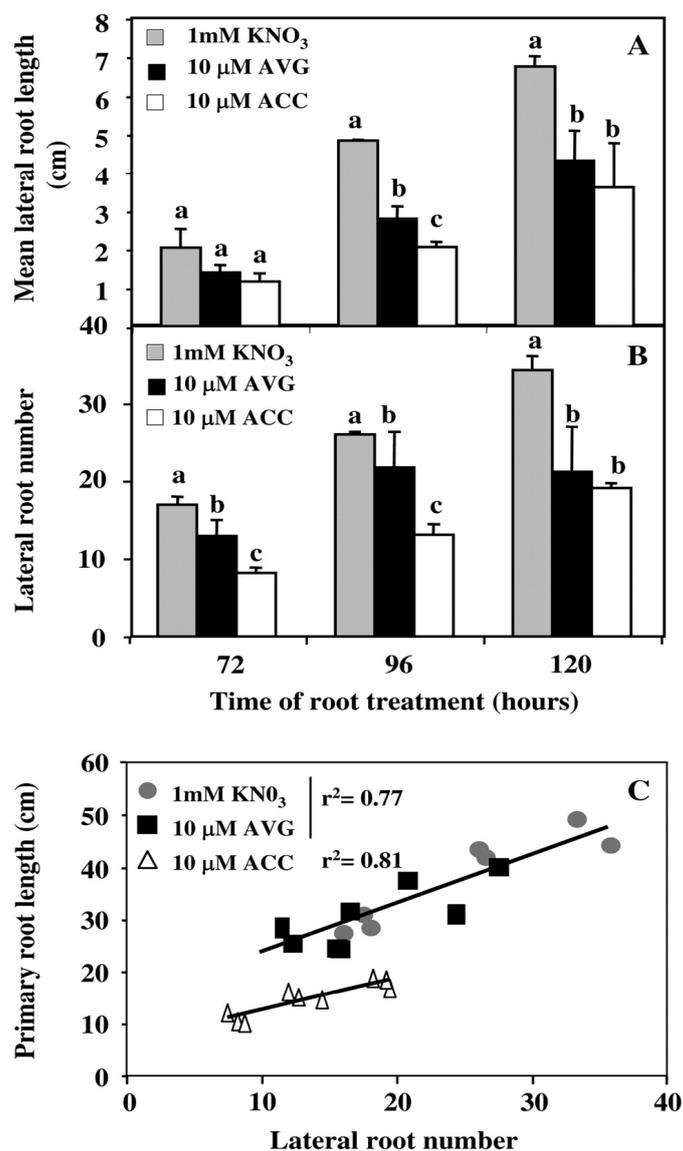


Figure III.31. A and B, Effects of 120 h of treatment with 10 μM ACC and 10 μM AVG on mean LR length (A) and LR number (B) under homogeneous feeding of N (1 mM) in oilseed rape seedlings. C, Changes induced by 10 μM ACC and 10 μM AVG root treatments on the correlation established between primary root length and LR number. Vertical bars indicate \pm se for $n = 3$ repeats of the sum of four seedlings each when larger than the symbol. Data were analyzed by the nonparametric test of Kruskal Wallis. Then, Mood median tests were to compare means or medians; bars sharing different letters are significantly different at $P = 0.05$ (Sokal and Rohlf, 2003).

Fig. III.31: Leblanc *et al.* (2008)
Plant Physiology

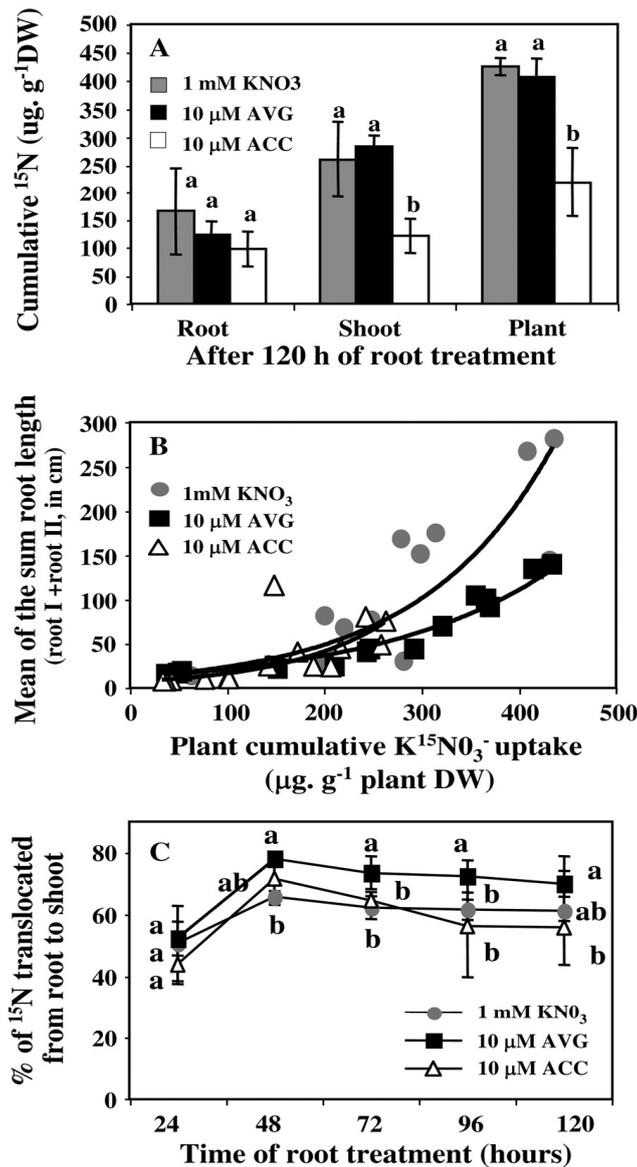


Figure III.32. A, Cumulative amount of N in root, shoot, and whole plant after 120 h of treatment with 10 μM ACC and 10 μM AVG under homogeneous feeding of 1 mM N. B, Relationship between cumulative ^{15}N uptake in seedlings and total roots length (points are the mean value of the sum of four seedlings). C, Curves of the percentage of ^{15}N translocated from root to shoot. Vertical bars indicate \pm se for $n = 3$ repeats of the sum of four seedlings when larger than the symbol.

Fig. III.32: Leblanc *et al.* (2008)
Plant Physiology

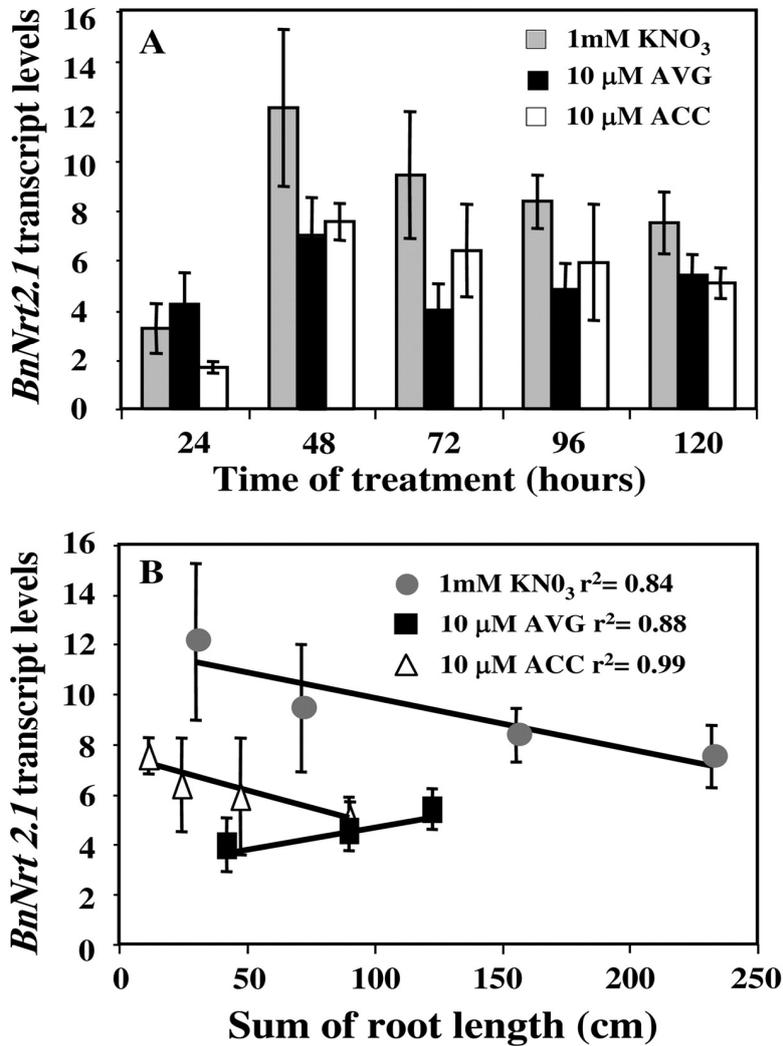


Figure III.33. A and B, Expression patterns of *BnNrt2.1* transcripts in root (A) and correlation between *BnRT2.1* transcript levels and total roots length in 10 μm ACC or 10 μm AVG-treated seedlings under homogeneous feeding of 1 mm N in oilseed rape seedlings (B). Vertical bars indicate ± se for $n = 4$ experiments with a bulk of four seedlings when larger than the symbol.

Fig. III.33: Leblanc *et al.* (2008)
Plant Physiology

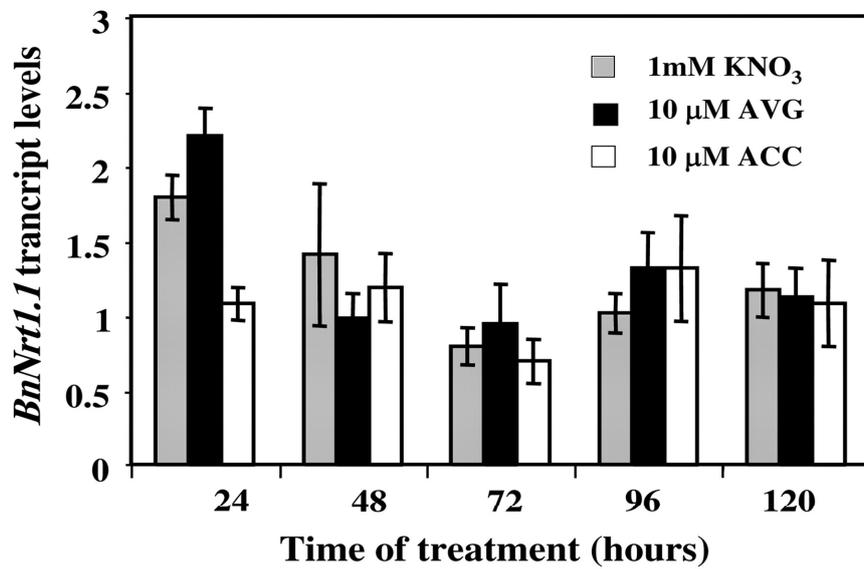


Figure III.34. Root expression patterns of *BnNrt1.1* transcripts in response to 10 μm ACC or 10 μm AVG treatments. Vertical bars indicate ± se for $n = 4$ experiments with a bulk of four seedlings when larger than the symbol.

Fig. III.34: Leblanc *et al.* (2008)
Plant Physiology

primary root elongation and LR number, was also modified by root treatments (Fig. III.31C). This correlation was similar for KNO₃- and AVG-treated seedlings even if in AVG-treated seedlings the reduction of primary root reduced significantly the LR number compared to KNO₃ treatment (Fig. III.31C). The differences observed after ACC and AVG treatments in terms of LR number (Fig. III.31C) and in terms of root hair length and number (Fig. III.26, A and B) suggested that the metabolic changes induced by high AVG concentrations on root elongation were clearly different from those caused by high ACC concentrations.

Impacts of Root Architectural Changes Induced by High Concentrations of ACC and AVG on N Uptake and the Expression Level of N Transporter Genes

We have measured the impacts of root architectural adjustments induced by 10 μM ACC and 10 μM AVG treatments on N accumulation, N uptake (by using K¹⁵NO₃ labeling) and *BnNrt2.1* and *BnNrt1.1* N transporter gene expression (by quantitative reverse transcription [RT]-PCR) during time-course experiment. After 120 h of treatment, 10 μM ACC-treated seedlings showed significantly less ¹⁵N accumulation in shoot than AVG and control plants (Fig. III.32A). Moreover, the exponential relationships established between cumulative ¹⁵Ng⁻¹ in seedlings dry weight and total root length for the different pharmacological root treatments (Fig. III.32B) showed that AVG-treated plants accumulated as much ¹⁵N as KNO₃ seedlings but with only half of their exploratory (Fig. III.30B) and root hair systems (Fig. III.32, A and B). Despite a high number of root hairs (Fig. III.26, A and B) and a more reduced exploratory root system (Fig. III.30B), ACC-treated plants did not upregulate the capacity of their N uptake systems. To investigate whether AVG compensatory effect on N uptake can be explained by either posttranscriptional or transcriptional regulation of N transporters, we have examined ¹⁵N translocation from root to shoot during the time-course experiment and quantified the transcript expression of the *BnNrt2.1* and *BnNrt1.1* N transporter genes by quantitative RT-PCR. AVG treatment induced a significant increase in ¹⁵N translocation from root to shoot when compared to ACC and control plants (Fig. III.32C). In addition, increase of the *BnNrt2.1* transcripts from 72 to 120 h (Fig. III.33A) in AVG treated seedlings was positively correlated with the appearance and the growth of LR (Figs. III.30B and III.33B). In contrast, a negative correlation was found between exploratory root length and *BnNrt2.1* expression levels for ACC and KNO₃ treatments from 48 to 120 h (Fig. III.33B). The expression patterns of the N transporter gene *BnNrt1.1* were very different from the *BnNrt2.1* gene (Fig. III.34). Indeed, *BnNrt1.1* transcript levels showed an opposite expression compared to *BnNrt2.1* during primary root elongation, in the first 48 h of treatments in control- and AVG-treated seedlings (Figs. 9A and 10). The strong inhibition of primary root elongation by ACC treatment (Fig. 1C) during the first 48 h of treatment was also accompanied by a significant

decrease of *BnNrt1.1* expression (Fig. III.34). Thereafter, *BnNrt1.1* expression was not significantly modified between the three treatments and a slight increase in *BnNrt1.1* expression was observed between 72 and 96 h of treatment during the LR emergence and elongation (Fig. III.34).

Discussion

The aim of this study was to establish a relationship between changes in the root absorbing surface (composed of primary root, LRs, and root hairs) and the activity and gene expression in N transport systems. This objective was first approached via characterization of the pharmacological dose effects of ACC and AVG treatments on root elongation of exploratory and root hair systems in oilseed rape; secondly we used $K^{15}NO_3$ isotope measurement of N uptake in relation to long-time (5 d) pharmacological modifications of root architecture with 10 μM ACC and 10 μM AVG root treatments. Indeed, until now, the physiological ethylene-induced cell root responses of these treatments on root absorbing surfaces (primary root, LR, and root hairs) have not been questioned in terms of transporter activity for the uptake of nutrients such as N.

Modulation of Ethylene Biosynthesis by AVG and ACC Up to 1 μM Level Modifies Primary Root and Root Hair Elongation in Oilseed Rape

We have found that the primary root elongation rate showed opposite dose-response curves when longtime (72 h) AVG and ACC treatments were applied exogenously up to the 1 μM concentration level (Fig. III.25A). AVG treatments increased root elongation whereas ACC decreases root length. These data were in agreement with recent results of Le *et al.* (2001, 2004) who reported after short-time experiments in the Arabidopsis that the elongation rate of primary root exposed from 1 to 5 μM ACC (saturating dose) was quickly and severely reduced in a dose-dependent way whereas AVG-treated plant showed an increase in primary root length for the same treatment dose. These results allow us to establish that in oilseed rape a 1 μM dose corresponds to the saturating condition for ACC and that above a 1 μM dose, AVG treatments inhibit metabolic targets other than the ACS enzyme (Fig. III.25B). In addition, we have found the same linear correlation between 24-h primary neo-elongated root length and primary root length for ACC-treated seedlings from 0 to 10 μM dose and AVG-treated seedlings from 0 to 1 μM dose (Fig. III.25C). From a dynamic point of view, this correlation brought convincing evidence that endogenous ACC and/or ethylene levels play a major role on root cell elongation processes. This result is in agreement with recent studies demonstrating the regulatory role of ethylene in root development through auxin biosynthesis, transport, and root distribution (Ruzicka *et al.*, 2007;

Swarup *et al.*, 2007) but also through microtubule reorientation in epidermal root cells during growth (Roberts *et al.*, 1985; Takahashi *et al.*, 2003; Le *et al.*, 2004, Chilley *et al.*, 2006).

Beyond 1 μ M AVG, Changes in Root Architecture Are Not Uniquely Due to ACC Synthase Inhibition But Certainly through a Nonoverlapping Ethylene Pathway

Until now, AVG inhibitory action has been only considered to be specific to ethylene biosynthesis via inhibition of the ACS enzyme (Rando 1974, Satoh and Yang, 1989) but some studies have demonstrated a broader spectrum of action for this xenobiotic molecule (Werck-Reichhart *et al.*, 1988). In fact, AVG is an olifinic Gly analog that inhibits irreversibly PLP (or vitamin B6)-dependent enzymes closely related to the subgroup of I aminotransferases such as Asp aminotransferase (Soper and Manning, 1982; Werck-Reichhart *et al.*, 1988). This group of aminotransferases can also be inhibited by other PLP inhibitors such as allyl-Gly, MSO, and AOA (Bagh *et al.*, 2004). As a consequence there exists a high degree of uncertainty about the targets and specificity of these inhibitors on PLP dependent enzymes especially on N metabolic aminotransferases using PLP as cofactor. Other intriguing and convincing evidences have been provided from *salt overly sensitive4*, and *pyridoxal phosphate synthase1.1 (pdx1.1)* and *pdx1.2* mutants that have been implicated in PLP production in higher plants. These genes encode for a PL kinase and pyridoxine (PLP precursor) biosynthesis proteins, respectively (Chen and Xiong, 2005; Titiz *et al.*, 2006; Wagner *et al.*, 2006), and these two mutants showed the same root hair phenotypes as those induced by AVG treatments (Shi and Zhu, 2002). In consequence, our results were consistent with the view that AVG effects on root development above 1 μ M impaired probably not only the ethylene metabolism via ACS inhibition but also other PLP enzyme activities implicated in N metabolism through an independent and nonoverlapping ethylene pathway. First, inhibition of ethylene pathway at ACC oxidase level by 1 μ M AIBA treatment (a structural analog of ACC; Satoh and Esashi, 1982) impaired less root elongation than 10 μ M AVG treatment (Fig. III.27A). Second, L-Glu was able to restore primary root elongation and root hair length only above 1 μ M AVG dose (Fig. III.27, B and C). Third, Gly and ACC root supplies were unable to restore primary root length and LR number in AVG-treated seedlings (Fig. III.28, A and B). Fourth, AVG inhibition induced biomass and N partitioning in favor of the shoot rather than the root (Figs. III.29, A and B, and III.31A). Taken together, these data demonstrated convincingly that the endogenous L-Glu pool used or produced by the N metabolism PLP enzyme(s) is a key element for normal root elongation. We can also assume that this specific pathway acts upstream from Met synthesis (ethylene precursor) through a nonoverlapping ethylene pathway

Does Glu Issued from N Metabolism Act on Root Elongation Components of Exploratory and Root Hair Systems?

Restoration of primary root and root hair elongation in 3 and 10 μM AVG-treated seedlings by L-Glu (Fig. III.28, A and B) suggests that PLP enzyme(s) of N metabolism that use or produce L-Glu such as transaminases play a central role in elongation of primary root cell files and consequently determination of LR number (Fig. III.31C). This assumption agrees for example with *aat2* (Asp aminotransferase 2) mutants that showed a significant reduction in root growth (Miesak and Coruzzi, 2002). However, there exist in Arabidopsis at least 44 genes encoding aminotransferases (Liepman and Olsen, 2004) that could be potential targets for AVG or other PLP inhibitors. Likewise, recent studies in Arabidopsis reported that L-Glu modulates both mitotic activity in the apical meristem (Li *et al.*, 2006; Walch-Liu *et al.*, 2006) and dynamic elongation of root cell files via the microtubule cytoskeleton (Sivaguru *et al.*, 2003). The very surprising point of our results is that, in our hands, L-Glu root treatment in the presence of AVG displayed an increase in root elongation and presented exactly the opposite root phenotype that has been reported in plants treated with L-Glu alone (Sivaguru *et al.*, 2003; Walch-Liu *et al.*, 2006). Moreover, L-Glu root supply from 100 to 1 mM in oilseed rape did not induce significant reduction of root elongation as reported in Arabidopsis by Walch-Liu *et al.* (2006; Supplemental Fig. III.S35). On the other hand, mutants deficient in highaffinity LYSINE HISTIDINE TRANSPORTER1 (LHT1) that cannot uptake L-Glu from the medium as sole nitrogen source show high-growth defects (Hirner *et al.*, 2007) suggesting that LHT1 instead of GluRs (Glu receptor-like proteins) are probably involved in Glu-root elongation responses. These combined results also suggest that Glu might mediate root-specific growth molecular responses, raising the question of whether Glu cellular concentrations and compartmentation act on root division and/or elongation mechanisms (Qi *et al.*, 2006; Forde and Lea, 2007).

The Increase of Root Hair System Induced by High Concentration of ACC Dramatically Impaired N Uptake via BnNrt2.1 Expression and N Translocation

From our results, it is clear that in ACC-treated seedlings the decrease in their exploratory root system and the increase in root hair number are accompanied by a dramatic decrease instead of an increase in N uptake when compared to AVG and control seedlings (Fig. III.32, A and B). Despite that the root lineic biomass was increased by ACC treatment (Fig. III.30C), these root morphogenetic changes did not impair shoot-root ratio (Fig. III.29A) but impaired N uptake from root (Fig. III.32B) and consequently N accumulation in the shoot (Fig. III.32A). This reduction in N uptake was only accompanied by a decrease in *BnNrt2.1* expression levels (Fig. III.33, A and B) without changes in *BnNrt1.1* (Fig. III.34) suggesting distinct roles and regulation for these two

genes in root architectural development. In other respects, the same overall trend observed in root growth parameters when compared to the control seedlings (Figs. III.29A, III.30, D and E, III.31C, III.32B, and III.33, A and B) pose questions about the effects of high ACC concentrations on plant growth and regulation of the NRT2 protein. Indeed, it is known that high ACC or ethylene concentrations induce severe reduction of growth via inhibition of foliar gas exchange by direct reduction on stomatal conductance and rate of photosynthesis (Pierik *et al.*, 2006). It is also well recognized that ACC treatment dampers the plant growth (Thain *et al.*, 2004; Pierik *et al.*, 2006). Taken together these results suggest clearly that N uptake is coregulated with carbon metabolism. Moreover, the synthesis of this stress hormone is regulated like N uptake in a circadian manner (Malagoli *et al.*, 2004; Thain *et al.*, 2004) and recent work has reported that posttranslational mechanisms are crucial for the fast modulation of NO₃⁻ uptake by NRT2 plasma membrane protein in response to environmental changes (Wirth *et al.*, 2007).

Reduction in Root Architecture by High AVG Concentrations Increased N Uptake and BnNrt2.1 Regulation at Transcriptional and Posttranscriptional Levels

Despite a reduction in exploratory and root hair systems, treatments with a high AVG concentration increased N uptake and ¹⁵N accumulation in comparison to the control plants (Fig. III.32B). This remarkable increase in N uptake after AVG treatment is mainly explained by a posttranscriptional regulation of N transporters probably by a significant translocation of ¹⁵N compounds from root to shoot (Fig. III.32C) that could alleviate the repression exercised by some N products, such as amino acids, on N transporters (Lejay *et al.*, 1999; Forde, 2002). Indeed, despite an increase in transcription from 72 to 120 h of treatment, the transcription level remains too low when compared to control seedlings to explain the high increase in N uptake (Fig. III.33A). Moreover, as observed during ACC treatments these results bring convincing evidence that root hair cells are not the only location of N absorption in the root. Nonhair cells could also be highly involved in N uptake. In this respect, Chopin *et al.* (2007) reported that in Arabidopsis the N transporter *AtNrt2.1* is not specifically targeted to the root plasma membrane of epidermal root cells. Moreover, our results demonstrated that *BnNrt2.1* expression levels for all the treatments were more correlated to the changes of exploratory root system (Fig. III.33B) than the changes of root hair system (Fig. III.26, A and B).

Role of BnNrt2.1 N Transporter in Root Elongation in Relation to N Metabolism

Despite the fact that macronutrients such as N are known to have an important impact on LR elongation (Lopez-Bucio *et al.*, 2003) it is surprising that no mutations of macronutrients (S, P, and N) transport have been directly implicated in the differentiation processes of the LR

primordium (Casimiro *et al.*, 2003; Montiel *et al.*, 2004). Our results on root elongation restoration by L-Glu in AVG-treated plants (Fig. III.28, A and B) pose questions about recent conclusions about the role of N transporters *AtNrt2.1* as a sensor or facilitator in the N signaling specific pathway implicated in LR development (Little *et al.*, 2005; Remans *et al.*, 2006a, 2006b). Thus, it is reported that there is an inhibition of LR primordia initiation in *atnrt2.1* mutants that is independent of N uptake at whole root system (Remans *et al.*, 2006a) suggesting a signaling role of N in root development. Surprisingly, Little *et al.* (2005) reported exactly the reverse phenotype (LR initiation activation) in the *lin1* mutant that carries a missense mutation in the *AtNrt2.1* gene. However, in these two contradictory studies the number of LR is not presented as a function of primary root elongation. Now there exists in Arabidopsis, as in oilseed rape (Fig. III.31C), a similar relationship between primary root length and LR number (Loudet *et al.*, 2005); therefore this correlation could explain the LR number decrease in the *atnrt2.1* mutants. Indeed, a reduction in primary root elongation induced by a decrease in N uptake and subsequently production of L-Glu could be the main reason. Moreover, in our results this correlation was established from pharmacological treatments with only one genotype and not from 150 inbred lines (Loudet *et al.*, 2005) demonstrating that AVG inhibition can modify one or several key steps of N metabolism implicated in root architecture formation. In relation to this, our transcriptional data showed that *BnNrt2.1* expression levels were markedly different between ACC (ethylene metabolism activation)- and AVG (N metabolism inhibition)-treated seedlings (Fig. III.33A).

Role of BnNrt1.1 N Transporter in Root Elongation in Relation to Ethylene Metabolism

In comparison to *BnNrt2.1*, *BnNrt1.1* expression pattern was quite different during the time course of experiment (Figs. III.33A and III.34) and no correlation can be drawn between *BnNrt1.1* expression level and exploratory root length. In control- and AVG-treated seedlings, *BnNrt1.1* transcript levels showed an opposite expression compared to *BnNrt2.1* during the first 48 h of treatments suggesting that transport function of *BnNrt1.1* during primary root elongation could be independent of N uptake or N metabolism (Figs. III.32A and III.33). Furthermore, *BnNrt1.1* expression was significantly decreased by ACC treatment during the first 48 h of primary root elongation and showed a slight increase during LR appearance and elongation from 72 to 96 h for all the treatments (Fig. III.34). Taken together, these data revealed that *BnNrt1.1* is clearly involved in the root elongation process through a function that could be precociously modified by ethylene (Zhang *et al.*, 2007). These results were consistent with the results of Guo *et al.* (2001) in Arabidopsis who reported by using *Nrt1.1*-GFP/GUS constructs that the strongest expression of *AtNrt1.1* was found in the growing tips of primary root and LR in the first few days after germination. Likewise, *atnrt1.1* mutants were impaired in primary root and LR development

during elongation and activation of the root meristems independently of the N uptake capacities and nitrogen source (Guo *et al.*, 2001; Remans *et al.*, 2006b). The activation and function of the Nrt1.1 gene as N transporter during growth of nascent organs such as root tips is not clear (Guo *et al.*, 2001). In fact, the BnNrt1.1 gene belongs not only to the NRT (N transporter) family but also to the PTR (di/tripeptide transporter) family whose members can transport di- or tripeptide, such as g-glutamyl-Cys and glutathione (GSH), but also indole-3-acetic acid/amino acid conjugates (Tsay *et al.*, 2007). Moreover, GSH and auxin are the main components involved in the G1-S transition in dividing root cells (Den Boer and Murray, 2000), and GSH levels are essential for initiation and maintenance of cell division in root elongation (Sanchez-Fernandez *et al.*, 1997; Vernoux *et al.*, 2000). Because ethylene up-regulates auxin biosynthesis in Arabidopsis seedling conducting to the inhibition of root cell elongation (Ruzicka *et al.*, 2007; Swarup *et al.*, 2007), it is tempting to speculate that Nrt1.1 expression changes induced by ACC treatments during root elongation could be linked directly or indirectly to GSH or auxin conjugates transport. In conclusion, our investigation of the elongation component of root by activation or inhibition of the ethylene metabolic pathway in relation to N uptake has revealed that some PLP enzyme(s) of N metabolism that use or produce L-Glu could play a central role in root elongation and N uptake. Indeed, the restoration of AVG-treated seedlings by L-Glu supply to the medium suggests that L-Glu acts upstream from hormonal pathways but probably downstream from highaffinity N transporters of the NRT2 family and brings convincing evidence that L-Glu acts as a major endogenous signal in root elongation and N allocation between root and shoot. In addition, BnNrt2.1 expression levels for all the treatments were more correlated to the elongation changes of the exploratory root system than the changes of the root hair system. The N transport function of BnNrt1.1 is less evident and seems to depend on hormonal regulation of root elongation and LR differentiation. In this context, a key challenge for future research will be first to elucidate the role of PLP enzymes of N metabolism that use or produce L-Glu (such as root transaminases) by using pharmacological and genetic approaches on specific targets.

Materials and Methods

Plant Material and Growth Conditions

Oilseed rape seeds (*Brassica napus* 'Capitol') were used. The seeds were sterilized with 20% hypochlorite solution (v/v) for 3 min, followed by three rinses in sterile water. The disinfected seeds were placed on imbibed filter paper saturated with sterile water within petri dishes (24 x 24 cm) for 48 h in the dark at room temperature. The germinated seeds were then selected from their radicle length (5–6mm) and four or five seedlings were transferred on new petri dishes (12 x 12 cm), filled up with 50 mL of solidified culture medium supplemented with or without activator or inhibitor of ethylene biosynthesis, and half-sealed with adhesive tape. Culture solution (50mL per Petri dish) was used for seedlings culture consisting of 0.4mMKH₂PO₄, 0.15mMK₂HPO₄, 1mM K₂SO₄, 0.5 mM MgSO₄, 3 mM CaCl₂, 0.2 mM Fe-Na EDTA, 14 mM H₃B₀₃, 5 mM MnSO₄, 3 mM ZnSO₄, 0.7 mM CuSO₄, 0.7 mM (NH₄)₆Mo₇O₂₄, and 0.1 mM CoCl₂ and solidified with 0.8% (w/v) agar (A-7002; Sigma), pH 6.75. The dishes were placed vertically in a growth chamber at 22°C under 16-h/8-h light/dark regime with a light intensity of 145 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 70% relative humidity.

Application of the Ethylene Biosynthesis Activator or Inhibitor

ACC (A-3903; Sigma), AIBA (850993; Sigma), and AVG (A-1284; Sigma) were dissolved in sterile distilled water to a final stock concentration of 10 and 100 mM and stored at 4°C, respectively. Chemicals were added to 50 mL autoclaved culture medium with 1 mM N in a falcon tube at 45 to 50°C, mixed, and then poured in petri dishes under laminar sterile air flux. Two-day-old germinated seedlings were grown in the vertical agar plates for 3 or 5 d before root morphometric measurements, ¹⁵N labeling, and molecular analyses were undertaken.

Exploratory and Root Hair System Morphometric Analyses

The primary root elongation of 3-d-old treated seedlings with different concentrations of AVG and ACC was only measured for the last 24 h of treatment with a ruler (approximately 24-h neo-elongated primary root). For each dose of treatment, 20 seedlings were treated. Among the 20 seedlings, six showing the same value of primary root elongation than the elongation mean value were chosen for measurement of root hairs length and number. From these six seedlings, the 12 longest root hairs and the total number of root hairs were measured within the primary hemiroot region of 3-mm length at the top of the last 24-h neo-elongated primary root (see experimental procedure in Fig. III.25A). Root hairs length and number were measured under a light microscope (CME; Leica) at 40x magnification equipped with a camera (TK- C1481BEG; JVC) and video

imaging system (PVM-20L1; Sony Trinitron). Treatment effects of 10 μM ACC and 10 μM AVG were examined during 5 d to quantify modifications of the exploratory root system (primary and LR). The three replicated agar plates of four seedlings used for each treatment were photocopied (KM-2030; Kyocera Mita) every day. Daily differences in primary root and LR lengths were obtained by superimposing two successively dated photocopies of the growth on a light bench and determined by a map measurer with a revolution counter (Wedo).

Net K^{15}NO_3 Uptake and Isotope Analysis

Three sets of germinated seeds for each treatment (10 μM AVG, 10 μM ACC, and 1 mM KNO_3) composed of three replicates of four seedlings were transferred into agar plates for different durations (0, 24, 48, 72, 96, and 120 h). For measurement of cumulative uptake during each point of this time series, the medium was supplemented with K^{15}NO_3 (atom % ^{15}N , 1%). At each sampling time, photocopies of each agar plate from the three replicates were made before washing the roots in 1 mM CaSO_4 solution for 1 min at room temperature and then harvesting the roots and shoots separately into 2-mL Eppendorf tubes. The FW of organs was measured before drying for 48 h at 60°C. After drying, organ dry weight was measured and then the shoots and roots were ground separately for 2 min to fine powder with inox beads of 0.4- mm diameter in an oscillating grinder (mixer mill MM301; Retsch) before isotope analysis. The ^{15}N content (mg ^{15}N per plant) was determined for roots, shoots, and seedlings. The ^{15}N analyses were performed using an analyzer (EA 300; Eurovector) coupled with a mass spectrometer (isoprime mass spectrometer; GV Instrument).

RNA Isolation and Quantitative RT-PCR Analysis

For a given date of treatment, total RNA was extracted from 200 to 400 mg of root fresh matter corresponding to three sets of seedlings for each treatment (10 μM AVG, 10 μM ACC, and 1 mM KNO_3) composed of four replicates of four seedlings. Fresh root samples frozen in 2-mL Eppendorf tubes in liquid nitrogen were ground for 1 min and 30 s with stainless steel beads of 0.4-mm diameter in an oscillating grinder (mixer mill MM301; Retsch). The resulting powder was suspended in 750 mL of extraction buffer (0.1 M Tris, 0.1 LiCl, 0.01 M EDTA, 1% SDS [w/v], pH8) and 750 mL of hot phenol (80°C, pH 4). This mixture was vortexed for 30 s. After addition of 750 mL of chloroform/ isoamylalcohol (24:1), the homogenate was centrifuged (15,000g, 5 min, 4°C). The supernatant was transferred into 4 M LiCl solution (w/v) and incubated overnight at 4°C. After centrifugation (15,000g, 30 min, 4°C), the pellet was suspended in 250 mL of sterile water. Fifty microliters of 3 M sodium acetate (pH 5.6) and 1 mL of 96% ethanol were added to precipitate the total RNA for 1 h at -80°C. After centrifugation (15,000g, 20 min, 4°C), the pellet

was washed with 1mL of 70% ethanol, then centrifuged at 15,000g for 5 min at 4°C. The resulting pellet was dried for 5min at room temperature and resuspended in sterile water containing 0.1% SDS and 20 mM EDTA. Quantification of total RNA was performed by spectrophotometer at 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf) before RT-PCR analysis. For RT, 1 mg of total RNA was converted to cDNA with an iScript cDNA synthesis kit using the manufacturer's protocol (Bio-Rad). The genes and specific primers selected for the analysis were the following: *EF1-α* (housekeeping gene; F, 5'-tttcgagggtgacaacatga; R, 5'-ccgttccaataaccaccaate); *BnNrt2.1* (F, 5'-tggtggaataggcggtcagtg; R, 5'-gtatacgtttgggtcattgccat); and *BnNrt1.1* (F, 5'-atggaaccgaagtgccttg; R, 5'-tgattccagctgttgaagc). The subsequent PCR reactions were performed with 4 mL of 200x diluted cDNA, 500 nM of the primers, 1xSYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad) in a total volume of 15 mL. The specificity of PCR amplification was examined by monitoring the melting curves after quantitative PCR reactions using the Chromo4 system (Bio-Rad) and by sequencing the quantitative PCR product to confirm that the correct amplicons were produced from each pair of primers (Biofidal). Comparative relative expression of the various genes was determined using the delta-delta Ct method employing the formula: relative expression = $2^{-[\Delta Ct \text{ sample} - \Delta Ct \text{ control}]}$ where Ct refers to the threshold cycle, sample indicates the gene of interest, and control indicates the endogenous housekeeping gene (Livak and Schmittgen, 2001).

Sequence data from this article can be found in the GenBank/EMBL data libraries under accession numbers DQ312264, AJ293028, and AJ278966.

Supplemental Data

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

Supplemental Figure S35. Effects of L-Glu or L-Gly treatment doses on 24-h neo-elongated primary roots of oilseed rape seedlings under homogeneous feeding of N (1 mM) on agarose gel (n = 12–16 seedlings).

Acknowledgments

We thank Professors C. Huault and J.P. Billard of Caen University for critical reading of this manuscript. The authors are grateful to J. Cliquet for permitting us to use the Leica microscope analysis system and to S. Reze' and M.-P. Henry for their technical assistance in quantitative RT-PCR and ¹⁵N analyses.

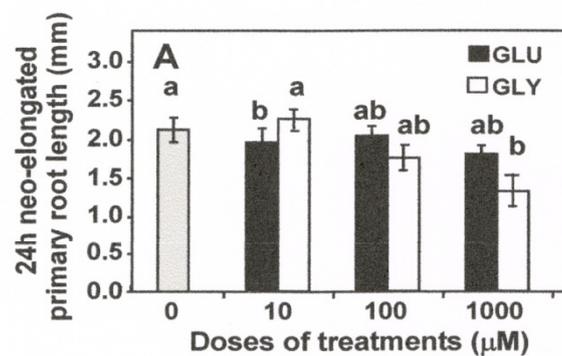


Figure III.S35: Effects of L-glutamate or L-glycine treatment doses on 24 h neoelongated primary roots of *Brassica napus* seedlings under homogeneous feeding of nitrate (1 mM) on agarose gel (n= 12-16 seedlings). See Fig.1A to get experimental procedure used to measure 24 h old neo-elongated primary root after treatments. Data were analysed by the non parametric test of Kruskall Wallis. Then, Mood median test have been used to compare means or medians; bars sharing different letters are significantly different at P = 0.05 (Sokal and Rohlf, 2003).

Supplemental data III.S35: Leblanc *et al.*, (2008)
Plant Physiology

C.6. Principaux résultats obtenus

C.6.1. Les fortes concentrations d'ACC et d'AVG réduisent la croissance du système racinaire exploratoire mais modifient de manière opposée la croissance du système racinaire absorbant (poils absorbant).

Si les traitements à l'aide de 10 μM l'ACC et l'AVG réduisent fortement le système racinaire exploratoire par 70 et 50 % respectivement. En revanche, ils présentent un effet opposé sur le système absorbant. L'augmentation des concentrations d'ACC de 0,1 à 10 μM induit une augmentation de la longueur et du nombre de poils absorbant. A l'inverse, l'augmentation des concentrations d'AVG de 0,1 à 10 μM induit une forte baisse du nombre et de la longueur des poils absorbants. Ces résultats sont conformes aux résultats obtenus précédemment chez *Arabidopsis* après le même type de traitements (Le *et al.*, 2001). L'approche pharmacologique utilisée permet donc de moduler la surface absorbante du système racinaire en modifiant profondément les systèmes racinaires exploratoire et absorbant.

C.6.2. Les poils absorbants ne sont pas le siège unique de l'absorption racinaire de nitrate

Bien que le traitement par 10 μM d'AVG réduise considérablement la surface absorbante (système exploratoire et nombre de poils absorbants), l'absorption de $^{15}\text{NO}_3^-$ n'est pas modifiée par rapport au témoin (non traité). Ces résultats montrent qu'il existe un phénomène de compensation pour l'absorption du nitrate et que celui-ci n'est pas dépendant du nombre de poils absorbants. Les poils absorbants ne sont donc pas le siège unique de l'absorption racinaire de nitrate. Les cellules épidermiques atrichoblastes sont donc également capables d'une forte activité d'absorption de nitrate. A l'inverse, lors du traitement par 10 μM d'ACC, l'augmentation du nombre et de la longueur des poils absorbants sont liés à une forte réduction de l'absorption suggérant que l'ACC pouvait modifier également l'activité des transporteurs de nitrate. Nous avons ensuite cherché à savoir : quel(s) transporteur(s) de nitrate étai(en)t impliqué dans ces réponses ?

C.6.3. Lors de la réduction de la surface racinaire absorbante, l'absorption compensatoire de $K^{15}NO_3$ est associée avec l'augmentation de l'expression du transporteur BnNRT2.1

Les variations d'expression des transporteurs BnNRT2.1 et BnNRT1.1 au cours des 5 jours de traitement par 10 μM d'AVG ou 10 μM d'ACC ont montré que seule l'expression du transporteur BnNRT2.1 était corrélée linéairement et positivement avec les variations de longueur du système racinaire exploratoire. Ainsi, l'expression de *BnNrt2.1* augmentait de façon compensatoire en réponse à la réduction de longueur du système exploratoire induit par l'AVG alors qu'elle baissait en réponse à la réduction de longueur du système exploratoire induit par l'ACC. Cependant lors du traitement AVG, l'induction de la transcription du gène *BnNRT2.1* ne semblait pas suffisante pour expliquer la compensation pour l'absorption du nitrate suggérant également la présence d'une régulation post-transcriptionnelle du transporteur NRT2.1.

L'analyse des profils d'expression du gène *BnNrt1.1* ne montrait quant à elle aucune différence significative entre les traitements et le témoin. Cependant, une augmentation d'expression des transcrits *BnNrt1.1* était observée lors de l'apparition des racines latérales suggérant l'implication du transporteur BnNRT1.1 dans ce processus.

C.6.4. L'AVG n'inhibe pas seulement la voie de biosynthèse de l'éthylène mais inhibe également d'autres transaminases et modifie par conséquent le métabolisme de l'azote

La stratégie pharmacologique utilisée à l'aide de l'AVG reposait sur une inhibition ciblée de l'ACC synthétase (Adams et Yang, 1979 ; Hanson et Kende, 1976 ; Rando, 1974 ; Satoh et Yang, 1989). Cependant une étude approfondie de la littérature a montré que l'AVG n'est pas spécifique de l'ACC synthétase mais est capable d'inhiber un large spectre d'enzymes qui nécessitent le phosphate de pyridoxal comme cofacteur (Werck-Reichhart, *et al.*, 1988). En effet l'AVG est un analogue oléfinique de la glycine qui inhibe de nombreuses transaminases. Or l'ACC synthétase appartient au sous groupe I des aminotransférases auquel appartient notamment l'aspartate transaminase (Metha *et al.*, 1993). De plus, l'AVG inhibe également des enzymes de la voie de biosynthèse de l'auxine comme la tryptophane aminotransférase qui nécessitent le PLP comme co-facteur (Shi et Zhu, 2002 ; Soeno *et al.*, 2010). En conséquence, il était raisonnable de supposer que dans nos conditions, l'AVG pouvait non seulement inhiber le métabolisme de l'éthylène et la synthèse d'auxine mais également le métabolisme de l'azote *via* les interconversions entre les acides aminés. Nous avons donc testé cette hypothèse de deux

manières. Dans un premier temps, nous avons co-traité les plantules par 10 μ M d'AVG et 1 mM de K-L-glutamate. En effet, le glutamate est la plaque tournante de l'azote dans la plante puisqu'il est à l'origine de nombreux acides aminés par transamination. Le traitement des plantules par 1 mM de K-L-glutamate a induit une restauration presque totale de la longueur des systèmes exploratoire et absorbant des plantules confirmant que le traitement AVG modifiait bien le métabolisme de l'azote. Dans un deuxième temps, nous avons comparé les profils des concentrations en acides aminés libres du témoin et des traitements ACC et AVG. L'analyse UPLC a révélé une baisse significative des concentrations de certains acides aminés libres comme l'aspartate chez les plantules traitées par l'AVG reconfirmant que l'AVG modifiait bien le métabolisme de l'azote.

C.7. Conclusions et perspectives

Les résultats ont montré que les variations de la surface absorbante (structure) induite par la modification du métabolisme de l'éthylène modifient de façon significative l'absorption du nitrate (fonction). Ainsi, les résultats ont révélé que **les poils absorbants ne sont pas à eux seuls le siège unique de l'absorption du nitrate**. Ils confirment donc les données récentes qui montrent que le transporteur AtNRT2.1 est aussi bien adressé à la membrane plasmique des poils absorbants qu'à celle des autres cellules épidermiques racinaires (Chopin *et al.*, 2007). Par ailleurs, le fait que seule l'expression du gène *BnNrt2.1* intervient dans les phénomènes de compensation ou d'inhibition de l'absorption du nitrate lors des traitements AVG et ACC apparaît doublement cohérent. D'une part, avec la localisation du transporteur AtNRT2.1 dans les assises épidermiques et corticales de la racine mature d'*Arabidopsis* (Guo *et al.*, 2001 et 2002 ; Remans *et al.*, 2006a, Girin *et al.*, 2007) et d'autre part, avec la corrélation positive que nous avons obtenue précédemment entre les variations d'expression de *BnNrt2.1* et les variations de longueur du système racinaire (cf. : Résultats A et B). En revanche, l'absence de variations significatives du gène *BnNrt1.1* entre les traitements et son augmentation entre 48 et 72 heures lors de la mise en place des racines latérales laissent supposer un rôle du transporteur NRT1.1 dans le transport de l'auxine. Cette hypothèse a depuis été validée par Krouk *et al.* (2010).

L'interaction possible dans les réponses induites par l'AVG avec le métabolisme de l'azote et la synthèse d'auxine, nous incite à beaucoup de prudence dans l'interprétation des résultats obtenus lors du traitement AVG. En effet, il est acquis que les acides aminés endogènes et le statut N exercent un rétro-contrôle négatif sur l'activité et l'expression du transporteur AtNRT2.1 (Lejay *et al.*, 1999). En conséquence, afin de confirmer les résultats et d'éviter des effets secondaires indésirables, nous avons préféré refaire l'expérimentation en utilisant à la place de

l'AVG, l'acide α -aminoisobutyrique (AIBA). L'AIBA est un analogue structural de l'ACC qui inhibe spécifiquement la seconde enzyme de la voie de biosynthèse de l'éthylène : l'ACC oxydase (Satho et Isachi, 1982; Satho et yang, 1989). En conséquence, l'emploi de l'AIBA présente moins de risque d'effets secondaires que l'AVG (Leblanc *et al.*, 2008 ; Soeno *et al.*, 2010).

D. Quel est l'impact d'un changement de la surface racinaire sur l'absorption du $K^{15}NO_3$ en réponse aux modifications d'élongation racinaire induites par la modulation de la synthèse d'éthylène à l'aide de l'AIBA et de l'ACC ?

D.1. Contexte scientifique

La stratégie pharmacologique utilisée précédemment pour pouvoir étudier l'impact d'une modification rapide et significative de l'architecture racinaire (structure) sur l'absorption du nitrate (fonction) nous incite à beaucoup de prudence dans l'interprétation des résultats. En effet, nous avons montré à l'aide d'un traitement par le L-glutamate qu'il existait une interaction entre les réponses morphologiques racinaires induites par l'AVG avec le métabolisme de l'azote. Sans présumer du type d'interaction métabolique et/ou signalétique en cause, il nous a semblé opportun de refaire l'expérimentation précédente en choisissant un nouvel inhibiteur de la voie de biosynthèse de l'éthylène n'entrant pas en interaction avec le métabolisme de l'azote.

Un examen approfondi de la littérature a montré que les autres inhibiteurs connus de l'ACC synthétase comme l'acide amino-oxy acétique (AOA), la canaline, la rhizobitoxine, la méthoxyvinylglycine, la gabaculine, l'allylglycine inhibaient les activités du même spectre d'aminotransférases et risquaient à nouveau d'interférer avec le métabolisme de l'N (Satoh et Esashi, 1982; Satoh et Yang, 1989 ; Soeno *et al.*, 2010). Nous avons donc recherché des inhibiteurs spécifiques de l'ACC oxydase, deuxième enzyme de la voie de biosynthèse de l'éthylène. Parmi les deux inhibiteurs identifiés possibles : le chlorure de cobalt ($CoCl_2$) et l'acide α -aminoisobutyrique (AIBA), nous avons retenu l'AIBA (Lau et Yang, 1976 ; Satoh et Esashi, 1982 ; Satoh et Yang, 1989 ; Soeno *et al.*, 2010). L'AIBA est un analogue structural de l'ACC qui inhibe spécifiquement l'ACC oxydase et dont l'emploi nous semble présenter moins de risques d'effets secondaires que le chlorure de cobalt (Simon *et al.*, 2004, communication personnelle; Leblanc *et al.*, 2008; Soeno *et al.*, 2010). En effet, un traitement comparatif entre les effets de différentes concentrations d'AIBA et d'AVG sur l'élongation de la racine primaire a montré que dans la gamme de concentrations de 0,1 à 1 μM , l'élongation racinaire est stimulée de façon similaire par les traitements AVG et AIBA (Leblanc *et al.*, 2008). De plus, ces résultats sont conformes aux données sur *Arabidopsis* montrant le même type de résultats entre 1 et 5 μM (Le *et al.*, 2001).

Contrairement à notre démarche pharmacologique précédente consistant à comparer les capacités d'absorption de deux architectures racinaires contrastées en termes de systèmes

exploratoire et absorbant, nous avons cherché cette fois à faire varier l'élongation du système exploratoire dans une gamme la plus large possible. L'idée étant de mettre en évidence les réponses physiologiques et métaboliques affectées par la variation progressive de la longueur racinaire.

D.2. Hypothèses de travail

Dans ce contexte, nos deux objectifs principaux étaient : (i) d'examiner l'impact d'une modification de la structure racinaire : variation de la surface absorbante sur l'absorption du nitrate et (ii) d'étudier si une relation entre le métabolisme de l'azote et les variations du système racinaire exploratoire pouvait être établies lorsque le métabolisme N n'était pas directement affecté par les traitements utilisés. En d'autres termes, d'établir un lien entre les métabolismes de l'éthylène et de l'auxine avec le métabolisme de l'azote. Ces deux objectifs reposaient sur l'hypothèse de travail suivante : **toute modification importante de la surface racinaire devrait modifier l'absorption du nitrate via des changements d'expression spécifiques des transporteurs NRT2.1 et NRT1.1.**

D.3. Stratégies expérimentales

Afin de vérifier ces hypothèses, notre stratégie expérimentale a consisté à modifier la croissance du système racinaire exploratoire (racine I et II) en modulant le métabolisme de l'éthylène à l'aide de l'ACC et de l'AIBA en présence de 1 mM nitrate. Les modifications du système racinaire exploratoire ont été caractérisées pour deux concentrations d'AIBA (0,1 et 0,5 μM) et 3 concentrations d'ACC (0,1 ; 1 et 10 μM). Le traitement témoin consistant à traiter les plantules par 1 mM nitrate. Ces six doses de traitement nous ont permis d'induire une variation importante et progressive de longueur du système exploratoire. Dès lors, il était possible d'atteindre les objectifs assignés et de vérifier les hypothèses de travail.

D.4. Méthodologies utilisées

De même que pour les précédentes expérimentations, les mesures d'absorption du nitrate sont réalisées à l'aide d'un marquage du nitrate avec l'isotope stable ^{15}N en utilisant un analyseur élémentaire (EA 300; Eurovector) couplé avec un spectromètre de masse IRMS (Isotopic Ratio Mass Spectrometry; GV Instrument). Les mesures d'absorption NO_3^- ont été réalisées au bout de cinq jours de traitement sur des plantules cultivées en gel d'agarose traitées par les différentes concentrations d'AIBA et d'ACC en présence de 1 mM de K^{15}NO_3 (1% d'atome de ^{15}N).

L'évolution de la longueur du système racinaire en fonction des traitements a également été suivie à l'aide d'un scanner numérique, puis analysée avec le logiciel Winrhizo.

Les variations des profils d'expression en fonction des traitements des gènes codant les transporteurs de nitrate intervenant de façon majeure dans l'absorption de nitrate : BnNRT1.1 et BnNRT2.1 ont été analysées par Q-PCR quantitative. L'échantillonnage des plantules a toujours été réalisé aux mêmes heures de la journée afin d'éviter d'introduire un biais dans les valeurs de transcription due à la variabilité nyctémérale de l'expression des transporteurs nitrate.

D.5. Article 4

Modulation of ethylene biosynthesis by ACC and AIBA revealed structural and functional relationship between changes in $K^{15}NO_3$ uptake and root absorbing surfaces

Lucille Lemaire¹², Antonin Leblanc¹², Carole Deleu³⁴, Erwan Le Deunff^{12*}

¹Université de Caen Basse-Normandie, UMR EVA, F-14032 Caen cedex, France

²INRA, UMR 950, Écophysiologie Végétale & Agronomie Nutrition NCS, F-14032 Caen cedex, France

³Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, UMR IGEPP, F-35042 Rennes cedex, France

⁴INRA, UMR 1349, Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes (IGEPP)
Domaine de la Motte - BP 35327 – F-35 653 LE RHEU CEDEX France

*Corresponding author, e-mail: erwan.ledeunff@unicaen.fr;

fax: (33) (0)2 31 56 53 60.

Running title: **Relationship between $^{15}NO_3^-$ uptake and root elongation changes**

Abstract

The modification of root traits such as exploratory and root hair systems in relation with nitrate uptake represent a possible source for improvement of nitrogen uptake efficiency. Because ethylene signalling rapidly modulated the root exploratory and root hair growth (min to hours), a pharmacological approach to decipher the relationships between root elongation and N uptake capacities was used. Rape seedlings growing in agar plates were supplied during 5 days with 1mM of $K^{15}NO_3$ and treated with different concentrations of the ethylene precursor: ACC (0.1, 1 and 10 μ M) and the ethylene biosynthesis inhibitor: AIBA (0.5 and 1 μ M). The highest concentrations used of AIBA and ACC induced a variation by 8 in the elongation of the exploratory root system. This variation in root elongation was exponentially correlated with N uptake capacities ($r = 0.99$). Thus, the highest root lengths induced by AIBA presented the lowest nitrate uptake rate whereas the lowest root lengths induced by ACC were overcompensated by nitrate uptake rate and *BnNrt2.1* and *BnNrt1.1* expression. However, these overcompensations were unable to restore normal shoots and root growth. Moreover, the daily root elongation changes between treatments were explained by the N resource acquisition history demonstrating that ethylene signalling was also involved in nitrate uptake regulation. From the correlations found between Asp concentrations in the root and shoots with root length and N status between treatments possible interactions between ethylene and N metabolisms are discussed.

Keywords: *Brassica napus*, nitrate uptake, ethylene signaling, root elongation, shoot growth, NRT2.1 and NRT1.1 nitrate transporters

Introduction

The improvement of macronutrient acquisition efficiency (such as K, P and N) in low-fertility soils constitutes one of the major goals of breeding programs to answer to the reduction of fertilization inputs and the increase of nutrient use efficiency (Lynch, 2007; Hirel *et al.*, 2007). In consequence, in the next few years, traits responsible for root architecture changes will be the most important to improve soil exploration and nutrient acquisition. Macronutrients availability (Lopez-Bucio, 2003; Little *et al.*, 2006; Remans *et al.*, 2006a and b; Le Ny *et al.*, 2013) as well as hormone treatments or hormone biosynthesis mutants (Casson and Lindsey, 2003; Casimiro *et al.*, 2003) modified root architectural traits but emerging literature just begins to establish the nature of the relationships between hormone and macronutrient signaling (Armengaud *et al.*, 2005; Lopez-Bucio *et al.*, 2002, Fitter *et al.*, 2002, Perez-Torres *et al.*, 2008; Nero *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2009; Krouk *et al.*, 2010). Recent transcriptomic studies have revealed that auxin, ethylene and cytokinin are implicated in root architectural responses to nitrate (Sakakibara, 2003; Vidal *et al.*, 2010; Leblanc *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2009) and could play a signaling role between roots and shoots development (Forde 2002, Forde and Walch-Liu, 2009).

Despite the role of ethylene in auxin synthesis, transport and repartition along the root have been clearly established (Stepanova *et al.*, 2005; Swarup *et al.*, 2007; Ruzicka *et al.*, 2007), few studies have been carried out to measure the impact of pharmacological treatments or genetic modifications in ethylene synthesis and signalling in macronutrient acquisition such as nitrate (Leblanc *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2009). These genetic and pharmacological studies highlight the regulatory role of ethylene in nitrate-dependent root development by modulating nitrate transporters *Nrt1.1* and *Nrt2.1* expression. Thus, *etr1-3* and *ein2-1* mutant in ethylene signalling show insensitivity to high nitrate concentration (Tian *et al.*, 2009). These results were confirmed by pharmacological treatments with 1-aminocyclopropane-1 carboxylic acid (ACC): the ethylene precursor and aminoethoxyvinylglycine (AVG): an inhibitor of ACC synthase (ACS) used to modulate ethylene biosynthesis and signalling. However, compared to mutant approach, pharmacological results have to take into account with caution because second targets or products of the inhibitors and activators used are also biologically relevant.

Thus, several authors have demonstrated that ACS inhibitors such as AVG treatment impair not only ethylene synthesis but also auxin synthesis and amino acids metabolism (Leblanc *et al.*, 2008; Beauclair *et al.*, 2009; Soeno *et al.*, 2010). Indeed, AVG is a suicide inhibitor of many PLP-dependent enzymes that belongs to the subgroup I of aminotransferases such as ACC synthetase (ACS) and Trp aminotransferase, the first enzyme of ethylene biosynthesis and the main enzymes

in AIA biosynthesis from L-tryptophan, respectively (Werck-Reichart *et al.*, 1988, Soeno *et al.*, 2010). This non-specific inhibition of AVG treatment on ACS was demonstrated by the restoration effect in root elongation in AVG treated seedlings by 1mM potassium glutamate treatment (Leblanc *et al.*, 2008). Similar inhibition and restoration effects on root growth were also obtained by using methionine sulfoximine (MSX), another PLP-enzyme inhibitor, alone or in co-treatment with 5mM glutamine (Gifford *et al.*, 2008).

Likewise, recent study has shown that morphological modifications induced by treatment with ethylene biosynthesis precursor ACC result from cyanide (HCN) production and its metabolic effects. Indeed, HCN is stoichiometrically produced during oxidation of ACC by ACC oxidase (ACO) to form ethylene (Peiser *et al.*, 1984; Wang *et al.*, 2002). Recent studies with *cys-cl* mutant of β -cyanoalanine synthase involved in cyanide detoxification have demonstrated that cyanide accumulation acts as a repressive signal for several genes encoding enzymes involved in cell wall rebuilding during root elongation and root hair tip (Garcia *et al.*, 2010). Thus, we cannot preclude the possibility that changes observed in *BnNrt2.1* and *BnNRT1.1* transcription levels induced by ACC treatment are, in fact, side effects of cyanide metabolism (Leblanc *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2009).

Accordingly, simultaneous inhibition of both ethylene and nitrogen metabolisms by ACC and AVG treatments cannot allow clear conclusion about ethylene-induced root elongation changes on nitrate uptake and nitrate transporters expression. In order to avoid nitrogen metabolism inhibition during modulation of ethylene biosynthesis by AVG, we have used another ethylene biosynthesis inhibitor: aminoisobutyric acid (AIBA). This inhibitor is a structural analog of ACC (ethylene precursor) and inhibits specifically the activity of ACO, the second enzyme of ethylene biosynthesis pathway that produces ethylene and cyanide (Satoh and Esashi, 1982; Liu *et al.*, 1984).

In this study, we investigated the impact of root architecture modifications (structure) on nitrate uptake regulation (function). We reexamined whether the elongation changes of exploratory and root hair systems induced by ethylene biosynthesis modulation by AIBA and ACC treatments affect nitrate uptake and *BnNRT* genes expression. The results show evidence for the existence of compensatory effect for the nitrate uptake and expression of nitrate transporters genes *BnNrt2.1* and *BnNrt1.1* when growth of both the exploratory and root hair systems are altered after five days of treatment by AIBA and ACC.

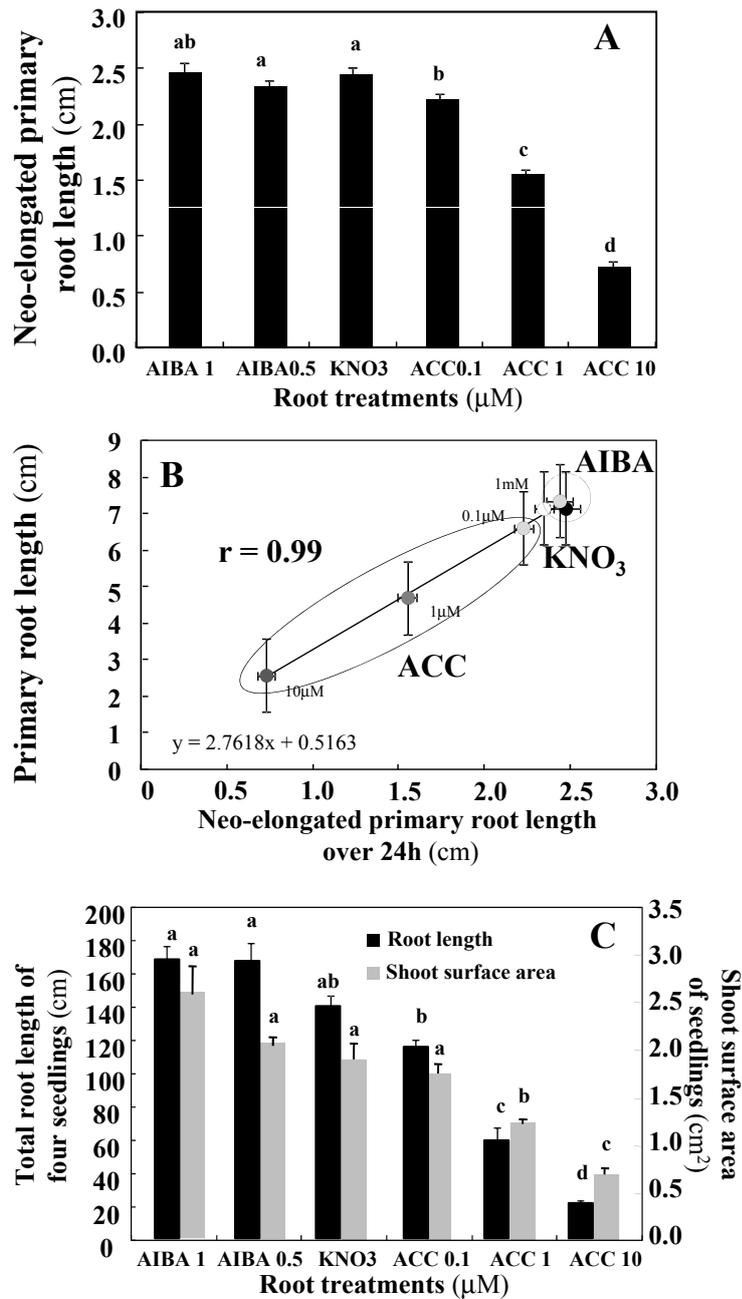


Figure III.36: Effects of AIBA or ACC treatment doses on **A)** 24 h neoelongated primary root length, **B)** relationship between primary root length and neo-elongated root length and **C)** total root length and shoot surface of *Brassica napus* seedlings under homogeneous feeding of nitrate (1 mM) on agarose gel (n= 12-16 seedlings). Data were analysed by the non parametric test of Kruskal Wallis. Then, Mood median test have been used to compare means or medians; bars sharing different letters are significantly different at P = 0.05.

Fig. III.36: Lemaire *et al.* (2013)

Results

Pharmacological modulation of ethylene biosynthesis by ACC and AIBA modifies elongation of the primary root and the exploratory root system

Changes in primary and exploratory root systems were examined on 2-days-old seedlings growing on vertical agar plates under homogeneous supply of 1mM K¹⁵NO₃ after short- (24 hours) or long-term treatment (120 hours) with different concentrations of the ethylene precursor: 1-aminocyclopropane-1 carboxylic acid (ACC) or an inhibitor of ethylene biosynthesis: aminoisobutyric acid (AIBA). After 24 hours of ACC treatments, elongation of primary root length was reduced in a dose dependent way whereas treatments with AIBA did not change significantly primary root length compared to the control (Fig. III.36A and B). However, in long-term treatments, the effects of both treatments were more pronounced on root elongation and shoot expansion (Fig. III.36C). Compared to control, the length of the exploratory root system (primary and lateral roots) was significantly increased in AIBA treated seedlings whereas it was strongly reduced in ACC treated seedlings (Fig. III.36C). Accordingly, the difference in the exploratory root length between the highest doses of AIBA and ACC was about eight times.

AIBA treatments has no effect on N metabolism compared to AVG inhibitor

Root treatments with ACC and AIBA induce an opposite effect on the elongation of the exploratory root system. These effects were observed in the short-term after 24 hours of treatment and were amplified in long-term after 5 days of treatment (Fig. III.36A and C). Ethylene modulation by ACC and AIBA allows varying absorptive surface of the exploratory root system in a very wide range and studying the impact of root architecture modification (structure) on nitrate uptake regulation (function). Comparison of root and shoot AA profiling between KNO₃ (control) and AIBA and AVG treatments demonstrates that AIBA has no effect on the root and shoot N metabolism unlike AVG treatment (Table III.3). This physiological situation allows studying more precisely the impact of ethylene metabolism modulation on changes in N metabolism such as modifications of endogenous AA concentrations in the shoots and roots.

Ethylene biosynthesis modulation by ACC and AIBA affects C partitioning pattern between the roots and shoots

To further investigate how the modulation of ethylene biosynthesis by ACC and AIBA might affect the allocation of carbon (C) in relation to the shoots and roots morphological changes, patterns of C accumulation in the roots and shoots were compared to the organ dry weights

Table III.3: Comparison of root amino acid contents in *Brassica napus* plantlets grown for 5 days on agar plates and treated with 10 μM AVG and 10 μM AIBA in the presence of 1 mM KNO_3

	Root amino acids ($\mu\text{mol. g}^{-1}$ root DW)					
	Glu	Gln	Asp	Asn	Others	Aatot
Control 1 mM KNO_3	19.28 \pm 2.64a	9.61 \pm 1.96a	8.72 \pm 0.26a	1.69 \pm 0.13a	27.62 \pm 2.27a	66.92 \pm 7.77a
1 μM AIBA + 1 mM KNO_3	21.00 \pm 0.73a	9.71 \pm 0.90a	9.54 \pm 0.22a	1.74 \pm 0.23a	28.04 \pm 4.08a	70.04 \pm 8.86a
T values	-2.13	-2.91	-0.48	-1.54	0.60	-1.38
p-values	0.417	0.949	0.237	0.841	0.883	0.634
Control 1 mM KNO_3	14.51 \pm 0.24a	7.63 \pm 0.80a	7.18 \pm 0.02a	1.35 \pm 0.03a	25.97 \pm 1.73a	56.65 \pm 2.27a
1 μM AVG + 1 mM KNO_3	21.25 \pm 0.60b	16.46 \pm 1.90b	9.83 \pm 0.38b	2.51 \pm 0.145b	35.77 \pm 1.23b	85.82 \pm 2.92b
T values	-10.34	-6.88	-6.80	-7.82	-4.60	-7.88
p-values	0.009	0.006	0.021	0.016	0.019	0.004

Amino acids were extracted and analysed according to Le Ny *et al.*, (2013). Values presented are the mean \pm se of three repetitions of a set of four individual seedlings

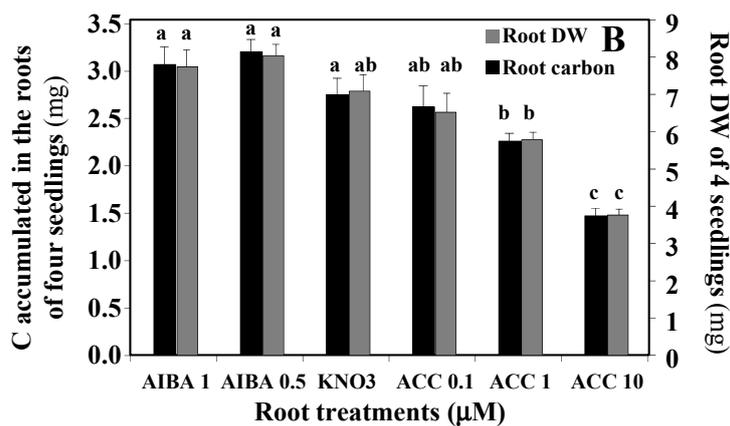
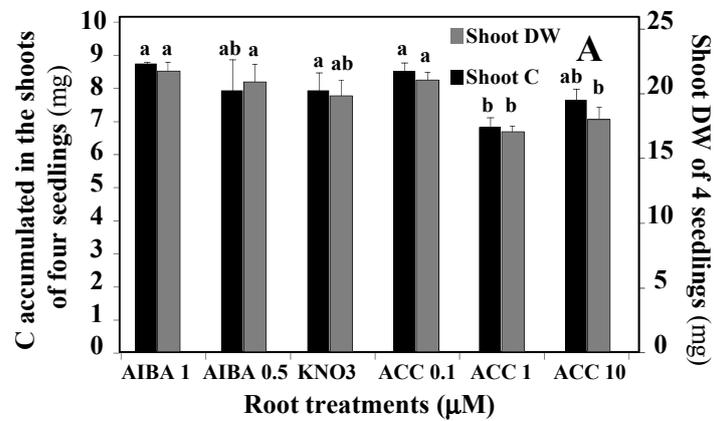


Figure III.37: Effects of AIBA or ACC treatment doses for 5 days on A) shoot and B) root C accumulated and dry weight of *Brassica napus* seedlings under homogeneous feeding of nitrate (1 mM) on agarose gel (n= 12-16 seedlings). Data were analysed by the non parametric test of Kruskal Wallis. Then, Mood median test have been used to compare means or medians; bars sharing different letters are significantly different at P = 0.05.

Fig. III.37: Lemaire *et al.* (2013)

between treatments (Fig. III.37A and B). The results show that the induction of ethylene biosynthesis by ACC and the inhibition by AIBA treatment strongly modulated the pattern of C and dry weight allocation to the root as shown by the significant correlations found ($r=0.97$; $P<0.01$; Fig. III.37A). This result was also confirmed by the significant correlations found between C accumulation in the roots with the root length and the root dry weight ($r= 0.97$ $P<0.01$; Fig. III.S42 at JXB online). Because external nitrate concentration used in agar plates was similar for all ACC and AIBA treatments (1mM KNO_3), we can reasonably assumed that changes of the root architecture induced by ethylene biosynthesis modulation were mainly associated with impairment in C translocation from the shoot to root. By contrast, despite a decline in the shoot surface area, the dry weight and C accumulation in the shoots were less affected by modulation of ethylene biosynthesis excepted for 1 and 10 μ M ACC concentrations (Fig. III.36C and Fig. III.S42 at JXB online). This leads to a significant increase in leaf specific area: leaf surface area per leaf weight (Fig. III.S43 at JXB online).

Inhibition of ethylene biosynthesis increases significantly elongation of the exploratory root system and ^{15}N accumulation in the plantlets

The impact of root elongation changes induced by the modulation of ethylene synthesis on nitrogen (N) accumulation and allocation between the shoots and roots was obtained by using $K^{15}NO_3$ labelling during five days of treatment (Fig. III.38). The exponential relationships were established between the daily accumulation of ^{15}N in the seedling and length in the exploratory root system for the different pharmacological treatments (Fig. III.38A). These results revealed that AIBA treated seedlings accumulated more ^{15}N whereas ACC treated seedlings accumulated less ^{15}N than control plantlets (Fig. III.38A). However, if increasing ACC concentrations reduced significantly ^{15}N accumulation in the shoots and roots (Fig. III.38B), ^{15}N allocation between the shoots and roots remained unchanged up to 1 μ M ACC treatment (Fig. III.38C). All these results demonstrated that ethylene metabolism modulation exerted a direct or indirect control on nitrate accumulation.

The reduction in the root elongation by ACC treatments induces a compensatory increase in ^{15}N uptake rate associated with an over expression of *BnNRT* genes

To allow a more complete characterization of nitrate uptake in response to the root elongation changes induced by modulation of ethylene biosynthesis, we calculated the nitrate uptake rate per unit of root length after five days of pharmacological treatments. We also compared expression of *BnNRT2.1* and *BnNRT1.1* genes in the roots after five days of treatment (Fig. III.39). Despite an

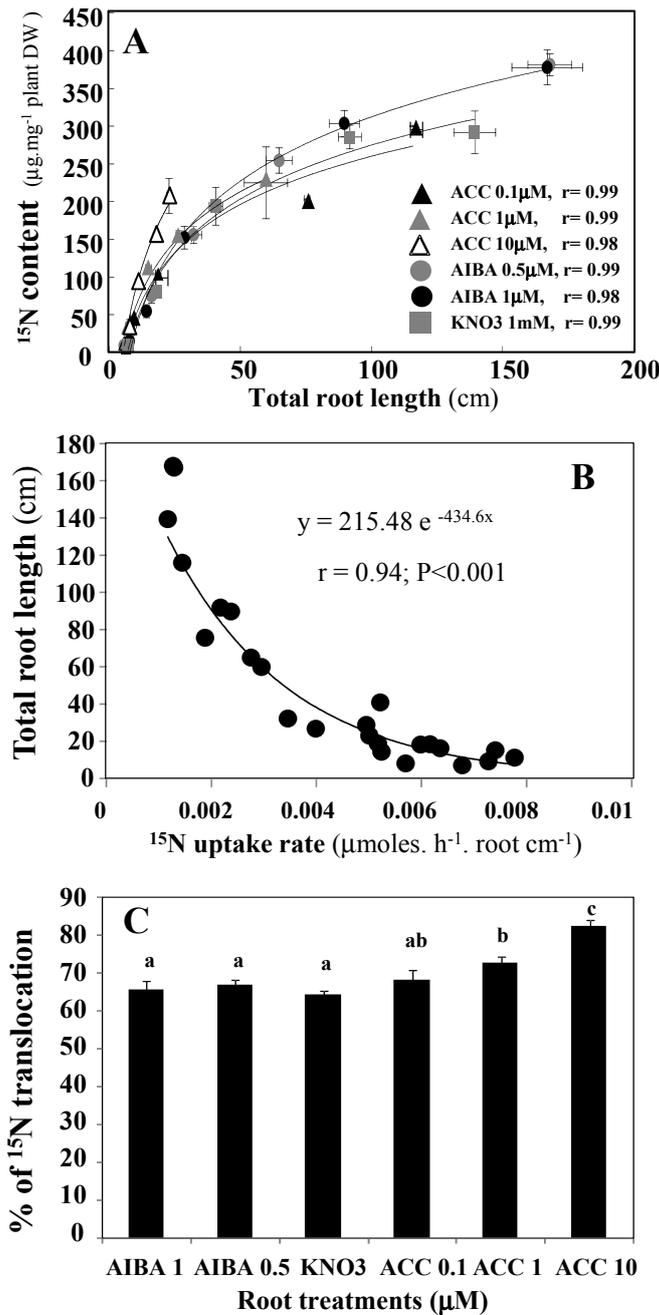


Figure III.38: Effects of AIBA or ACC treatment doses for 5 days on ^{15}N accumulated and root length of *Brassica napus* seedlings under homogeneous feeding of nitrate (1 mM) on agar plates ($n = 12-16$ seedlings). **A)** Relationship between ^{15}N content and total root length. **B)** Relationship between total root length and ^{15}N uptake rate. **C)** ^{15}N translocation to the shoot. The regression coefficient and significance for each relationship are shown. Data were analysed by the non parametric test of Kruskal Wallis. Then, Mood median test have been used to compare means or medians; bars sharing different letters are significantly different at $P = 0.05$.

Fig. III.38: Lemaire *et al.* (2013)

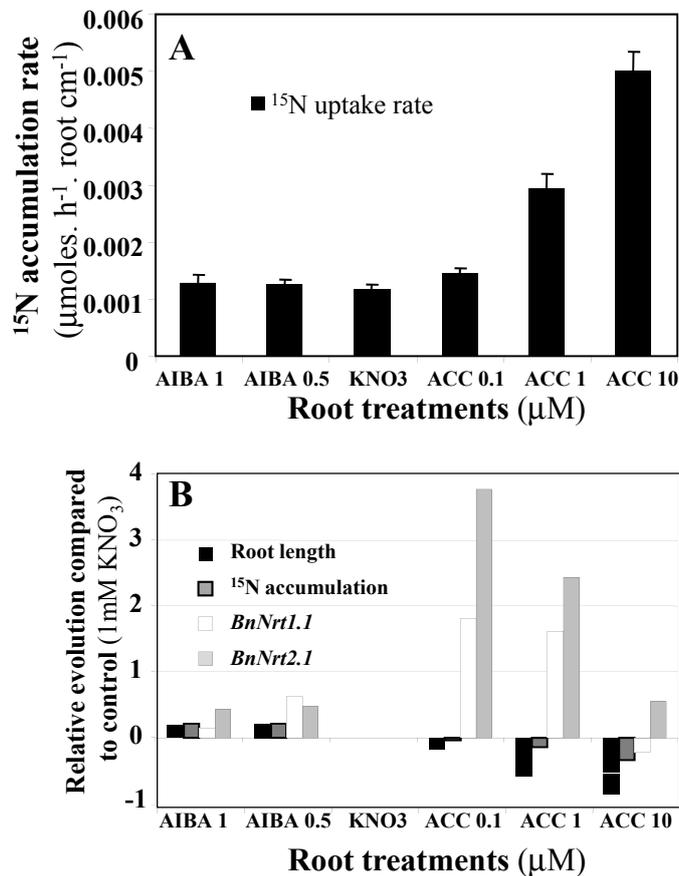


Figure III.39: Effects of AIBA or ACC treatment doses for 5 days on ¹⁵N accumulation and nitrate transporters expression of *Brassica napus* seedlings under homogeneous feeding of nitrate (1 mM) on agar plates (n= 12-16 seedlings). **A)** ¹⁵N accumulation. **B)** relative evolution compared to control treatment (1 mM KNO₃) of root length, ¹⁵N accumulation, *BnNrt1.1* and *BnNrt2.1* expression.

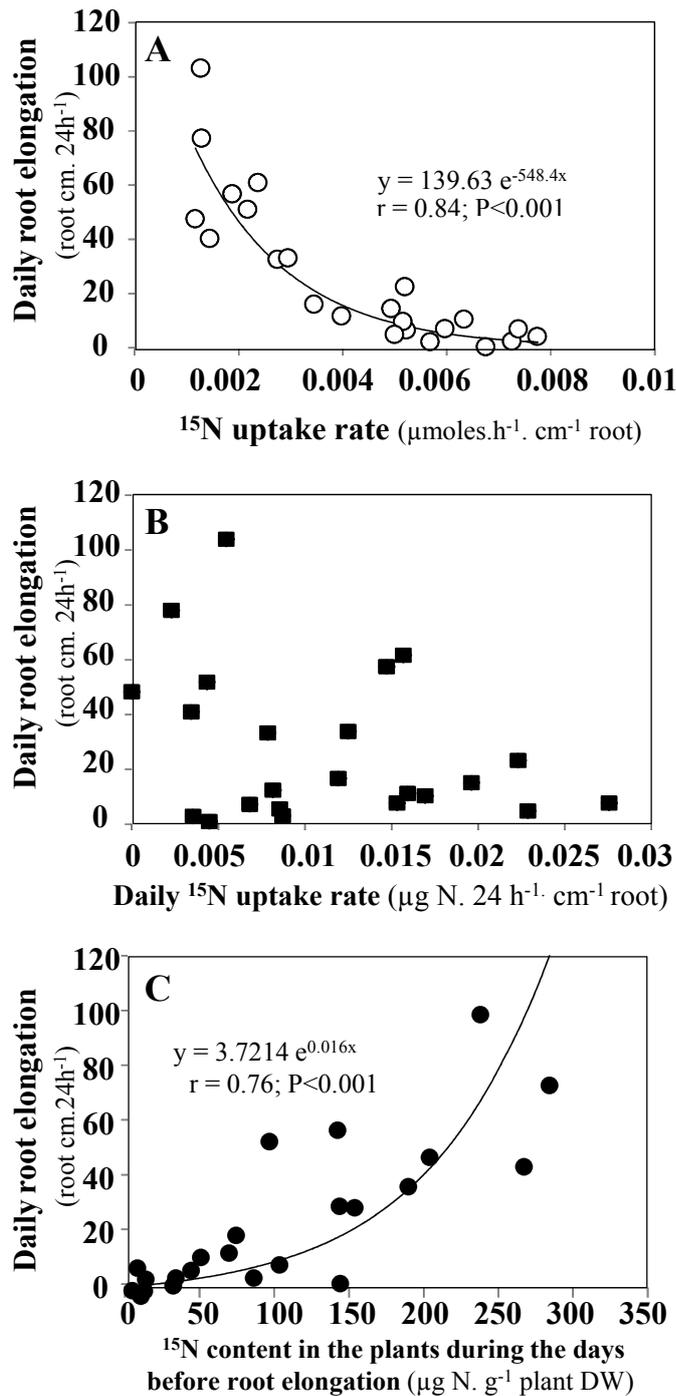


Figure III.40: Effects of AIBA or ACC treatment doses for 5 days on ¹⁵N uptake and daily root elongation of *Brassica napus* seedlings under homogeneous feeding of nitrate (1 mM) on agar plates (n= 12-16 seedlings). **A)** Relationship between daily root elongation and ¹⁵N uptake. **B)** Relationship between daily root elongation and daily ¹⁵N uptake. **C)** Relationship between daily root elongation and ¹⁵N content in the plant during the days before root elongation. The regression coefficient and significance for each relationship are shown.

Fig. III.40: Lemaire *et al.* (2013)

increase of the roots elongation and ^{15}N accumulation in AIBA treated plantlets, the nitrate influx rate per unit of root length was slightly enhanced compared to control (Fig. III.39A). By contrast, in ACC treated plantlets, the important reduction of the roots elongation was partially compensated by a large increase in nitrate uptake rate per unit of root length compared to control plantlets (Fig. III.39A). The compensatory effect induced by ACC treatment was also analysed during the time course of experiment from daily changes in root length elongation and daily nitrate uptake rate between treatments (Fig. III.S44 at JXB online). This compensatory effect could be explained by a significant increase of *BnNRT2.1* and *BnNRT1.1* transcript levels (Fig. III.39B and Fig. III.S44 at JXB online). Indeed, compared to control plantlets, *BnNRT1.1* and *BnNRT2.1* transcript levels were 2- and 4-fold increased (Fig. III.39B). However, the reduction in *BnNRT1.1* and *BnNRT2.1* transcript levels during increasing ACC concentrations, when the greatest increase in nitrate uptake rate occurred, suggested that there exists a differential regulation of *BnNRT1.1* and *BnNRT2.1* transporters at transcriptional and posttranscriptional levels (Fig. III.39A and B). This discrepancy between activity and transcription levels was not explained by changes in amino acids concentrations such as Gln and Glu during ACC treatments. Indeed, the endogenous concentrations of Gln and Glu in the roots were unchanged during the increase in nitrate uptake rate (Fig. III.S45 at JXB online).

Relationships between structural and functional adjustments induced by ethylene metabolism modulation depend on the plant N status

The large range in elongation changes of the exploratory root system (factor 8) induced by modifications of ethylene metabolism constitutes a unique tool to dissect the root structural and functional relationships. Thus, correlations between changes of K^{15}NO_3 uptake capacities and root elongation were systematically sought (Fig. III.40). A significant exponential correlation was obtained between the length of the exploratory root system and the nitrate uptake capacities between treatments (Fig. III.40A). This suggests that structural and functional adjustments induced by ethylene metabolism modulation are perfectly coordinated. In order to investigate the effects of short-term root elongation changes on ^{15}N uptake rate, daily root elongation and daily ^{15}N uptake rate between treatments were examined. No correlation was found between treatments (Fig. III.40B). However, the daily increase in root elongation was significantly correlated with ^{15}N accumulated in plantlets during the previous days of treatment (Fig. III.40C). Accordingly, these results demonstrated that the potential in root elongation was associated with the plant N status controlled by ethylene effects on plant growth.

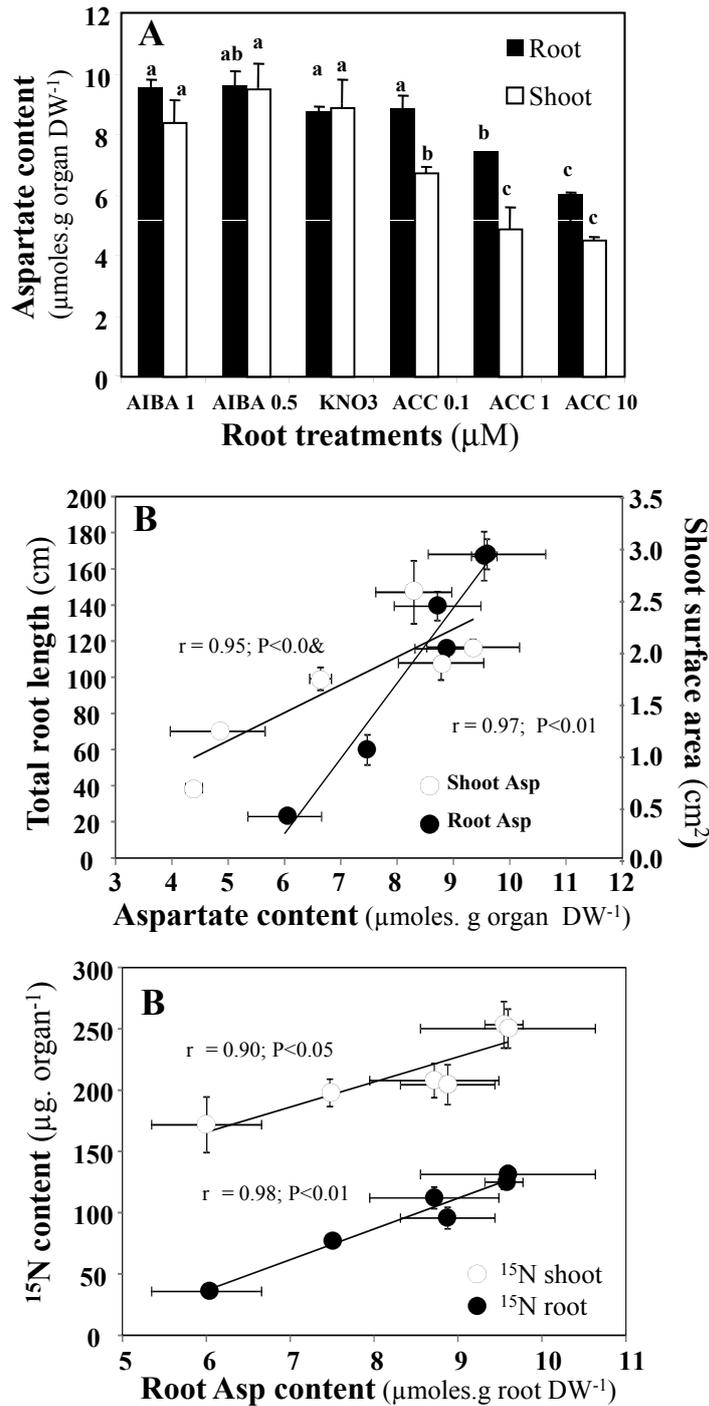


Figure III.41: Effects of AIBA or ACC treatment doses for 5 days on aspartate (Asp) content, ¹⁵N uptake and root length and shoot surface of *Brassica napus* seedlings under homogeneous feeding of nitrate (1 mM) on agar plates (n= 12-16 seedlings). **A)** Asp content in root and shoot. **B)** Relationship between total root length and root Asp content and relationship between shoot surface and shoot Asp content. **C)** Relationship between root or shoot ¹⁵N content and root Asp content. The regression coefficient and significance for each relationship are shown.

Fig. III.41: Lemaire *et al.* (2013)

The ethylene-induced variations in the roots and shoots expansion correlate with aspartate concentration changes and N status

To investigate further the possible relationships between nitrogen and hormone metabolisms in the root length and shoot surface area responses to ethylene biosynthesis modulation, we examined the changes of free amino acids concentrations in the roots and shoots (Fig. III.41). Among all AA analysed, Asp concentrations in the shoots and roots were the only ones to show a significant decline in response to ethylene treatments (Fig. III.41A). Hence, this decline in Asp concentrations was strongly correlated with the variations in the root length and shoot expansion (Fig. III.41B and Fig. III.S46 at JXB online). Because daily root elongation was correlated to the ¹⁵N accumulated in plantlets during the previous days of treatment (Fig. III.40C), correlations between N status and endogenous concentrations of Asp were also sought. This revealed tight relationships between Asp concentration and N status in the shoot and root suggesting that a metabolic link exists between ethylene and N metabolisms (Fig. III.41C and Fig. III.S46 at JXB online).

Discussion

Modulation of ethylene biosynthesis caused impairment in C and N metabolisms and significant changes in the root elongation and shoot expansion

The variations in the root elongation induced by ACC treatments are highly correlated with changes in the amounts of C accumulated in the roots ($r^2 = 0.95$, $P < 0.001$). This result confirms that the root growth is strongly dependent on the supply of C (Aguirrezabal *et al.*, 1994, Muller *et al.*, 1998; Freixes *et al.*, 2002). They also show that reduction of the root growth induced by ethylene affects carbon allocation to the roots (Yazdanbakhsh *et al.*, 2011). Although these variations of C allocation to the roots can be attributed to ethylene effects on photosynthesis reduction (Ahmed *et al.*, 2006; Tholen *et al.*, 2007), it could also result from the reduction of N metabolism induced by cyanide (HCN) production in ACC treatment (Garcia *et al.*, 2010). Indeed, cyanofornic acid produced by oxidation of ACC by ACC oxidase (ACO) is spontaneously degraded to carbon dioxide and cyanide (Peiser *et al.*, 1984; Pirrung, 1985; Wang *et al.*, 2002).

Nitrate uptake rate is strictly adjusted with modulation of exploratory root system by ACC and AIBA treatments and depends to N status

In homogeneous and constant nitrate supply to the root (1mM), the modulation of root elongation by pharmacological treatments with ACC and AIBA revealed that there exists a strict adjustment between the root elongation and N uptake capacities. This structural and functional adjustment was observed during a very large elongation changes in the exploratory root system (factor 8) and was mainly explained by the N resource acquisition history (N status). Indeed, daily root elongation was correlated with ^{15}N accumulation in the shoot and root during the previous days. In fact, N status was directly modulated by ethylene effects on the root and shoot growth. Hence, the reduction in nitrate uptake rate when plant N demand is satisfied and root elongation rate reached its maximum level suggested that a local or a systemic signal operates as negative feedback on nitrate uptake activity in relation with plant N status. This led to the conclusion that even in homogeneous nitrate supply, large root proliferation does not confer an ecophysiological advantage on plant growth. This result is in agreement with recent evidence that the root proliferation in nitrate and phosphate rich patches has little influence on long-term plant growth (Kembel et Cahill, 2005; Jansen *et al.*, 2006; De Kroon *et al.*, 2009).

Furthermore, this pharmacological study provided several lines of evidence indicating that ethylene is not only involved in the control of exploratory root system elongation (Stepanova *et*

al., 2005; Swarup *et al.*, 2007; Ruzicka *et al.*, 2007) but is also directly or indirectly implied in the control of nitrate uptake regulation.

ACC-induced reduction in root length causes an up-regulation in BnNrt2.1 and BnNrt1.1 expression

The first evidence is provided by the fact that compared to AIBA and control treatments, ACC induced an up-regulation in *BnNrt2.1* and *BnNrt1.1* expression. This increase in transcript levels fits well with the increasing in nitrate uptake rate per unit of root length in ACC treated plantlets even if this compensatory effect was unable to restore normal shoots and root growth. These results are also in agreement with the linear correlation previously found between changes in root length and *BnNRT2.1* expression levels in response to 10 mM AVG supply or changes in nitrate availability (Leblanc *et al.*, 2008; Le Ny *et al.*, 2013). This suggested, as previously proposed, that *BnNRT2.1* is essential for nitrate uptake and that its expression level and activity adapts to the elongation changes of the exploratory root system induced by environmental cues (Leblanc *et al.*, 2008; Le Ny *et al.*, 2013). The fact that in *Arabidopsis* and rice, *NRT2.1* is specifically located in cortical and epidermal cell layers of the mature root are also in line with this assumption (Girin *et al.*, 2007; Orsel *et al.*, 2007; Chopin *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2011). Similarly, the decrease in *BnNrt2.1* expression with the increasing in ACC concentrations from 0.1 to 10 mM suggested that *BnNrt2.1* expression levels might adapt to changes of the whole root absorbing surfaces (exploratory and root hair systems) by a regulatory mechanism that remains to be deciphered. This does not preclude the possibility that this mechanism may occur *via* ethylene signalling cascade on *BnNrt2.1* and *BnNRT1.1* transcription levels as proposed by Tian *et al.* (2009).

How to explain the correlations observed between changes in roots and shoots Asp concentrations and variations in the root length and N status?

The second evidence indicating that ethylene or ethylene signalling is involved in the control of nitrate uptake regulation is more indirect but very intriguing. It is provided by the linear correlations found between decline of Asp concentrations in the shoots and roots and total root length and N status. Our results established for the first time that there exists a metabolic relationship between N metabolism changes and variations in root elongation. They also indicate that during ethylene biosynthesis modulation, Asp can be considered as a marker of root elongation changes. Previous studies on molecular and physiological analysis of *Arabidopsis* mutants defective in cytosolic aspartate aminotransferase (AAT) have reported similar reduction in the root growth (Miesak and Coruzzi, 2002;; Coruzzi, 2003). In AIBA/ACC treatments, two

hypotheses that are not mutually exclusive can be proposed to explain possible interaction between ethylene and Asp metabolisms.

One possibility is that Asp is used to maintain auxin (IAA) homeostasis by conjugation with IAA (Staswick *et al.*, 2005; Ludwig-Müller 2009) in order to counteract the action of ACC on IAA biosynthesis induction and transport (Stepanova *et al.*, 2005). Indeed, IAA-Asp conjugate is formed rapidly by GH3 enzyme (IAA amido synthetase) after IAA supply to plants tissues and participated to dampen auxin signalling (Staswick *et al.*, 2002; Normanly, 1997; Ljung *et al.*, 2005).

An alternative possibility could imply detoxification of the hydrogen cyanide (HCN) produced by ACC oxidase (ACO) during ethylene formation after ACC treatment (Peiser *et al.*, 1984; Garcia *et al.*, 2010; Piotrowsky, 2008). In AIBA treated seedlings, the increase in nitrate absorption and seedlings growth are in agreement with this assumption because AIBA inhibits specifically ACO enzyme and probably reduced HCN production (Sato and Esashi, 1982). By contrast, in ACC treated plants, the production of HCN and the induction of HCN detoxification pathway could explain the reduction of endogeneous Asp concentrations (Piotrowski, 2008; Yu and Zhang, 2012). Indeed, in a first step, cyanide and cysteine are converted in β -cyanoalanine by β -cyanoalanine synthase (CAS). In a second step, β -cyanoalanine is converted in Asp, Asn and ammonia by a nitrilase (NIT4). Hence, the reduction in Asp after ACC treatment will directly reflect induction of this pathway used to maintain AAT functioning for minimal plant growth during light and dark (Coruzzi, 2003) when NR activity is reduced by cyanide (Yu and Zhang, 2012). Indeed, this pathway is considered as alternative metabolic pathway for nitrogen recycling (Piotrowski, 2008; Yu and Zhang, 2012).

A key priority for future researches is to investigate the direct or indirect influence of ACC on nitrate regulation in relation to changes in root absorbing surfaces (exploratory and root hairs systems). Clear challenges will be to elucidate the interactions between ethylene metabolism and signalling with N metabolism *via* AIA homeostasis or HCN production.

Materials and Methods

Plant material and growth conditions

The oil seed rape (*Brassica napus* L.) seeds used in this study was the winter oil seed rape cultivar Capitol. The seeds were treated with 70% alcohol for 3 minutes, followed by four rinses in sterile water and placed on imbibed filter paper (Watmann 3M) saturated with sterile water within Petri dishes (12x12 cm) for 48 h in the dark at room temperature (22°C). The germinated seeds were then selected from their radicle length (5-6 mm) and 4 seedlings were transferred on new Petri dishes (12x12 cm), filled up with 50 ml of solidified agar culture medium with different chemical treatments. Basic medium contained 0.4 mM KH₂PO₄, 0.15 mM K₂HPO₄, 1 mM K₂S0₄, 0.5 mM MgSO₄, 3 mM CaCl₂, 0.2 mM Fe-Na EDTA, 14 µM H₃B0₃, 5 µM MnSO₄, 3µM ZnSO₄, 0.7 µM CuSO₄, 0.7µM (NH₄)₆ Mo₇O₂₄ and 0.1 µM CoCl₂ and solidified with 0.8% (W/V) agar (Sigma-Aldrich, A-7002), pH 6.75. This basic medium was supplemented with 1 mM KNO₃ as a sole nitrogen source for all the treatments. Ethylene biosynthesis activator ACC (Sigma-Aldrich, A 3903) and inhibitor AIBA (Sigma-Aldrich, 850993) were dissolved in sterile water to final stock concentration of 10mM. Adequate volumes of chemicals were added to 50mL autoclaved cultured medium with 1mM KNO₃ in a falcon tube, mixed and then poured in Petri dishes under laminar sterile air flux. After transfer of two-day-old germinated seedlings, Petri dishes were half sealed with adhesive tape. The dishes were placed vertically in growth chamber at 22°C under 16/8 light/dark regime with a light intensity of 200 µmol. m⁻² s⁻¹.

Root system length and cotyledonary surface area morphometric analyses

The neo-elongation of the primary root apex was measured on treated seedlings with different concentrations of AIBA (0.5 and 1µM) and ACC (0.1, 1 and 10µM) in presence of 1mM KNO₃ between 48 and 72 hours of treatment as described by Leblanc *et al.*, 2008. Transparent slides were placed to the back of Petri dishes to draw with pencil the neo-elongation of primary root. Then, for each treatment, the neo-elongated primary root length was measured from the slides with a WinRHIZO scan system (Regent Instruments, Quebec, Canada).

Effects of treatments on the exploratory root system (primary and lateral roots) and shoot area were measured every day during a kinetic of 5 days. For each treatment four repeats corresponding to four different agar plates composed by 4 seedlings were harvested. The root and shoot parts of the seedlings were excised. Seedlings roots were washed in 1 mM CaSO₄ solution for 1 minute at room temperature before to be placed in demineralized water solution and analyzed by WinRHIZO scan system. Shoot part was placed on transparent slide and photocopied (copier Kyocera Mita, KM-2030) to further quantify the leaves area by WinRHIZO scan system.

After these treatments, the roots and shoots were dried on tissue paper and placed into 2 mL Eppendorf tubes. Roots and shoots fresh weights were estimated. Then, tubes were dried in oven for 72h at 60°C and roots and shoot parts were weighed to get their dry weight. Before isotope analyses, the shoots and roots were ground separately for 2 minutes to fine powder with an inox beads of 0.4 mm diameter in oscillating grinder (Retsch mixer mill, MM301, Haan, Germany).

Net $K^{15}NO_3^-$ uptake and isotope analysis

Net uptake of NO_3^- was obtained by ^{15}N labeling. For each point of the kinetic study (24, 48, 72, 96 and 120 h) the medium was supplemented with $K^{15}NO_3$ (atom % ^{15}N : 1%). The total ^{15}N amount was determined for roots and shoots. The ^{15}N analyses were performed using an analyser (EA 3000, Eurovector, Milan Italy) coupled with a isotopic mass spectrometer (isoprime X, GV instrument, Manchester, UK).

RNA isolation and quantitative RT-PCR analyses

For gene expression analysis, total RNA was extracted from 4 seedlings (200 to 400 mg of root fresh matter) issue from five to height set of experiment with the different nitrate concentrations after 5 days of treatment. Fresh root samples frozen in 2 mL Eppendorf tubes in liquid nitrogen were ground for 1 minute 30s with inox beads of 0.4 mm diameter in oscillating grinder (Retsch mixer mill MM301) before the extraction of total RNA with the RNeasy plant mini kit according to the instruction of manufacturer (Qiagen). Quantification of total RNA was performed by spectrophotometer at 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf, Le Pecq, France) before RT-PCR analyses. For RT, 1 μ g of total RNA was converted to cDNA with an "iScript cDNA synthesis kit using the manufacturer's protocol (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). Expression levels of genes were normalized to the expression level of the *18S* (house-keeping gene) (F, 5'-CGGATAACCGTAGTAATTCTAG and R, 5'-GTACTCATTCCAATTACCA GAC). The primers used to amplify the gene specific sequences were for PiP1b (F, 5'-AGGTGGAGCCAACACCATAG and R, 5'-GGGGATGGTTGCTAA GTGAA); for *BnNrt2.1* (F, 5'-T GGTGGAATA GGCGGCTCGAGTTG and R, 5'-GTATACGTTTTGGGTC ATTGCCAT; AJ293028) and for *BnNrt1.1* (F, 5'-ATGGTAACCGAAGTGCCTTG and R, 5'-TGATTCCAGCTGTTGAAGC, AJ278966). The subsequent PCR reactions were performed with 4 μ L of 200 \times diluted cDNA, 500 nM of the primers, 1 \times SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad) in a total volume of 15 μ L. The specificity of PCR amplification was examined by monitoring the melting curves after qPCR reactions using the Chromo4 System (Bio-Rad) and by sequencing the qPCR product to confirm that the correct amplicons were produced from each pair of primers (Biofidal, Vaulx en Velin, France). Comparative relative expression of the various genes was

determined using the delta-delta method employing the formula: relative expression = $2^{-[\Delta Ct \text{ sample} - \Delta Ct \text{ control}]}$ where Ct refers to the threshold cycle, sample indicates the gene of interest and control indicates the endogenous house-keeping gene (Livak and Schmittgen, 2001).

Amino Acids Profiling

Amino acids profiling was performed on shoot and root material using the ACQUITY UltraPerformance LC (UPLC) separation system (Waters corp., Milford, USA). Plant tissues were collected, freeze-dried and homogenized with a 4 mm steel for 1 min at 30/s frequency. Methanol-chloroform-water-based extractions were made on 10 mg of the resulting dry powder. The powder was suspended in 400 μ l of methanol containing 200 μ M DL-3-aminobutyric acid (BABA) as an internal standard and agitated at 1500 rpm for 15 min at room temperature. 200 μ l of chloroform was then added and samples were agitated at 1500 rpm for 5 min at room temperature. Finally, 400 μ l of ultra-pure water was added and samples were vigorously mixed and then centrifuged at 13,000 g for 5 min at 4°C. The upper phase containing amino acids was transferred to a clean microtube, dried under vacuum and the dry residue was resuspended in 600 μ l of ultra-pure water. A 5 μ l aliquot of the resulting extract was used for derivatization according to the AccQ•Tag Ultra Derivatization Kit protocol (Waters corp., Milford, USA) and then derivatized amino acids were analyzed using an ACQUITY UPLC[®] system (Waters corp., Milford, USA). One μ l of the reaction mix was injected onto an ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μ m 2.1 x 100 mm column heated at 55°C. Elution of amino acids was performed with a mix of 10-fold diluted AccQ•Tag Ultra Eluent (A) and acetonitrile (B) at 0.7 ml.min⁻¹ flow according to the following gradient : initial, 99.9 % A ; 0.54 min, 99.9 % A ; 6.50 min, 90.9 % A, curve 7 ; 8.50 min, 78.8 % A, curve 6 ; 8.90 min, 40.4 % A, curve 6 ; 9.50 min, 40.4 % A, curve 6 ; 9.60 min, 99.9 % A, curve 6 ; 10.10 min, 99.9 % A. Amino acids were detected at 260 nm using a photo diode array detector and were subsequently identified and quantified with the individual external standard calibration curves.

Supplemental Material

Figure III.S42, Figure III.S43, Figure III.S44, Figure III.S45, Figure III.S46,

Acknowledgements

The authors are grateful to J. Pichon and M-P Bataillé for their technical assistance during seedling harvest and ¹⁵N analyses.

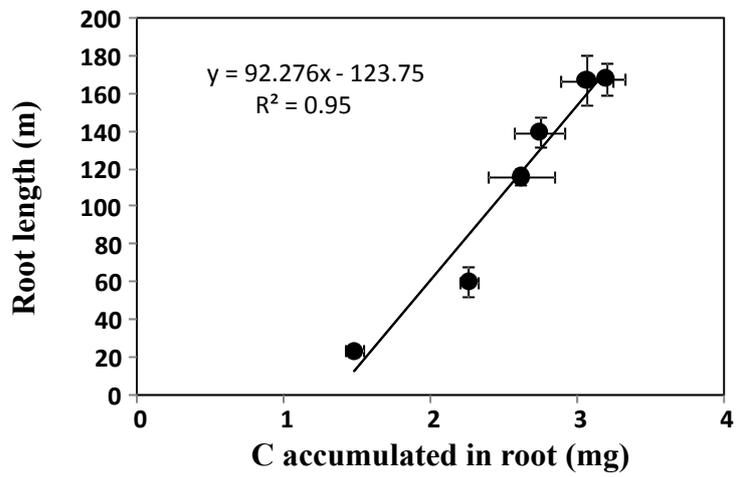
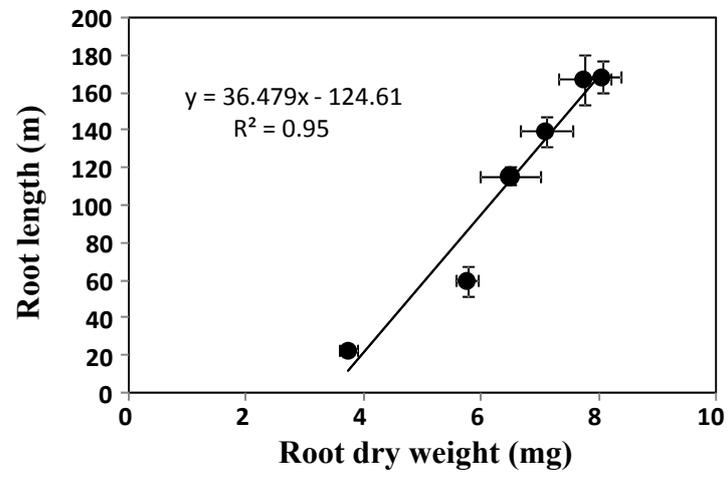


Figure III.S42: Lemaire et al. 2013

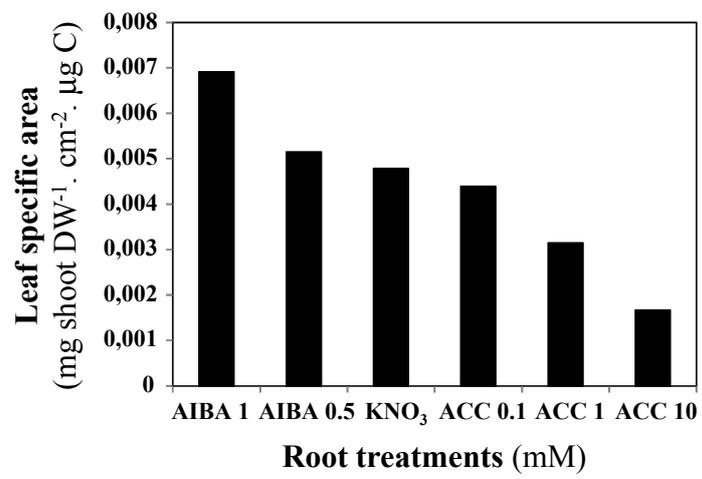


Figure III.S43: Lemaire et al. 2013

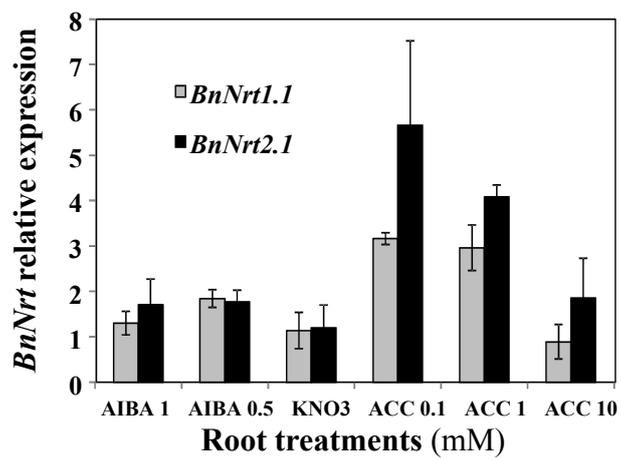


Figure III.S44: Lemaire et al. 2013

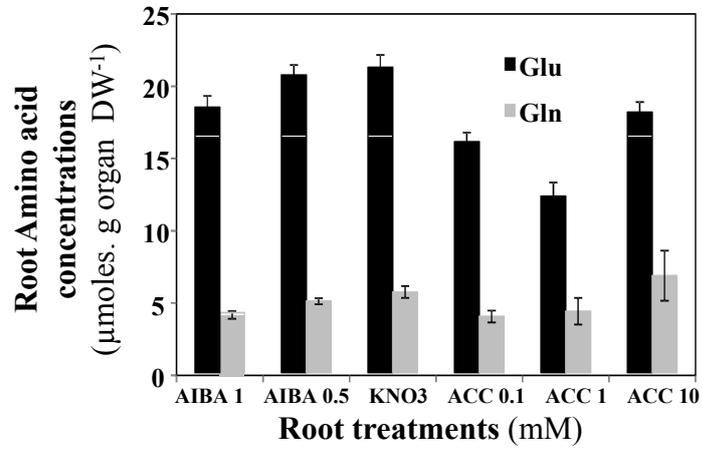
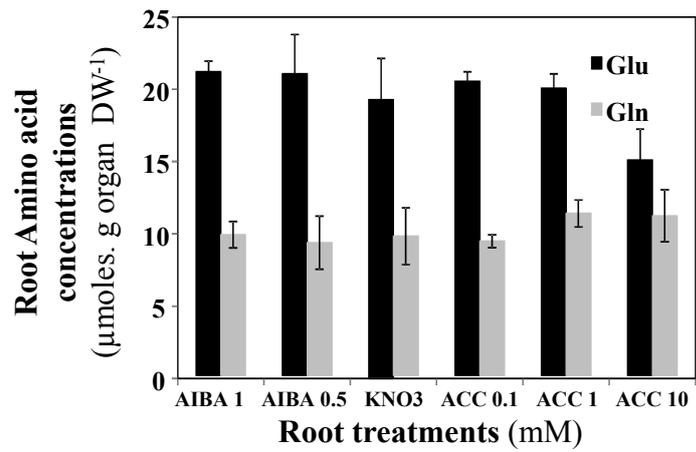


Figure III.S45: Lemaire et al. 2013

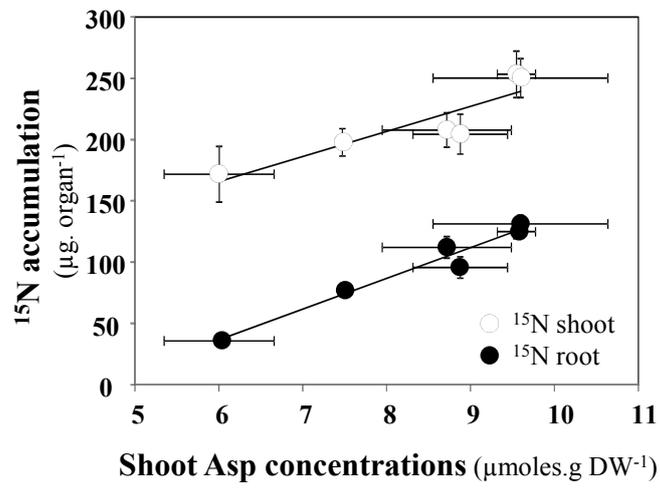
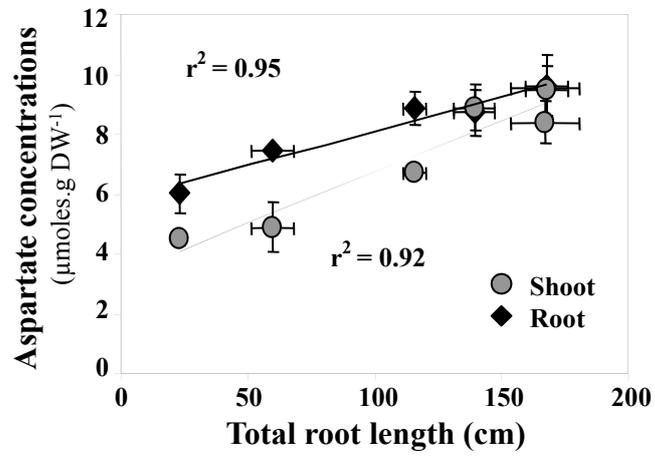


Figure III.S46: Lemaire et al. 2013

D.6. Principaux résultats obtenus

D.6.1. Les traitements AIBA et ACC modifient de manière opposée la croissance du système exploratoire.

Les traitements à l'aide de l'ACC et l'AIBA induisent un effet opposé sur l'élongation du système racinaire exploratoire. Ces effets sont observés à court terme après 24 heures de traitement et amplifiés à long terme après 5 jours de traitement. Ces résultats confirment les résultats obtenus précédemment par Leblanc *et al.* (2008). De plus, **ils valident l'approche pharmacologique utilisée qui permet donc de faire varier la surface absorbante du système racinaire exploratoire dans une très large gamme et d'étudier les réponses physiologiques et métaboliques affectées par les variations de la longueur racinaire.**

D.6.2. Les variations du système exploratoire sont très fortement corrélées avec la quantité de carbone accumulée dans les racines

Les variations d'élongation du système racinaire exploratoire induites par les traitements sont très fortement corrélées avec les variations des quantités de carbone accumulées dans les racines ($r^2 = 0,95$; $P < 0,001$). Ce résultat confirme donc que la croissance racinaire est fortement dépendante de la fourniture en carbone (Aguirrezabal *et al.*, 1994 ; Muller *et al.*, 1998 ; Freixes *et al.*, 2002). Ils montrent également que la réduction de la croissance racinaire induite par l'éthylène affecte l'allocation du carbone aux racines. Cela confirme donc que le métabolisme de l'éthylène ne modifie pas le contrôle circadien de l'élongation racinaire (Thain *et al.*, 2004) mais qu'une régulation s'opère en réponse à la modulation de la biosynthèse d'éthylène sur l'allocation du carbone (Yazdanbakhsh *et al.*, 2011). Même si ces variations d'allocation du carbone aux racines peuvent être attribuées à l'effet de l'éthylène sur la photosynthèse (Ahmed *et al.*, 2006 ; Tholen *et al.*, 2007), il nous paraît plus probable que cet effet soit la conséquence d'une modification du métabolisme de l'aspartate.

D.6.3. Les variations du système exploratoire sont très fortement corrélées avec les variations de concentrations racinaires en aspartate

La corrélation linéaire négative mise en évidence entre les variations des concentrations racinaires d'aspartate et d'élongation racinaire plaide en faveur d'une modification majeure, induite par le traitement ACC, du métabolisme de l'azote et du carbone (Lemaire *et al.*, 2013). En

effet, la synthèse d'aspartate *via* l'aspartate transaminase joue un rôle clé dans le métabolisme N pour régénérer l' α -cétoglutarate requis pour l'assimilation de la glutamine. L'aspartate est également un acide aminé clé dans le transport à courte et longue distance de l'azote et du carbone entre les cellules mais également les organites cellulaires comme la mitochondrie et le chloroplaste *via* la navette malate-aspartate.

Deux hypothèses peuvent expliquer les corrélations entre les variations des concentrations d'aspartate et les variations de longueur racinaire. La première hypothèse est que l'aspartate étant l'acide aminé qui permet le catabolisme de l'AIA par conjugaison entre eux (Staswick *et al.*, 2002; Staswick *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2008). Deux phénomènes peuvent s'additionner pour induire une baisse des teneurs en aspartate (Asp). Le premier est l'inhibition de l'aspartate transaminase et le second est l'induction de la détoxification de l'AIA par conjugaison. La deuxième hypothèse, repose sur la voie de détoxification de l'acide cyanhydrique (HCN) produit par l'ACC oxydase (ACO). Cette voie métabolique produit alors de l'Asp, de l'asparagine et de l'ammoniac. Or le cyanure réduit l'activité de la NR (Yu et Zhang, 2012), l'Asp est alors utilisé pour la croissance, ce qui pourrait expliquer la baisse des teneurs en Asp lors du traitement ACC.

D.6.4. Les variations de la surface racinaire exploratoire sont corrélées avec les quantités de ^{15}N accumulées

L'augmentation de la surface racinaire exploratoire induite par le traitement AIBA est associée avec une augmentation des capacités d'absorption du nitrate. A l'inverse la réduction de la surface racinaire exploratoire induite par l'augmentation des concentrations d'ACC est associée à une réduction des capacités d'absorption. Ce résultat contraste avec les résultats obtenus précédemment avec le traitement AVG. En effet, **les variations des capacités d'absorption ne sont pas de type compensatoire mais sont linéairement corrélées aux variations de longueur du système racinaire exploratoire.** Ensuite nous avons cherché à mesurer l'impact des traitements ACC et AIBA sur les profils d'expression des deux principaux transporteurs de nitrate BnNRT2.1 et BnNRT1.1 de façon à vérifier s'il existait une variation coordonnée de l'activité et de l'expression des transporteurs.

D.6.5. La réduction de la surface racinaire exploratoire induit une expression compensatoire des transporteurs BnNRT2.1 et BnNRT1.1

Bien que la réduction du système exploratoire induite par l'augmentation des concentrations d'ACC ne cause pas une compensation des capacités d'absorption du nitrate, en revanche, elle provoque une expression fortement compensatoire de l'expression des gènes *BnNrt2.1* et *BnNrt1.1*. Ce résultat démontre donc que l'activation de la biosynthèse de l'éthylène par l'ACC inhibe l'activité des transporteurs BnNRT1.1 et BnNRT2.1. Bien que la fourniture en carbone racinaire soit fortement corrélée avec la réduction de l'absorption, les résultats ne nous permettent pas de conclure si cette régulation post-transcriptionnelle des transporteurs BnNRT1.1 et BnNRT2.1 est causée par la réduction de la fourniture en carbone donc en sucres aux racines.

D.7. Conclusions et perspectives

Les résultats ont montré que les variations de la surface absorbante (structure) induite par la modification du métabolisme de l'éthylène modifient de façon significative l'absorption du nitrate (fonction). **Ainsi, les résultats ont révélé que les poils absorbants ne sont pas à eux seuls le siège unique de l'absorption du nitrate.** Ils confirment donc les données récentes qui montrent que le transporteur AtNRT2.1 est aussi bien adressé à la membrane plasmique des poils absorbants que celle des autres cellules épidermiques racinaires (Chopin *et al.*, 2007). Par ailleurs, le fait que seule l'expression du gène *BnNrt2.1* intervient dans les phénomènes de compensation ou d'inhibition de l'absorption du nitrate lors des traitements AVG et ACC apparaît doublement cohérent. D'une part, avec la localisation du transporteur AtNRT2.1 dans les assises épidermiques et corticales de la racine mature d'*Arabidopsis* (Guo *et al.*, 2001 et 2002; Remans *et al.*, 2006a, Girin *et al.*, 2007) et d'autre part, avec la corrélation positive que nous avons obtenue précédemment entre les variations d'expression de *BnNrt2.1* et les variations de longueur du système racinaire (cf. : résultats A et B). En revanche, l'absence de variations significatives de l'expression du gène *BnNrt1.1* entre les traitements et son augmentation entre 48 et 72 heures lors de la mise en place des racines latérales laissent supposer un rôle du transporteur BnNRT1.1 dans le transport de l'auxine. Cette hypothèse a depuis été validée par Krouk *et al.* (2010).

IV. DISCUSSION GENERALE

La question liminaire de notre travail de recherche concernait le bien fondé de l'hypothèse de Lynch (2007) selon laquelle « la deuxième révolution verte » passerait obligatoirement par une amélioration du prélèvement des macro-éléments *via* la sélection de traits racinaires plus performants. Cette hypothèse a par ailleurs été reprise et discutée par de nombreux auteurs (Dorlodot *et al.*, 2007; Garnett *et al.*, 2009; Herder *et al.*, 2010 ; Kant *et al.*, 2011). Selon Lynch (2007), l'exploitation des traits racinaires étant restée très longtemps inaccessible aux sélectionneurs, elle pourrait représenter un potentiel d'amélioration considérable dans un contexte de baisse des fertilisants N, P et K. Cette proposition nous laissait quelque peu perplexe au regard des travaux pionniers de Drew et Saker dans les années soixante dix et plus récemment des expériences de « split-root » dans les années quatre-vingt dix. **En effet, les premiers travaux montraient clairement les relations étroites à long terme entre structure racinaire et fonction de prélèvement des macro-éléments en situation homogène et hétérogène d'alimentation** (Drew *et al.*, 1973 ; Drew, 1975; Drew et Saker, 1975). Quant aux études plus récentes de « split root », elles révélaient des phénomènes de compensation à court terme pour l'absorption des macroéléments comme le nitrate (Lainé *et al.*, 1995 ; Gansel *et al.*, 2001). Ces phénomènes adaptatifs de compensation au niveau de la structure ou de la fonction révélaient donc de fait une **très grande plasticité des plantes pour ajuster leur prélèvement en fonction des variations de concentrations en macro-éléments du sol** (Robinson, 1994 et 1996). De plus, les lois allométriques existant entre la croissance des parties aériennes et racinaires laissaient également penser que la sélection pour la croissance des parties aériennes avait, en fait, influencé de façon indirecte (mais importante) la sélection de traits racinaires particuliers, même si ceux-ci n'avaient pu être suivis et mesurés.

Par ailleurs, une autre question cruciale, rarement prise en compte dans les programmes d'amélioration de l'efficacité de prélèvement des macro-éléments, concernait **les relations entre les flux d'eau pour la croissance et la transpiration** (Forde et Clarkson, 1999 ; Clarkson *et al.*, 2000 ; Brueck, 2008 ; Brouder et Volenec, 2008).

En effet, **à l'échelle des relations sol-plante-atmosphère**, et bien que la transpiration soit une variable d'ajustement du prélèvement des macroéléments implicitement admise *via* son effet sur le flux de masse et le flux diffusif des ions du sol vers la racine (Barber, 1995 ; Marschner, 1995; Tinker et Nye, 2000), **le contrôle possible par les macro-éléments comme le nitrate de cette variable d'ajustement reste encore très peu étudié** (Cramer *et al.*, 2009). Pourtant, des modèles mécanistes de prélèvement établis à partir des équations de diffusion et de convection des macro-éléments N, P, et K dans le sol ont montré toute leur pertinence dans la prédiction du prélèvement (Barber, 1995 ; Tinker et Nye , 2000).

A l'échelle de la plante, bien que de nombreux biophysiciens aient formalisé les relations entre flux d'eau et de solutés dans les années soixante dix (Fiscus, 1975, 1977, Fiscus et Kramer, 1975) et que l'identification et la caractérisation des transporteurs d'eau et d'ions aient fait d'énormes progrès ces vingt dernières années, les connaissances restent encore trop souvent éparses. En effet, les biophysiciens considèrent les solutés comme un facteur environnemental externe modulant seulement à la marge l'absorption d'eau *via* la composante osmotique du flux d'eau intervenant sur la croissance (Fiscus, 1975; Fiscus et Kramer, 1975). De plus, leurs méthodes de validation fortement invasives sur racines excisées méconnaissent la signalétique entre les racines et les parties aériennes présente chez des plantes intactes (Schneider *et al.*, 1997; Wegner et Zimmerman, 2009). Les physiologistes, quant à eux, se focalisent sur la régulation fine des transporteurs de nitrate, de potassium, de phosphate et de sulfate sans prendre en compte leur relation avec les flux hydriques. Dans le cas du nitrate, il suffit pour s'en convaincre de comparer les travaux de Gansel *et al.* (2001) et de Gorska *et al.* (2008b). Dans les années quatre-vingt-dix, les travaux de Hoarau *et al.* (1996) et Carvajal *et al.* (1996) furent les premiers à démontrer l'effet positif du nitrate sur la conductance hydraulique racinaire et l'induction de l'activité des aquaporines chez le Maïs au niveau post-transcriptionnel (Barthes *et al.*, 1995 et 1996; Carvajal *et al.*, 1996; Hoarau *et al.*, 1996; Lopez *et al.*, 2003). Récemment, ces travaux ont été redécouverts et confirmés (Gloser *et al.*, 2007, Gorska *et al.*, 2008a et b, Gorska *et al.*, 2010).

En fait, la question des relations entre flux d'eau et flux de nitrate à l'échelle de la plante entière pour la croissance n'a été vraiment considérée et discutée que par Clarkson (Clarkson, 1993; Forde et Clarkson 1999). Cette question l'a conduit, en collaboration avec Ernst Steudle, à proposer un modèle hypothétique structure-fonction sous contrainte nutritionnelle N, P, S prenant en compte les flux d'eau pour la croissance et la transpiration (Clarkson *et al.*, 2000). **Ce modèle n'a, à ce jour, jamais été ni vérifié ni précisé** (Fig. II.49).

Au regard de l'ensemble de ces éléments, l'hypothèse de Lynch n'apparaissait donc plus aussi simple et évidente. **Dans ce contexte et pour aborder et réexaminer simultanément au niveau écophysiologique ces deux problématiques (i) les relations structure-fonction lors du prélèvement du nitrate (ii) les relations entre flux hydrique et flux de nitrate sur la croissance, nous avons développé un dispositif expérimental en boîte de Pétri sur plantules de Colza.**

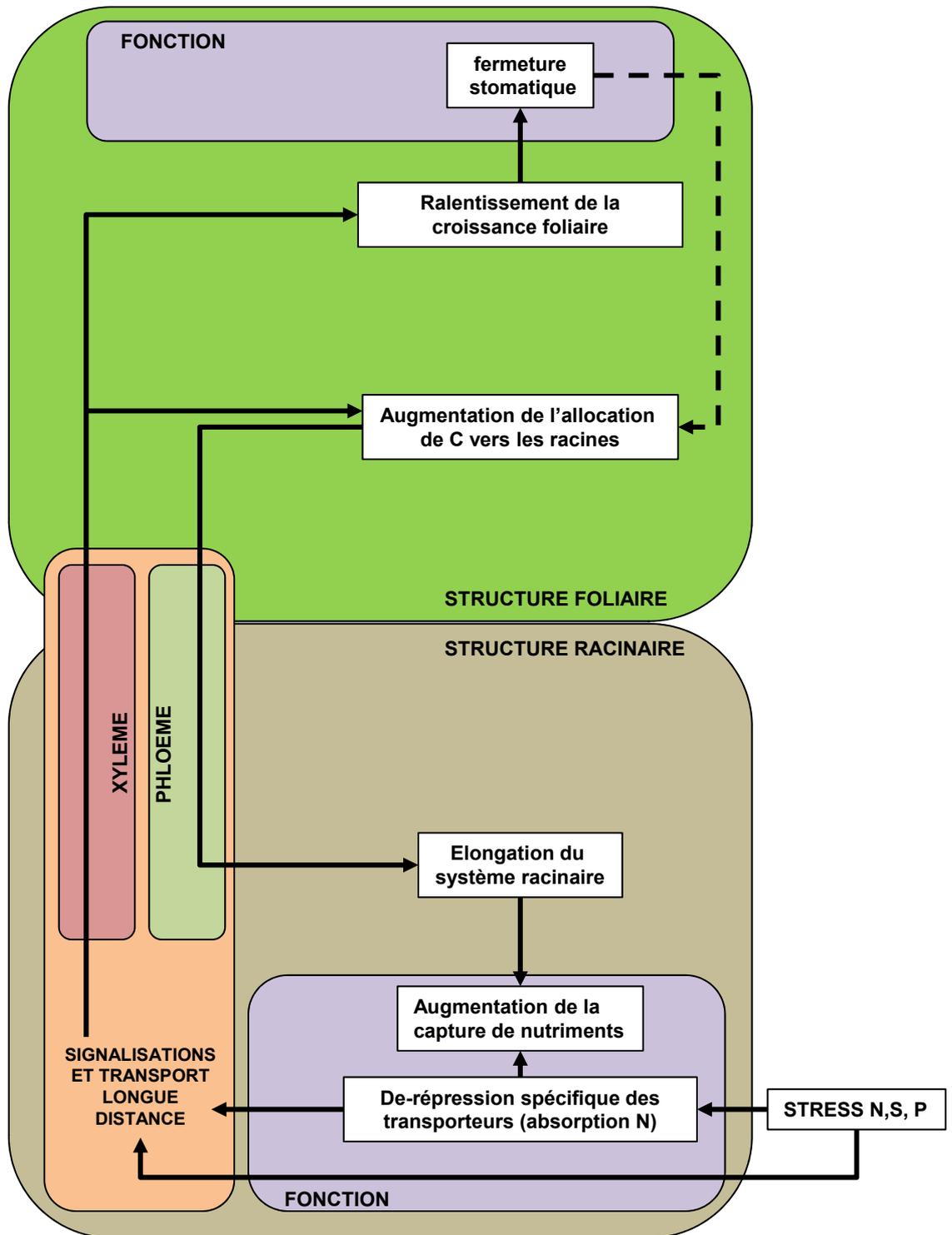


Figure IV.1: Re-figuration du modèle hypothétique des événements physiologiques et morphologiques induits par un stress nutritionnel pour l'azote, adapté à partir du modèle de Clarkson *et al.*, (2000). Ce modèle permet de mettre en évidence l'effet du stress azoté sur les fonctions endogènes du prélèvement de l'azote, de la transpiration, et sur les modifications morphologiques des structures foliaire set racinaires.

A. Coordination des relations Structure-Fonction en réponse à la disponibilité en nitrate et en absence de transpiration

A.1. Conditions expérimentales de validation du modèle de Clarkson-Steudle

Notre premier objectif de thèse a consisté à vérifier **en situation homogène d'alimentation en nitrate la validité du modèle hypothétique structure-fonction** proposé par Clarkson et Steudle (2000). Comme le montre la figure II.49, ce modèle a été proposé initialement pour décrire une situation de stress nutritionnel pour l'azote, le phosphore et le soufre. Outre les modifications structurales et fonctionnelles induites en situation de stress nutritionnel, **le modèle suppose l'implication d'aspects signalétiques racines-feuilles et feuilles-racines comme l'illustre la refiguration que nous présentons** (Fig. IV.1). Pour valider ce modèle pour l'azote, nous avons travaillé sur une **large gamme de disponibilités en nitrate** afin de décrire et de caractériser **un plus grand nombre de situations et de réponses physiologiques et moléculaires**. Les plantes ont donc été placées sur un gradient de nitrate allant de 0,05 à 20 mM, c'est-à-dire en conditions limitantes (0,05 et 0,2 mM), optimales (0,5 et 1 mM) et sub-optimales (5, 10, 20 mM).

Par ailleurs, nous avons choisi de travailler sur un **modèle de plante simplifié : la plantule**. Les plantules ont été cultivées en gel d'agarose sur des pas de temps de 1 à 5 jours en chambre de culture *in vitro*, ce qui a favorisé l'obtention d'un plus **grand nombre de répétitions statistiques**. La forte **homogénéité et répétabilité des conditions expérimentales** (PAR, température, photopériode) nous a autorisé la comparaison des résultats entre les différentes expérimentations. Enfin, l'utilisation des boîtes de Pétri nous a permis d'accéder plus facilement aux modifications morphologiques de croissance du système racinaire.

A.2. Hypothèses de fonctionnement implicites induites par les conditions expérimentales en boîte de Pétri

Bien que le recours à la culture de plantules en boîte de Pétri soit couramment utilisé aujourd'hui, en particulier pour le modèle *Arabidopsis*, un aspect jamais pris en compte dans ces conditions de culture est que les plantules sont soumises à une très forte humidité relative. En conséquence, **les plantules ne transpirent pas ou très peu**. La première question que nous nous sommes posée était : **Les plantules placées à 100 % d'humidité relative (HR) présentent-elles une transpiration réduite par rapport aux plantes placées à HR ambiante ?** Les mesures de

transpiration à l'aide d'un système gravimétrique sur plantules âgées de cinq jours, cultivées en conditions hydroponique nous ont permis de montrer que les plantules placées à 100 % d'HR transpiraient 10 fois moins que celles placées à HR ambiante (70 % d'HR ; Fig. III.1). De même, nous avons montré que le flux résiduel hydrostatique dû à la transpiration était seulement 1,3 fois plus élevé que le flux osmotique d'eau pour la croissance alors que ce même flux était 10 fois plus élevé en condition non transpirante (données non présentées). La deuxième question que nous nous sommes posée était : **quelles implications physiologiques peuvent avoir ces conditions particulières de culture sur la validation de ce modèle physiologique?** Nous avons donc recherché dans la littérature si des plantes avaient déjà été cultivées dans ces deux types de conditions sur un gradient de nitrate. Et si oui, **quelles hypothèses de fonctionnement pouvions-nous en déduire?** Par chance, les travaux de Stitt et coll sur les plantes sauvages et les mutants NR de Tabac avaient été réalisés sur gradient de nitrate en conditions transpirantes (pot) et non transpirantes (boîte de Pétri) (Stitt *et al.*, 1999). Si dans ces deux études, **les modifications des propriétés hydrauliques ainsi que les changements d'activité et d'expression des transporteurs nitrate n'étaient pas mesurés**, en revanche la comparaison entre plantes sauvages et mutants NR démontrait clairement qu'**en condition transpirante, comme en condition non transpirante, la croissance des parties aériennes et des racines dépendait du signal nitrate** (Scheible *et al.*, 1997a; Stitt et Feil, 1999).

Par ailleurs, il était également possible de déduire à partir de l'équation de conservation de la biomasse de Boyer (1985) :

$$\textit{Absorption d'eau} = \textit{transpiration} + \textit{croissance} \pm \textit{capacitance} \quad (1)$$

ou de l'équation flux-force appliquée au transport de l'eau dans la plante (Fiscus, 1975):

$$\textit{Absorption d'eau} = J_{eau} = Lp_{rac} (\Delta P - \sigma \Delta \pi) \quad (2)$$

qu'**en condition de faible transpiration, la croissance devait dépendre majoritairement du flux osmotique d'eau ($\sigma \Delta \pi$) causé par l'accumulation de nitrate dans le xylème**. La forte baisse ou l'absence de la composante hydraulique due à la transpiration dans les équations (1) et (2) conduisant à :

$$\textit{Absorption d'eau} = \textit{croissance} \pm \textit{capacitance} \quad (3)$$

$$\textit{Absorption d'eau} = J_{eau} = - Lp_{rac} (\sigma \Delta \pi) \quad (4)$$

En conséquence, en condition faiblement transpirante, **les plantules devaient donc fonctionner presque comme des osmomètres** uniquement contrôlés par les différences de concentrations de nitrate entre le xylème et le milieu de culture. De plus, puisque les transporteurs de nitrate contrôlent le transport de nitrate, il était également raisonnable de supposer **qu'en faible transpiration, les modifications de croissance racinaire et foliaire devaient s'ajuster au fonctionnement des transporteurs de nitrate**. Néanmoins, pour être validée, cette dernière hypothèse nécessitait de vérifier **les trois hypothèses implicites suivantes** :

En condition de non ou de faible transpiration,

Hyp. 1 : Le signal nitrate est capable de déclencher la croissance au niveau foliaire, ce qui est un préalable à toute accumulation d'eau et à toutes modifications morpho-physiologiques.

Hyp. 2 : Il doit exister un parallèle étroit entre l'absorption et l'allocation du nitrate et de l'eau dans les racines et les parties aériennes.

Hyp. 3 : Il doit exister de fortes corrélations entre l'accumulation d'eau et de ^{15}N pour la croissance et les variations de la surface foliaire.

Bien que la première hypothèse ait été validée par Stitt *et al.* (Scheible *et al.*, 1997a ; Stitt et Feil, 1999), il restait à la confirmer et à vérifier les deux autres hypothèses. Le dispositif de culture utilisé (boîte de Pétri) s'avérait donc parfaitement adapté pour suivre les cinétiques des flux d'eau et de K^{15}NO_3 induits par la disponibilité en nitrate.

A.3. Validation expérimentale du modèle de Clarkson-Steudle

Afin de vérifier, en situation de limitation en nitrate et à faible transpiration, la validité du modèle hypothétique proposé par Clarkson et Steudle (2000), nous avons, dans un premier temps, cherché à décrire précisément, les relations existant entre les variations de croissance des parties racinaires et aériennes avec l'expression et l'activité des transporteurs de nitrate en réponse à la disponibilité en nitrate.

A.3.1. Validation des hypothèses connexes implicites

Dans les conditions de culture utilisées, les résultats ont montré que l'absorption de K^{15}NO_3 est fortement corrélée à l'absorption d'eau (Fig. III.4B, **Hyp. 2**). De même, les cinétiques durant les cinq jours de culture, de l'allocation du ^{15}N et de l'eau dans les parties aériennes sur des pas de temps de 24 heures montrent des profils équivalents (Fig. III.5B et C). Les seules différences observées entre les cinétiques à 1 et 5 mM de nitrate correspondent aux bascules morphologiques racinaires et foliaires induites pour ces doses de traitement. C'est en effet entre ces deux

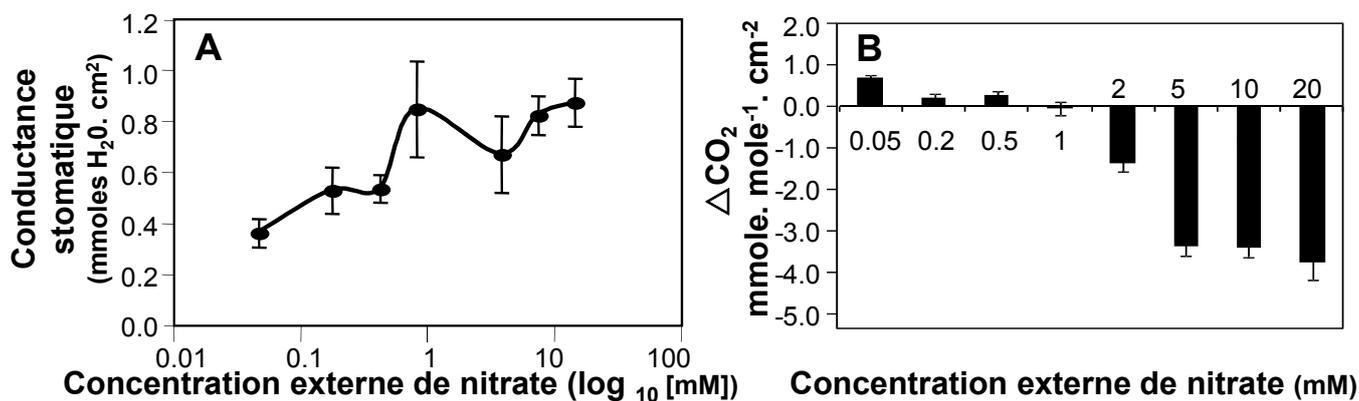


Fig. IV.2: **A)** Conductance stomatique de plantules de *Brassica napus* en fonction de la concentration exogène de nitrate (échelle logarithmique en base 10). **B)** Effet de la disponibilité en nitrate (0,05 à 20 mM) sur la photosynthèse mesurée à l'aide du Licor 6400. Une valeur négative indique une activité photosynthétique importante. Les valeurs correspondent aux moyennes de quatre répétitions de quatre plantules chacune ± l'erreur standard.

concentrations de nitrate que l'on observe une inversion du rapport biomasse aérienne / biomasse racinaire. La forte absorption d'eau et de nitrate induite entre 1 et 5 mM est concomitante avec la réduction par deux de la longueur racinaire et l'augmentation par deux de la surface foliaire (Fig. III.2B). Malgré ces bascules morphologiques majeures, l'accumulation d'eau dans les parties aériennes restait étroitement corrélée à l'augmentation de la surface foliaire ($r^2 = 0,9$; $p < 0,05$) et aux quantités de ^{15}N accumulées ($r^2 = 0,9$ $p < 0,05$, Fig. III.S10B et S12, **Hyp. 3**).

L'ensemble de ces résultats confirme donc l'hypothèse selon laquelle, **en conditions non transpirantes, les plantules fonctionnent presque à la façon d'un osmomètre commandé uniquement par les variations des concentrations externes de nitrate**. Dans cette situation physiologique, le flux osmotique d'eau est lié à la réduction de la croissance racinaire et à l'augmentation de la croissance foliaire. Ce flux osmotique est parfaitement corrélé avec l'absorption et la translocation de nitrate dans les parties aériennes. **Ces résultats confirment donc que c'est bien le signal nitrate qui agit sur les modifications morpho-physiologiques observées au niveau foliaire et racinaire. Ceci a pour conséquence une entrée d'eau pour la croissance foliaire.**

A.3.2. Confirmations des relations hypothétiques du modèle de Clarkson-Steudle

Les relations hypothétiques entre la disponibilité racinaire de nitrate et les changements morpho-physiologiques au niveau foliaire proposées dans **la branche droite du modèle de Clarkson-Steudle ont été confirmées et précisées** (Fig. II.49 et IV.1).

Ainsi, nous avons confirmé que l'accroissement des concentrations externes en nitrate induit une augmentation de la conductance stomatique (Fig. IV.2A) ce qui est en accord avec les données obtenues dans la littérature (Radin et Boyer, 1982). La mesure de la photosynthèse nette par unité de surface réalisée avec un système Licor nous a également permis de montrer que les variations de la photosynthèse nette étaient corrélées avec l'ouverture stomatique (Fig. IV.2B). Cependant, la forte augmentation de la photosynthèse observée entre 1 et 5 mM correspondait à une diminution de la conductance suggérant une régulation stomatique liée au statut N (Fig. IV.2.A et B). Il n'est pas exclu que cet ajustement dépende de l'augmentation de la production de NO induit par l'activité nitrate réductase et la signalétique ABA (Desikan *et al.*, 2002; Neill *et al.*, 2008 ; cf §: II.Structure-Fonction.D.4).

De même, les résultats ont confirmé et permis d'établir la relation entre l'augmentation de la croissance foliaire (biomasse fraîche et surface foliaire) et la disponibilité en nitrate (Fig. III.S10B et S12). Les mesures cinétiques d'accumulation du carbone dans les tissus par IRMS nous ont

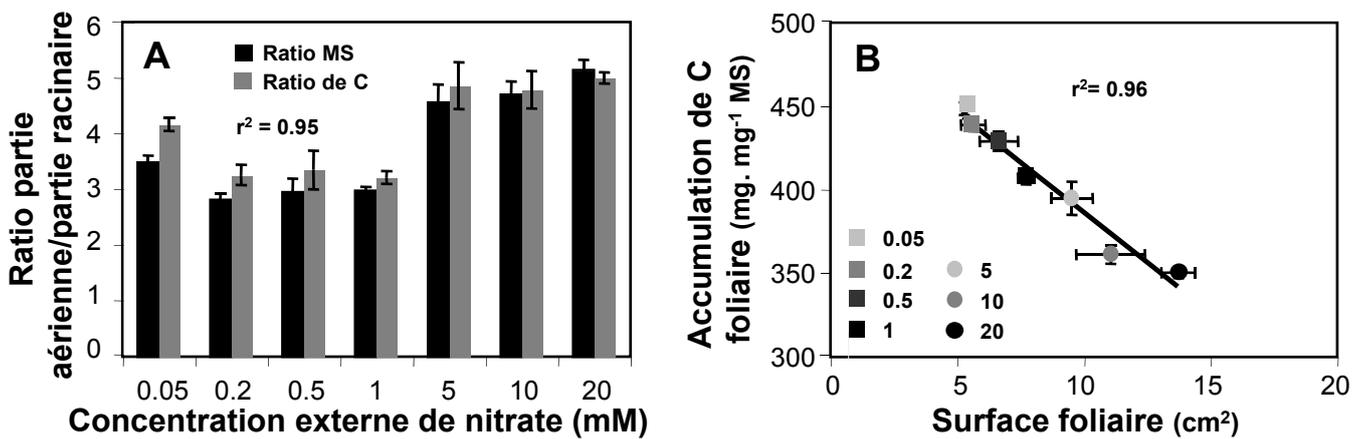


Fig. IV.3: **A)** Rapport de la masse des parties aériennes sur la masse des parties racinaires en fonction de la concentration externe de nitrate (0,05 à 20 mM) de plantules de *Brassica napus* cultivées pendant cinq jours en boîte de Pétri. **B)** Relation entre l'accumulation de carbone foliaire et la surface foliaire. Les valeurs correspondent aux moyennes de quatre répétitions de quatre plantules chacune \pm l'erreur standard. Les coefficients de corrélation (r^2) sont indiqués.

également permis d'analyser la répartition du carbone entre les racines et les parties aériennes en fonction de la disponibilité en nitrate. Cette relation montre une bascule nette entre 1 et 5 mM dans le rapport du carbone accumulé entre les parties aériennes et les racines (Fig. IV.3A). L'allocation du carbone est en faveur des racines en conditions limitantes (0,05 à 0,2 mM) et optimales (0,5 et 1 mM) puis change en faveur des feuilles en conditions suboptimales (1 à 20 mM). Ces résultats confirment les données de nombreuses études de la littérature (Scheible *et al.*, 1997a ; Stitt et Feil, 1999). Une analyse plus précise de nos données a également permis de montrer qu'il existait une relation linéaire négative entre la quantité de carbone accumulée dans les feuilles et la surface foliaire (Fig. IV.3B). Ceci peut être interprété par une diminution du carbone alloué à la paroi des cellules foliaires (masse surfacique) lorsque l'expansion et le volume de celles-ci augmentent en réponse au nitrate. Ce dernier résultat est conforme avec les résultats obtenus chez le Tabac par Scheible *et al.* (1997a).

A.3.3. Différences observées avec le modèle hypothétique de Clarkson-Steudle

La principale différence observée entre le modèle hypothétique de Clarkson-Steudle et les résultats expérimentaux obtenus concerne **la branche gauche du modèle** et l'expression des transporteurs (Fig. II.49 et IV.1). Si dans nos conditions expérimentales comme dans le modèle, une limitation en nitrate induit bien une prolifération racinaire, en revanche les gènes codant les transporteurs de nitrate BnNRT2.1 et BnNRT1.1 ne sont pas déréprimés comme le suppose le modèle (Fig. III.4C). Bien que la branche de droite du modèle se rapporte à des situations de la littérature correspondant à une limitation initiale en nitrate, en sulfate ou en phosphate; Clarkson *et al.* (2000) ont décrit une situation physiologique de stress nutritionnel pour l'azote. Dans cette situation, les plantes normalement alimentées en nitrate subissent brusquement une limitation ou une carence. Il est alors généralement observé une dé-répression du gène codant le transporteur AtNRT2.1 et une répression du gène *Nrt1.1* (Lejay *et al.*, 1999; Remans *et al.*, 2006a ; Beuve *et al.*, 2004). Cependant chez le Colza, la privation en nitrate n'entraîne pas toujours une dé-répression du gène *BnNrt2.1*, mais une répression (Faure-Rabasse *et al.*, 2002).

A.3.4. Les relations signalétiques racines-feuilles et feuilles-racines dans le modèle

Notre approche éco-physiologique à l'échelle de la plante entière ne nous a pas permis de préciser les **relations signalétiques à longue distance racines-feuilles et feuilles-racines** *via* le

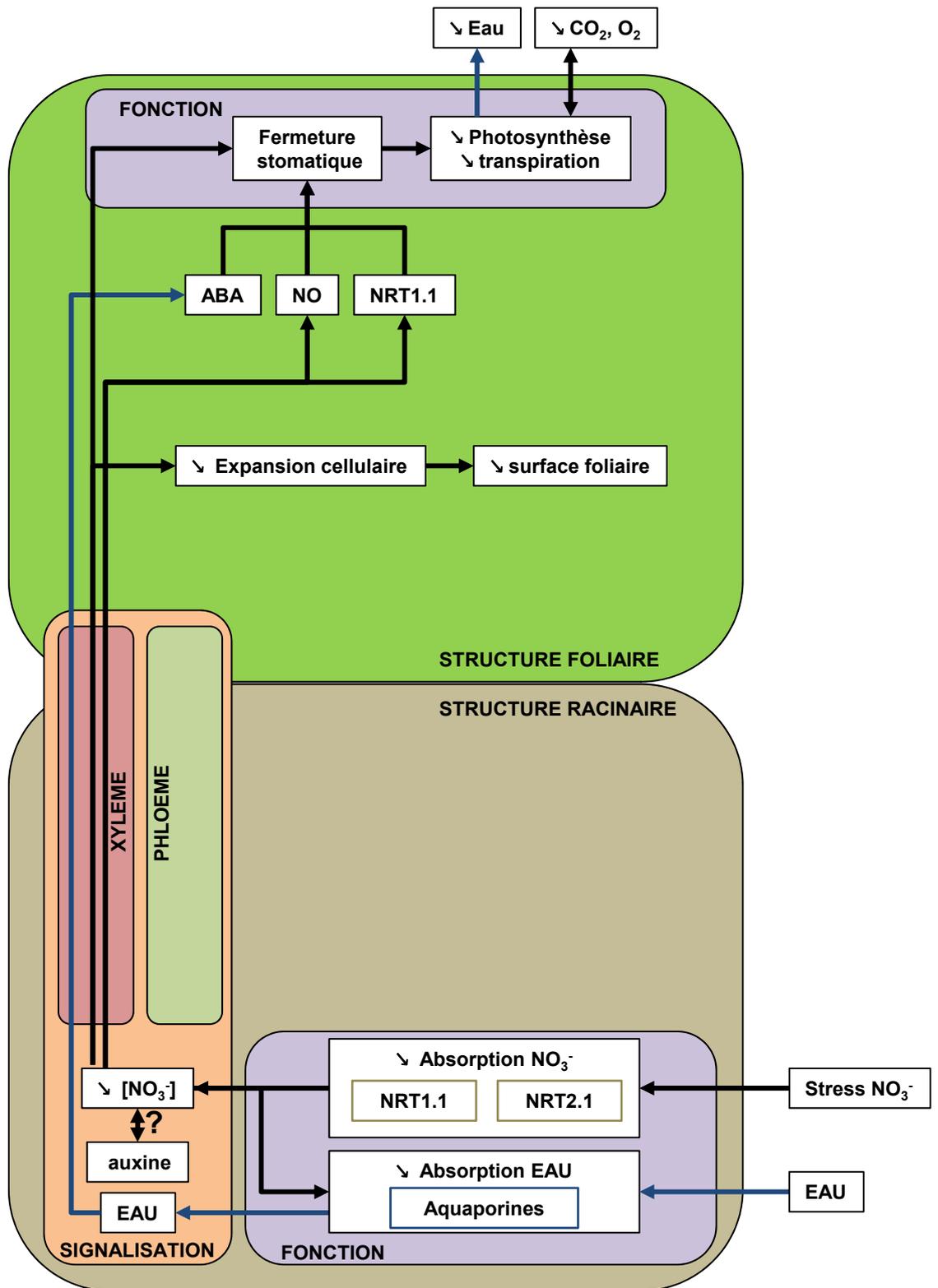


Figure IV.4: Modèle signalétique racine-feuille (stomates) induit par la disponibilité en nitrate. Ce Modèle intègre les transporteurs de nitrate (NRT1.1 et NRT2.1) et d'eau (aquaporines), les échanges gazeux vers l'extérieur des plantules résultant de la transpiration et de la photosynthèse. Les trois hypothèses signalétiques pour le contrôle de l'ouverture stomatique sont représentés: Régulation par l'ABA (Christmann *et al.*, 2007 ; Tardieu *et al.*, 2010), par le NO (Desikan *et al.*, 2002 ; Neill *et al.*, 2008) et par le transporteur NRT1.1 (Guo *et al.*, 2003).

système vasculaire (xylème et phloème) ainsi que **les signalétiques à l'échelle cellulaire qui interviennent sur l'élongation des cellules foliaires et racinaires. Cependant, les résultats de la littérature nous permettent de proposer les hypothèses suivantes :**

Une signalétique nitrate racines-feuilles *via* le xylème est impliquée dans le **contrôle de l'ouverture stomatique, la photosynthèse et la croissance foliaire.** Comme nous l'avons signalé dans notre analyse bibliographique, cette relation signalétique a déjà été décortiquée par des études séparées. Elle fait l'objet de trois hypothèses non mutuellement exclusives sur le rôle signalétique du nitrate (cf. § : II.Structure-Fonction.D.2.). Ces trois hypothèses signalétiques qui dépendent toutes du signal nitrate sont présentées dans le modèle figure IV.4.

Une signalétique feuilles-racines *via* le phloème est impliquée dans la **prolifération racinaire en relation avec l'allocation du carbone** des feuilles aux racines en situation de limitation ou d'alimentation optimale. Nous proposons ici une **hypothèse signalétique feuilles-racines** (Fig. IV.5) basée sur le contrôle de la croissance racinaire par l'interaction glucose/auxine proposée par Misrha *et al.* (2009). En effet, cette hypothèse permet d'intégrer d'une façon simple différents résultats de la littérature obtenus en réponse à la limitation en nitrate. Les résultats de Scheible *et al.* (1997a), montrent une augmentation racinaire des concentrations de glucose et de fructose de la racine mature et les résultats de Tian *et al.* (2008) qui révèlent une augmentation du flux phloémique et de la synthèse racinaire d'AIA en réponse à la limitation en nitrate. **De plus, cette hypothèse signalétique renforce et précise l'ancienne hypothèse du flux phloémique d'AIA proposée par Forde en situation de carence nutritionnelle pour l'azote** (Forde, 2000; Forde et Lorenzo, 2001).

A.3.5. Quelles nouvelles relations structure-fonction révèlent les résultats?

Relations morpho-physiologiques au niveau racinaire

La gamme étendue de nitrate utilisée pour établir le modèle en conditions limitantes, optimales et suboptimales a permis de mettre en évidence après cinq jours de traitements des relations originales en termes de relation structure-fonction. En effet, les analyses réalisées au cours de deux études indépendantes ont révélé que les variations d'expression des gènes codant les transporteurs BnNRT2.1 et BnNRT1.1 étaient corrélées avec les changements morpho-physiologiques mesurés au niveau racinaire (Le Ny *et al.*, 2013 ; Leblanc *et al.*, 2013). Ainsi l'expression du gène *BnNrt2.1* était corrélée de façon linéaire aux variations d'élongation racinaire et d'accumulation d'eau et de ^{15}N , alors que l'expression du gène *BnNrt1.1* était corrélée

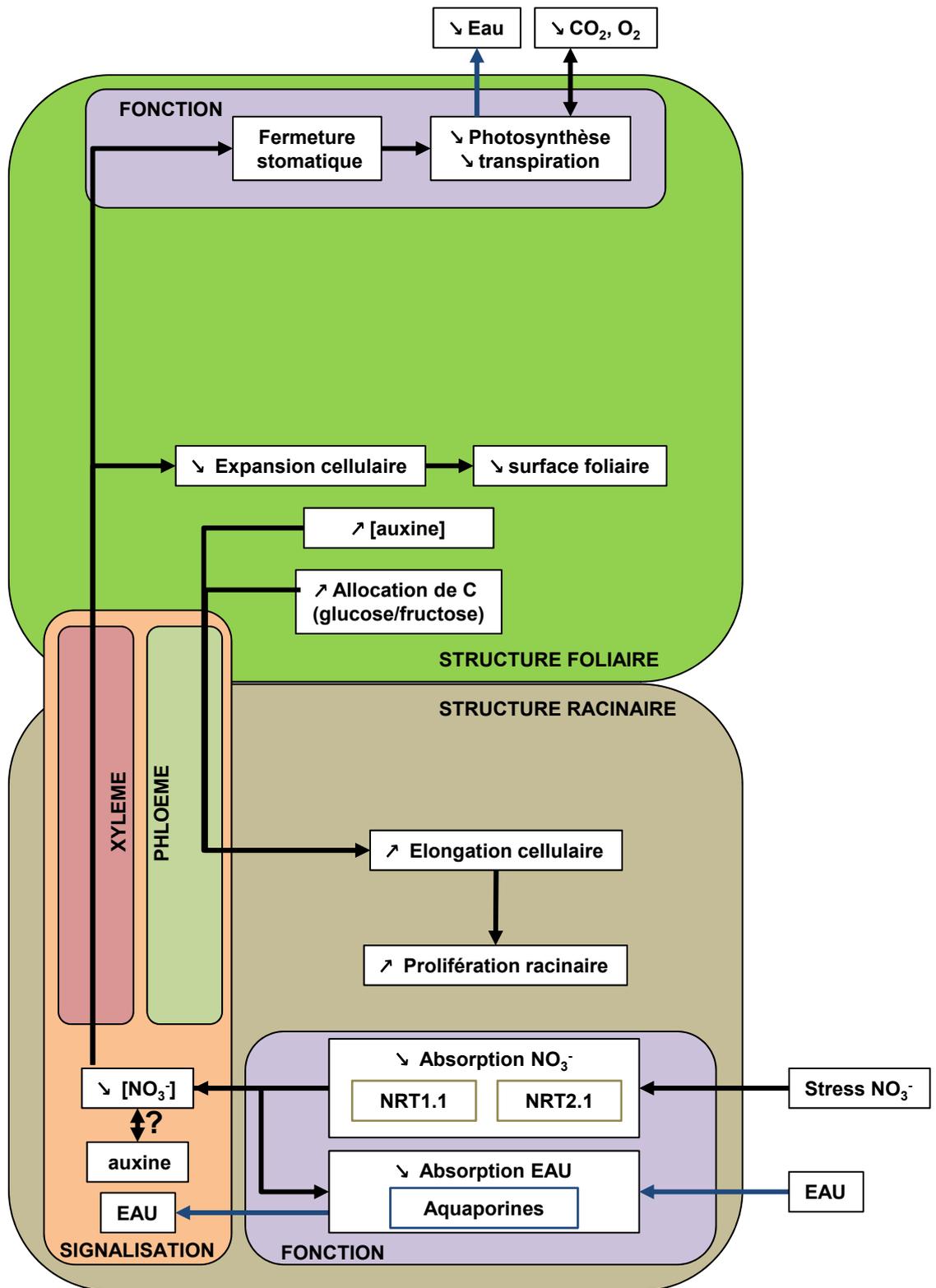


Figure IV.5: Modèle signalétique feuilles-racines induit par la disponibilité en nitrate. Ce modèle synthétise les résultats montrant un contrôle de la croissance racinaire lors d'une faible alimentation en azote par l'interaction glucose/auxine (Misrha *et al.*, 2009), ainsi que l'augmentation des concentrations en glucose et en fructose (Scheible *et al.*, 1997a). Ce modèle intègre les transporteurs de nitrate (NRT1.1 et NRT2.1) et d'eau (aquaporines), la signalétique entre les parties aériennes et racinaires, ainsi que les échanges gazeux vers l'extérieur des plantules résultant de la transpiration et de la photosynthèse.

de façon exponentielle à ces variables (Fig. III.7A, B et C). Une conclusion logique suggère que **l'expression du transporteur BnNRT2.1 s'adapte aux variations de la longueur et de la surface absorbante du système racinaire** (Fig. III.7C). Cette conclusion est cohérente avec la localisation du transporteur BnNRT2.1 dans les assises corticales et épidermiques de la racine mature (Girin *et al.*, 2007 ; Orsel *et al.*, 2007 ; Chopin *et al.*, 2007).

L'induction exponentielle de l'expression du transporteur BnNRT1.1 entre 1 et 5 mM (Fig. III.4C) semble quant-à-elle, liée à la forte réduction de l'élongation du système racinaire. Sachant que la transcription du gène *BnNrt1.1* est régulée par l'auxine (Guo *et al.*, 2002) et que le transporteur pourrait agir comme un transporteur d'auxine (Krouk *et al.*, 2010), il n'est pas exclu que la sur-expression de celui-ci soit directement sous le contrôle de l'AIA en provenance des feuilles ou synthétisé dans la racine. Cependant, cette relation reste difficile à expliquer au regard des résultats de Tian *et al.* (2008). Ceux-ci ont en effet montré, chez le Maïs, que l'inhibition racinaire induite par les fortes concentrations de nitrate est corrélée à une baisse des concentrations phloémiques et racinaire d'AIA. Cependant, les mesures de concentrations tissulaires ne rendent pas compte des variations fines des concentrations de l'AIA dans les différentes zones racinaires (Ljung *et al.*, 2005). Ainsi, chez *Arabidopsis* la présence de fortes concentrations d'AIA dans les tissus de la stèle et dans les méristèmes I et II est plus conforme au profil de localisation du transporteur AtNRT1.1 (Guo *et al.*, 2001a et 2002, Remans *et al.*, 2006b).

Par ailleurs, l'expression de *BnNrt1.1* dans les cotylédons présente un profil de transcription inverse par rapport aux racines mais de plus faible intensité (Fig.III.6B). Ce résultat est confirmé par les corrélations opposées obtenues entre les variations d'eau accumulée dans les feuilles et l'expression racinaire et foliaire de *BnNrt1.1* (Fig. III.6C). **Ces relations laissent donc supposer une implication coordonnée de BnNRT1.1 au niveau foliaire et racinaire pour la croissance en relation avec la disponibilité en nitrate.** Ce résultat est en accord avec des travaux anciens chez le Cotonnier montrant l'effet de la disponibilité en nitrate sur l'augmentation de la conductance stomatique (Radin et Boyer, 1982). Il confirme également des résultats plus récents chez *Arabidopsis* qui montrent la présence de AtNRT1.1 dans les cellules de garde des stomates et son implication dans la régulation stomatique (Guo *et al.*, 2001). Bien que tous ces résultats cités aient été obtenus en conditions transpirantes, il n'est pas exclu que, dans nos conditions, la très forte augmentation de l'absorption et de la translocation d'eau et de nitrate pour la croissance des parties aériennes soit responsable de l'ouverture stomatique sans effet sur la transpiration.

En résumé, la relation linéaire ente les modifications de l'architecture racinaire et de l'expression du transporteur BnNRT2.1 permet de concevoir une relation proportionnée en réponse à la disponibilité en nitrate entre modification structurale et fonctionnelle, en

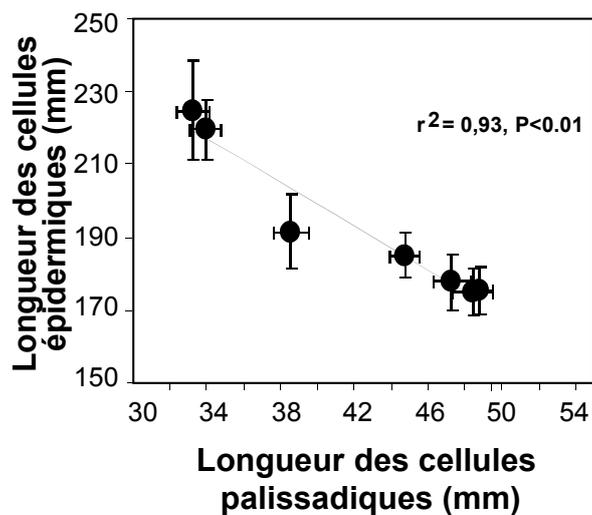


Fig. IV.6: Relation entre la longueur des cellules épidermiques et la longueur des cellules palissadiques en réponse à une dose croissante de nitrate exogène. Les valeurs correspondent aux moyennes de quatre répétitions de quatre plantules chacune \pm l'erreur standard. Le coefficient de corrélation (r^2) et de significativité (P) sont indiqués.

revanche la relation est moins évidente dans le cas du transporteur BnNRT1.1. La relation exponentielle observée, de type tout ou rien entre 1 et 5 mM de nitrate, ainsi que les éléments récents de la littérature sur d'autres rôles fonctionnels de ce transporteur (régulation par l'auxine, transport d'auxine et rôle dans la conductance stomatique) nous ont conduit à réexaminer la fonction de NRT1.1 en tant que transporteur de nitrate.

Relations morpho-physiologiques au niveau cellulaire

Si les fortes corrélations que nous obtenons entre les variables morphologiques, physiologiques et l'expression des transporteurs nitrate ne laissent aucun doute sur les liens entre croissance tissulaire et réponse au nitrate, en revanche, elles soulèvent deux questions majeures. La première concerne le **rôle du signal nitrate sur la croissance des cellules racinaires et foliaires**. La seconde concerne le **rôle potentiel joué dans ces réponses par l'ion d'accompagnement du nitrate : le potassium**.

Rôle du signal nitrate et de l'auxine dans l'élongation cellulaire

Sur le modèle plantule utilisé, les résultats montrent que l'expansion des cellules épidermiques racinaires et des cellules palissadiques foliaires présente une réponse en miroir à la disponibilité en nitrate (Fig. III.2C). En conséquence, il existe une corrélation négative entre l'élongation de ces deux types de cellules sur le gradient de nitrate utilisé (Fig. IV.6). Si ce résultat rend compte de l'inversion du rapport de biomasse entre les parties aériennes et les racines induit par l'accumulation de nitrate dans les feuilles (Scheible *et al.*, 1997a), **il suggère que les réponses induites par le nitrate sur l'élongation cellulaire commandent en grande partie les variations tissulaires observées**.

Cependant, si l'expansion cellulaire et tissulaire au niveau foliaire est corrélée à l'augmentation des concentrations de $^{15}\text{NO}_3^-$ et d'eau pour la croissance (Fig. III.S10B et S12), en revanche la situation est complètement différente pour les racines. En effet, l'élongation racinaire est induite en situation limitante pour le nitrate (Fig. III.2B). Ainsi, malgré des concentrations de nitrate extrêmement faibles dans la racine, on observe une élongation cellulaire importante (Fig. III.2B). L'accumulation d'eau nécessaire à la croissance racinaire ne peut donc être expliquée, ni par l'accumulation xylémique de nitrate (Ficus, 1975), ni la modification post transcriptionnelle des aquaporines induite par le nitrate (Hoarau *et al.*, 1996; Gorska *et al.*, 2008b; Gloser *et al.*, 2007). La seule explication rationnelle possible pour expliquer les résultats correspond à une

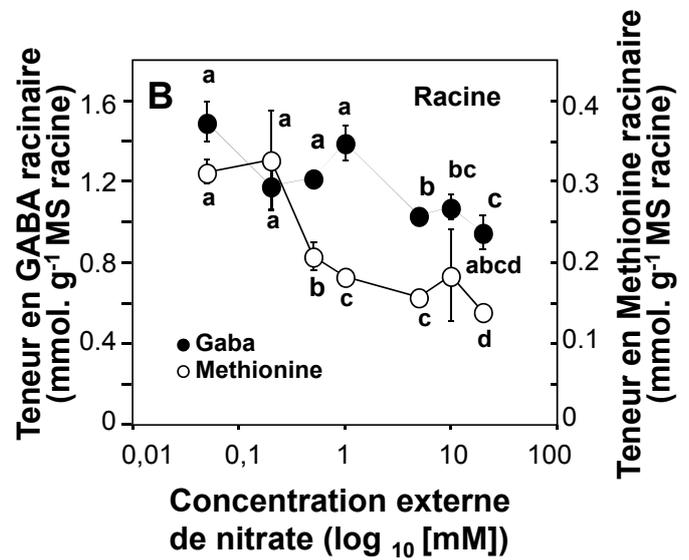
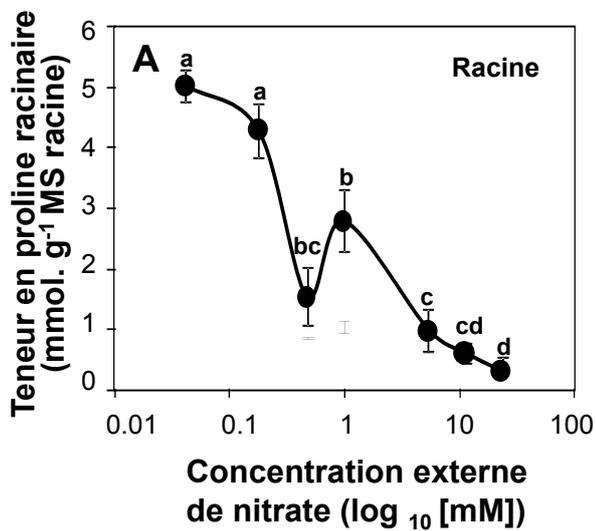


Fig. IV.7: Teneur en **A)** proline, **B)** gaba et methionine dans les racines de plantules de *Brassica napus* en fonction de la concentration externe de nitrate. La concentration en nitrate est représenté avec une échelle logarithmique en base 10. Les valeurs correspondent aux moyennes de quatre répétitions de quatre plantules chacune \pm l'erreur standard.

réorientation du métabolisme N, ce qui conduit à une forte augmentation des concentrations de proline, gaba et méthionine (Fig. IV.7A et B), **est donc probablement l'accumulation de solutés compatibles, qui permet le flux osmotique d'eau nécessaire à la croissance des cellules racinaires**. Par ailleurs, le signal d'élongation des cellules racinaires ne serait donc pas ici le nitrate mais certainement l'auxine. Ces résultats sont, en effet, cohérents avec les fortes concentrations racinaires d'AIA induites par la limitation en nitrate chez le Maïs (Tian *et al.*, 2008). Or selon **la théorie de la croissance acide**, c'est bien l'auxine *via* son action sur les ATPases H⁺ membranaires qui constituent le signal inducteur de la croissance cellulaire.

Rôle du potassium dans l'élongation cellulaire

La deuxième question soulevée par nos résultats concerne **le rôle joué** dans les réponses morphologiques et physiologiques observées **au niveau cellulaire et tissulaire par l'ion d'accompagnement du nitrate: le potassium**.

Au niveau cellulaire, il est établi depuis longue date, que le potassium intervient dans l'élongation cellulaire (Haschke et Lüttge, 1975 ; Luthen *et al.*, 1990; Rayle et Cleland, 1992). En effet, lors de l'élongation cellulaire, on observe une forte entrée d'ions potassium entre 0-30 minutes après l'induction par l'auxine des ATPases-H⁺. Cet influx de potassium induit une production stœchiométrique de malate qui s'accumule dans la vacuole. Le malate joue ici **un rôle d'acide correcteur** pour contrebalancer l'alcalinisation du cytoplasme induit par l'extrusion de protons par les ATPases-H⁺ mais également **un rôle d'osmoticum** afin de maintenir la pression de turgescence nécessaire à l'élongation cellulaire (Haschke et Lüttge, 1975). Dans nos conditions limitantes en nitrate (0,05 à 0,2 mM), le potassium n'est jamais un facteur limitant pour l'élongation cellulaire puisque les concentrations du potassium sont au minimum de 1,5 à 1,75 mM. En effet, le potassium est apporté dans la solution nutritive *via* le K₂SO₄, le KHPO₄ et le KH₂PO₄.

Au niveau tissulaire, les travaux de Drew (1975) ont montré que lorsque le potassium est limitant (0,01 mM), l'élongation racinaire est réduite. De même, lorsque que le potassium est apporté de façon hétérogène (0,01-3-0,01 mM), la prolifération des racines latérale est observée sur l'ensemble de la racine et non pas comme dans le cas du phosphate et du nitrate dans la zone médiane spécifiquement alimentée (Drew, 1975). Par ailleurs, à la différence du phosphate et du nitrate, le potassium n'a pas d'effet sur la croissance des poils absorbants (Desbrosses *et al.*, 2003). En conséquence, l'augmentation de l'élongation racinaire observée entre 0,05 et 1 mM nitrate et la forte réduction du système exploratoire observée entre 1 et 5 mM de KNO₃ ne

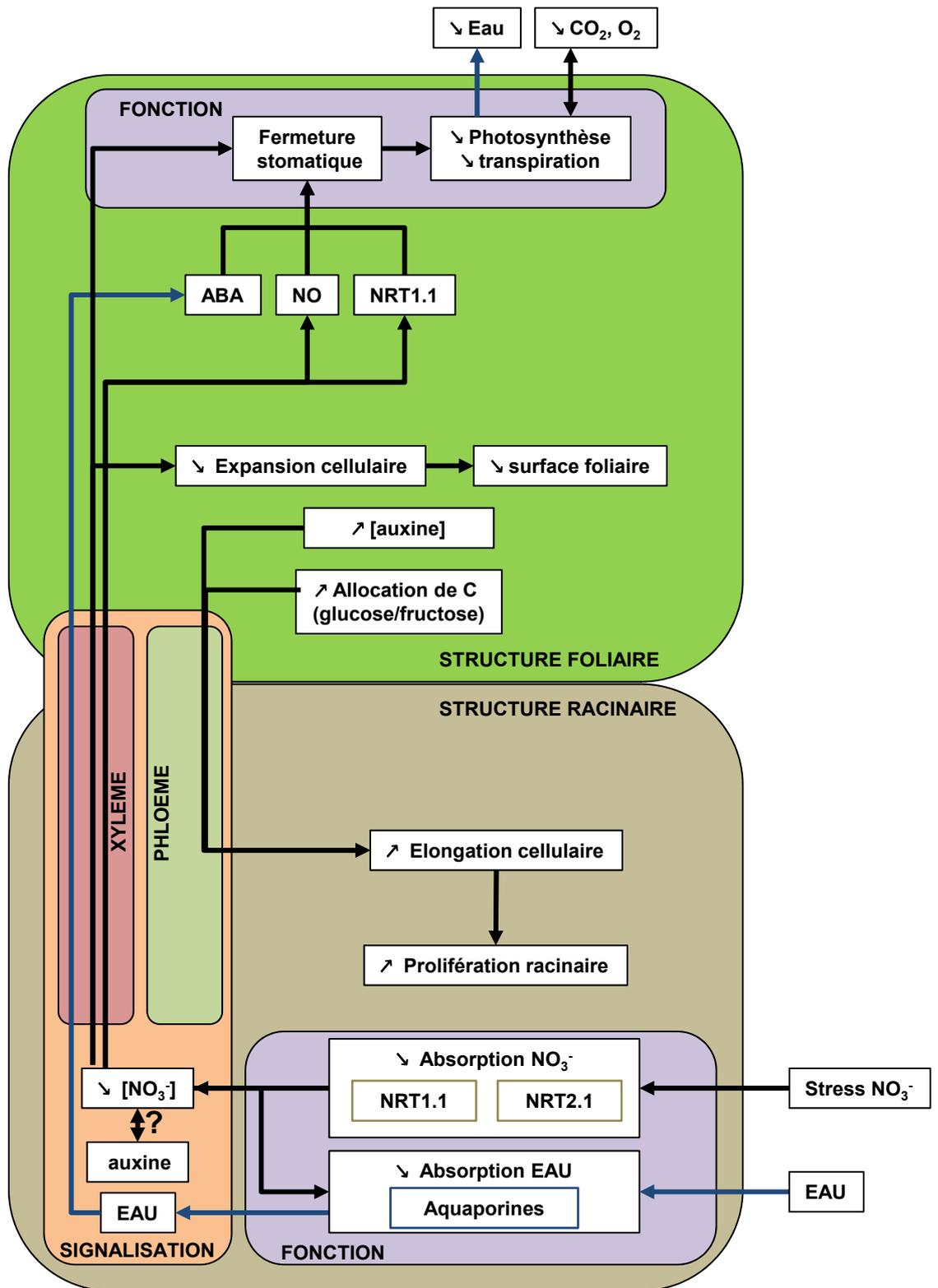


Figure IV.8: Modèle associant les signalétiques racines-feuilles et feuilles-racines présentés dans les figures IV.4 et IV.5. Ce modèle intègre la fonction des transporteurs de nitrate (NRT1.1 et NRT2.1) et d'eau (aquaporines). Ce modèle présente la signalétique entre les parties aériennes et racinaires, ainsi que les échanges gazeux vers l'extérieur des plantules résultant de la transpiration et de la photosynthèse.

peuvent pas être attribuées à l'effet du potassium. De même, la faible expression du gène *BnNrt1.1* observée entre 0,05 et 1 mM KNO_3 est contradictoire avec la surexpression par un facteur 3 du gène *AtNrt1.1* induite chez *Arabidopsis* lors d'une privation en potassium (Armengaud *et al.*, 2004). Par contre, ces résultats confirment les résultats d'expression des gènes *AtNrt2.1* et *AtNrt1.1* chez *Arabidopsis*. En effet, la transcription des gènes *AtNrt2.1* et *AtNrt1.1* est induite par l'augmentation des concentrations de KNO_3 de 0,25 à 25 mM mais n'est pas induite par les mêmes concentrations de KCl (Hu *et al.*, 2009).

En résumé, comme précédemment pour les signalétiques longue distance, les résultats posent la question suivante : comment interpréter de façon cohérente le lien entre le signal nitrate et le signal auxine par rapport à la croissance racinaire et foliaire? En effet, ces deux signaux ne semblent réellement intervenir simultanément dans l'induction de la croissance cellulaire qu'au niveau foliaire. Une hypothèse simple pour relier ces résultats contradictoires consiste à supposer que le signal nitrate agit en amont sur le transport et la répartition de l'auxine dans la plante plutôt que directement sur l'élongation cellulaire.

En conclusion, l'ensemble de ces premiers résultats nous permet donc de proposer un modèle de fonctionnement structure-fonction plus complet en condition non transpirante sur des plantules de Colza en réponse à la disponibilité en nitrate (Fig. IV.8). Les relations établies entre les modifications morphologiques racinaires et foliaires montrent que celles-ci sont parfaitement corrélées avec le fonctionnement des transporteurs de nitrate *BnRT2.1* et *BnNRT1.1*. Elles montrent que les transporteurs nitrate jouent un rôle clé dans les flux et la répartition de l'azote et de la signalétique nitrate pour la croissance racinaire et foliaire. La croissance induite dans les feuilles par le signal nitrate conduit par voie de conséquence à un flux osmotique d'eau. De même, les modifications de croissance induites aux niveaux tissulaire et cellulaire laissent supposer une interaction forte entre le signal nitrate et le signal auxine, le nitrate semblant agir en amont sur le transport et la répartition de l'auxine dans la plante.

Tableau IV.1: Synthèse (non exhaustive) bibliographique sur les conditions de cultures utilisées pour mesurer les variations d'élongation racinaire en fonction de la disponibilité en nitrate.

Espèces	Dispositif d'alimentation minérale	Type d'alimentation Nitrate (mM)	Temps de traitement des racines	Conditions physiologiques	Auteurs
Orge (<i>Hodeum Vulgare</i> L.)	Système segmenté sur papier filtre horizontal	Hétérogène 0,01/1/0,01	26 et 34 jours	Transpiration	Drew <i>et al.</i> , 1973
Orge (<i>Hodeum Vulgare</i> L.)	Système segmenté sur sable vertical	Hétérogène 0,01/1/0,01	21 jours	Transpiration	Drew, 1975
Tabac (<i>Nicotiana Tabacum</i> L.)	Split root hydroponie	Homogène 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 6; 12; 20	21 et 42 jours	Transpiration	Scheible <i>et al.</i> , 1997
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Gel d'agarose segmenté horizontal	Hétérogène 0,01/ 0,05 ; 0,1 ; 1 ; 10 ; 50 /0,01	9 jours	Absence de transpiration	Zhang <i>et al.</i> , 1998
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Split root gel segmenté vertical	Hétérogène 0,05/10	9 jours	Absence de transpiration	Remans <i>et al.</i> , 2006

B. Effets compensatoires Structure-Fonction sur l'absorption et le fonctionnement des transporteurs de nitrate BnNRT2.1 et BnNRT1.1 en absence de transpiration

Les effets compensatoires de la structure ou de la fonction sur le prélèvement de nitrate ou d'autres macroéléments ont été initialement discutés par Robinson (1994 et 1996). Robinson tient compte dans ces effets, **des temps de réponse et de l'aspect réversible ou irréversible** de ces phénomènes. Ainsi, il distingue la **compensation fonctionnelle réversible** : augmentation de l'absorption *via* les transporteurs qui survient **à court terme**, et la **compensation structurale irréversible** : augmentation de la croissance racinaire dont les effets permettent une compensation sur **le long terme** de l'absorption (Robinson, 1996). Cette distinction est justifiée au regard des temps de réponse observés pour l'absorption et la croissance racinaire en situation hétérogène d'alimentation (Tableau IV.1). **Afin de réexaminer plus finement au niveau physiologique le rôle des transporteurs nitrate dans ces deux types de compensation, nous avons utilisé sur notre modèle expérimental deux stratégies pharmacologiques :**

Notre première stratégie expérimentale a consisté à moduler à l'aide de L-glutamate la transcription et l'activité du transporteur BnNRT2.1 de **façon à étudier les effets d'une modification de l'absorption (fonction) sur les modifications d'architecture racinaire (structure)**. En effet, seule l'activité et la transcription du gène *AtNrt2.1* semble affectée par les acides aminés et le statut N (Lejay *et al.*, 1999 ; Vidmar *et al.*, 2000 ; Loqué *et al.*, 2003). Le transporteur AtNRT2.1 étant localisé sur les assises épidermiques et corticales de la racine mature d'*Arabidopsis* (Girin *et al.*, 2007) et l'expression du gène *BnNrt2.1* étant corrélée linéairement avec l'élongation racinaire (Leblanc *et al.*, 2008), la stratégie expérimentale a consisté à inhiber spécifiquement et progressivement à l'aide de concentrations croissantes de L-glutamate l'activité du transporteur BnNRT2.1. **Les objectifs étaient d'étudier d'une part, le rôle de BnNRT2.1 dans l'absorption du nitrate et, d'autre part, l'importance des phénomènes de compensation et/ou de couplage entre le transporteur BnNRT2.1 et BnNRT1.1 pour l'absorption du nitrate en relation avec la croissance racinaire et foliaire.**

Notre seconde stratégie expérimentale a consisté à moduler la biosynthèse de l'éthylène, par une approche pharmacologique à l'aide d'un activateur (ACC) et de deux inhibiteurs (AVG et AIBA) de façon à **étudier les effets d'une modification de l'architecture racinaire (structure) sur l'absorption du nitrate (fonction)**. L'idée était ici de court-circuiter les temps de réponse des effets du nitrate sur la croissance racinaire en jouant sur les régulateurs de croissance dont les

effets sont beaucoup plus forts et rapides (minutes – heures). L'éthylène a été choisi car il a été démontré que celui-ci intervient sur la croissance cellulaire *via* son action sur la synthèse, le transport et la répartition de l'AIA le long de la racine (Stepanova *et al.*, 2005; Swarup *et al.*, 2007; Ruzicka *et al.*, 2007). **Les effets de l'éthylène sur l'élongation des cellules épidermiques racinaires sont également extrêmement rapides de l'ordre de quelques minutes** (Le *et al.*, 2001). De plus, les modifications induites ne portent pas seulement sur l'élongation du système exploratoire mais également sur le système absorbant *via* le nombre et la longueur des poils absorbants (Tanimoto *et al.*, 1995; Masucci et Scheifeibein, 1996 ; Pitts *et al.*, 1998).

Ces deux stratégies étaient justifiées par le fait qu'il existe chez *Arabidopsis*, que ce soit pour la synthèse d'éthylène ou le transport du nitrate, une très forte redondance des gènes impliqués (Orsel, 2002; Okamoto *et al.*, 2003; Tsuchisaka et Theologis, 2004). Cette redondance est encore accrue chez une espèce amphidiploïde comme le Colza. En conséquence, **ces stratégies pharmacologiques présentent l'avantage d'éteindre d'un seul coup l'activité catalytique de toute une famille de transporteurs ou d'enzymes. Elle évitent ainsi les phénomènes de compensation observés avec les approches mutants gène par gène chez *Arabidopsis*** (Orsel *et al.*, 2004, Remans *et al.*, 2006b). **Cependant, l'inconvénient majeur de ces stratégies est que les molécules pharmacologiques utilisées n'ont pas toujours une action ciblée, et qu'elles induisent parfois des effets secondaires qui peuvent masquer ou perturber la réponse physiologique étudiée.**

B.1. Rôle du transporteur NRT2.1 dans les effets compensatoires structure-fonction

B.1.1. Effet d'une inhibition pharmacologique de la fonction du transporteur NRT2.1 par le L-glutamate

L'activité et l'expression du transporteur BnNRT2.1 sont fortement inhibées par le traitement au L-glutamate. Des concentrations croissantes de L-glutamate dans le milieu de culture (0.5 à 10 mM) conduisent à une baisse progressive et significative de l'absorption $K^{15}NO_3$ (Fig. III.16) et une forte inhibition de l'expression du transporteur BnNRT2.1 (Fig. III.18), que les plantules soient traitées par 1 ou 5 mM de nitrate. Ces résultats démontrent donc que **le transporteur NRT2.1 est indispensable pour l'absorption racinaire de nitrate.** Ils sont en accord avec les données de localisation du transporteur NRT2.1 dans l'épiderme et le cortex de la racine mature d'*Arabidopsis* (Girin *et al.*, 2007 ; Orsel *et al.*, 2007) et permettent d'expliquer la relation linéaire obtenue entre l'expression du gène *BnNrt2.1* et la longueur du système racinaire

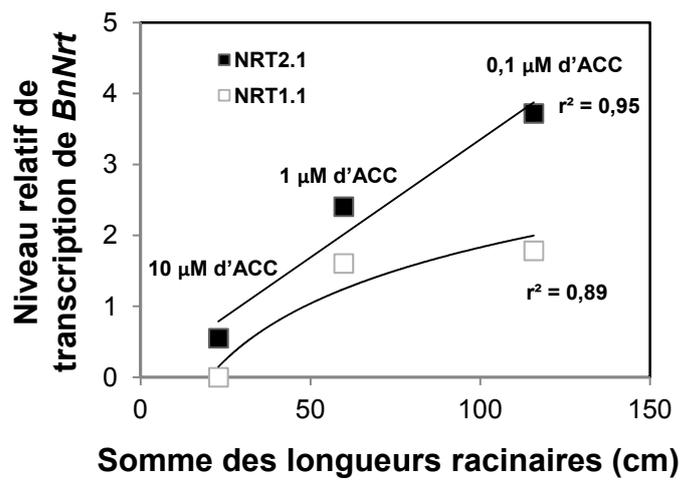


Fig. IV.9: Relation entre l'expression relative de *BnNrt2.1* et *BnNrt1.1* racinaire et la longueur du système racinaire traité avec 0,1, 1 et 10 μ M d'ACC en présence de 1 mM de nitrate de plantule de *Brassica napus* après cinq jours. Les valeurs correspondent aux moyennes de quatre répétitions de quatre plantules chacune \pm l'erreur standard.

exploratoire (Leblanc *et al.*, 2008). De plus, ils confirment les résultats obtenus par notre laboratoire sur la modélisation de l'absorption du nitrate chez le Colza (Malagoli *et al.*, 2004). En effet, selon ces résultats, le système HATS impliquant le transporteur BnNRT2.1 intervient pour plus de 90% dans l'absorption du nitrate au cours d'un cycle de culture en réponse à différents niveaux de fertilisation azoté.

B.1.2. Effet d'une inhibition de la croissance racinaire par l'AVG sur l'absorption et l'expression du transporteur NRT2.1

Les cinétiques de réponse aux traitements AVG ont montré que **le transporteur BnNRT2.1 est responsable de l'absorption du nitrate dans les cellules épidermiques de la racine mature** (Fig. III.33B). En effet, au bout de cinq jours de traitement par 10 μM d'AVG, **les systèmes exploratoire et absorbant sont réduits de plus de moitié par rapport aux plantes témoins** (Fig. III.26A et B). Cependant, les plantules ont absorbé la même quantité de $^{15}\text{NO}_3^-$ (Fig. III.32B). L'augmentation de l'expression de *BnNrt2.1* **compense donc** les modifications de croissance des systèmes exploratoire et absorbant induits par le traitement AVG (Fig. IV.9). Les racines traitées par l'AVG n'ayant presque plus aucun poil absorbant, cette compensation ne s'explique que si **le siège de l'absorption du nitrate ne se situe pas exclusivement au niveau des poils absorbants mais sur l'ensemble des cellules épidermiques racinaires**. En fait, ce résultat corrobore les données cellulaires de localisation histochimique GUS et GFP de la protéine AtNRT2.1 qui montrent que celle-ci est adressée aussi bien à la membrane plasmique des cellules trichoblastes qu'à celle des cellules atrichoblastes (Chopin *et al.*, 2006 ; Orsel *et al.*, 2007).

B.1.3. Effet d'une inhibition pharmacologique de la croissance racinaire par l'ACC sur l'absorption et l'expression du transporteur NRT2.1

Les phénomènes de compensation pour l'expression du gène *BnNrt2.1* lors de traitements par l'ACC démontrent que les variations d'expression de *BnNrt2.1* sont corrélées de façon spatio-temporelle avec les modifications d'architecture racinaire. En effet, l'expression de *BnNrt2.1* diminue linéairement avec la réduction de l'élongation racinaire lors d'un traitement prolongé (5 jours) par 10 μM ACC (Fig. III.33B ; Leblanc *et al.*, 2008). De même, lors de l'augmentation des doses d'ACC (0,1 à 10 μM) on observe une corrélation linéaire négative entre les variations d'expression du transporteur BnNRT2.1 et les variations de longueur du système exploratoire des plantules de *B. napus* après 5 jours de traitement (Fig. IV.9). Cependant, ce traitement induit un découplage entre la régulation transcriptionnelle des gènes *BnNrt2.1* et

BnNrt1.1 et l'absorption de $^{15}\text{NO}_3^-$ (Lemaire *et al.*, 2013). Ainsi, contrairement à l'étude cinétique (Fig. III.4C), la transcription diminue alors que l'absorption de $^{15}\text{NO}_3^-$ augmente par unité de longueur racinaire. Par ailleurs, cette sur-expression du gène *Nrt2.1* en présence d'ACC, bien que contradictoires avec les résultats de Tian *et al.* (2009), ne peut être comparés avec ceux-ci. En effet, leurs traitements sont des **traitements aigus** d'une durée de 6 heures effectués à faibles et fortes concentrations exogènes de nitrate (0,1 ou 10 mM KNO_3), alors que nos traitements, sont des **traitements chroniques** réalisés sur 5 jours à 1 mM KNO_3 avec des doses variables d'ACC : 0,1, 1 et 10 μM .

Le découplage observé entre la transcription et l'activité des transporteurs de nitrate induit par les traitements 0,1, 1 et 10 μM d'ACC (Fig. III.38A et III.39B), pourrait être expliqué par l'inhibition des ATPases- H^+ membranaires. En effet, des résultats récents chez *Arabidopsis* ont révélé que **le traitement racinaire par l'ACC entraîne une alcalinisation de l'apoplaste des cellules épidermiques racinaire et conduit à une inhibition de l'élongation cellulaire** (Staal *et al.*, 2011). Le traitement par un inhibiteur (N,N'-dicyclohexylcarbodiimide) et par un activateur (fusiccoccine) des ATPases- H^+ ainsi que l'utilisation des mutants *aux1-22*, *axr2-1* et *axr3-1* a permis de démontrer que l'ACC contrôlait l'activité membranaire des ATPases- H^+ via l'augmentation des concentrations cellulaires d'AIA (Staal *et al.*, 2011). En conséquence, la baisse d'absorption du $^{15}\text{NO}_3^-$ induite par l'augmentation des concentrations d'ACC est probablement liée à l'effet secondaire exercé par l'ACC sur les ATPase- H^+ via la synthèse d'AIA. L'inhibition de la croissance racinaire causée par l'ACC pourrait donc être à l'origine d'une inhibition de l'énergisation de la membrane nécessaire au transport des solutés (dont le nitrate) pour la croissance cellulaire. Si cette hypothèse se confirmait, elle montrerait à nouveau la nécessité d'étudier l'impact du nitrate sur la croissance cellulaire par rapport au centre coordinateur que représentent les ATPases- H^+ et les protéines régulatrices CIPK11 et 14-3-3 (cf. § : IV.A.3.5).

Cet ensemble de résultats renforce donc les conclusions précédentes avec le L-glutamate et démontre que **le transporteur NRT2.1 est principalement responsable de l'absorption du nitrate au niveau des cellules épidermiques de la racine mature de Colza** (Leblanc *et al.*, 2013 ; Lemaire *et al.*, 2013). Ces résultats sont également très cohérents avec les données de localisation histochimique GUS du transporteur AtNRT2.1 au niveau des assises cellulaires épidermiques et corticales de la racine mature d'*Arabidopsis* (Girin *et al.*, 2007 ; Orsel *et al.*, 2007). Ils sont également en accord avec les résultats antérieurs de la littérature montrant que l'absorption racinaire de nitrate n'a pas lieu au niveau du méristème mais principalement au

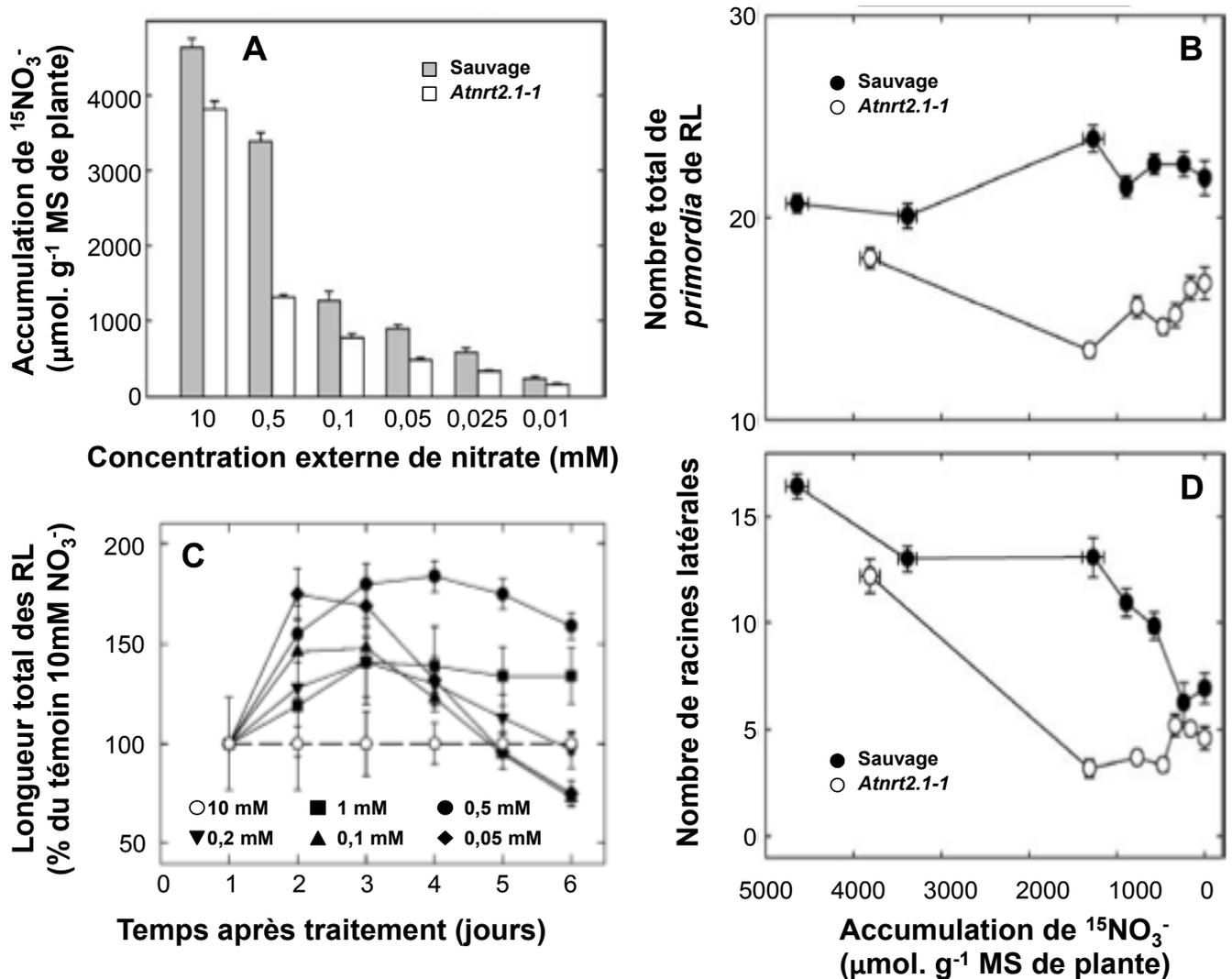


Fig. IV.10: Comparaison entre le type sauvage et mutant du transporteur NRT2.1 chez *Arabidopsis* de l'accumulation de $^{15}\text{NO}_3^-$ et du développement des racinaires latérales (RL) de la partie nouvellement formée après transfert de 10 mM de nitrate aux traitements **A**) Accumulation de $^{15}\text{NO}_3^-$, **B**) Nombre de *primordia* de RL, **C**) Longueur total de RL normalisé par rapport au témoin 10 mM et **D**) nombre de RL. Les plantules sont transférées après 6 jours de culture en présence de 10 mM de nitrate. Les données sont recueillies après 12 jours. Les valeurs correspondent aux moyennes : pour l'accumulation de $^{15}\text{NO}_3^-$ à cinq répétitions de deux plantules chacune et pour les analyses du développement racinaire à 12 plantules \pm l'erreur standard (d'après Remans et al., 2006a).

niveau de la racine mature à partir de la zone de différenciation (Bloom *et al.*, 2003 ; Lazof *et al.*, 1992 ; Taylor et Bloom, 1998).

B.1.4. Le transporteur NRT2.1 peut-il être considéré comme un transcepteur?

Deux études récentes ont proposé que le transporteur NRT2.1 pourrait jouer un rôle de **transcepteur : transporteur et récepteur de nitrate** (Gojon *et al.*, 2010 ; Little *et al.*, 2005 ; Remans *et al.*, 2006a). Le principal argument invoqué était le suivant: la réduction significative d'initiation des racines latérales chez le mutant *nrt2.1* lors du transfert des plantules de 10 mM nitrate sur une gamme de concentration de 0 à 10 mM n'est pas corrélée avec les quantités d'azote absorbées (Fig. IV.10). **Il existerait donc une décorrélation entre la fonction de transporteur et de senseur/récepteur de nitrate. La fonction de senseur/récepteur étant supposée intervenir dans le développement racinaire. Nous n'adhérons pas à cette conclusion pour plusieurs raisons :** (i) la réduction du nombre de racines latérales chez le mutant est observée au bout de 12 jours, ce temps de réponse s'accorde mal avec la **fonction de récepteur et les temps de transduction du signal généralement admis en biologie** (quelques minutes). Les signalétiques auxine/éthylène plus rapide (minutes/heures) sur la croissance racinaire sont beaucoup plus cohérentes (Le *et al.*, 2001). (ii) Les données ^{15}N , lors du transfert des plantules de 10 mM nitrate sur une gamme de concentrations de 10 à 0,01 mM, démontrent clairement un phénomène partiel de compensation pour l'absorption du nitrate faisant intervenir d'autres transporteurs racinaires NRT2 et NRT1 (Remans *et al.*, 2006a), (iii) malgré cette compensation, ces conditions induisent une situation plus limitante en azote chez les plantules mutantes. Or, lors d'une limitation en azote, il a été démontré que l'allocation du carbone vers la racine augmente et favorise la prolifération des racines en place (Scheible *et al.*, 1997a). Dans l'étude de Remans *et al.* (2006a), bien que le nombre de racines latérales initiées soit significativement plus faible que chez le mutant, la longueur moyennes des racines latérales déjà en place est significativement plus importante après seulement deux jours de traitement. **Il existe donc une compensation entre le nombre de racines latérales initiées et la longueur des racines latérales déjà en place.** Ce mécanisme non pris en compte doit certainement participer à la baisse de l'initiation des racines latérales chez le mutant. Tel qu'il est présenté ce résultat ne constitue donc pas une preuve de l'effet de NRT2.1 sur le développement racinaire. (iv) En conséquence, la baisse du nombre de racines latérales initiées chez les mutants *Atnrt2.1* d'*Arabidopsis* pourrait être simplement liée à une allocation dirigée du carbone et de l'auxine dans les racines déjà initiées plutôt que les méristèmes latéraux en cours de formation et d'activation (Nero *et al.*, 2008 ; Mirshra *et al.*,

2009), (v) le coût énergétique et respiratoire nécessaire à la mise en place de nouvelles racines latérales est certainement très supérieur à celle requis pour l'élongation de cellules déjà en place dans les méristèmes actifs, (vi) **tous nos résultats démontrent une corrélation fonctionnelle de NRT2.1 avec les variations d'élongation du système racinaire exploratoire** mais pas de lien direct de cause à effet sur l'élongation comme le souligne la décorrélation structure-fonction avec les doses croissantes d'ACC (Fig. III.33B, III.38A et 39B). (vii) La forte affinité pour le nitrate du transporteur NRT2.1 en fait déjà **un senseur du nitrate exogène extrêmement efficace en terme cinétique** (secondes-minutes) sans qu'il soit nécessaire de lui **surajouter une fonction de récepteur du statut N** pour le développement racinaire. **Pour toutes ces raisons**, il nous paraît impossible de conclure à un rôle de transcepteur de NRT2.1 sans **des études cinétiques beaucoup plus approfondies menées sur des échelles de temps plus réduites (minutes-heures) où la croissance racinaire, l'activité et la transcription de *Nrt2.1* sont mesurées en parallèle.**

En conclusion, **le transporteur NRT2.1 serait principalement responsable de l'absorption de nitrate dans les cellules épidermiques de la racine mature.** En effet, **la régulation de l'expression du transporteur NRT2.1 intervient pour compenser les variations d'élongation des systèmes exploratoire et absorbant** que celles-ci soient induites à long terme par la disponibilité en nitrate ou à court terme par des traitements avec des régulateurs de la croissance racinaire ou lors d'expériences de split root (Gansel *et al.*, 2001). Ces conclusions s'accordent avec les résultats de modélisation de Malagoli *et al.* (2004) et les conclusions de Glass (2009) sur le rôle fonctionnel de NRT2.1 dans l'absorption racinaire de nitrate.

B.2. Rôle du transporteur NRT1.1 dans les effets compensatoires structure-fonction

B.2.1. Effet d'une inhibition du transport du nitrate par le L-glutamate sur l'expression de *Nrt1.1*

L'inhibition progressive de l'activité et de l'expression du transporteur BnNRT2.1 par des concentrations croissantes de L-glutamate conduit à une forte surexpression du transporteur BnNRT1.1. Cependant, **cette surexpression du gène *BnNrt1.1*** induites par le traitement glutamate **ne permet pas une absorption compensatoire de nitrate** (Fig. III.16 et III.18).

En terme fonctionnel, deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ce résultat : *i*) seule l'activité du transporteur BnNRT1.1 est inhibée par le glutamate, mais pas sa transcription et, *ii*) l'activité du transporteur BnNRT1.1 n'est pas inhibée par le glutamate mais son activité dans les assises internes de la racine mature (stèle : endoderme et péricycle) rend impossible un

rôle compensatoire de BnNRT1.1 pour l'absorption de nitrate. **Dans les deux cas, le transporteur NRT1.1 est donc incapable d'assurer sa fonction de transport.**

Cependant dans **la deuxième hypothèse, l'activité du transporteur NRT1.1 serait obligatoirement couplée avec celle du transporteur NRT2.1 pour permettre l'absorption et la translocation du nitrate vers les parties aériennes.** Cette hypothèse est corroborée par plusieurs résultats expérimentaux : (i) dans la racine mature d'*Arabidopsis* le transporteur AtNRT1.1 est localisé dans les tissus de la stèle (endoderme et péricycle) alors que le transporteur AtNRT2.1 est localisé sur les assises épidermiques et corticales (Guo *et al.*, 2001 et 2002; Remans *et al.*, 2006b ; Girin *et al.*, 2007), (ii) la transcription du gène *AtNrt1.1* n'est pas régulée par les mêmes produits de l'assimilation du nitrate que le transporteur AtNRT2.1 (NO_2^- versus NH_4^+ et AA; Lejay *et al.*, 1999; Loqué *et al.*, 2003), et (iii) le transporteur AtNRT1.1 contrôle l'expression du gène *AtNrt2.1* en relation avec le statut N (Krouk *et al.*, 2006). Dans cette seconde hypothèse, le transporteur NRT2.1 est donc absolument indispensable pour l'absorption du nitrate exogène. Ceci est démontré par la corrélation linéaire établie entre son expression et les variations de longueur du système racinaire exploratoire (Leblanc *et al.*, 2008; Le Ny *et al.*, 2012 ; Leblanc *et al.*, 2013) mais fait également sens au vu de la localisation racinaire de NRT2.1 et sa forte affinité pour le nitrate.

En terme structural, les résultats ne permettent pas de conclure sur le rôle possible de NRT1.1 sur l'élongation racinaire dans la mesure où le traitement au L-glutamate inhibe fortement l'élongation racinaire (racine I et II) des plantules traitées par 1 et 5 mM de nitrate (Walch-Liu *et al.*, 2006 ; Li *et al.*, 2006). Cependant, nos résultats montrent clairement que **les fortes concentrations de nitrate (5 à 15 mM) ou les fortes concentrations de L-glutamate ont des effets distincts et additifs sur la réduction de la croissance racinaire** (cf. §.: IV.C.3). Ces résultats sont donc contradictoires avec les effets antagonistes observés chez *Arabidopsis* (Walch-Liu et Forde, 2008). De même, à l'inverse des résultats de Walch-Liu et Forde (2008), la transcription du gène *BnNrt1.1* est significativement induite plutôt que réprimée par le traitement glutamate (Fig. III.18). **L'ensemble de nos résultats remet donc en cause l'argumentation basée sur l'antagonisme nitrate/L-glutamate pour valider le rôle de transporteur du transporteur NRT1.1** (Walch-Liu et Forde, 2008 ; Gojon *et al.*, 2010).

B.2.2. Effet d'une inhibition de l'architecture racinaire par les traitements AVG sur l'absorption et l'expression du transporteur NRT1.1

Quels que soient les traitements utilisés 10 μM AVG ou 10 μM ACC, les cinétiques d'expression de *BnNrt1.1* au cours des 120 heures de traitement étaient très différentes des profils d'expression de *BnNrt2.1* (Fig. III.34). De plus, **contrairement à *BnNrt2.1*, les variations d'expression n'étaient pas corrélées linéairement avec les variations d'élongation racinaire et d'accumulation des quantités de ^{15}N** (Fig. III.33B). En dépit d'une réduction significative entre 72 et 120 heures de la longueur de la racine I et des racines latérales ainsi que du nombre de poils absorbants, **les plantules traitées par l'AVG ne présentaient aucune surexpression compensatoire de BnNRT1.1 par rapport aux plantules témoins (1 mM KNO_3) ou traitées par 10 μM ACC** (Fig. IV.9). Par ailleurs, quel que soient les traitements utilisés, les résultats montraient **une légère surexpression du transporteur BnNRT1.1 associée à l'élongation des racines latérales entre 72 et 120 heures de traitement** (Fig. III.34) et confirmaient ainsi le rôle de BnNRT1.1 dans l'élongation et la croissance des racines latérales plutôt que dans l'initiation des racines latérales (Guo *et al.*, 2001; Krouk *et al.*, 2010).

B.2.3. Effet d'une inhibition de l'architecture racinaire par les traitements ACC sur l'expression du transporteur BnNRT1.1 et l'absorption du $^{15}\text{NO}_3^-$

Les traitements des racines pendant 120 heures par des concentrations croissantes d'ACC 0,1, 1 et 10 μM en présence de 1 mM KNO_3 induisent **une sur-expression compensatoire et parallèle des gènes *BnNrt1.1* et *BnNrt2.1*, comparativement au traitement témoin par 1 mM KNO_3** (Fig. III.39B). Bien que la régulation de l'expression soit parfaitement corrélée avec les variations d'élongation racinaire induites par les traitements ACC, les résultats ne permettent pas de conclure sur le rôle de NRT1.1 dans l'élongation du système racinaire. Par ailleurs, comme nous l'avons discuté précédemment pour BnNRT2.1, il est très probable que l'alcalinisation de l'apoplaste des cellules racinaires induite par le traitement ACC soit responsable de la chute d'activité d'expression et d'absorption du $^{15}\text{NO}_3^-$ par les transporteurs BnNRT1.1 et BnNRT2.1 avec l'augmentation des doses d'ACC (Staal *et al.*, 2011).

B.2.4. Quelle(s) autre(s) fonction(s) ou rôle à attribuer au transporteur NRT1.1 ?

Comme nous l'avons signalé dans notre analyse bibliographique, on attribue aujourd'hui beaucoup trop de fonctions au transporteur NRT1.1. Ainsi, il existe deux modèles pour décrire le(s) rôle(s) possible(s) du transporteur NRT1.1.

Le premier modèle explique l'activation biphasique de la conductance racinaire par le nitrate grâce à la double affinité du transporteur NRT1.1 qui pourrait lui conférer un rôle de senseur. Celle-ci est mesurée indirectement à partir de l'induction transcriptionnelle du gène *AtNrt2.1* (après 30 minutes de traitement) **chez différents mutants *nrt1.1* dont le profil d'expression est assimilé à la conductance racinaire pour le nitrate** (Hu et Tsay, 2009 ; Ho et Tsay 2009)¹. La double affinité du transporteur NRT1.1 par phosphorylation/déphosphorylation et l'utilisation de mutants *chl1-9^{Pro492}*, *cipk23*, et le mutant *chl1-5* transformé par les constructions *CHL1::CHL1^{T101A} ou D* a permis d'attribuer au **transporteur AtNRT1.1 un rôle de senseur des concentrations exogènes de nitrate** (cf.§ : II.Fonction.B.4.1). NRT1.1 serait également responsable de l'activation biphasique de nombreux gènes induits par le nitrate *via* une cascade signalétique qui reste à définir.

Le deuxième modèle tente d'expliquer les variations d'élongation racinaire du mutant du transporteur NRT1.1 en réponse au nitrate. Dans le cadre de ce modèle, deux hypothèses ont été proposées (non exclusives mutuellement). **Dans l'hypothèse de Forde *et al.*,** les variations d'élongation de **la racine I** sont expliquées à l'aide de **l'antagonisme des effets du nitrate et du glutamate** qui est mesuré **au bout de six jours de traitement** chez le témoin Columbia, le mutant *chl1-5* et le mutant *chl1-5* transformés par les constructions *35S-CHL1* et *35S-CHL1^{T101A}* (Walch-liu et Forde, 2008). **Dans l'hypothèse de Gojon *et al.*,** les variations d'élongation des racines latérales mesurées après cinq jours de croissance sont **expliquées à l'aide de la double fonction de transport de NRT1.1 pour le nitrate et l'AIA** lorsque celui-ci est potentiellement phosphorylé (faibles concentrations de nitrate). Cette double fonction de transport a été mise en évidence à l'aide des mutants *chl1-5*, *chl1-10* et du transport d'AIA marqué au ³H dans des oocytes de xénope et chez les mutants *chl1-5* et *chl1-10* (Krouk *et al.*, 2010).

¹ Bien que non démontrée, cette hypothèse a été validée par les revues *Cell* et *Plant Journal*.

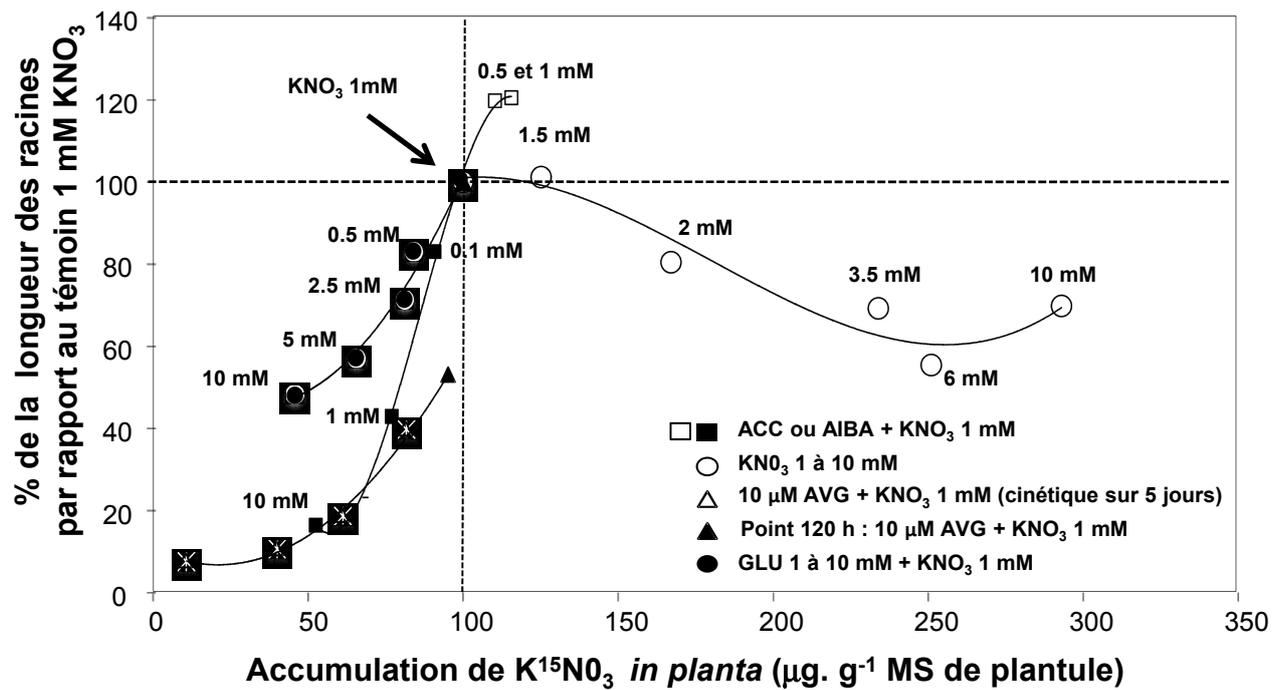


Fig. IV.11: Relation entre la longueur du système racinaire et l'accumulation de $^{15}\text{NO}_3^-$ dans des plantules de *Brassica napus* L.. Les données proviennent de différentes expériences et sont comparées en pourcentage par rapport au témoin 1 mM de nitrate de chaque expérience. Les concentrations des traitements sont indiquées. La courbe pour le traitement 10 μM AVG + 1 mM de nitrate (Δ), est obtenue pour une cinétique de 24h durant cinq jours de traitements.

Si l'ensemble de nos résultats ne nous permet pas de conclure sur le rôle du transporteur NRT1.1 dans le contrôle de l'architecture racinaire, en revanche notre étude à l'aide du L-glutamate et de l'ACC apportent **plusieurs démentis aux résultats avancés pour valider les hypothèses de senseur exogène des concentrations de nitrate ou de trancepteur à l'aide de l'antagonisme nitrate/glutamate sur l'élongation racinaire** (cf. § : III.B.2.). Par ailleurs, si l'hypothèse de Gojon *et al.* (Krouk *et al.*, 2010) est compatible avec l'effet localisé d'un apport de nitrate sur la croissance racinaire (effet local), elle reste incompatible avec l'inhibition de la croissance racinaire observée lors d'un apport homogène de nitrate à de fortes concentrations (effet systémique). De plus, une double fonction de transport de NRT1.1 pour le nitrate et l'AIA lorsque celui-ci est phosphorylé ne démontre pas un rôle de récepteur de ce transporteur, qui plus est, avec des temps de réponse pour la croissance racinaire chez les mutants qui deviennent seulement significatifs entre 6 à 9 jours de croissance (Remans *et al.*, 2006b, Krouk *et al.*, 2010). C'est pourquoi, dans le cadre de nos expérimentations en apport homogène de nitrate, nous ne retiendrons des deux hypothèses proposées que l'hypothèse de Tsay *et al.* (Ho *et al.*, 2009). Mais, compte tenu de la localisation du transporteur NRT1.1 dans les assises cellulaires de la stèle de la racine mature chez *Arabidopsis*, **nous admettrons que le transporteur NRT1.1 agit potentiellement comme un senseur endogène des concentrations de nitrate plutôt qu'exogène en vertu de sa double affinité et de sa localisation tissulaire dans la racine mature.**

C. Effets de modifications racinaires induites par les différents traitements pharmacologiques sur l'absorption du nitrate et la croissance

Les effets des modifications racinaires sur l'absorption du nitrate et la croissance des plantules ont été réexaminés à la suite des différents traitements pharmacologiques par l'AVG, l'AIBA, l'ACC et le L-glutamate. **Le traitement L-glutamate**, qui était **destiné initialement** à ne modifier uniquement de la **fonction de prélèvement** (absorption), sera également pris en compte dans cette discussion. En effet, nous avons montré qu'il induisait une inhibition de l'élongation racinaire de façon distincte du nitrate mais additive par rapport à celui-ci. **Notre objectif est donc ici d'examiner, indépendamment de tout effet génotypique, dans quelle mesure les modifications induites de l'architecture racinaire (structure) peuvent être compensées par une absorption de nitrate (fonction) ? En d'autres termes, peut-on facilement, en modulant**

l'architecture racinaire, modifier l'absorption du nitrate? Ou bien, est-on soumis à des contraintes allométriques liées à la croissance racinaire et foliaire telles, qu'il est impossible d'induire une compensation fonctionnelle utilisable en sélection pour la création d'idéotypes? Afin de comparer les effets structure-fonction des différents traitements pharmacologiques utilisés dans nos études, ceux-ci sont rassemblés figure IV.11. Cette figure établit les corrélations entre le pourcentage d'élongation racinaire et le pourcentage de $K^{15}NO_3$ absorbé par rapport aux plantules témoins traitées par 1 mM KNO_3 . Ces résultats mettent en évidence trois groupes de réponses distinctes.

C.1. Impact des variations de l'architecture racinaire induits par la modulation du métabolisme de l'éthylène sur l'absorption du nitrate

Le premier groupe de réponses est composé des traitements KNO_3 , ACC et AIBA. Dans ce groupe, les points correspondant aux différentes concentrations d'ACC et d'AIBA se retrouvent sur la même courbe exponentielle que les plantules témoins traitées par 1 mM de KNO_3 . Contrairement à l'expression des transporteurs BnNRT2.1 et BnNRT1.1 (Fig. III.39B), **les variations des capacités d'absorption du $^{15}NO_3^-$ ne sont pas de type compensatoire mais décroissent avec la réduction de la longueur du système racinaire exploratoire induite par les traitements.** De même, les variations d'élongation du système racinaire exploratoire induites par les traitements sont très fortement corrélées avec les quantités de carbone accumulées dans les racines (Fig. III.S42 ; $r^2 = 0,95$; $P < 0,001$). Ce résultat confirme donc que la croissance racinaire est fortement dépendante de la fourniture en carbone par les parties aériennes (Aguirrezabal *et al.*, 1994 ; Freixes *et al.*, 2002 ; Muller *et al.*, 1998). Ils montrent également que **la modulation du métabolisme de l'éthylène réduit l'allocation du carbone aux racines.** Ces variations d'allocation du carbone aux racines peuvent certainement être attribuées à l'effet de l'éthylène sur la photosynthèse *via* l'augmentation des concentrations de glucose foliaire entraînant l'inhibition de la synthèse de Rubisco (Ahmed *et al.*, 2006 ; Tholen *et al.*, 2007). De façon surprenante, bien que les sucres : glucose-6-P et saccharose agissent positivement sur l'expression des transporteurs AtNRT2.1 et AtNRT1.1 (Lejay *et al.*, 1999, 2003), la baisse d'allocation racinaire de carbone induite par le traitement ACC et associée avec une forte dérégulation des gènes *BnNrt1.1* et *BnNrt2.1*. En conséquence, cette dérégulation pourrait être attribuée à l'augmentation des concentrations de glucose-6-P induit par les traitements ACC dans la mesure où le traitement ACC n'entraîne pas de diminution des concentration de Glu ou de Gln racinaire (Beauclair *et al.*, 2009). Cette hypothèse reste cependant à vérifier.

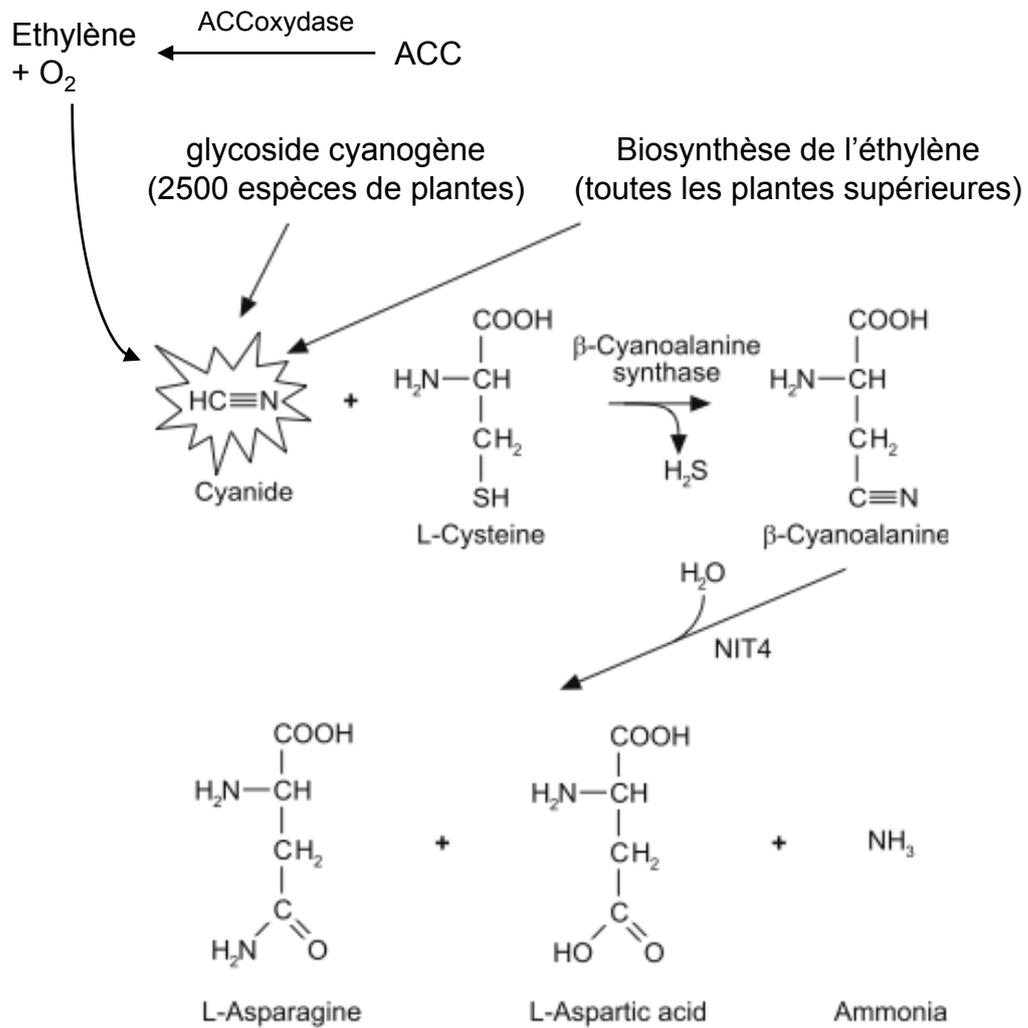


Figure IV.12: Synthèse, détoxification et recyclage par la β-cyanoalanine synthase et par la nitrilase 4 (NIT4), du cyanide produit lors de la synthèse d'éthylène par l'ACC oxydase dans les plantes supérieures (d'après Piotrowsky, 2008).

Par ailleurs, **la corrélation linéaire obtenue entre les variations des concentrations racinaires d'aspartate (Asp) et l'élongation racinaire plaide en faveur d'une modification majeure induite par le traitement ACC sur le métabolisme de l'azote** (Fig. III.41). En effet, comme le démontrent les résultats des analyses UPLC de deux expérimentations indépendantes, le traitement ACC induit une baisse significative des teneurs en Asp (Beauclair *et al.*, 2009 ; Lemaire *et al.*, 2013). Or, il est reconnu que l'aspartate transaminase qui produit l'Asp joue un rôle clé dans le métabolisme N pour régénérer l' α -cétoglutarate requis pour l'assimilation de la glutamine. L'aspartate transaminase est, de plus, fortement régulée par la lumière et les sucres (Coruzzi, 2003 ; Miesak et Coruzzi, 2002). L'aspartate constitue également un acide aminé clé dans le transport à courte et à longue distance de l'azote et du carbone entre les cellules, mais également entre les organites cellulaires comme la mitochondrie et le chloroplaste *via* la navette malate-aspartate. Deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer la corrélation observée (Fig. III.41B). **La première hypothèse** est basée sur le fait que l'aspartate est l'acide aminé qui permet le catabolisme de l'AIA après conjugaison avec celui-ci (Staswick *et al.*, 2002 ; Staswick *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2008). Le traitement ACC induisant une forte synthèse d'AIA (Stepanova *et al.*, 2005 ; Swarup *et al.*, 2007 ; Ruzicka *et al.*, 2007), il est donc raisonnable de penser que la baisse des teneurs en aspartate puisse être la conséquence, à la fois de l'inhibition de l'aspartate transaminase *via* l'inhibition de la photosynthèse par l'éthylène, mais également de l'induction de la détoxification de l'AIA par conjugaison. **Cette hypothèse permettrait ainsi d'établir le lien entre le métabolisme N et hormonal et d'expliquer la baisse fortement corrélative de l'élongation du système racinaire avec l'augmentation des concentrations racinaires en Asp.** De plus, la réduction de l'élongation racinaire induite par les concentrations croissantes d'ACC est également très cohérente avec une inhibition des transporteurs H^+ /solutés induite par l'alcalinisation pariétale causée par l'inhibition des ATPases- H^+ (Staal *et al.*, 2011).

Une autre hypothèse implique la détoxification de l'acide cyanhydrique (HCN) produit par l'ACC oxydase (ACO) lors de la formation d'éthylène après le traitement par l'ACC (Garcia *et al.*, 2010 ; Peiser *et al.*, 1984 ; Piotrowsky, 2008). **Pour les plantules traitées par l'AIBA, l'augmentation de l'absorption du nitrate et de la croissance des plantules est en accord avec cette hypothèse.** En effet, l'AIBA inhibe spécifiquement ACO et réduit ainsi la production de HCN (Satoh et Esashi, 1982). En revanche, chez les plantules traitées par l'ACC, l'induction de la voie de détoxification de l'HCN pourrait expliquer la réduction d'Asp. Certains auteurs considèrent aujourd'hui que cette voie métabolique interviendrait dans le recyclage de l'azote (Piotrowski, 2008 ; Yu et Zhang, 2012). Ainsi, dans une première étape, le cyanure et la cystéine sont convertis en β -cyanoalanine par une cyanoalanine synthétase (CAS). Dans une deuxième étape, la β -

cyanoalanine est convertie en Asp, Asn et en ammoniac par une nitrilase (NIT4). Par conséquent, la réduction de l'Asp après le traitement ACC pourrait directement refléter l'induction de cette voie métabolique (Fig. IV.12). L'Asp étant alors utilisé pour maintenir la croissance lorsque l'activité NR est réduite par le cyanure produit par l'ACCoxydase lors de la synthèse d'éthylène (Yu et Zhang, 2012).

C.2. Impacts des variations de l'architecture racinaire induits par l'AVG sur l'absorption du nitrate

Le deuxième groupe de réponses est induit par le traitement AVG. Dans ce groupe, la corrélation entre la longueur racinaire et le ^{15}N accumulé diverge fortement du premier groupe de réponses. En effet, les plantes ont absorbé les mêmes quantités de $^{15}\text{NO}_3^-$ mais avec des systèmes racinaires exploratoire et absorbant réduits de moitié (Fig. III.32B). Comme nous l'avons vu précédemment, la compensation fonctionnelle induite est due à une légère surexpression du transporteur BnNRT2.1 (Fig. III.33B). **Cette réponse compensatoire, dans le cadre d'une amélioration de l'efficacité de prélèvement de l'azote, est une piste intéressante.** Mais il reste, bien entendu, à identifier les cibles moléculaires responsables de l'inhibition de la croissance racinaire et de la dérégulation du transporteur BnNRT2.1. Dans ce sens, une étude transcriptomique récente vient de montrer que l'AVG est le plus fort des inhibiteurs connus de la synthèse d'AIA racinaire (Soeno *et al.*, 2010). En effet, **l'AVG inhibe spécifiquement de nombreuses enzymes à phosphate de pyridoxal comme les amino-transférases dont fait partie la tryptophane amino-transférase qui convertit le tryptophane en acide indol-pyruvique et en NH_3** (Soeno *et al.*, 2010). Les résultats de Soeno *et al.* (2010) montrent clairement que l'AVG inhibe la production d'AIA racinaire en bloquant l'activité de la tryptophane aminotransférase et la transcription des gènes inductibles par l'AIA. **Ces résultats soulignent donc l'importance d'utiliser des mutants de la signalétique auxine (transport, synthèse, répartition dans la racine et détoxification) afin de pouvoir comparer l'efficacité du prélèvement de nitrate (Nupt) sur des idéotypes qui présentent une forte ou une faible croissance racinaire.**

C.3. Impacts des variations de l'architecture racinaire induits par le glutamate sur la croissance racinaire et foliaire

Le troisième groupe de réponse est induit par le traitement pharmacologique à l'aide du L-glutamate (Fig. IV.11). Comme nous l'avons discuté précédemment (cf. §. II.Structure.C.2), l'inhibition de l'élongation racinaire par le L-glutamate s'accompagne d'une décroissance linéaire de l'élongation racinaire et de l'absorption du nitrate (Fig. III.19). Cette inhibition de la croissance racinaire par des doses croissantes de L-glutamate est distincte de la réduction d'élongation induite par les doses croissantes de nitrate (Fig. III.19B). Les deux phénomènes sont distincts et additifs comme le montre la figure III.19B. De plus, la réduction de l'absorption du $^{15}\text{NO}_3^-$ et de l'accumulation tissulaire de nitrate induit par les concentrations croissantes de L-glutamate module les effets signalétiques et osmotiques du nitrate sur la croissance foliaire. Ces effets sont illustrés de façon très démonstrative à l'aide des corrélations linéaires obtenues entre l'accumulation de nitrate et d'eau dans les feuilles avec les modifications de la longueur racinaire (Fig III.19A). La figure III.19A semble démontrer que les plantules se comportent presque comme des osmomètres uniquement dépendants des concentrations endogènes de nitrate durant l'augmentation des concentrations externes de nitrate de 1 à 11 mM et durant les co-traitements nitrate-glutamate avec 5 mM de nitrate.

Dans les conditions non transpirantes utilisées, le flux osmotique d'eau à travers la racine est lié à l'effet du signal nitrate sur la croissance cellulaire et tissulaire des parties aériennes. En effet, en conditions non transpirantes à la différence des solutés, l'eau ne peut s'accumuler dans les tissus foliaires qu'à la suite d'une expansion cellulaire et tissulaire. **Ces résultats soulignent donc à nouveau que la division et l'expansion des cellules foliaires induites par le signal nitrate précède le flux osmotique d'eau** (cf. : II.Structure-Fonction.D.3). Ainsi, comme il a déjà été démontré, ce sont les processus de croissance qui contraignent la pression de turgescence et le statut hydrique et non l'inverse (Bressan *et al.*, 1982 ; Maggio *et al.*, 2006 ; Proseus *et al.*, 1999, 2000; Zhu & Boyer, 1992). L'ensemble de ces résultats corrobore les conclusions de Stitt *et al.*, à savoir que **le nitrate agit d'abord comme signal pour réguler la croissance foliaire et racinaire probablement via une régulation hormonale initiale plutôt que par une modification de la pression de turgescence** (Scheible *et al.*, 1997a ; Le Ny *et al.*, 2013). Cette conclusion est également en accord avec la théorie acide de la croissance, où l'auxine cause une excrétion de protons dans l'apoplasme *via* les ATPases- H^+ . Celles-ci sont responsables du relâchement pariétal nécessaire à l'expansion cellulaire après une entrée massive de solutés par les symports H^+ /solutés et d'eau (Rayle et Cleland, 1992). Cette conclusion va également dans le sens de données récentes de transcriptomique qui montrent que les hormones comme l'AIA, l'ABA et

les cytokinines sont induites par le nitrate et agissent comme des amplificateurs du signal nitrate (Gutiérrez *et al.*, 2007 ; Krouk *et al.*, 2009 ; Nero *et al.*, 2009).

En résumé, les résultats montrent clairement que sans l'activité du transporteur BnNRT2.1, aucun flux d'eau et de nitrate n'est possible pour la croissance racinaire et foliaire malgré une surexpression du transporteur BnNRT1.1 à toutes les doses de L-glutamate utilisées. Au regard de la localisation complémentaire dans la racine mature des deux transporteurs NRT2.1 et NRT1.1, ces résultats suggèrent l'existence d'**une coordination fonctionnelle et catalytique entre NRT2.1 et NRT1.1 pour le transport du nitrate à travers les différentes assises cellulaires de la racine mature**. Cette coordination n'exclue pas un couplage d'activité avec d'autres transporteurs comme les CLC impliqués dans l'homéostasie pour le nitrate ou les transporteurs NAXT impliqués dans l'efflux de nitrate et le chargement du xylème.

V. CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

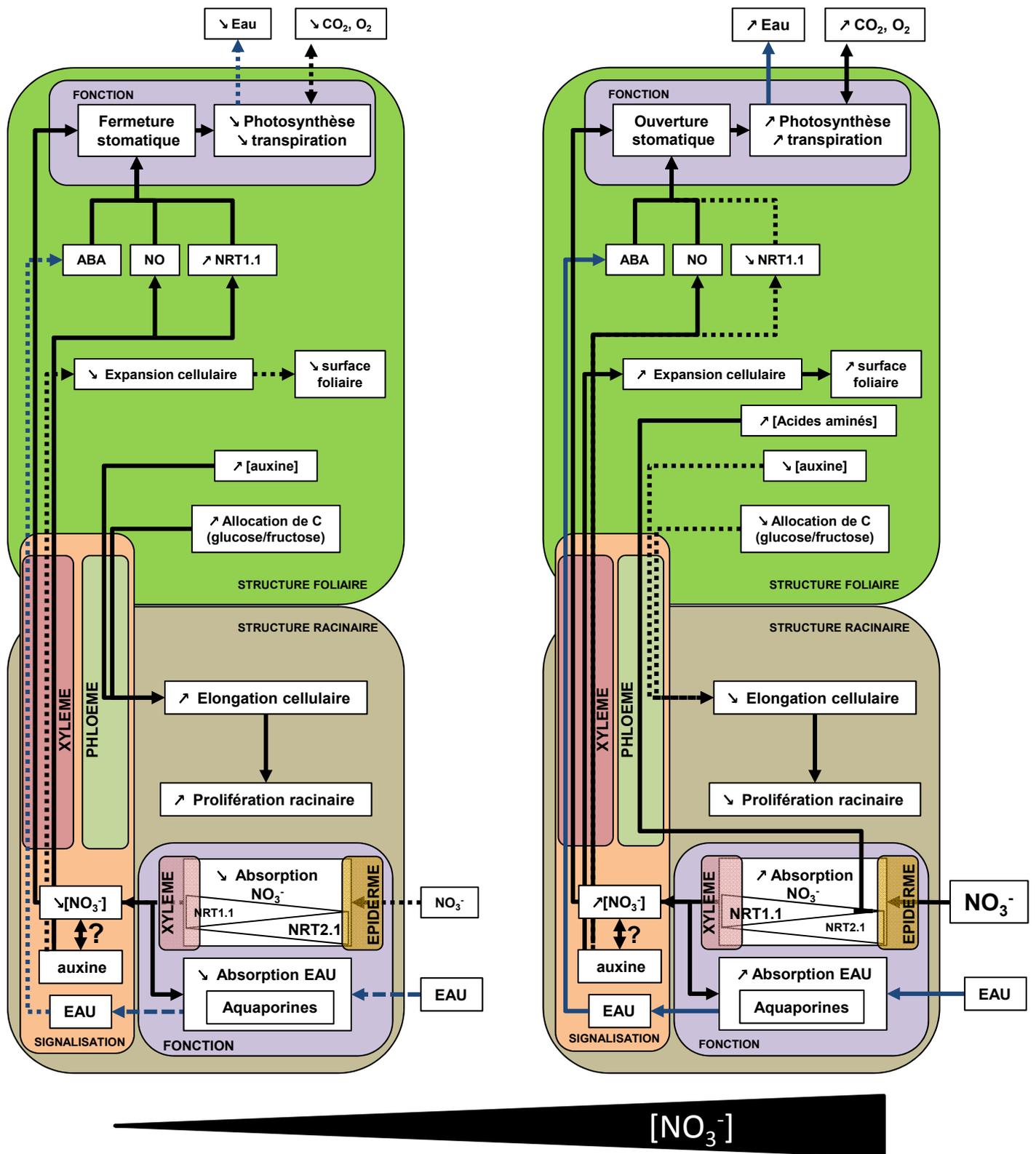


Figure V.1: Modèle physiologique intégrant les modifications de la structure (croissance racinaire et foliaire) et de la fonction (absorption du nitrate et de l'eau) en réponse à une variation de la disponibilité du nitrate exogène. Ce modèle, prend en compte les signalisations racines-feuilles et feuilles-racines présentées dans la figure IV.8. Dans ce modèle la fonction des transporteurs d'eau (aquaporines) et de nitrate (NRT1.1 et NRT2.1) ainsi que la localisation tissulaire de ces derniers est décrite, ainsi que les échanges gazeux vers l'extérieur des plantules résultant de la transpiration et de la photosynthèse.

A. Conclusions générales

L'ensemble de nos résultats apporte de nombreuses preuves corrélatives que la disponibilité en nitrate *via* la signalétique nitrate régule indirectement (conséquence) l'absorption d'eau et la translocation d'eau pour la croissance en condition non transpirante. L'intégration de l'ensemble de nos résultats permet de préciser les modèles de Clarkson *et al.*, (2000) et de Cramer *et al.*, (2009) et de proposer un modèle physiologique intégratif structure-fonction beaucoup plus complet (Fig. V.1). Ce modèle, fait intervenir les signalisations mises à jour dans la littérature et dans nos études sur les régulations du transport du nitrate et de l'eau pour la croissance. Ce modèle tient également compte de la localisation complémentaire des transporteurs NRT2.1 et NRT1.1 dans la racine et la présence du transporteur NRT1.1 dans les stomates. Il repose sur deux hypothèses majeures : (i) la coordination de l'activité des transporteurs NRT2.1 et NRT1.1 serait liée au rôle de senseur² des concentrations exogènes et endogènes de nitrate des transporteurs NRT2.1 et NRT1.1, (ii) le nitrate contrôle la circulation de l'eau du sol vers la racine et donc son propre flux diffusif et convectif *via* son effet sur la transpiration et la croissance foliaire.

Modèle physiologique structure-fonction prenant en compte les régulations des flux d'eau et d'azote en relation avec la disponibilité en nitrate

Dans le modèle intégratif que nous proposons, la localisation épidermique du transporteur NRT2.1 dans la racine mature et son affinité pour le nitrate serait seules responsables de la perception rapide et réversible du signal nitrate et de son transport dans la plante (Girin *et al.*, 2007 ; Orsel *et al.*, 2007) tandis que l'activité duale du transporteur NRT1.1 présent dans le tissu vasculaire serait responsable du contrôle de la translocation de nitrate associée avec l'induction des gènes de la réduction et de l'assimilation du nitrate et des bascules morpho-physiologiques (Munos *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 1999 ; Ho *et al.*, 2009).

Ainsi, pour des conditions limitantes en nitrate, lorsque les teneurs racinaires sont faibles, le transporteur NRT1.1 fonctionnerait comme un transporteur à forte affinité relayant l'action épidermique et corticale du transporteur NRT2.1. Cependant, pour des conditions non limitantes

² Rôle senseur pas au sens transcepteur vis-à-vis de l'effet sur la morphologie racinaire et foliaire.

(apport optimal ou sub optimal), l'augmentation des concentrations de nitrate endogènes induirait le changement d'affinité du transporteur NRT1.1 et permettrait l'augmentation du flux xylémique de nitrate. L'accumulation racinaire et foliaire de nitrate, et donc le signal nitrate, provoqueraient les bascules morpho-physiologiques majeures comme la réduction de l'élongation racinaire et l'induction de l'expansion foliaire en relation avec une signalétique auxine (Li *et al.*, 2007 ; Ho *et al.*, 2009). L'augmentation du flux de nitrate provoqué par NRT1.1 serait compensée par une concentration du nombre de transporteurs NRT2.1 par unité de surface racinaire. L'induction concomitante de l'activité racinaire des aquaporines par le signal nitrate faciliterait l'absorption et le transport radial de l'eau dans la racine et augmenterait les flux osmotique et hydrostatique d'eau pour la croissance et la transpiration (Guo *et al.*, 2007 ; Gorska *et al.*, 2008a). Par voie de conséquence, le flux convectif du nitrate et de l'eau dans le sol, amplifié par la transpiration, compléterait l'action du flux diffusif pour faire face à la très forte augmentation du transport actif.

Dans les parties aériennes, la forte assimilation du nitrate induit une production importante d'acides-aminés dont la circulation par le phloème permet l'ajustement du prélèvement par la répression de la transcription et de l'activité du transporteur NRT2.1 sur l'épiderme racinaire (Vidmar *et al.*, 2000 ; Gansel *et al.*, 2001 ; Loqué *et al.*, 2003). Les flux de nitrate sont donc directement régulés par la demande en azote pour la croissance *via* le transporteur NRT2.1 et les flux d'eau pour la croissance indirectement par l'effet du nitrate sur la conductivité hydraulique racinaire et la conductance stomatique. Le contrôle des flux endogènes de nitrate et d'eau (transport et translocation) s'opère alors de façon coordonnée *via* la fonction de senseur de nitrate du transporteur NRT1.1 dont les variations de transcription et d'activité sont associées aux bascules morpho-physiologiques et à un contrôle direct de la transcription de nombreux gènes liés au métabolisme de l'azote et du carbone (NIA1, NIA2, GS, GOGAT,...). Par ailleurs, **en condition transpirante et en absence de stress hydrique**, il est probable que le contrôle de l'ouverture stomatique de façon directe *via* le transporteur NRT1.1 ou indirecte *via* les variations des concentrations racinaires de nitrate (les systèmes : Nitrate réductase/NO, NO/ABA et Nitrate/flux hydraulique/ABA) constitue un autre niveau de régulation possible des flux diffusifs et convectifs de nitrate ou d'autres macro-éléments du sol vers la racine.

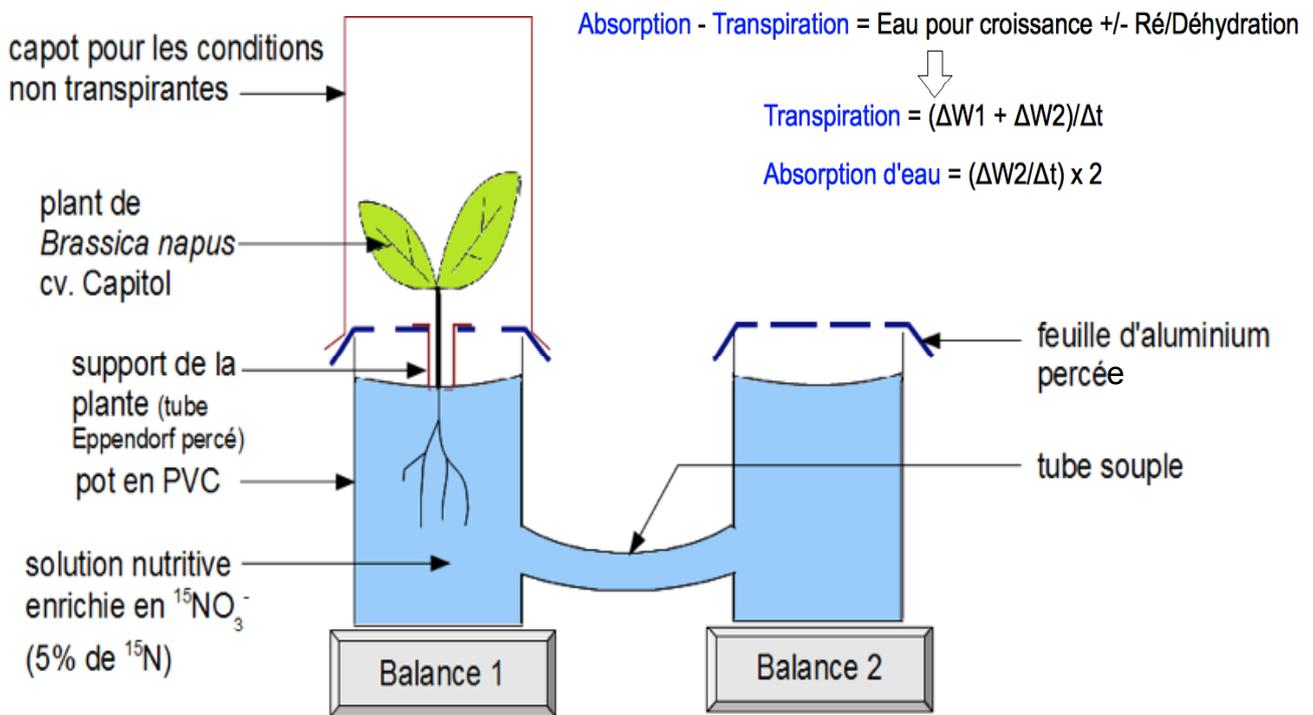


Figure V.2: schéma du dispositif qui a été utilisé dans nos expérimentations pour suivre simultanément les flux d'eau pour la croissance et la transpiration ainsi que les flux de ^{15}N . Ce système gravimétrique a été établi par Van Leperen et Madery (1993)

B. Perspectives de recherches

L'ensemble de nos résultats nous conduit à formuler trois questions fondamentales de recherche qui feront l'objet des perspectives de ce travail, tant sur le plan fondamental que sur le plan appliqué :

- **Les transporteurs de nitrate NRT2.1 et NRT1.1 forment-ils réellement un double système senseur pour la perception et l'intégration du signal nitrate à l'échelle de la plante entière?**
- **Comment le signal nitrate intervient-il sur la croissance racinaire et foliaire en conditions transpirante et non transpirante? Ou, en d'autres termes, comment le signal nitrate modifie-t-il à très court terme les flux d'eau et de nitrate pour la croissance des parties aériennes et des racines?**
- **Quelle(s) interaction existe-t-il entre le signal nitrate, la synthèse et le transport d'AIA?**

Pour répondre à ces trois questions, il est indispensable de mettre au point ou d'utiliser des dispositifs permettant de mesurer **l'effet du signal nitrate sur la croissance à très court terme**, c'est-à-dire **dans la minute ou l'heure** après un apport exogène à l'échelle de l'organe, ou de la plante entière.

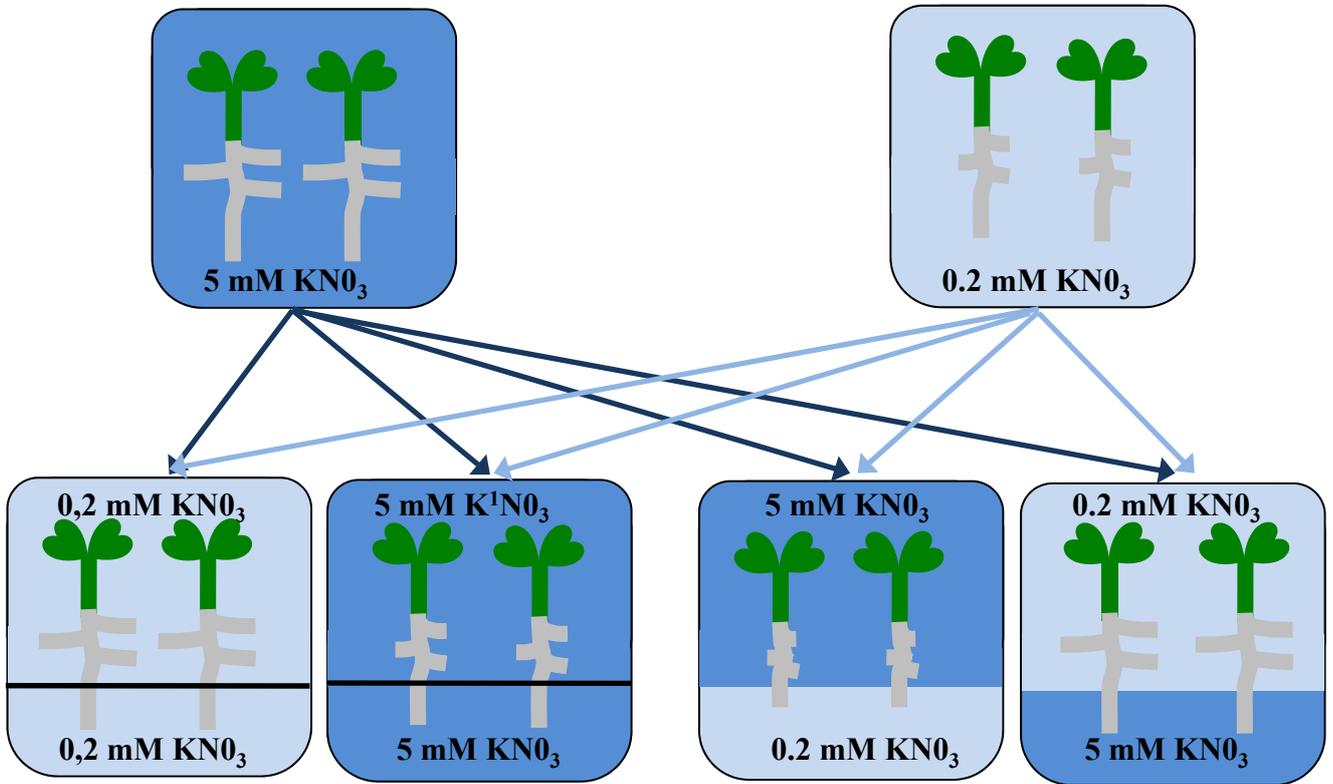
En tant qu'écophysiologistes, nous laissons le soin aux physiologistes moléculaires d'aborder la question au niveau cellulaire.

B.1. Effet du signal nitrate sur la croissance aérienne

Nous nous proposons d'utiliser le système gravimétrique mis au point par Van Ieperen et Madery (1993) permettant de suivre l'évolution des flux d'eau pour la croissance et la transpiration au cours d'une cinétique sur 24 heures (Fig. V.2). L'utilisation du nitrate marqué par le ^{15}N dans ce dispositif devrait nous permettre d'établir les relations entre flux d'eau et flux de nitrate pour la croissance sans ambiguïté. L'enregistrement digital des pesées sur des pas de temps de l'ordre de la minute, nous permettra de suivre en temps réel l'effet du signal nitrate (passage d'une faible à une forte concentration) sur les flux d'eau et la croissance.

Cet outil méthodologique non invasif laisse également entrevoir de nombreuses perspectives dans l'élucidation du signal nitrate sur la croissance. Ainsi, **l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques des transporteurs de nitrate comme le glutamate pour NRT2.1 ou le nitrite pour NRT1.1 devrait permettre d'évaluer la coordination et**

Plantules prétraitées pendant 48h avec 0,2 ou 5mM KNO_3



Racines traitées de façon homogène ou hétérogène au cours de cinétiques de 0 à 24h et de 0 à 72h avec 0,2 ou 5 mM de KNO_3

Figure V.3: Stratégie et dispositif expérimental en gel d'agarose segmenté pour évaluer les effets des variations de l'absorption d'eau et de nitrate associées aux modifications de croissance des racines et des parties aériennes induites par des apports hétérogènes de nitrate sur la pointe et les parties matures de la racine primaire.

l'importance respective de ces deux transporteurs dans l'absorption de nitrate et la croissance.

De même, les interactions signalétiques entre le nitrate et l'AIA sur la coordination et l'intégration des flux d'azote et d'eau au sein de la plante pourront être étudiés à l'aide d'inhibiteurs du transport phloémique de l'AIA comme le NPA (acide naphtylphtalique) et le TIBA (acide 2,3,5-Triiodobenzoïque). Le perfectionnement de dispositif devraient aussi permettre de mieux appréhender les interactions entre le signal nitrate et d'autres acteurs majeurs comme les transporteurs d'eau (aquaporines) ou d'auxine (gènes AUX et PIN).

En conséquence, différents types de mutants pourront être utilisés dans le dispositif. Ainsi, les mutants des transporteurs NRT1.1 et NRT2.1 d'*Arabidopsis*, nous permettront d'évaluer le rôle et la coordination à très court terme entre les deux transporteurs majeurs de nitrate dans la croissance et les flux d'eau. Le mutant NR d'*Arabidopsis* (G'4-3) permettra de décortiquer les relations entre le signal nitrate et les flux hydraulique et nitrique pour la croissance. De même, l'utilisation de mutants spécifiques d'*Arabidopsis* intervenant sur le développement et le fonctionnement du xylème ou la translocation du nitrate devrait nous apporter de nombreuses réponses sur la régulation et la translocation du nitrate.

B.2. Effet du signal nitrate sur la croissance racinaire

Bien que l'implication du signal nitrate soit connue depuis plus de 40 ans, l'effet à très court terme (minutes-heures) du signal nitrate sur la croissance racinaire : racines I et II, et poils absorbants n'a fait l'objet d'aucune étude sérieuse. L'effet du nitrate sur la croissance racinaire a été mesuré jusqu'à présent en situation homogène et hétérogène d'alimentation après des temps d'incubation très longs d'une à plusieurs semaines (Tableau IV.1). En conséquence, de façon à mieux caractériser l'effet du signal nitrate sur l'élongation racinaire à très court terme (minute-heure), nous nous proposons de développer un dispositif expérimental original sur gel d'agarose segmenté permettant de soumettre la pointe ou la partie mature de la racine I à des changements brusques d'alimentation en $K^{15}NO_3$ (de 0,2 à 5 mM et de 5 à 0,2 mM) au cours d'une période de 0 à 24 heures ou de 0 à 72 heures (Fig. V.3). Ce dispositif aura donc pour but de déterminer si la perception du signal nitrate est :

- i) localisée au niveau des apex racinaires ou sur la racine mature,
- ii) diffuse sur l'ensemble de la racine,
- iii) rapide et réversible en fonction de la disponibilité en nitrate et le sens du traitement.

Dans un premier temps, les variations horaires des élongations racinaires seront mesurées à l'aide de feutres de couleur et de calques placés derrière les boîtes de Pétri puis traitées a posteriori à l'aide d'un scanner de racines (WinRHIZO, Regent Instruments Inc, Canada). A terme, si les résultats s'avèrent probant, nous souhaiterions faire évoluer ce dispositif vers une acquisition instantanée à l'aide de Caméras CCD comme cela a été mis au point chez E. Spalding à l'Université de Madison (Durham Brooks *et al.*, 2010) et étendre le dispositif à l'étude des effets d'autres macro-éléments comme le potassium, le phosphate et le sulfate. L'élucidation des interactions entre les flux de N, P, K et S et d'eau pour la croissance devrait donc permettre d'améliorer et de mieux comprendre les relations physiologiques qui conditionnent la WUE *via* les efficacités d'utilisation des macroéléments (N, P, K, S).

VI. BIBLIOGRAPHIE

A

- Abeles F.B., Wydoski S.G.** (1987). Inhibitors of ethylene synthesis and action: a comparison of their activities in a lettuce root growth model system. *Journal of the American Society Horticultural Science*: **112**: 122–125.
- Adams D.O., Yang S.F.** (1979). Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proceeding of the National Academy of Science USA*: **76**: 170-174
- Aguirrezabal L.A.N., Deleens E., Tardieu F.** (1994). Root elongation rate is accounted for by intercepted PPFD and source-sink relations in-field and laboratory-grown sunflower. *Plant Cell and Environment*: **17**: 443–450.
- Ahmed S., Nawata E., Sakuratani T.** (2006). Changes of endogenous ABA and ACC, and their correlations to photosynthesis and water relations in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczak V.KPS1) during water logging. *Environmental and Experimental Botany*: **57**: 278-84.
- Amarasinghe B.H., de Bruxelles G.L., Braddon M., Onyeocha I., Forde B.G., Udvardi M.K.** (1998). Regulation of GmNRT2 expression and nitrate transport activity in roots of soybean (*Glycine max*). *Planta*: **206**(1): 44-52.
- Anderson W.P.** (1973). Ion transport in plants. Proceedings of an International meeting, Liverpool, July 1972. (Anderson WP, eds) Academic Press London and New York.
- Armengaud P., Breitling R., Amtmann A.** (2004). The potassium-dependent transcriptome of *Arabidopsis* reveals a prominent role of jasmonic acid in nutrient signaling. *Plant Physiology*: **136**: 2556-2576.

B

- Bänziger M., Edmeades G.O., Lafitte H.R.** (2002). Physiological mechanisms contributing to the increased N stress tolerance of tropical maize selected for drought tolerance. *Field Crops Research*: **75**:223-233.
- Bagh K., Hiraoki T., Thorpe T.A., Vogel H.J.** (2004). Nitrogen-15 NMR studies of nitrogen metabolism in *Picea glauca* buds. *Plant Physiology and Biochemistry*: **42**: 803–809.
- Baker D.A., Hall J.L.** (1988). Introduction and general principles. In, Ions transport in plant cells and tissues. (DA Baker and JL Hall, eds) pp.1-27, Longman Scientific & Technical Group, London.
- Barber S.A.** (1995). Nutrient absorption by plant roots. In *Soil Nutrient Bioavailability* : (eds Barber SA): 49-84. John Wiley and sons.
- Barber S.A., Walker J.M., Vasey E.H.** (1963). Mechanisms for the movement of plant nutrients from soil and fertilizer to the plant root. *Journal of Agriculture, Food and chemistry*: **11**: 204-207.
- Barratt N., Dong W., Gage D., Magnus V., Town C.** (1999). Metabolism of exogenous auxin by *Arabidopsis thaliana*: identification of the conjugate *N*-(indol-3-ylacetyl)-glutamine and initiation of a mutant screen. *Physiologia Plantarum*: **105**: 207–217.
- Barthes L., Bousser A., Hoarau J., Deléens E.** (1995). Reassessment of the relationship between nitrogen supply and xylem exudation in detopped maize seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*: **33**: 173–183.
- Barthes L., Deleens E., Bousser A., Hoarau J., Prioul J.L.** (1996). Xylem exudation is related to nitrate assimilation pathway in detopped maize seedlings: use of nitrate reductase and glutamine inhibitors as tools. *Journal of Experimental Botany*: **47**(297): 485-495.
- Bath K.S., Brerton A.J., Nye P.H.** (1979). The possibility of predicting solute uptake and plant growth response from independently measured soil and plant characteristics. VIII. the growth and nitrate uptake of rape in soil at nitrate concentrations and a comparison of the results with model prediction. *Plant and Soil*: **53**: 169-191.

- Beauclair P., Leblanc A., Lemauiel S., Deleu C., Le Deunff E.** (2009). Ethylene modifies architecture of root system in response to stomatal opening and water allocation changes between root and shoot. *Plant Signalling and Behavior*: **4(1)**: 1-3.
- Beauclair P., Jacquet A.** (2003). Manuel simplifié d'utilisation de l'analyseur de photosynthèse. Li-COR® 6400 system. *Cahier Techniques INRA*: **49**: 43-59.
- Berger F., Hung C.Y., Dolan L., Schiefelbein J.** (1998). Control of cell division in the epidermis of *Arabidopsis thaliana*. *Developmental Biology*: **194**: 235-245.
- Beuve N., Rispaill N., Laine P., Ourry A., Le Deunff E.** (2004). Putative role of g-aminobutyric acid (GABA) as long distance signal in up-regulation of nitrate uptake in *Brassica napus* L. *Plant Cell Environment*: **27**:1035-1046.
- Bhalerao R.P., Eklôf J., Ljung K., Marchant A., Bennet M., Sandberg G.** (2002). Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedling. *Plant Journal*: **29**: 325-332.
- Blackwell R.D., Murray A.J.S, Lea P.J., Kendall A.C., Hall N.P., Turner J.C. Wallsgrove R.M.** (1988). The value of mutants unable to carry out photorespiration. *Photosynthesis Research*: **16**: 155-176.
- Blakeslee J.J., Peer W.A., Murphy A.S.** (2005). Auxin transport. *Current Opinion in Plant Biology*: **8**: 494-500.
- Bloom A.J., Meyerhoff P.A., Taylor A.R., Rost T.L.** (2003). Root development and absorption of ammonium and nitrate from the rhizosphere. *Journal of Plant Growth Regulation*: **21**: 416-431.
- Boerjan, W., Cervera, M.T., Delarue, M., Beeckman, T., Dewitte, W., Bellini, C., Caboche, M., Van Onckelen, H., Van Montagu, M., and Inze, D.** (1995). Super root, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. *Plant Cell*: **7**: 1405-1419.
- Boyer J.S.** (1985). Water transport. *Annual Review of Plant Physiology*: **36**: 473-516.
- Brenner E.D., Stahlberg R., Mancuso S., Vicanco J., Baluska F., Van Volkenburg E.** (2006). Plant neurobiology: an integrated view of plant signaling. *Trends in Plants Science* : **11**: 413-9.
- Bressan R.A., Handa A.K., Handa S., Hasegawa P.M.** (1982). Growth and water relations of cultured tomato cells after adjustment to low external water potentials. *Plant Physiology*: **70**: 1303-1309.
- Brouder S.M., Volenec J.J.** (2008). Impact of climate change on crop nutrient and water use efficiencies. *Physiologia Plantarum*: **133**: 705-724.
- Brouder S.M., Volenec J.J., Turco R., Smith D.R., Ejeta G.** (2009). Nutrient-use efficiency in bioenergy cropping systems: Critical research questions. *Keynote Address. In Proc. of the XVI International Plant Nutrition Colloquium: Plant Nutrition for Sustainable Development and Global Health*: 26-30.
- Browlee A.G., Arst H.N.** (1983). Nitrate uptake in *Aspergillus nidulans* and involvement of the third gene of the nitrate assimilation gene cluster. *Journal of Bacteriology*: **155**: 1138-1146.
- Brucek H.** (2008). Effects of nitrogen supply on water-use efficiency of higher plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*: **171**: 210-219.

C

- Carvajal M., Cooke D.T., Clarkson D.T.** (1996). Responses of wheat plants to nutrient deprivation may involve the regulation of water-channel function. *Planta*: **199**: 372-381.
- Carvajal M., Cerda A., Martinez V.** (2000). Does calcium ameliorate the negative effect of NaCl on melon root water transport by regulating aquaporin activity? *Nez Phytologist*: **145**: 439-447.
- Cardenas-Navarro R., Adamowicz S., Robin P.** (1998). Diurnal nitrate uptake in young tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants: test of a feedback-based model. *Journal of Experimental Botany*: **49**: 721-730.
- Carol R.J., Dolan L.** (2002). Building a hair: tip growth in *Arabidopsis thaliana* root hairs. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Biological*: **357**: 815-821.
- Casimiro I., Beeckman T., Graham N., Bhalerao R., Zhang H., Casero P., Sandberg G., Bennett M.J.** (2003). Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends in Plant Science*: **8(4)**: 165-171.

- Casimiro I., Marchant A., Bhalerao R.P., Beeckman T., Dhooge S., Swarup R., Graham N., Inzé D., Sandberg G., Casero P.J., Bennett M.** (2001). Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell*: **13**(4):843-52.
- Casson S.A., Lindsey K.** (2003). Gene and signalling in root development. *New Phytologist*: **158**: 11–38.
- Celenza J.L., Grisafi P.L., Fink G.R.** (1995). A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes and Development*: **9**: 2131–2142.
- Cerezo M., Tillard P., Filleur S., Muños S., Daniel-Vedele F., Gojon A.** (2001). Major alterations of the regulation of root NO₃⁻ uptake are associated with the mutation of Nrt2.1 and Nrt2.2 genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*: **127**: 262-271.
- Chapin F.S.** (1990). Effects of nutrient deficiency on plant growth: evidence for a centralized stress-response system. In: Davies WJ, Jeffcoat B, eds. Importance of root to shoot communication in the response to environmental stress, Monograph 21. Bristol. *British Society for Plant Growth Regulation*: 135–148.
- Chapin F.S., Walter C.H.S., Clarkson D.T.** (1988). Growth response of barley and tomato to nitrogen stress and its control by abscisic acid, water relations and photosynthesis. *Planta*: **173**: 352-366.
- Chen H., Xiong L.** (2005). Pyridoxine is required for post-embryonic root development and tolerance to osmotic and oxidative stresses. *Plant Journal*: **44**: 396–408.
- Cheong Y.H., Pandey G.K., Grant J.J., Batistic O., Li L., Kim B.-G., Lee S.-C., Kudla J., Luan S.** (2007). Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in *Arabidopsis*. *Plant Journal*: **52**: 223-239.
- Chilley P.M., Casson S.A., Tarkowski P., Hawkins N., Wang K.L.C., Hussey P.J., Beale M., Ecker J.R., Sandberg G.K., Lindsey K.** (2006). The POLARIS peptide of *Arabidopsis* regulates auxin transport and root growth via effects on ethylene signaling. *Plant Cell*: **18**: 3058–3072.
- Christmann A., Hoffmann T., Teplova I., Grill E., Muller A.** (2005). Generation of Active Pools of Abscisic Acid Revealed by *In Vivo* Imaging of Water-Stressed *Arabidopsis*. *Plant Physiology*: **137** (1): 209-219.
- Christmann A., Weiler E.W., Steudle E., Grill E.** (2007). A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *Plant Journal*: **52**: 167-174.
- Chopin F., Wirth J., Dorbe M.F., Lejay L., Krapp A., Gojon A., Daniel-Vedel F.** (2007). The *Arabidopsis* nitrate transporter AtNRT2.1 is targeted to the root plasma membrane. *Plant Physiology and Biochemistry*: **45**: 630-635.
- Chung H.J., Sehnke P.C., Ferl R.J.** (1999). The 14-3-3 proteins: cellular regulators of plant metabolism. *Trends Plant Science*: **4**:367-371.
- Clark D.G., Gubrium E.K., Barrett J.E., Nell T.A., Klee H.J.** (1999). Root formation in ethylene-insensitive plants. *Plant Physiology*: **121**: 53–59.
- Clarkson D.T.** (1993). Roots and the delivery of solutes to the xylem. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Biological*: **341**: 5-17.
- Clarkson D.T., Carvajal M., Henzler T., Waterhouse R.N., Smyth A.J., Cooke D.T., Steudle E.** (2000). Root hydraulic conductance: diurnal aquaporin expression and the effects of nutrient stress. *Journal of Experimental Botany*: **51**(342): 61-70.
- Clarkson D.T., Hanson J.B.** (1980). The mineral nutrition of higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*: **31**: 239-311.
- Clarkson D.T., Hanson J.B.** (1986). Proton fluxes and the activity of a stellar proton pump in onion roots. *Journal of Experimental Botany*: **37**: 1136-1150.
- Colmer T.D., Bloom A.J.** (1998). A comparison of NH₄⁺ and NO₃⁻ net fluxes along roots of rice and maize. *Plant, Cell and Environment*: **21**: 240-246.
- Cornish-Bowden A.** (2005). Cinétique enzymatique. *EDP sciences*.
- Coruzzi G.M.** (2003). Primary N-assimilation into amino acids in *Arabidopsis*. In: Somerville CR, Meyerowitz EM (eds) *The Arabidopsis book*. *American Society of Plant Biologists*, Rockville, pp 1–17.
- Cosgrove D.J.** (2005). Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol*: **6**:850-861.
- Cramer M.D., Hawkins H.J., Verboom G.A.** (2009). The importance of nutritional regulation of plant water flux. *Oecologia*: **161**:15–24.

- Crawford N.M.** (1995). Nitrate : nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell*: **7**: 1861-1864.
- Crawford N.M.** (2006). Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *Journal of Experimental Botany*: **57**: 471-478.
- Crawford N.M., Glass A.D.M.** (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plants Science*: **3**: 389-395.

D

- Dainty J.** (1963). Water relations of plant cells. *Advance in Botanical Research*: **1**: 279-326.
- Dainty J.** (1985). Water transport through the root. *Acta Horticulturae*: **171**: 21-31.
- Dalton F.N., Raats P.A.C., Gardner W.R.** (1975). Simultaneous uptake of water and solutes by plant roots. *Agronomy Journal*: **67**: 334-339.
- Darcy H.** (1856). Les fontaines publiques de la ville de Dijon. *Histoire de l'Académie royale des sciences*: **1733**: 351.
- Davies W.J., Wilkinson S., Loveys B.** (2002). Stomatal control by chemical signaling and the exploitation of this mechanism to increase water use efficiency in agriculture. *New Phytologist*: **153(3)**:449-460.
- De Angeli A., Monachello D., Ephritikhine G., Frachisse J.M., Thomine S., Gambale F., Barbier-Brygoo H.** (2006). The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature*: **442**: 939.
- Desbrosses G., Josefsson C., Rigas S., Hatzopoulos P., Dolan L.** (2003). AKT1 and TRH1 are required during root hair elongation in *Arabidopsis*. *Journal of Experiment. Botany*: **54(383)**: 781-788.
- Dejoux J.F.** (1999). Evaluation d'itinéraires techniques du Colza d'hiver en semis très précoces. Analyse agronomique, conséquences environnementales et économiques. *Thèse de Doctorat, INA Paris-Grignon, France*.
- De Kroon H., Visser E.J.W., Huber H., Mommer L., Hutchings M.J.** (2009). A modular concept of plant foraging behaviour: the interplay between local responses and systemic control. *Plant Cell and Environment*: **32**: 704-712.
- Delhon P., Gojon A., Tillard P., Passama P.** (1995). Diurnal regulation of NO₂⁻ uptake in soybean plants. II. *Journal of Experimental Botany*: **46** : 1595-1 602.
- Den Boer B.G.W., Murray J.A.H.** (2000). Triggering the plant cell cycle in plants. *Trends in Cell Biology*: **10**: 245-250.
- Desikan R., Griffiths R., Hancock J., Neill S.** (2002). A new role for an old enzyme: Nitrate reductasemediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*: **99(25)**: 16314-16318.
- Dodd I.C.** (2003). Hormonal interactions and stomatal responses. *Journal of Plant Growth Regulation*: **22**: 32-46.
- Doddema H., Hofstra J.J., Feenstra W.J.** (1978). Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana*, disturbed in uptake or reduction of nitrate. I. Effect of nitrogen source during growth on uptake of nitrate and chlorate. *Plant Physiology*: **43**: 343-350.
- Doddema H., Otten H.** (1979a). Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana*, disturbed in uptake or reduction of nitrate. II. Kinetics. *Plant Physiology*: **45**: 332-338.
- Doddema H., Otten H.** (1979b). Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana*, disturbed in uptake or reduction of nitrate. III. Regulation. *Physiologia Plantarum*: **45**: 339-346.
- Doddema, H., and Telkamp, G.P.** (1979). Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana* disturbed in uptake or reduction of nitrate. 11. Kinetics. *Physiologia Plantarum*: **45**: 332-338.
- Dolan L., Janmaat K., Willemsen V., Linstead P., Poethig S., Roberts K., Scheres B.** (1993). Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development*: **119**: 71-84.
- Dorlédot S., Forster B., Pagès L., Price A., Tuberosa R., Draye X.** (2007). Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvement of crops *Trends in Plant Science*: **12(10)**: 474-481.

- Drew M.C.** (1975). Comparison of the effects of localized supply of phosphate, nitrate, ammonium and potassium on the growth of the seminal root system, and the shoot, in Barley. *New Phytologist*: **75**: 479-490.
- Drew M.C., Saker L.R.** (1975). Nutrient supply and the growth of the seminal root system in barley. *Journal of Experimental Botany*: **26(90)**: 79-90.
- Drew M.C., Saker L.R., Ashley T.W.** (1973). Nutrient supply and the growth of the seminal root system in barley I. The effect of nitrate concentration on the growth of axes and laterals. *Journal of Experimental Botany*: **24**: 1189.
- Dugardeyn J., Van Der Straeten D.** (2008). Ethylene: Fine-tuning plant growth and development by stimulation and inhibition of elongation. *Plant Science*: **175**: 59-70.
- Durham Brooks T.L., Miller N.D., Spalding E.P.** (2010). Plasticity of *Arabidopsis* Root Gravitropism throughout a Multidimensional Condition Space Quantified by Automated Image Analysis: *Plant Physiology*: **152**: 206–216.

E

- Epstein E.** (1953). Mechanism of ion absorption by roots. *Nature* 171: 83-84
- Epstein E.** (1966). Dual pattern of ion absorption by plant cells and by plants. *Nature*: **212**: 1324-1327.
- Epstein E., Rains D.W., Elzam O.E.** (1963). Resolution of dual mechanism of potassium absorption by barley roots. *Proceeding of the National Academy of Science USA*: **49**: 684-692.
- Epstein E., Hagen C.E.** (1952). A kinetic study of the absorption of alkalis by Barley roots. *Plant Physiology*: **27(3)**: 457–474.
- Estelle M., Somerville C.** (1987). Auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology. *Molecular and General Genetics*: **206**: 200–206.
- Evans M.L., Ishikawa H.I., Estelle M.A.** (1994). Response of *Arabidopsis* roots to auxin studied with high temporal resolution : comparison of wild type and auxin-response mutants. *Planta*: **194**: 215-222.
- Ezeta F.N., Jackson W.A.** (1975). Nitrate translocation by detopped corn seedling. *Plant Physiology*: **56**: 148-156.

F

- Faure-Rabasse S., Le Deunff E., Laine P., Macduff J.H., Ourry A.** (2002). Effects of nitrate pulses on *BnNRT1* and *BnNRT2* genes mRNA levels and nitrate influx rates in relation to the duration of N deprivation in *Brassica napus* L. *Journal of Experimental Botany*: **53**: 1711-1721.
- Feng H.M., Yan M., Fan X.R., Li B.Z., Shen Q.R., Miller A.J., Xu G.H.** (2011). Spatial expression and regulation of rice high-affinity nitrate transporters by nitrogen and carbon status. *Journal of experimental Botany*: **62(7)**: 2319-2332.
- Ferrario-Méry S., Hodges M., Hirel B., Foyer C.H.** (2002). Photorespiration-dependent increases in phosphoenol pyruvate carboxylase, isocitrate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase in transformed tobacco plants deficient in ferredoxin-dependent glutamine-alpha-ketoglutarate aminotransferase. *Planta*: **214**: 877–888.
- Filleur S., Daniel-Vedele F.** (1999). Expression analysis of a high-affinity nitrate transporter isolated from *Arabidopsis thaliana* by differential display. *Planta*: **207**: 461-469.
- Filleur S., Dorbe M.F., Cerezo M., Orsel M., Granier F., Gojon A., Daniel-Vedele F.** (2001). An *Arabidopsis* T-DNA mutant affected in *Nrt2* genes is impaired in nitrate uptake. *FEBS Letters*: **489**: 220-224.
- Fiscus E.L.** (1975). The interaction between osmotic and pressure induced water flow in plant roots. *Plant Physiology*: **55**: 917-922.

- Fiscus E.L.** (1986). Diurnal changes in volume and solute transport coefficients of phaseolus roots. *Plant Physiology*: **80(3)**:752-9.
- Fiscus E.L., Kramer P.J.** (1975). General model for osmotic and pressure-induced flow in plant roots. *Proceeding of the National Academy of Science*: **72(8)**: 3114-3118.
- Fiscus E.L.** (1977). Determination of hydraulic and osmotic properties of soybean root systems. *Plant Physiology* : **59**: 1013-1020.
- Fitter A., Williamson L., Linkohr B., Leyser O.** (2002). Root system architecture determines fitness in an *Arabidopsis* mutant in competition for immobile phosphate ions but not for nitrate ions. *Proceedings of the Royal Society: Biological Sciences*: **7: 269 (1504)**: 2017-2022.
- Forde B.G.** (2000). Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica and Biophysica Acta*: **1465**: 219-235.
- Forde B.G.** (2002). Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. *Annals Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*: **53**: 203-224.
- Forde B.G., Clarkson D.T.** (1999). Nitrate and ammonium nutrition of plants: physiological and molecular perspectives. *Advance in Botanical Research*: **30**: 1–90.
- Forde B.G., Lea P.J.** (2007). Glutamate in plants: metabolism, regulation and signaling. *Journal of Experimental Botany*: **58(9)**: 2339-2358.
- Forde B.G., Lorenzo H.** (2001). The nutritional control of root development. *Plant and Soil*: **232**: 51-68.
- Forde B.G., Walch-Liu P.** (2009). Nitrate and Glutamate as environmental cues for behavioural responses in plant roots. *Plant Cell and Environment*: **32**: 682-693.
- Freixes S., Thibaud M.C., Tardieu F., Muller B.** (2002). Root elongation and branching is related to local hexose concentrations in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant, Cell and Environment*: **25**: 1357- 1366.
- Friml J.** (2003). Auxin transport – shaping the plant. *Current Opinion in Plant Biology*: **6**: 7-12.
- Fuglsang A.T., Visconti S., Drumm K., Jahn T., Stensballe A., Mattei B., Jensen O.N., Aducci P., Palmgren M.G.** (1999). Binding of 14-3-3 protein to the plasma membrane H(+)-ATPase AHA2 involves the three C-terminal residues Tyr(946)-Thr-Val and requires phosphorylation of Thr(947). *The Journal Biological Chemistry*: **274**:36774-36780.
- Fuglsang A.T., Guo Y., Cui T.A., Qiu Q., Song C., Kristiansen K.A., Bych K., Schulz A., Shabala S., Schumaker K.S., Palmgren M.G., Zhu J.** (2007). Arabidopsis protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H⁺-ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein. *Plant Cell*: **19**:1617-1634.

G

- Gansel X., Munos S., Tillard P., Gojon A.** (2001). Differential regulation of the NO₃⁻ and NH₄⁺ transporter genes *AtNrt2.1* and *AtAmt1.1* in *Arabidopsis*: relation with long-distance and local controls by N status of the plant. *The Plant Journal*: **26**: 143–155.
- Garcia I., Castellano J.M., Vioque B., Solano R., Gotor R., Romero L.** (2010). Mitochondrial b-cyanoalanine synthase is essential for root hair formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*: **22**:3268-3279.
- Garnett T., Conn V., Kaiser B.N.** (2009). Root based approaches to improving nitrogen use efficiency in plants. *Plant Cell and Environment*: **32**: 1272-1283.
- Geelen D., Lurin C., Bouchez D., Frachisse J.M., Lelièvre F., Courtial B., Barbier-Brygoo H., Maurel C.** (2000). Disruption of putative anion channel gene *AtCLC-a* in *Arabidopsis* suggests a role in the regulation of nitrate content. *Plant Journal*: **21**: 259-267.
- Gifford M.L., Dean A., Gutierrez R.A., Gloria M. Coruzzi G.M., Birnbaum K.D.** (2008). Cell-Specific Nitrogen Responses Mediate Developmental Plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: **105:2** 803-808.
- Girin T., Lejay L., Wirth J., Widiez T., Palenchar P.M., Nazon P., Touraine B., Gojon A., Lepetit M.** (2007). Identification of a 150 bpcis-acting element of the *AtNRT2.1* promoter involved in the regulation of gene expression by the N and C status of the plant. *Plant Cell and Environment*: **30**: 1366-1380.

- Glass A.D.M.** (1988). Nitrogen uptake by plant roots. *ISI Atlas Science*: **1**: 151-156.
- Glass A.D.M.** (2009). Nitrate uptake by plant roots. *Botany*: **87(7)**: 659-667.
- Glass A.D.M., Siddiqi Y., Ruth T.J., Ruffy T.W.** (1990). Studies of the uptake of nitrate in Barley II. Energetics. *Plant Physiology*: **93(4)**: 1585-1589.
- Glass A.D.M., Shaff J.E., Kochian L.V.** (1992). Studies of the uptake of nitrate in barley IV. Electrophysiology. *Plant Physiology*: **99**: 456-463.
- Gloser V., Zwieniecki M.A., Orians C., Holbrook N.M.** (2007). Dynamic changes in root hydraulic properties in response to nitrate availability. *Journal of Experimental Botany*: **58**: 2409-2415.
- Gojon A., Krouk G., Perrine-Walker F., Laugier E.** (2010). Nitrate tranceptor(s) in plants. *Journal of Experimental Botany*: 1-10.
- Gorska A., Zwieniecka A., Holbrook N.M., Zwieniecki M.A.** (2008a). Nitrate induction of root hydraulic conductivity in maize is not correlated with aquaporin expression. *Planta*: **228(6)**: 989-998.
- Gorska A., Ye Q., Holbrook N.M., Zwieniecki M.A.** (2008b). Nitrate control of root hydraulic properties in plants: translating local information to whole plant response. *Plant Physiology*: **148**: 1159-1167.
- Górska A., Lazor J.W., Zwieniecka A.K., Benway C., Zwieniecki M.A.** (2010). The capacity for nitrate regulation of root hydraulic properties correlates with species nitrate uptake rates. *Plant and Soil*: **337**: 447-455.
- Good A.G., Shrawat A., Muench D.G.** (2004). Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? *Trends in Plant Science*: **9(12)**: 597-605.
- Graham R.D., Ulrich A.** (1972). Potassium deficiency-induced changes in stomatal behavior, leaf water potentials, and root system permeability in beta vulgaris L.. *Plant Physiology*: **49(2)**: 105-109.
- Gregory P.** (2006). Plant roots: growth, activity and interaction with soils. *Blackwell Publishing, Oxford*.
- Guignard J.L.** (2000). Biochimie végétale. *Dunod*
- Guo F.Q., Wang R., Chen M., Crawford N.M.** (2001). The *Arabidopsis* dual-affinity nitrate transporter gene *AtNRT1.1* (CHL1) is activated and functions in nascent organ development during vegetative and reproductive growth. *Plant Cell*: **13**: 1761-1777.
- Guo F.Q., Wang R., Crawford N.M.** (2002). The *Arabidopsis* dual-affinity nitrate transporter gene *AtNRT1.1* (CHL1) is regulated by auxin in both shoots and roots. *Journal of Experimental Botany*: **53(370)**: 835-844.
- Guo F.Q., Young J., Crawford N.M.** (2003). The nitrate transporter *AtNRT1.1* (CHL1) functions in stomatal opening and contributes to drought susceptibility in *Arabidopsis*. *Plant Cell*: **15**: 107-117.
- Guo S., Bruck H., Sattelmacher B.** (2002). Effect of nitrogen forms on the growth and water uptake of french bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. *Plant and Soil*: **239**: 267-275.
- Guo S., Kaldenhoff R., Uehlein N., Sattelmacher B., Bueck H.** (2007). Relationship between water and nitrogen uptake in nitrate- and ammonium- supplied *Phaseolus vulgaris* L. plants. *Journal of Plant Nutritional and Soil Science*: **170**: 1-8.
- Gutiérrez R.A., Lejay L.V., Dean A., Chiaromonte F., Shasha D.E., Coruzzi G.M.** (2007). Qualitative network models and genome-wide expression data define carbon/nitrogen-responsive molecular machines in *Arabidopsis*. *Genome Biology*: **8**: R7.

H

- Hanson, A. and Kende, H.** (1976). Biosynthesis of wound ethylene in morning-glory flower tissue. *Plant Physiology*: **57**: 538 – 541.
- Haschke H.P., Lüttge U.** (1975). Stoichiometric correlation of malate accumulation with auxin-dependent K⁺-H⁺ exchange and growth in *Avena* coleoptile segments. *Plant Physiology*: **56**: 696-698.
- Herder G., Van Isterdael G., Beeckman T., De Smet I.** (2010). The roots of a new green revolution. *Trends in Plant Science*: **15(11)**: 600–607.
- Hirel B., Le Gouis J., Ney B., Gallais A.** (2007). The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *Journal of Experimental Botany*: **58(9)**: 2369-2387.

- Hirner A., Ladwig F., Stransky H., Okumoto S., Keinath M., Harms A., Frommer W.B., Koch W.** (2007). *Arabidopsis* LHT1 is a high-affinity transporter for cellular amino acid uptake in both root epidermis and leaf mesophyll. *Plant Cell*: **18**: 1931–1946.
- Ho C.H., Lin S.H., Hu H.C., Tsay Y.F.** (2009). CHL1 Functions as a nitrate sensor in plants. *Cell*: **138**: 1184–1194.
- Hoarau J., Barthes L., Bousser A., Deleens E., Prioul J.P.** (1996). Effect of nitrate on water across roots of nitrogen pre-starved maize seedlings. *Planta*: **200**: 405–415.
- Hobbie L.J.** (1998). Auxin: molecular genetic approaches in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*: **36**: 91–102.
- Hogh-Jensen H., Wollenweber B., Schjoerring J.K.** (1997). Kinetics of nitrate and ammonium absorption and accompanying H^+ fluxes in roots of *Lolium perenne* L. and N_2^- fixing *Trifolium repens* L.. *Plant Cell and Environment*: **20**: 1184–1192.
- Holsbeeks I., Lagatie O., Van Nuland A., Van de Velde S., Thevelein J.M.** (2004). The eukaryotic plasma membrane as a nutrient-sensing device. *Trends in Biochemical Sciences*: **29**: 556–564.
- Hu H.C., Wang Y.Y., Tsay Y.F.** (2009). AtCIPK8, a CBL-interacting protein kinase, regulates the low-affinity phase of the primary nitrate response. *Plant Journal*: **57**: 264–278.
- Huai Q., Xia Y., Chen Y., Callahan B., Li N., Ke H.** (2001). Crystal structures of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase in complex with aminoethoxyvinylglycine and pyridoxal-5-phosphate provide new insight into catalytic mechanisms. *The Journal of Biological Science*: **276 (41)**: 38210–38216.
- Huang N.C., Chiang C.S., Crawford N.M., Tsay Y.F.** (1996). CHL1 encodes a component of the low-affinity nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *Plant Cell*: **11**: 1381–1392.
- Huang N.C., Liu K.H., Lo H.J., Tsay Y.F.** (1999). Cloning and functional characterization of an *Arabidopsis* nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *Plant Cell*: **11**: 1381–1392.

J

- Ivachenko M.G., Muday G.K., Dubrovsky J.G.** (2008). Ethylene-auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*: **55**: 335–347.

J

- Johnston A.E.** (2008). Resource or waste: the reality of nutrient recycling to land. *Proceeding 630. York, UK: International Fertiliser Society*.
- Jackson M.B.** (1991). Ethylene in root growth and development. In AKMattoo, JC Suttle, eds, *The Plant Hormone Ethylene*. *CRC Press, BocaRaton, FL*: 159–181.
- Jones D.L., Healey J.R., Willet V.B., Farrar J.F., Hodge A.** (2005). Dissolved organic nitrogen uptake by plant: an important N uptake pathway? *Soil Biology and Biochemistry*: **37**: 413–423.
- Jubault M., Hamon C., Gravot A., Lariagon C., Delourme R., Bouchereau A., Manzanares-Dauleux M.J.** (2008). Differential regulation of root Arginine catabolism and polyamine metabolism in club root-susceptible and partially resistant *Arabidopsis* genotypes. *Plant Physiology*: **146**: 2008–19.

K

- Kant S, Bi YM, Rothstein SJ. (2011).** Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. *Journal of experimental botany* : **62(4)**:1499-509
- Kaldenhoff R., Grote K., Zhu J.J., Zimmermann U. (1998).** Significance of plasmalemma aquaporins for water transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*: **14**: 121-8.
- Kamaluddin M., Zwiazek J.J. (2002).** Ethylene enhances water transport in hypoxic Aspen. *Plant Physiology*: **128**: 1-8.
- Karmoker J.L., Clarkson D.T., Saker L.R., Rooney J.M., Purves J.V. (1991).** Sulphate deprivation depresses the transport of nitrogen to the xylem and hydraulic conductivity of barley (*Hordeum vulgare* L.) roots. *Planta*: **185**: 269–278.
- Kembel S.W., Cahill J.F. (2005).** Plant Phenotypic Plasticity Belowground: A Phylogenetic Perspective on Root Foraging Trade-Offs. *American Naturalist*: **166(2)**: 216-229.
- Khan S., Stone J.M. (2007).** *Arabidopsis thaliana* GH3.9 influences primary root growth. *Planta*: **226(1)**: 21-34.
- Kiba T., Kudo T., Kojima M., Sakakibara H. (2011).** Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin. *Journal of Experimental Botany*: **62(4)**: 1399-409.
- King J., Gay A., Sylvester-Bradley R., Bingham I., Foulkes J., Gregory P., Robinson D. (2003).** Modelling cereal root systems for water and nitrogen capture: towards an economic optimum. *Annals of Botany*: **91(3)**: 383-90.
- King J., Stimart D.P., Fisher R.H., Bleecker A.B. (1995).** A mutation altering auxin homeostasis and plant morphology in *Arabidopsis*. *Plant Cell*: **7**: 2023–2037.
- Kissen R., Winge P., Tran D.H.T., Jørstad T.S., Størseth T.R., Christensen T., Bones A.M. (2010).** Transcriptional profiling of an Fd-OGAT/GLU1 mutant in *Arabidopsis thaliana* reveals a multiple stress response and extensive reprogramming of the transcriptome. *BMC Genomics*: **11**: 190.
- Köhler B., Raschke K. (2000).** The Delivery of Salts to the Xylem. Three Types of Anion Conductance in the Plasmalemma of the Xylem Parenchyma of Roots of Barley. *Plant Physiology*: **122(1)**: 243-254.
- Köhler B., Wegner L.H., Osipov V., Raschke K. (2002).** Loading of nitrate into the xylem: apoplastic nitrate controls the voltage dependence of X-QUAC, the main anion conductance in xylem-parenchyma cells of barley roots. *Plant Journal*: **30(2)**: 133–142.
- Kowalczyk M., Sandberg G. (2001).** Quantitative analysis of indole-3-acetic acid metabolites in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* : **127(4)**: 1845-53.
- Kramer P.J. (1983).** The absorption of water and root and stem pressures. In PJ Kramer, eds. *Water Relations of Plants*. Academic press, Orlando: 215-234.
- Krapp A., Fraiser V., Scheible W.R., Quesada A., Gojon A., Stitt M., Caboche M., Daniel-Vedele F. (1998).** Expression studies of *Nrt: INp*, a putative high affinity nitrate transporter: evidence for its role in nitrate affinity uptake. *Plant Journal*: **14(6)**: 723-732.
- Kronzucker H.J., Glass A.D.M., Siddiqi M.Y. (1999).** Inhibition of nitrate uptake by ammonium in barley. Analysis of component fluxes. *Plant Physiology*: **120**: 283-291.
- Krouk G., Tillard P., Gojon A. (2006).** Regulation of the high-affinity NO₃⁻ uptake system by NRT1.1-mediated NO₃⁻ demand signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*: **142**: 1075-1086.
- Krouk G., Tranchina D., Lejay L., Cruikshank A.A., Shasha D., Coruzzi G.M., Gutiérrez R.A. (2009).** A systems approach uncovers restrictions for signal interactions regulating genome-wide responses to nutritional cues in *Arabidopsis*. *PLOS Computational Biology*: **5(3)**: 1-12.
- Krouk G., Lacombe B., Bielach A., Perrine-Walker F., Malinska K., Mounier E., Hoyerova K., Tillard P., Leon S.L., Jung K. (2010).** Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Cell*: **18**: 1-11.

ℒ

Lainé P., Ourry A., Boucaud J. (1995). Shoot control of nitrate uptake rates by roots of *Brassica napus* L. Effects of localized nitrate supply. *Planta*: **196**: 77-83.

- Laties G.G., MacDonald I.R., Dainty J.** (1964). Influence of the counter-ion on the absorption isotherm for chloride at low temperature. *Plant Physiology*: **39(2)**: 254-262.
- Lau O.L., Yang S.F.** (1976). Inhibition of ethylene production by cobaltous ion. *Plant physiology*: **58**:114-117.
- Lazof D.B., Rufty T.W., Redinbaugh M.G.** (1992). Localization of nitrate absorption and translocation within morphological regions of the corn root. *Plant Physiology*: **100**: 1251-1258.
- Le J., Vandenbusche F., Van Der Streaten D., Verbelen J.P.** (2001). In early response of *Arabidopsis* roots to ethylene, cell elongation is up- and down-regulated and uncoupled from differentiation. *Plant Physiology*: **125**: 519–522.
- Le J., Vandenbusche F., Van Der Streaten D., Verbelen J.P.** (2004). Position and cell type-dependent microtubule reorientation characterizes the early response of *Arabidopsis* root epidermis to ethylene. *Physiologia Plantarum*: **121**: 513–519.
- Leblanc A., Renault H., Lecourt J., Etienne P., Deleu C., Le Deunff E.** (2008). Elongation changes of exploratory and root hair systems induced by ACC and AVG affect nitrate uptake and the *BnNRT2.1* and *BnNRT1.1* transporters genes expression in *Brassica napus*. *Plant Physiology*: **146**: 1928-1940.
- Leblanc A., Segura R., Deleu C., Le Deunff E.** (2013). In low transpiring conditions, uncoupling the *BnNrt2.1* and *BnNrt1.1* NO₃⁻ transporters by glutamate treatment reveals the essential role of *BnNRT2.1* for nitrate uptake and the nitrate-signaling cascade during growth. *Plant Signaling and Behavior* : **8(2)**..
- Leegood R.C., Lea P.J., Adcock M.D., Häusler R.E.** (1995). Theregulation and control of photorespiration. *Journal of Experimental Botany*: **46**: 1397–1414.
- Lejay L., Gansel X., Cerezo M., Tillard P., Muller C., Krapp A., von Wiren N., Daniel-Vedele F., Gojon A.** (2003). Regulation of root ion transporters by photosynthesis: functional importance and relation with hexokinase. *Plant Cell*: **15**: 2218-2232.
- Lejay L., Tillard P., Lepetit M., Olive F.D., Filleur S., Daniel-Vedele F., Gojon A.** (1999). Molecular and functional regulation of two NO₃⁻ uptake systems by N- and C-status of *Arabidopsis* plant. *Plant Journal*: **18(5)**: 509-519.
- Lejay L., Wirth J., Pervent M., Cross J., Tillard P., Gojon A.** (2008). Oxidative pentose phosphate pathway-dependent sugar sensing as a mechanism for regulation of root ion transporters by photosynthesis. *Plant Physiology*: **146**: 2036-2053.
- Lemaire L, Antonin Leblanc A., Carole Deleu C., Erwan Le Deunff E.** (2013) Modification of ethylene biosynthesis by ACC and AIBA revealed structural and functional relationship between changes in K¹⁵NO₃ uptake and root absorbing surface. (soumis à *Journal of experimental Botany*)
- Le Ny F., Leblanc A., Beauclair P., Deleu C., Le Deunff E.** (2013). In low transpiring conditions, nitrate and water fluxes for growth of *B. napus* plantlets correlate with changes in *BnNrt2.1* and *BnNrt1.1* nitrate transporter expression. *Plant Signaling and Behavior* : **8(2)**..
- Li J., Zhu S., Song X., Shen Y., Chen H., Yu J., Yi K., Liu Y., Karplus V.J., Wu P., Deng X.W.** (2006). A rice glutamate receptor-like gene is critical for the division and survival of individual cells in the root apical meristem. *Plant Cell*: **18** : 340-349.
- Li W., Wang Y., Okamoto M., Crawford N.M., Siddiqi M.Y., Glass A.D.M.** (2007). Dissection of the AtNRT2.1:AtNRT2.2 inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. *Plant Physiology*: **143**: 425-433.
- Liepman A.H., Olsen L.J.** (2004). Genomic analysis of aminotransferases in *Arabidopsis thaliana*. *Critical Reviews in Plant Sciences*: **23**: 73–89.
- Lin S.H., Kuo H.F., Cavinec G., Lin C.S., Lepetit M., Hsu P.K., Tillard P., Lin H.L., Wang Y.Y., Tsai C.B., Gojon A., Tsay Y.F.** (2008). Mutation of *Arabidopsis* NRT1.5 nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. *Plant Cell*: **20**: 2514-2528.
- Lincoln C., Britton J.H., Estelle M.** (1990). Growth and development of the AXR1 mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell*: **2**: 1071–1080.
- Lineweaver H., Burk D.** (1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of the American Chemical Society*: **56 (3)**: 658–666.
- Linkhor, B., Williamson, L., Fitter, A., and H. L. Ottoline.** (2002). Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *Plant Journal*: **29(6)**: 751-760.

- Little D.Y., Rao H., Oliva S., daniel-Vedele F., Krapp A., Malamy J.E.** (2005). The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutrient Cues. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*: **102**: 13693-13698.
- Liu J., An X., Cheng L., Chen F., Bao J., Yuan L., Zhang F., Mi G.** (2010). Auxin transport in maize roots in response to localized nitrate supply. *Annals of Botany*: **106(6)**: 1019-1026.
- Liu K.H., Huang C.Y., Tsay Y.F.** (1999). CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of *Arabidopsis* involved in multiple phases of nitrate uptake. *Plant Cell*: **11**: 865-874.
- Liu K.H., Tsay Y.F.** (2003). Switching between the two action modes of the dual affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *EMBO Journal*: **22(5)**: 1005-1013.
- Liu Y, Su L, Yang SF.** (1984). Metabolism of α -aminoisobutyric acid in mungbean hypocotyls in relation to metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Planta*: **161**: 439-443.
- Livak K.J., Schmittgen T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods in Cell Science*: **25**: 402-408.
- Ljung K., Hull A.K., Kowalczyk M., Marchant A., Celenza J., Cohen J.D.** (2002). Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*: **50**: 309-332.
- Ljung K., Hull A.K., Celenza J., Yamada M., Estelle M., Nonmanly J.** (2005). Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell*: **17**: 1090-1104.
- Locke J.M., Bryce J.H., Morris P.C.** (2000). Contrasting effects of ethylene perception and biosynthesis inhibitors on germination and seedling growth of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Experimental Botany*: **51**: 1843-1849.
- Lopez F., Bousser A., Sissoëff I., Gaspar M., Lachaise B., Hoarau J. Mahé A.** (2003). Diurnal regulation of water transport and aquaporin gene expression in maize roots: contribution of PIP2 proteins. *Plant and Cell Physiology*: **44(12)**: 1384-1395.
- Lopez-Bucio J., Cruz-Ramirez A., Herrera-Estrella L.** (2003). The role of nutrient in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology*: **6**: 280-287.
- Lopez-Bucio J, Hernandez-Abreu E, Sanchez-Calderon L, Nieto-Jacobo MF, Simpson J an Herrera-Estrella L.** (2002). Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiology*: **129**: 244-256.
- López-Bucio J., Hernández-Abreu E., Sánchez-Calderón L., Pérez-Torres A., Rampey R.A., Bartel B., Herrera-Estrella L.** (2005a). An auxin transport independent pathway is involved in phosphate stress-induced root architectural alterations in *Arabidopsis*. Identification of BIG as a mediator of auxin in pericycle cell activation. *Plant Physiology*: **137(2)**: 681-91.
- López-Bucio J., Cruz-Ramírez A., Pérez-Torres A., Ramírez-Pimentel J.G., Sánchez-Calderón L., Herrera-Estrella L.** (2005b). Root Architecture. En: *Plant Architecture and its manipulation*. *Turnbull, C. (Ed). Blackwell Annual Review Series*. pp 182-208.
- Lopushinsky W.** (1964). Effect of Water Movement on Ion Movement into the Xylem of Tomato Roots. *Plant Physiology*: **39(3)**: 494-501.
- Loqué D., Tillard P., Gojon A., Lepetit M.** (2003). Gene expression of the NO_3^- transporter NRT1.1 and the nitrate reductase NIA1 is repressed in *Arabidopsis* roots by NO_2^- , the product of NO_3^- reduction. *Plant Physiology*: **132**: 958-967.
- Loqué D., Yuan L., Kojima S., Gojon A., Wirth J., Gazzarrini S., Ishiyama K., Takahashi H., von Wiren N.** (2006). Additive contribution of AMT1;1 and AMT1;3 to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogen-deficient *Arabidopsis* roots. *Plant Journal*: **48**: 522-534.
- Loudet O., Gaudon V., Trubuil A., Daniel-Vedele F.** (2005). Quantitative trait loci controlling root growth and architecture in *Arabidopsis thaliana* confirmed by heterogeneous inbred family. *Theoretical and Applied Genetics*: **110**: 742-753.
- Ludwig-Müller J.** (2009). Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany*: **62(6)**: 1757-1773.
- Ludwig-Müller J., Jülke S., Bierfreund N.M., Decker E.L., Reski R.** (2010). Moss (*Physcomitrella patens*) GH3 proteins act in auxin homeostasis. *New Phytologist*: **181(2)**: 323-38.

- Lüthen H., Bigdon M., Böttger M.** (1990). Reexamination of the Acid Growth Theory of Auxin Action. *Plant Physiology*: **93(3)**: 931-939.
- Lüttge U., Laties G.G.** (1967). Selective inhibition of absorption and long distance transport in relation to the dual mechanisms of ion absorption in maize seedling. *Plant Physiology*: **42**: 181-185.
- Lynch** (2007). Roots of the second green revolution. *Canadian Journal of Botany*: **55**: 493-512.

M

- Macduff J.H., Bakken A.K.** (2003). Diurnal variation in uptake and xylem contents of organic and assimilated N under continuous and interrupted N supply to *Phleum pratense* and *Festuca pratensis*. *Journal of Experimental Botany*: **54(381)**: 431-444.
- Maggio A., Zhu J.K., Hasegawa P.M., Bressan R.A.** (2006). Osmogenetics: Aristotle to *Arabidopsis*. *Plant Cell*: **18**: 1542-1557.
- Makino A.** (2011). Photosynthesis, Grain Yield, and Nitrogen Utilization in Rice and Wheat. *Plant Physiology* : **155**: 125-129.
- Malagoli P., Laine P., Le Deunff E., Rossato L., Ney B., Ourry A.** (2004). Modeling nitrogen uptake in oilseed rape cv Capitol during a growth cycle using influx kinetics of root nitrate transport systems and field experimental data. *Plant Physiology*: **134**: 388-400.
- Malamy J.E., Benfey P.N.** (1997). Down and out in *Arabidopsis*: the formation of lateral roots. *Trends in Plant Science*: **2**: 390-395.
- Marschner A.** (1995). Mineral nutrition of higher plant. *Academic Press, San Diego, CA*.
- Martinez-Ballesta M.d.C., Martinez V., Carvajal M.** (2000). Regulation of water channel activity in whole roots and in protoplasts from roots of melon plants grown under saline conditions. *Australian Journal of Plant Physiology*: **27**: 685-691.
- Masucci J.D., Schiefelbein J.W.** (1994). The *rdh6* mutation of *Arabidopsis thaliana* alters root-hair initiation through an auxin- and ethylene-associated process. *Plant Physiology*: **106**: 1335-46.
- Masucci J.D., Schiefelbein J.W.** (1996). Hormones act downstream of TTG and GL2 to promote root hair outgrowth during epidermis development in the *Arabidopsis* root. *Plant Cell*: **8**: 1505-1517.
- Mees G.C., Watherley P.E.** (1957a). The mechanism of water absorption by roots. I. Preliminary studies on the effects of hydrostatic pressure gradients. *Proceedings of the Royal Society. Londre Biological Sciences*: **147**: 367-380.
- Mees G.C., Weatherley P.E.** (1957b). The Mechanism of Water Absorption by Roots. II. The Role of Hydrostatic Pressure Gradients Across the Cortex. *Proceedings of the Royal Society. Londre Biological Sciences*: **147**: 381-391.
- Merritt F., Kemper A., Tallman G.** (2001). Inhibitors of ethylene synthesis inhibit auxin-induced stomatal opening in epidermis detached from leaves of *Vicia faba* L. *Plant and Cell Physiology*: **42**: 223-30.
- Miesak B.H., Coruzzi G.M.** (2002). Molecular and physiological analysis of *Arabidopsis* mutants defective in cytosolic or chloroplastic aspartate aminotransferase. *Plant Physiology*: **129**: 1-11.
- Miller A.J., Smith S.J.** (1996). Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells. *Journal of Experimental Botany*: **47**: 843-854.
- Minshall W.H.** (1964). Effect of nitrogen-containing nutrients on the exudation from detopped tomato plants. *Nature*: **202**: 925-926.
- Minshall W.H.** (1968). Effect of nitrogenous materials on translocation and stump exudation in root system of tomato plants. *Canadian Journal of Botany*: **46**: 363-376.
- Mishra B.S., Singh M., Aggrawal P., Laxmi A.** (2009). Glucose and Auxin Signaling Interaction in Controlling *Arabidopsis thaliana* Seedlings Root Growth and Development. *PLoS ONE*: **4(2)**: e4502.
- Monachello D., Allot M., Oliva S., Krapp A., Daniel-Vedele F., Barbier-Brygoo H., Ephritikhine G.** (2009). Two anion transporters AtClCa and AtClCe fulfil interconnecting but not redundant roles in nitrate assimilation pathways. *New Phytologist*: **183(1)**: 88-94.

- Montiel G., Gantet P., Jay-Allemand C., Breton C.** (2004). Transcription factor networks pathways to the knowledge of root development. *Plant Physiology*: **136**: 3478–3485.
- Moorhead G., Douglas P., Morrice N., Scarabel M., Aitken A., Mackintosh C.** (1996). Phosphorylated nitrate reductase from spinach leaves is inhibited by 14-3-3 proteins and activated by fusicossin. *Current Biology*: **9**:1104-1113.
- Moorhead G., Douglas P., Cotelle V., Harthill J., Morrice N., Meek S., Deiting U., Stitt M., Scarabel M., Aitken A., MacKintosh C.** (1999). Phosphorylation-dependent interactions between enzymes of plant metabolism and 14-3-3 proteins. *The Plant Journal*: **18**:1-12.
- Muldin I., Ingemarsson B.** (1995). A cDNA from *Brassica napus* L. encoding a putative nitrate transporter (GenBank U17987). *Plant Physiology*: **108**: 1341–1343.
- Muller B., Stosser M., Tardieu F.** (1998). Spatial distributions of tissue expansion and cell division rates are related to irradiance and to sugar content in the growing zone of maize roots. *Plant, Cell and Environment*: **21**: 149–158.
- Muller B., Tilliard P., Touraine B.** (1995). Nitrate fluxes in soybean seedling roots and their response to amino acids : an approach using ¹⁵N. *Plant Cell and Environment*: **18**: 1267-1279.
- Muller B., Touraine B.** (1992). Inhibition of NO₃⁻ uptake by various phloem translocated amino acids in soybean seedlings. *Journal of Experimental Botany*: **43**: 617-623.
- Munos S., Cazettes C., Fizames C., Gaymard F., Tillard P., Lepetit M., Lejay L., Gojon A.** (2004). Transcript profiling in the *chl1-5* mutant of *Arabidopsis* reveals a role of the nitrate transporter NRT1.1 in the regulation of another nitrate transporter, NRT2.1. *Plant Cell*: **16**: 2433-2447.

N

- Nandwal A.S., Maan A., Kundu B.S., Sheokand S., Kamboj D.V., Sheoran A., Kumar B., Dutta D.** (2000). Ethylene evolution and antioxidant defence mechanism in *Cicer arietinum* roots in the presence of nitrate and aminoethoxyvinylglycine. *Plant Physiology and Biochemistry*: **38**: 709-15.
- Nazoa P., Vidmar J.J., Tranbarger T.J., Mouline K., Damiani I., Tillard P., Zhuo D., Glass A.D., Touraine B.** (2003). Regulation of the nitrate transporter gene AtNRT2.1 in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate, amino acids and developmental stage. *Plant Molecular Biology*: **52(3)**: 689-703.
- Negi S., Ivanchenko M.G., Muday G.** (2008). Ethylene regulates lateral root formation and auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*: **55(2)** : 175-187.
- Neill S., Barros R., Bright J.** (2008). Nitric oxide, stomatal closure and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*: **59(2)** : 165-176.
- Nero D., Krouk G., Tranchina D., Coruzzi G.M.** (2009). A system biology approach highlights a hormonal enhancer effect on regulation of genes in a nitrate responsive “biomodule”. *BMC System Biology*: **3**: 59.
- Neuman S.P.** (1976). Wetting front pressure head in infiltration model of Green and Ampt. *Water Resources Research*: **12(3)**: 564-566.
- Nissen P.** (1974). Uptake mechanisms : Inorganic and Organic. *Annual Review of Plant Physiology*: **25**: 53-79.
- Nissen P.** (1991). Multiphasic uptake mechanisms in plants. *International Review of Cytology*: **126**: 89-134.
- Normanly J.** (1997). Auxin metabolism. *Physiologia Plantarum*: **100**: 431-442.

O

- Okamoto M., Vidmar J.J., Glass A.D.M.** (2003). Regulation of *NRT1* and *NRT2* gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. *Plant and Cell Physiology*: **44(30)**: 304-317.

- Oparka K.J., Prior D.A.M.** (1992). Direct evidence for pressure-generated closure of plasmodesmata. *Plant Journal*: **2**: 741-750.
- Orsel M., Krapp A., Daniel-Vedele F.** (2002). Analysis of the *NRT2* nitrate transporter family in *Arabidopsis*. Structure and gene expression. *Plant Physiology*: **129**: 886-896.
- Orsel M., Eulenburg K., Krapp A., Daniel-Vedele F.** (2004). Disruption of the nitrate transporter gene *AtNRT2.1* and *AtNRT2.2* restricts growth at low external concentration. *Planta*: **219**: 714-721.
- Orsel M., Chopin F., Leleu O., Smith S.J., Daniel-Vedele F., Miller A.** (2007). Nitrate signaling and the two component high affinity uptake system in *Arabidopsis*. *Plant Signalling and Behavior*: **2(4)**: 260-262.
- Ortega-Martinez O., Pernas M., Carol R.J., Dolan L.** (2007). Ethylene modulates stem cell division in the *Arabidopsis thaliana* root. *Science*: **317**: 507-510.

P

- Pace G. M., Macclure P. R.** (1986). Comparison of nitrate uptake kinetic parameters across maize inbred lines. *Journal of Plant Nutrition*: **9**: 1095-1011.
- Palmgren M.G.** (2001). Plant plasma membrane H⁺-ATPases powerhouses for nutrient uptake. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*: **52**:817-845.
- Passioura J.B.** (1988). Root signals control leaf expansion in wheat seedlings growing in drying soil. *Australian Journal of Plant Physiology*: **15**: 687-693.
- Peiser G.D., Wang T.T., Hoffman N.E., Yang S.F., Liu H.W., Walsh C.T.** (1984). Formation of cyanide from carbon 1 of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid during its conversion to ethylene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*: **81**: 3059-3063.
- Péret B., De Rybel B., Casimiro I., Benkova E., Swarup R., Laplace L., Beechman T., Bennett M.J.** (2009). *Arabidopsis* lateral root development : an emerging story. *Trends in Plant Science*: **14**: 399-408.
- Perez-Torres C-A, Lopez-Bucio J, Cruz-Ramirez A, Ibarra-Laclette E, Dharmasiri S, Estelle M and Herera-Estrella L.** (2008). Phosphate availability alters lateral root development in *Arabidopsis* by modulating Auxin sensitivity via a mechanism involving the TIR1 auxin receptor. *Plant Cell* : 1-15.
- Perrot-Rechenmann C.** (2012). Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*: 1-15.
- Peyrano G., Taleisnik E., Quiroga M., de Forchetti S.M., Tigier H.** (1997). Salinity effects on hydraulic conductance, lignin content and peroxidase activity in tomato roots. *Plant Physiology and Biochemistry*: **35**: 387-393.
- Pierik R., Tholen D., Pooter H., Visser E.J.W., Voesenek A.C.J.** (2006). The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends in Plant Science*: **11**: 176-183.
- Pitts R.J., Cernac A., Estelle M.** (1998). Auxin and ethylene promote root hair elongation in *Arabidopsis*. *Plant Journal*: **16**: 553-560.
- Piotrowski M.** (2008). Primary or secondary? Versatile nitrilases in plant metabolism. *Phytochemistry*: **69** : 2655-2667.
- Pirrung MC.** (1985). Ethylene biosynthesis. 3. Evidence concerning the fate of C1-N1 of 1-aminocyclopropane carboxylic acid. *Bioorgan. Chem.*: **13**: 219-226
- Proseus T.E., Ortega J.K.E., Boyer J.S.** (1999). Separating growth from elastic deformation during cell enlargement. *Plant Physiology*: **119**: 775-784.
- Proseus T.E., Zhu G.L., Boyer J.S.** (2000). Turgor, temperature and the growth of plant cells: using *Characarollina* as a model system. *Journal of Experimental Botany*: **51(350)**: 1481-1494.

Q

Qi Z., Stephens N.R., Spalding E.P. (2006). Calcium entry mediated by GLR3.3, an *Arabidopsis* glutamate receptor with a broad agonist profile. *Plant Physiology*: **142**: 963–971.

R

Radin J.W. (1990). Responses of transpiration and hydraulic conductance to root temperature in nitrogen- and phosphorus-deficient cotton seedlings. *Plant Physiology*: **92**: 855-857.

Radin, J.W. (1983). Physiological consequences of cellular water deficits: Osmotic adjustment. In: Limitation to Efficient Water Use in Crop Production, Taylor, H.M., Jordan, W.R. et Sinclair, J.R. (éds). *American Society of Agronomy*, Madison, WI, pp. 267-276.

Radin J.W., Ackerson R.C. (1981). Water relation of cotton plants under nitrogen deficiency. III. Stomatal conductance, photosynthesis, and abscissic acid accumulation during drought. *Plant Physiology*: **67**: 115-119.

Radin, J.W. & Boyer, J.S. (1982). Control of leaf expansion by nitrogen nutrition in sunflower plants: role of hydraulic conductivity and turgor. *Plant Physiology*: **69**: 771-775.

Radin J.W., Eidenbock M.P. (1984). Hydraulic conductance as a factor limiting leaf expansion of phosphorus-deficient cotton seedlings. *Plant Physiology*: **75**: 372-377.

Radin J.W., Matthews M.A. (1989). Water transport properties of cortical cells in roots of nitrogen- and phosphorus-deficient cotton seedlings. *Plant Physiology*: **89**: 264-268.

Rando R.R. (1974). Irreversible inhibition of aspartate aminotransferase by 2-amino-3-butenoic acid. *Biochemistry*: **13**: 3859–3863.

Rayle D.L., Cleland R.E. (1970). Enhancement of wall loosening and elongation by acid solutions. *Plant Physiology*: **46**: 250–253.

Rayle D.L., Cleland R.E. (1992). The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*: **99**: 1271–1274.

Reed R.C., Brady S.R., Muday G.K. (1998). Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*: **118**: 1369-1378.

Remans T., Nacry P., Pervent M., Girin T., Tillard P., Lepetit M., Gojon A. (2006a). A central role for the nitrate transporter NRT2.1 in the integrated morphological and physiological responses of the root system to nitrogen limitation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*: **140**: 909-921.

Remans T., Nacry P., Pervent M., Filleur S., Diatloff E., Mounier E., Tillard P., Forde B.G., Gojon A. (2006b). The *Arabidopsis* NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patch. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*: **103**: 19206-19211.

Renault H., Roussel V., El Amrani A., Arzel M., Renault D., Bouchereau A., Deleu C. (2010). The *Arabidopsis* pop2-1 mutant reveals the involvement of GABA transaminase in salt stress tolerance. *BMC Plant Biology*: 10-20.

Ringli C., Baumberger N., Keller B. (2005). The *Arabidopsis* root hair mutants *der2-9* are affected at different stages of root hair development. *Plant and Cell Physiology*: **46**: 1046–1053.

Roberts I.N., Lloyd C.W., Roberts K. (1985). Ethylene-induced microtubule reorientations: mediation by helical arrays. *Planta*: **164**: 439–447.

Robinson D., Linehan D.J., Gordon D.C. (1994). Capture of nitrate from soil by wheat in relation to root length, nitrogen in soil and availability. *New Phytologist*: **128**: 297-305.

Robinson D. (1996). Variation, co-ordination and compensation in root systems in relation to soil variability. *Plant and Soil*: **187**: 57-66.

Rodriguez-Pousada R.A., Rycke R.D., Dedonder A., Van Caeneghem W., Engler G., Van Montagu M., Van Der Straeten D. (1993). The *Arabidopsis* 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene 1 is expressed during early development. *Plant Cell*: **8**: 897–911.

- Rubio-Teixeira M., Van Zeebroeck G., Voordeckers K., Thevelein J.M.** (2010). Saccharomyces cerevisiae plasma membrane nutrient sensors and their role in PKA signaling. *FEMS Yeast Research*: **10(2)**: 134-49.
- Rüdinger M., Hallgren S.W., Steudle E., Schulze E.D.** (1994). Hydraulic and osmotic properties of spruce roots. *Journal of Experimental Botany*: **45**:1413–1425.
- Ruzicka K., Ljung K., Vanneste S., Podhorska R., Beeckman T., Frimi J. Benkova E.** (2007). Ethylene regulates root growth through effect on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *Plant Cell*: **19**: 2197-2212.
- Rygol J., JPritchard J., Zhu J.J, Tomos A. D., Zimmermann U.** (1993). Transpiration Induces Radial Turgor Pressure Cradients in Wheat and Maize Roots. *Plant Physiology*: **103**: 493-500.

S

- Sanchez-Fernandez R., Fricker M., Corben L.B., White N.S., Sheard N., Leaver C.J., Van Montagu M., Inze' D., May M.J.** (1997). Cell proliferation and hair tip growth in the *Arabidopsis* root are under mechanistically different forms of redox control. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*: **94**: 2745–2750.
- Satoh S., Esashi Y.** (1982). Effect of α -aminoisobutyric acid and D- and L-amino acids on ethylene production and content of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in cotyledonary segments of cocklebur seeds. *Physiologia Plantarum*: **54**: 147–152.
- Satoh S., Yang S.F.** (1989). Inactivation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylatesynthase by L-vinylglycine as related to the mechanism-based inactivation of the enzyme by S-adenosyl-L-methionine. *Plant Physiology*: **91**: 1036–1039.
- Sakakibara H.** (2003). Nitrate-specific and cytokinin-mediated nitrogen signaling pathways in plants. *Journal of Plant Research*: **116**: 253-257.
- Sakakibara H., Takei K., Hirose N.** (2006). Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development. *Trends in Plant Science*: **11**: 440-448.
- Scheible W., Lauerer M., Schulze E., Caboche M., Stitt M.** (1997a). Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *Plant Journal*: **11(4)**: 671-691.
- Scheible W., Lauerer M., Schulze E., Caboche M., Stitt M.** (1997b). Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *Plant Cell*: **9**: 783-798.
- Schieble W.R., Morcuende R., Czechowski T., Fritz C., Osuna D., Palacios-Rojas N., Schindelasch D., Thimm O., Udvardi M., Stitt M.** (2004). Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiology*: **136**: 2483-2499.
- Schiefelbein J.W., Masucci J.D., Wang H.** (1997). Building a root: The control of patterning and morphogenesis during root development. *The Plant Cell*: **9**:1089-1098.
- Schiefelbein J.W.** (2000). Constructing a plant cell. The genetic control of root hair development. *Plant Physiology*: **124**: 1525–1531.
- Schiefelbein J.W.** (1994). Cell fate and cell morphogenesis in higher plants. *Current Opinion in Genetics and Development*: **4(5)**: 647-651.
- Scheres B., Wolkenfelt H., Willemsen V., Terlouw M., Lawson E., Dean C., Weisbeek P.** (1994). Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development*: **120**: 2475-2487.
- Schneider H., Wistuba1 N., Miller B., Gepner P., Thürmer F., Melcher P., Meinzer F. and Zimmermann U.** (1997). Diurnal variation in the radial reflection coefficient of intact maize roots determined with the xylem pressure probe. *Journal of Experimental Botany*: **48(317)** : 2045-2053.
- Segonzac C., Boyer J.C., Ipotesi E., Szponarski W., Tillard P., Touraine B., Sommerer N., Rossignol M., Gibrat R.** (2011). Nitrate Efflux at the Root Plasma Membrane: Identification of an *Arabidopsis* Excretion Transporter. *Plant Cell*: **19**: 3760–3777.

- Shi H., Zhu J.K.** (2002). SOS4, a pyridoxal kinase gene, is required for root hair development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*: **129**: 585–593.
- Siddiqi M.Y., Glass A.D., Ruth T.J., Fernando M.** (1989). Studies of the Regulation of Nitrate Influx by Barley Seedlings Using NO₃. *Plant Physiology*: **90**(3): 806–813.
- Siddiqi M.Y., Glass A.D.M., Ruth T.J., Rufty T.W.** (1990). Studies of the uptake of nitrate in Barley: I. Kinetics of ¹³NO₃⁻ influx. *Plant Physiology*: **93**:1426-1432.
- Siddiqi M.Y., King B.J., Glass A.D.** (1992). Effects of nitrite, chlorate, and chlorite on nitrate uptake and nitrate reductase activity. *Plant Physiology*: **100**(2): 644-50.
- Sivaguru M., Pike S., Gassmann W., Baskin T.I.** (2003). Aluminum rapidly depolymerizes cortical microtubules and depolarizes the plasma membrane: evidence that these responses are mediated by a glutamate receptor. *Plant and Cell Physiology*: **44**: 667–675.
- Slatyer R.O., Taylor S.A.** (1960). Terminology in plant and soil water relations. *Nature*: **187**: 922-924.
- Smalle J., Van Der Straeten D.** (1997). Ethylene and vegetative development. *Physiologia Plantarum*: **100**: 595–605.
- Soeno K, Goda H, Ishii T, Ogura T, Tachikawa T, Sasaki E, Yoshida S, Fujioka S, Asali T, Shimada Y.** (2010). Auxin biosynthesis inhibitors, identified by a genomics-based approach, provide insights into auxin biosynthesis. *Plant Cell and Physiology*: **51**(4): 524-536.
- Sokal R.R., Rohlf F.J.** (2003). Biometry, Ed 3. Freeman, New York.
- Soper T.S., Manning J.M.** (1982). Inactivation of pyridoxal phosphate enzymes by gabaculine. *Journal of Biological Chemistry*: **257**: 13930-6.
- Staal M, de Cnodder T, Simon D, Vandenbussche F, Van Der Straeten D, Verbelen JP, Elzenga T, Vissenberg K.** (2011). Apoplastic alkalisation is instrumental for the inhibition of cell elongation in the *Arabidopsis* root by the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Plant Physiology*: **155**: 2049-2055.
- Staswick P.E.** (2009). The tryptophan conjugates of jasmonic and indole-3-acetic acids are endogenous auxin inhibitors. *Plant Physiology*: **150**: 1310–1321.
- Staswick P.E., Tiryaki I., Rowe M.L.** (2002). Jasmonate response locus JAR1 and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell*: **14**:1405–1415.
- Staswick P.E., Serban B., Rowe M., Tiryaki I., Maldonado M.T., Maldonado M.C., Suza W.** (2005). Characterization of an *Arabidopsis* enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell*: **17**(2): 616-627.
- Stepanova A.N., Hoyt J.M., Hamilton A.A., Alonso J.M.** (2005). A link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis*. *Plant Cell*: **17**: 2230-2242.
- Steudle E.** (1994a). The regulation of plant water at the cell, tissue, and organ level: role of active processes and of compartmentation. In: Schulze E-D (ed) Flux control in biological systems: from the enzyme to the population and ecosystem level. *Academic Press: San Diego*: 237-299.
- Steudle E.** (1994b). Water transport across roots. *Plant and Soil*: **167**: 79-90.
- Steudle E.** (1997). Water transport across plant tissue: role of water channels. *Biology of the Cell*: **89**: 259–273.
- Steudle E.** (2000 a). Water uptake by plant roots: an integration of views. *Plant and Soil*: **226**: 45-56.
- Steudle E.** (2000b). Water uptake by plant roots: effect of water deficit. *Journal of Experimental Botany*: **51**(350): 1531-1542.
- Steudle E., Oren R., Schulze E-D.** (1987). Water transport in maize roots: measurements of hydraulic conductivity, solute permeability, and of reflection coefficients of excised roots using the root pressure probe. *Plant Physiology*: **84**: 1220-1232.
- Steudle E., Meshcheryakov A.B.** (1996). Hydraulic and osmotic properties of oak roots. *Journal of Experimental Botany*: **47**(296): 387-401.
- Steudle E., Heydt H.** (1997). Water transport across tree roots. In *Trees—Contributions to Modern Tree Physiology* (eds H. Rennenberg, W. Eschrich H. Ziegler). Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands. 239–255.

- Steudle E., Peterson C.A.** (1998). How does water get through the roots. *Journal of Experimental Botany*: **49**: 775-788.
- Steudle E., Zimmerman U.** (1977). Effect of turgor pressure and cell size on the wall elasticity of plant cells. *Plant Physiology*: **59(2)**: 285-289.
- Stitt M., Feil R.** (1999). Lateral root frequency decreases when nitrate accumulates in tobacco transformants with low reductase activity: consequences for the regulation of biomass partitioning between shoots and root. *Plant and Soil*: **215**: 143-153.
- Stitt, M. et Scheible, W.-R.** (1998). Understanding Allocation to Shoot and Root Growth Will Require Molecular Information About Which Compounds Act as Signals for the Plant Nutrient Status, and How Meristem Activity and Cellular Growth Are Regulated – Opinion. *Plant and Soil*: **201**: 259-263.
- Stitt M., Muller C., Matt P. Gibon Y., Carillo P., Morcuende R., Scheible W.R., Krapp A.** (2002). Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *Journal of Experimental Botany*: **53**: 959–970.
- Stoynova-Barkalova E., Petrov P.** (2002). Cell division and cell enlargement in isolated *Curcubita* cotyledons grown in darkness and in light. *Journal of Plant Research*: **115**: 375-380.
- Stoynova-Barkalova E., Petrov P.** (2006). Control by cytokinins of the cellular behavior in the plate meristem of zucchini cotyledons. *Planta*: **223**: 1256-1262.
- Swarup R., Perry P., Hagenbeek D., Van Der Straeten D., Beemster G.T.S., Saandberg G., Bhalerao R., Ljung K., Bennett M.J.** (2007). Ethylene upregulates auxin biosynthesis in *Arabidopsis* seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. *Plant Cell*: **19**: 2186-2196.

T

- Takahashi H., Kawahara A., Yasunori I.** (2003). Ethylene promotes the induction by auxin of the cortical microtubule randomisation required for low-pH-induced root hair initiation in lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedlings. *Plant and Cell Physiology*: **44**: 932–940.
- Tanaka Y., Sano T., Tamaoki M., Nakajima N., Kondo N., Hasezawa S.** (2005). Ethylene inhibits abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*: **138**: 2337-43.
- Tanaka Y., Sano T., Tamaoki M., Nakajima N., Kondo N., Hasezawa S.** (2006). Cytokinin and auxin inhibit abscisic acid-induced stomatal closure by enhancing ethylene production in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*: **57**: 2259-66.
- Tanimoto M., Roberts K., Dolan L.** (1995). Ethylene is a positive regulator of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*: **8**: 943-8.
- Tanner W., Beevers H.** (1990). Does transpiration have an essential function in long-distance ion transport in plants? *Plant Cell and Environment*: **13**: 745-750.
- Tanner W., Beevers H.** (2001). Transpiration, a prerequisite for long-distance transport of minerals in plants? *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*: **98(16)**: 9443-9447.
- Tardieu F., Parent B., Simonneau T.** (2010). Control of leaf growth by abscisic acid: hydraulic or non-hydraulic processes? *Plant Cell and Environment*: **33(4)**: 636–647.
- Tarun A.S., Lee J.S., Theologis A.** (1998). Random mutagenesis of 1-aminocyclopropane-1-carboxyalte synthase: a key enzyme in ethylene biosynthesis. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*: **95**: 9796-9801.
- Taylor A.R., Bloom A.J.** (1998). Ammonium, nitrate, and proton fluxes along the maize root. *Plant, Cell and Environment*: **21**: 1255-1263.
- Thain S.C., Vandenbussche F., Laarhoven L.J.J., Dowson-Day M.J., Wang Z.Y., Tobin E.M., Harren F.J.M., Millar A.J., Van Der Straeten D.** (2004). Circadian rhythms of ethylene emission in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*: **136**: 3751–3761.
- Thellier M.** (1970). An electrokinetic interpretation of the functioning of biological systems and its application to the study of mineral salts absorption. *Annals of Botany*: **34**: 983-1009.

- Thellier M.** (1971). Electronkinetic formulation of ionic absorption by plants samples. In *WP Anderson eds, Ions transport in plants, Academic Press, London and New York*: 47-63.
- Tholen D., Pons T.L., Voesenek L.A.C.J., Poorter H.** (2007). Ethylene insensitivity results in down regulation of rubisco expression and photosynthetic capacity in tobacco. *Plant Physiology*: **144**:1305-1315.
- Tian C. E., Muto H., Higuchi K., Matamura T., Tatematsu K., Koshiba T.** (2004). Disruption and overexpression of auxin response factor 8 gene of *Arabidopsis* affect hypo- cotyl elongation and root growth habit, indicating its possible involvement in auxin homeostasis in light condition. *Plant Journal*: **40**:333–343.
- Tian Q., Chen F., Liu J., Zhang F., Mi G.** (2008). Inhibition of maize root growth by high nitrate supply is correlated to reduced IAA levels in roots. *Journal of Plant Physiology*: **165**: 942-951.
- Tian Q.Y., Sun P., Zhang W.H.** (2009). Ethylene is involved in nitrate-dependent root growth and branching in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*: **184**: 918-931.
- Tinker P.B., Nye P.H.** (2000). Solute movement in the rhizosphere. *Oxford University Press, Oxford*.
- Titiz O., Tambasco-Studart M., Warzych E., Apel K., Amrhein N., Laloi C., Fitzpatrick T.B.** (2006). PDX1 is essential for vitamin B6 biosynthesis, development and stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Journal*: **48**: 933–946.
- Toroser D., Athwal G.S., Huber S.C.** (1998). Site-specific regulatory interaction between spinach leaf sucrose-phosphate synthase and 14-3-3 proteins. *FEBS Letter*: **435(1)**:110-114.
- Torii K., Laties G.G.** (1966). Dual mechanisms of ion uptake in relation to vacuolation in corn roots. *Plant Physiology*: **41(5)**: 863-870.
- Touraine B., Daniel-Vedele F., Forde B.** (2001). Nitrate uptake and its regulation. In *PJ Lea, JF Morot-Gaudry, eds, Plant Nitrogen. Springer-Verlag, Berlin*: 1–37.
- Triplett E.W., Barnett N.M., Blevins D.G.** (1980). Organic Acids and Ionic Balance in Xylem Exudate of Wheat during Nitrate or Sulfate Absorption. *Plant Physiology*: **65(4)**: 610-613.
- Tromas A., Perrot-Rechenmann C.** (2010). Recent progress in auxin biology. *Compte Rendu. Biologies*: **333**: 297–306
- Trueman L.J., Richardson A., Forde B.G.** (1996). Molecular cloning of higher plant homologues of the high-affinity nitrate transporters of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Aspergillus nidulans*. *Gene*: **175**: 223-231.
- Tsay Y.F., Schroeder J.I., Feldmann K.A., Crawford N.M.** (1993). The herbicide sensitivity gene CHL1 of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell*: **72**: 705-713.
- Tsay Y.F., Chiu C.C., Tsai C.B., Ho C.H., Hsu P.K.** (2007). Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Letters*: **581**: 2290-2300.
- Tsuchisaka A., Theologis A.** (2004). Unique and Overlapping Expression Patterns among the *Arabidopsis* 1-Amino-Cyclopropane-1-Carboxylate Synthase Gene Family Members. *Plant Physiology*: **136(2)**: 2982-3000.

U

- Unkless S.E., Hawker K.L., Grieve C., Campbell E.I., Montague P., Kinghorn J.R.** (1991). *crnA* encodes a nitrate transporter in *Aspergillus nidulans*. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*: **88**: 204-208.
- Unkless S.E., Hawker K.L., Grieve C., Campbell E.I., Montague P. & Kinghorn J.R.** (1995). *crnA* encodes a nitrate transporter in *Aspergillus nidulans*. (correction). *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*: **92**: 3076.

V

- Van der Honert T.H.** (1948). Water transport in plants as a catenary process. *Discussions of the Faraday Society*: **3**: 146-153.
- Van der Leij M., Smith S.J., Miller A.J.** (1998). Remobilisation of vacuolar stored nitrate in barley root cells. *Planta*: **205(1)**: 64-72.
- Van Ieperen W., Madery H.** (1993). A new method to measure plant water uptake and transpiration simultaneously. *Journal of Experimental Botany*: **45(270)**: 51-60.
- Verbelen J.P., De Cnodder T., Le J., Vissenberg K., Baluska F.** (2006). The root apex of *Arabidopsis thaliana* consists of four distinct zones of growth activities: meristematic zone, transition zone, elongation zone and growth terminating zone. *Plant Signaling and Behavior*: **1**: 296-304.
- Vernoux T., Wilson R.C., Seeley K.A., Reichheld J.P., Muroy S., Brown S., Maughan S.C., Cobbett C.S., Van Montagu M., Inze D.** (2000). The root meristemless1/cadmium sensitive2 gene defines a glutathione dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *Plant Cell*: **12**: 97-109.
- Vidal E.A., Tamayo K.P., Gutierrez R.A.** (2010). Gene networks for nitrogen sensing, signaling, and response in *Arabidopsis thaliana*. *Reviews Systems Biology and Medicine*: **2(6)**: 683-93.
- Vidmar J.J., Zhuo D., Siddiqi M.Y., Schjoerring J.K., Touraine B., Glass A.D.M.** (2000). Regulation of high-affinity nitrate transporter genes and high-affinity nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley. *Plant Physiology*: **123**: 307-318.

W

- Wagner S., Bernhardt A., Leuendorf J.E., Drewke C., Lytovchenko A., Mujahed N., Gurgui C., Frommer W.B., Leistner E., Fernie A.R.** (2006). Analysis of the *Arabidopsis* rsr4-1/pdx1-3 mutant reveals the critical function of PDX1 protein family in metabolism, development and vitamin B6 biosynthesis. *Plant Cell*: **18**: 1722-1735.
- Walch-Liu P., Liu L.H., Remans T., Tester M., Forde B.J.** (2006). Evidence that L-glutamate can act as an exogenous signal to modulate root growth and branching in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*: **47**: 1045-1757.
- Walch-Liu P., Forde B.J.** (2008). Nitrate signaling mediated by NRT1.1 nitrate transporter antagonizes L-glutamate-induced changes in root architecture. *Plant Journal*: **54**: 820-828.
- Walker D.J., Smith S.J., Miller A.J.** (1995). Simultaneous measurement of intracellular pH and K^+ or NO_3^- in barley root cells using triple-barreled, ion-selective microelectrodes. *Plant Physiology*: **108**: 743-751.
- Wang G., Li C., Zhang F.** (2003). Effects of different nitrogen forms and combination with foliar spraying with 6-benzylaminopurine on growth, transpiration, and water and potassium uptake and flow in tobacco. *Plant and Soil*: **256**: 169-178.
- Wang K.L.C., Li H., Ecker J.R.** (2002). Ethylene biosynthesis and signalling networks. *Plant Cell*: **14(suppl)**: S131-151.
- Wang R., Liu D., Crawford N.M.** (1998). The *Arabidopsis* CHL1 protein plays a major role in high-affinity nitrate uptake. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*: **95**: 15134-15139.
- Wang R., Guegler K., LaBrie S.T., Crawford N.M.** (2000). Genomic analysis of a nutrient in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. *Plant Cell*: **12**: 1491-1509.
- Wang R., Tischner R., Rodrigo A.G., Hoffman M., Xing X., Chen M., Coruzzi G., Crawford N.M.** (2004). Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*: **136**: 1-11.
- Wang H., Tian C.E., Duan J., Wu K.** (2008). Research progresses on GH3s, one family of primary auxin-responsive genes. *Plant Growth Regulation*: **56**: 225-232.
- Wang R., Xing X., Wang Y., Tran A., Crawford N.M.** (2009). A genetic screen for nitrate regulatory mutants captures the nitrate transporter gene NRT1.1. *Plant Physiology*: **151**: 472-478.

- Wang Y.H., Garvin D.F., Kochian L.V.** (2001). Nitrate-induced genes in tomato roots : array analysis reveals novel genes that may play a role in nitrogen nutrition. *Plant Physiology*: **127**: 345-359.
- Wegner L.H., Zimmermann U.** (2009). Hydraulic conductance and K⁺ transport into the xylem depend on radial volume flow, rather than on xylem pressure, in roots of intact, transpiring maize seedlings. *New Phytologist*: **181**: 361-373.
- Werck-Reichhart D., Jones O.T.G., Durst F.** (1988). Haem synthesis during cytochrome P-450 induction in higher plants. *Biochemical Journal*: **249**: 473-80.
- Wilkinson S.** (2008). Manipulation of the apoplastic pH of the intact plants mimics stomatal and growth responses to water availability and microclimatic variation. *Journal of experimental botany*: **59(3)**: 619-631.
- Wilkinson S., Davies W.J.** (2002). ABA-based chemical signaling: the co-ordination of response to stress in plants. *Plant, Cell and environment*: **25**: 195-210.
- Wirth J., Chopin F., Santoni V., Viennois G., Tillard P., Krapp A., Lejay L., Daniele-Vedele F., Gojon A.** (2007). Regulation of root nitrate uptake at the NRT2.1 protein level in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* : **282**: 23541–23552.
- Wu G., Lewis D.R., Spalding E.P.** (2007). Mutations in *Arabidopsis* multidrug resistance-like ABC transporters separate the role of acropetal and basipetal auxin transport in lateral root development. *Plant Cell*: **19**: 1826-37.

Y

- Yan M., Fan X., Feng H., Millet A.J., Shen Q., Xu G.** (2011). Rice OsNar2.1 interacts with OsNRT2.1, OsNRT2.2 and OsNRT2.3a as nitrate transporters to provide uptake over high and low concentrations ranges. *Plant Cell and Environment*: **34**: 1360-1372.
- Yang Y., Hammes U.Z., Taylor C.G., Schachtman D.P., Nielsen E.** (2006). High-affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein. *Current Biology*: **16**: 1123–1127.
- Yang J.H., Han S.J., Yoon E.K., Lee W.S.** (2006). Evidence of an auxin signal pathway, microRNA167-ARF8-GH3, and its response to exogenous auxin in cultured rice cells. *Nucleic Acids Research*: **34**: 1892–1899.
- Yazdanbakhsh N., Sulpice R., Graf A., Stitt M., Fisahn J.** (2011). Circadian control of root elongation and C partitioning in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell and Environment*: **34**: 877-894.
- Young B.A., Sherwood R.T., Bashaw E.C.** (1979). Cleared-pistil and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in Grasses. *Canadian Journal of Botany*: **57**: 1668-1672.
- Yu X.Z. and Zhang F.Z.** (2012). Activities of nitrate reductase and glutamine synthetase in rice seedlings during cyanide metabolism. *Journal of Hazardous Materials*: **225–226** : 190–194.

Z

- Zhang H., Forde B.G.** (1998). An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science*: **279**: 407-409.
- Zhang H. and Forde B.G.** (2000). Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *Journal of Experimental Botany*: **51(352)**: 51-59.
- Zhang H., Jennings A., Barlow P.W., Forde B.G.** (1999). Dual pathway for regulation of root branching by nitrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*: **96**: 6529-6534.
- Zhang H., Rong H., Pilbeam D.** (2007). Signalling mechanisms underlying the morphological responses of root system to nitrogen in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*: **58**: 2329–2338.

- Zhang Z., Li Q., Li Z., Staswick P.E., Wang M., Zhu Y.** (2007). Dual regulation role of GH35 in salicylic acid and auxin signaling during *Arabidopsis*-*Pseudomonas syringae* interaction. *Plant Physiology*: **145**:450–464.
- Zhen R.G., Koyro H.W., Leigh R.A., Tomos A.D., Miller A.J.** (1991). Compartmental nitrate concentrations in barley root cells measured with nitrate-selective microelectrodes and by single-cell sap sampling. *Planta*:**185**: 356-361.
- Zhou J.J., Fernandez E., Galvan A., Miller A.J.** (2000). A high affinity nitrate transport system from *Chlamydomonas* requires two gene products. *FEBS Letters*: **466**: 225-227.
- Zhou J.J., Theodoulou F.L., Muldin I., Ingemarsson B., Miller A.J.** (1998). Cloning and functional characterization of a *Brassica napus* transporter which is able to transport nitrate and histidine. *Journal of Biological Chemistry*: **273**: 12017-12033.
- Zhu G.L., Boyer J.S.** (1992). Enlargement in *Chara* studied with a turgor clamp. Growth rate is not determined by turgor. *Plant Physiology*: **100**: 2071-2080.
- Zhuo D., Okamoto M., Vidmar J.J., Glass A.D.M.** (1999). Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (*Nrt2;1At*) in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*:**17**: 563-568.
- Zimmermann U., Steudle E.** (1978). Physical aspect of water relations of plant cells. *Advances in Botanical Research*: **6**: 45-117.

Références électroniques :

www.oilworld.biz
www.coceral.com
<http://www.agreste.agriculture.gouv.fr>
ONIGC : <http://www.franceagrimer.fr/>

VII. ANNEXE

Article Addendum

Ethylene modifies architecture of root system in response to stomatal opening and water allocation changes between root and shoot

Beauclair Patrick,¹ Leblanc Antonin,¹ Lemauviel-Lavenant Servane,¹ Carole Deleu² and Erwan Le Deunff^{1,*}

¹INRA; UMR 950; Laboratoire d'Écophysiologie Végétale; Agronomie & Nutrition N,C,S; Caen France; ²INRA; UMR 118; Laboratoire d'Amélioration des Plantes et Biotechnologies Végétales; Rennes France

Key words: ethylene, root architecture, root and shoot growth, nitrate, water relations, stomatal conductance

Ethylene plays a key role in the elongation of exploratory and root hair systems in plants, as demonstrated by pharmacological modulation of the activity of ethylene biosynthesis enzymes: ACC synthase (ACS) and ACC oxidase (ACO). Thus, treatments with high concentrations (10 μ M) of aminoethoxyvinylglycine (AVG, inhibitor of ACS) and 1-aminocyclopropane carboxylic acid (ACC, ethylene precursor, ACO activator) severely decrease the elongation of the exploratory root system but induce opposite effects on the root hair system: root hair length and numbers were increased in seedlings treated with ACC, whereas they were reduced in seedlings treated with AVG. Until now, such elongation changes of root architecture had not been questioned in terms of nitrate uptake. In the march issue of *Plant Physiology* we report that N uptake and nitrate transporter *BnNrt2.1* transcript level were markedly reduced in ACC treated seedlings, but were increased in AVG treated seedlings compared to the control.¹ Because recent studies have revealed that ethylene can also modulate stomatal opening as well as root hair cell elongation, we have examined whether pharmacological modulation of ethylene biosynthesis could affect, in an integrated manner, and at a whole-plant level, the exploratory and root hair systems, through changes of stomatal conductance and water allocation between the root and shoot.

The implication of ethylene in the elongation of exploratory and root hair systems has been recognized for a long time.^{2,3} Recent papers in *Arabidopsis* focusing on ethylene signaling during root development, have underlined the importance of ethylene-auxin interactions during primary root cell elongation.⁴⁻⁷ However while

these elegant molecular models of acropetal and basipetal movements of auxin induced by ethylene explain root elongation, they fail to integrate the role of the shoot and the involvement of water fluxes within a plant via stomatal closure regulation. Indeed, recent studies have shown that ethylene signaling is also involved in stomatal opening.⁸⁻¹⁰ Taken together, all of these studies raise the question: can integrated ethylene signaling from root hair to stomata at the whole-plant level controls water fluxes and auxin movements within the plant?^{11,12} In this context, our working hypothesis assumed that ethylene could affect, in an integrated manner, the functioning of epidermal root hair cells, as well as shoot epidermal stomatal guard cells, and could modify water fluxes and water allocation between the shoot and root. To test this hypothesis, we measured gas fluxes using a Li-COR[®] 6400 system (Inc., Lincoln, NE) and 1 centimeter *Arabidopsis* chamber (6400 s) on leaves of *Brassica napus* seedlings grown on agar plates in order to establish the relationship between changes in foliar conductance induced by different concentrations of ACC and AVG applied to the root, and the modifications of shoot area and root length in relation to water content.¹³

Changes in stomatal conductance in *Brassica napus* seedlings were examined on vertical agar plates under supplies of 1 mM and 10 mM nitrate but also under supply of 1 mM nitrate with low (1 μ M) or high (10 μ M) concentrations of the precursor (ACC) or inhibitor (AVG) of ethylene biosynthesis (Fig. 1A and B). The results showed that an increase of nitrate concentration induces stomatal opening. An identical effect is observed under the supply of 1 mM nitrate with high ACC concentration, whereas stomatal closure is favored with the supply of high AVG concentration compared to the control (1 mM nitrate, Fig. 1B).

This data demonstrates that at the whole-plant level, ethylene regulates stomatal opening, as already demonstrated in detached leaves of *Vicia faba* and *Arabidopsis*, by the use of ethylene biosynthesis inhibitors as well as ethylene mutants *eto1* (ethylene over producer).⁸⁻¹⁰ These results also confirm the effect of an increase in nitrate concentration on stomatal opening, even if the nature of the long distance signal responsible for this regulation is poorly understood.¹¹ The analogous effect of nitrate and ACC on stomatal opening raises questions about the relationship between N metabolism and ethylene. Indeed, recent papers have reported that nitrate and ACC treatments increase root hydraulic conductance, and that high nitrate concentration (>10 mM) enhances both ACC oxidase

*Correspondence to: Erwan Le Deunff; UMR INRA-UCBN 950; Laboratoire Ecophysiologie Végétale et Agronomie; Nutrition N, C et S; Université de Caen; Esplanade de la paix; 14032 Caen cédex France; Tel.: 02.31.56.53.74; Email: erwan.ledeunff@unicen.fr

Submitted: 10/24/08; Accepted: 10/27/08

Previously published online as a *Plant Signaling & Behavior* E-publication: <http://www.landesbioscience.com/journals/psb/article/7268>

Addendum to: Leblanc A, Renault H, Lecourt J, Etienne P, Deleu C, Le Deunff E. Elongation changes of exploratory and root hair systems induced by ACC and AVG affect nitrate uptake and the *BnNrt2.1* and *BnNrt1.1* transporters genes expression in *Brassica napus*. *Plant Physiol* 2008; 146:1928-40; PMID: 18287493; DOI: 10.1104/pp.107.109363.

activity and ACC content in roots, suggesting ethylene has a function in signaling in these responses.^{14,15}

Despite an increase of stomatal conductance, ACC treated seedlings showed an opposing effect on shoot area compared to nitrate treated plants (Fig. 1C). An increasing concentration of ACC drastically reduced shoot growth, whereas an increasing concentration of nitrate enhanced shoot growth (Fig. 1C). The ACC growth response has previously been explained by the photoinhibition observed after ACC treatment on the chlorophyll fluorescence yield (Fv/Fm) which reduces photosystem II activity and, as a consequence, the rate of photosynthesis.¹⁶ However, the dose-response changes of the shoot area of *Brassica napus* seedlings showed no effect on shoot water content, the shoot area being correlated with shoot water content for all the pharmacological treatments (Fig. 1D).

Similarly, although all the treatments reduced exploratory root length (Fig. 1E), the ACC and KNO₃ treatments induced an opposing effect on stomatal conductance to the AVG treatment (Fig. 1B). To interpret these paradoxical results, it is important to consider that high concentrations of AVG can inhibit the elongation of exploratory and root hair systems through both N metabolism and ethylene biosynthesis inhibition, as previously shown.¹ Indeed, a high degree of uncertainty about the targets and specificity of AVG treatment remains. AVG, in addition to ACC synthetase, can inhibit many aminotransferases closely related to the subgroup I of aminotransferases, using pyridoxal 5'-phosphate (PLP) as cofactor.^{17,18} This lack of AVG inhibition specificity was confirmed by UPLC analyses of root free amino acids (AA) levels in 1 mM KNO₃, 10 μM ACC and 10 μM AVG treated seedlings. Indeed, amino acids analyses showed that AVG treatment significantly increased major AA such as Glutamate, Glutamine, Aspartate and Asparagine compared to control and ACC treated seedlings. Despite ACC treatment-impaired plant growth (Fig. 1A, C and E) and C fixation, the treatment did not significantly modify N metabolism compared to the control seedlings, suggesting that the ACC treatment impaired mainly C metabolism rather than N metabolism (Table 1).^{16,19}

In consequence, it is reasonable to assume that the reductions of stomatal conductance and root elongation observed at high AVG concentrations are linked to the AVG inhibition on N metabolism

PLP-enzymes.¹ In addition, these results demonstrate that root hair proliferation in ACC treated plants is certainly a physiological response to the increase of stomatal opening (Fig. 1B) and the reduction of the elongation of primary and lateral roots (Fig. 1A).^{2,3,6} Indeed, without the possibility of increasing their shoot surface (Fig. 1C) and their exploratory root system (Fig. 1E) (due to the upregulation of root auxin biosynthesis), ACC treated seedlings can only increase their root hair absorption surface to compensate for a high transpiration rate. A similar mechanism of root surface compensation for water uptake has been provided by aquaporin PIP1B antisense plants in *Arabidopsis*.²⁰ In these plants, the whole exploratory root system is increased five fold without alteration of the shoot biomass

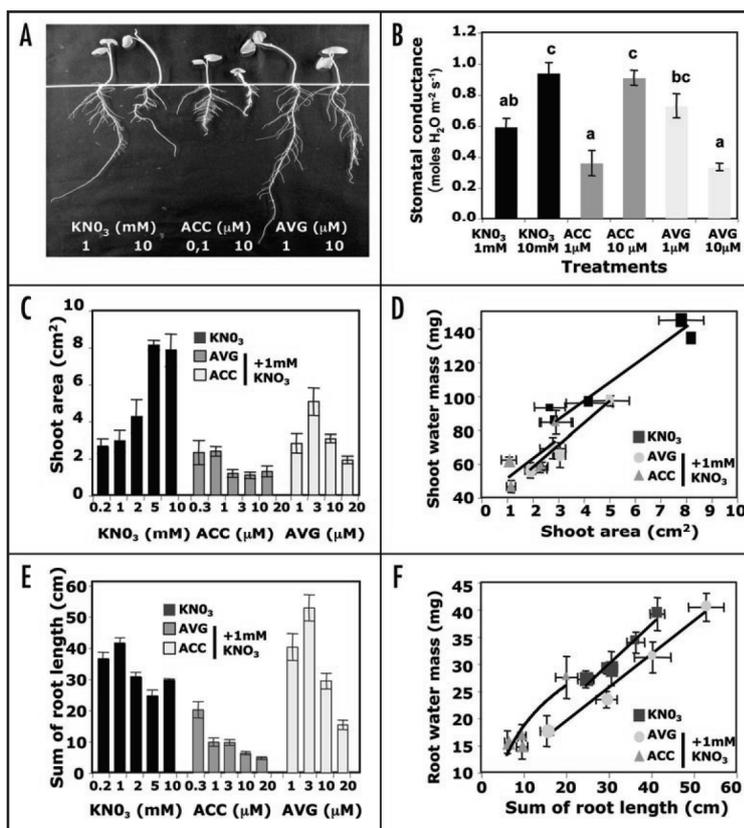


Figure 1. Physiological and morphological changes induced after ethylene biosynthesis modulation by ACC (from 0.3 to 20 μM) and AVG (from 1 to 20 μM) treatments. Effects of treatments on stomatal conductance (B), on root length and shoot area (C and E) and on the relationships between root water mass and root length and shoot water mass and shoot area (D and F). Seedlings were grown on agarose gel supply with the different concentrations treatment for 5 days after sowing. In (B) the mean ± se of 5–6 individual seedlings are reported, ANOVA and Tukey test were used to compare the effect of treatments ($F = 15.21$, $p < 0.001$). Probabilities of 0.05 or less were considered significantly different. In (D and F), the increasing concentration for each treatment is represented by the increase of symbols size. Vertical and horizontal bars indicate ± se for $N = 5-6$ seedlings when larger than the symbol.

Table 1 Changes in root amino acids concentration in seedlings treated with 10 μ M ACC and 10 μ M AVG in presence of 1 mM KNO₃ during 5 days

	Root amino acids					
	Glu	Gln	Asp (μ mol. mg ⁻¹ root DW)	Asn	Others AA	AA tot
Control 1 mM KNO ₃	7.92 \pm 0.34 ^a	3.67 \pm 0.22 ^a	4.24 \pm 0.26 ^b	0.85 \pm 0.05 ^a	27.35 \pm 1.23 ^a	44.02 \pm 1.15 ^a
10 μ M ACC + 1 mM KNO ₃	6.13 \pm 0.18 ^a	3.82 \pm 0.38 ^a	3.07 \pm 0.15 ^a	0.78 \pm 0.08 ^a	23.29 \pm 0.95 ^a	37.09 \pm 1.53 ^a
10 μ M AVG + 1 mM KNO ₃	13.54 \pm 0.89 ^b	7.26 \pm 0.78 ^b	6.92 \pm 0.33 ^c	1.21 \pm 0.09 ^b	35.81 \pm 2.06 ^b	64.75 \pm 3.27 ^b
F values	47.16	15.54	59.95	9.4	18.40	43.21
p-values	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.01	p < 0.001	p < 0.001

Amino acids were extracted and analyzed according to Jubault et al., (2008).²¹ Values presented are mean \pm se of four repetitions of a set of four individual seedlings. F values of Anovas were determined after assessment of normality (Ryan-Joiner test) and homogeneity of variances (Bartlett test). Values followed by different letters are significantly different from the control conditions by means of ANOVA and Tukey tests (p < 0.05).

compared to the control. In fact, in these transformants, auxin synthesis and its repartition along the root are certainly not affected by the transformation event. In consequence, water flux compensation is possible via an increase in the elongation of the exploratory root system, without modification of the root hair system as in the roots of ACC treated plants. This hypothesis is also confirmed by AVG treatment which increased, even at low concentrations, the stomatal conductance as well as the elongation of the exploratory root system (Fig. 1B and E).^{1,2}

Taken together, all of these results suggest that ethylene affects, in an integrated manner, the functioning of epidermal root hair cells as well as shoot epidermal stomatal guard cells. High ACC concentrations reduce exploratory root elongation and increase root hair length and number to allow water flux between the root and shoot. However, these results also raise questions about whether the metabolisms of ethylene and nitrogen could interact in root cells to modify exploratory and root hair systems in relation to stomatal response and water flux within seedlings.

References

- Leblanc A, Renault H, Lecourt J, Etienne P, Deleu C, Le Deunff E. Elongation changes of exploratory and root hair systems induced by ACC and AVG affect nitrate uptake and the *BnNrt2.1* and *BnNrt1.1* transporters genes expression in *Brassica napus*. *Plant Physiol* 2008; 146:1928-40.
- Masucci JD, Schiefelbein JW. The *rdh6* mutation of *Arabidopsis thaliana* alters root-hair initiation through an auxin- and ethylene-associated process. *Plant Physiol* 1994; 106:1335-46.
- Tanimoto M, Roberts K, Dolan L. Ethylene is a positive regulator of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 1995; 8:943-8.
- Wu G, Lewis DR, Spalding EP. Mutations in *Arabidopsis* multidrug resistance-like ABC transporters separate the role of acropetal and basipetal auxin transport in lateral root development. *Plant Cell* 2007; 19:1826-37.
- Ruzicka K, Ljung K, Vanneste S, Podhorska R, Beeckman T, Frimi J, Benkova E. Ethylene regulates root growth through effect on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *Plant Cell* 2007; 19:2197-212.
- Stepanova AN, Hoyt JM, Hamilton AA. A link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene insensitive mutants in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2007; 17:2230-42.
- Swarup R, Perry P, Hagenbeek D, Van Der Straeten D, Beeckman T, Sandberg G, Bhalerao R, Ljung K, Bennett MJ. Ethylene upregulates auxin biosynthesis in *Arabidopsis* seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. *Plant Cell* 2007; 19:2186-96.
- Tanaka Y, Sano T, Tamaoki M, Nakajima N, Kondo N, Hasezawa S. Ethylene inhibits abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2005; 138:2337-43.
- Tanaka Y, Sano T, Tamaoki M, Nakajima N, Kondo N, Hasezawa S. Cytokinin and auxin inhibit abscisic acid-induced stomatal closure by enhancing ethylene production in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 2006; 57:2259-66.
- Merritt F, Kemper A, Tallman G. Inhibitors of ethylene synthesis inhibit auxin-induced stomatal opening in epidermis detached from leaves of *Vicia faba* L. *Plant Cell Physiol* 2001; 42:223-30.
- Clarkson DT, Carvajal M, Henzler T, Waterhouse RN, Smyth AJ, Cooke DT, Steudle E. Root hydraulic conductance: diurnal aquaporin expression and the effects of nutrient stress. *J Exp Bot* 2000; 51:61-2.
- Brenner ED, Stahlberg R, Mancuso S, Vicanco J, Baluska F, Van Volkenburg E. Plant neurobiology: an integrated view of plant signaling. *Trends Plants Sci* 2006; 11:413-9.
- Beauclair P, Jacquet A. Manuel simplifié d'utilisation de l'analyseur de photosynthèse. Li-COR® 6400 system. Cahier Techniques INRA 2003; 49:43-59.
- Nandwal AS, Maan A, Kundu BS, Sheokand S, Kamboj DV, Sheoran A, Kumar B, Dutta D. Ethylene evolution and antioxidant defence mechanism in *Cicer arietinum* roots in the presence of nitrate and aminoethoxyvinylglycine. *Plant Physiol Biochem* 2000; 38:709-15.
- Kamaluddin M, Zwiasek JJ. Ethylene enhances water transport in hypoxic Aspen. *Plant Physiol* 2002; 128:1-8.
- Ahmed S, Nawata E, Sakuratani T. Changes of endogenous ABA and ACC, and their correlations to photosynthesis and water relations in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczak cv. KPS1) during waterlogging. *Env Exp Bot* 2006; 57:278-84.
- Werck-Reichhart D, Jones OTG, Durst F. Haem synthesis during cytochrome P-450 induction in higher plants. *Biochem J* 1988; 249:473-80.
- Soper TS, Manning JM. Inactivation of pyridoxal phosphate enzymes by gabaculine. *J Biol Chem* 1982; 257:13930-6.
- Tholen D, Pons TL, Voeselek LACJ, Poorter H. Ethylene insensitivity results in downregulation of rubisco expression and photosynthetic capacity in tobacco. *Plant Physiol* 2007; 144:1305-15.
- Kaldenhoff R, Grote K, Zhu JJ, Zimmermann U. Significance of plasmalemma aquaporins for water transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 1998; 14:121-8.
- Jubault M, Hamon C, Gravor A, Lariagon C, Delourme R, Bouchereau A, Manzanares-Dauleux MJ. Differential regulation of root Arginine catabolism and polyamine metabolism in clubroot-susceptible and partially resistant *Arabidopsis* genotypes. *Plant Physiol* 2008; 146:2008-19.

Apports des traitements pharmacologiques à l'étude des relations compensatoires structure-fonction (architecture racinaire-absorption de nitrate) sur la croissance de plantules de Colza d'hiver (*Brassica napus* L. cv. Capitol) en condition faiblement transpirante.

Aujourd'hui, les pressions exercées sur l'agriculture (accroissement de la demande, changement climatique, réduction des intrants azotés...) ainsi que le mauvais indice de récolte en azote (IRN) du Colza d'hiver, conduisent à améliorer l'efficacité d'usage de l'azote (EUA), notamment en condition limitante en azote. Cela peut passer par l'amélioration de la capacité de prélèvement de l'azote par les racines, qui dépend de la surface racinaire (structure) ainsi que du nombre et de l'activité des transporteurs de nitrate BnNRT1.1 et BnNRT2.1 (fonction).

Une approche pharmacologique permettant de moduler rapidement (minutes-heures) la fonction à l'aide d'apports en glutamate (inhibiteur du transporteur BnNRT2.1) et la structure racinaire, en modulant la synthèse de l'éthylène à l'aide de l'ACC (précurseur de l'éthylène) et de l'AIBA (inhibiteur de l'ACC oxydase) a été menée sur des plantules de Colza, traitées durant cinq jours, en boîte de Pétri (conditions de faible transpiration).

Nos résultats montrent clairement que sans l'activité du transporteur BnNRT2.1, aucun flux d'eau et de nitrate n'est possible pour la croissance racinaire et foliaire malgré une sur-expression du transporteur BnNRT1.1. Au regard de la localisation complémentaire de ces deux transporteurs dans la racine mature, nos résultats suggèrent l'existence d'une coordination fonctionnelle entre BnNRT2.1 et BnNRT1.1 pour le transport du nitrate. En outre, la modification de la synthèse de l'éthylène met en évidence une forte corrélation entre la structure racinaire et la fonction d'absorption du nitrate. En effet, l'ACC induit une diminution du système racinaire conjointement à une diminution de l'absorption du nitrate. *A contrario*, l'AIBA induit la prolifération racinaire parallèlement à l'augmentation de l'absorption du nitrate.

L'ensemble de nos résultats a permis d'élaborer un modèle physiologique intégratif structure-fonction plus complet que ceux proposés par Clarkson *et al.*, (2000) et Cramer *et al.*, (2009). En effet, ce modèle fait intervenir les signalisations mises à jour à la fois dans la littérature et dans nos études sur les régulations du transport du nitrate et de l'eau pour la croissance. Il tient également compte de la localisation complémentaire des transporteurs BnNRT2.1 et BnNRT1.1 au sein de la racine mature.

Contributions of pharmacological treatments in the study of **compensatory** structure-function relationships (**root architecture – nitrate uptake**) **on growth** of seedlings of winter oilseed rape (*Brassica napus* L. cv. Capitol) in low transpiring condition.

Nowadays, the pressures on agriculture (increasing demand, climate change, reduction of nitrogen inputs...) and the weak nitrogen harvest index (NHI) of winter oilseed rape, lead to improve the nitrogen use efficiency (NUE), particularly under limiting nitrogen condition. This can be achieved through improved root uptake capacity of nitrogen, which both depends on the root surface (structure) and the number and activity of nitrate transporters BnNRT1.1 BnNRT2.1 (function).

A pharmacological approach was realized in order to rapidly modulate (minutes-hours) the function with the supply of glutamate (inhibitor of BnNRT2.1 transporter) and the root structure, by modifying the synthesis of ethylene using ACC (precursor of ethylene) and AIBA (ACC oxidase inhibitor) on oilseed rape seedlings, treated for five days in Petri dishes (low transpiring condition).

Our results clearly show that without BnNRT2.1 transporter activity, no water and nitrate flow is possible for root and leaf growth, despite over-expression of BnNRT1.1 transporter. According to the complementary location of these two transporters in mature root, our results suggest the existence of a functional coordination between BnNRT2.1 and BnNRT1.1 for nitrate transport. In addition, the change in ethylene synthesis shows a high correlation between both the root structure and function for nitrate uptake. Indeed, the ACC causes a decrease of the root system in conjunction with a decrease of the absorption of nitrate. On the contrary, the AIBA treatment induces a root proliferation in parallel with the increase of nitrate uptake.

All of our results led to the development of an integrative physiological structure-function model more thorough than those provided by Clarkson *et al.* (2000) and Cramer *et al.* (2009). Indeed, this model involves both the signaling updates in literature and in our studies on regulation of nitrate and water transport for growth. It also takes into account the complementary localization of BnNRT2.1 and BnNRT1.1 nitrate transport in the mature root.

Mots-clés : *Brassica napus* L. – Absorption – Nitrate – Eau – Transporteurs nitrate – architecture racinaire – Ethylène.