



HAL
open science

Les transporteurs de saccharose et la répartition du carbone chez *Arabidopsis thaliana*: rôle dans l'adaptation du système racinaire aux contraintes de l'environnement

Nils Hennion

► **To cite this version:**

Nils Hennion. Les transporteurs de saccharose et la répartition du carbone chez *Arabidopsis thaliana*: rôle dans l'adaptation du système racinaire aux contraintes de l'environnement. Botanique. Université de Poitiers, 2018. Français. NNT : 2018POIT2296 . tel-02131557

HAL Id: tel-02131557

<https://theses.hal.science/tel-02131557v1>

Submitted on 16 May 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées

Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016

Ecole Doctorale : Sciences pour l'environnement « Gay Lussac » 524

Secteur de Recherche : Biologie des organismes ; Biotechnologies Animales, Végétales et Microbiennes

Présentée par :

Nils HENNION

Les transporteurs de saccharose et la répartition du carbone chez *Arabidopsis thaliana* : rôle dans l'adaptation du système racinaire aux contraintes de l'environnement

Directeurs de Thèse :

Rémi LEMOINE

Nathalie POURTAU

Soutenue le 23 Novembre 2018 devant la commission d'examen

JURY

Sylvie DINANT	Directeur de recherche INRA Versailles	Rapporteur
Philippe NACRY	Chargé de recherche INRA Montpellier	Rapporteur
Nathalie OLLAT	Ingénieur de recherche INRA Bordeaux	Examineur
Marie-Pascale PRUD'HOMME	Professeur de l'Université de Caen	Examineur
Rémi LEMOINE	Directeur de recherche CNRS Poitiers	Examineur
Nathalie POURTAU	Maître de conférences de l'Université de Poitiers	Examineur



Les transporteurs de saccharose et la répartition du carbone chez *Arabidopsis thaliana* : rôle dans l'adaptation du système racinaire aux contraintes de l'environnement

L'objectif de cette thèse était d'élucider le rôle des transporteurs de saccharose dans les racines d'*Arabidopsis thaliana* pour mieux comprendre la répartition du carbone dans la plante entière.

Nous nous sommes focalisés sur l'étude des deux principaux transporteurs de saccharose exprimés dans les racines : AtSUC1 et AtSUC2. Une étude du mutant KO *suc1* et une étude des plantes greffées présentant la mutation KO du gène *AtSUC2* uniquement dans les racines (micro-greffe) ont été réalisées sur des plantes au stade adulte (30 à 32 jours après semis) cultivées en rhizobox. De plus, les localisations de l'expression des gènes et des protéines de ces transporteurs ont été réalisées dans les racines de plantes adultes pour la première fois. La localisation de l'expression d'*AtSUC1* dans les pointes racinaires, nous a permis de conclure sur un rôle potentiel d'AtSUC1 dans la répartition du saccharose dans les zones de croissance des racines et/ou un rôle dans la signalisation glucidique, probablement en lien avec l'acide abscissique. Les résultats montrent qu'AtSUC2 aurait un rôle dans le développement racinaire, certainement *via* le déchargement du saccharose du phloème dans les zones d'élongation des racines et dans le rechargement du phloème le long des racines (notamment dans les départs de racines latérales). De plus, AtSUC2 pourrait avoir un rôle dans l'augmentation locale d'hexoses liée à l'émergence des racines latérales. Enfin, nos résultats indiquent une contradiction entre la localisation de l'expression du gène *AtSUC2* retrouvée dans le parenchyme cortical et la localisation de la protéine qui n'est pas retrouvée dans ces cellules. Néanmoins les deux approches s'accordent sur la localisation dans les cellules compagnes.

Mots clefs : AtSUCs, saccharose, racines, transport, phloème

Sucrose transporters and carbon partitioning in *Arabidopsis thaliana*: role in root system adaptation to environmental constraints

The aim of this thesis was to elucidate the role of sucrose transporters in the roots of *Arabidopsis thaliana* to have a better comprehension of the carbon partitioning in the whole plant.

We focused on the study of the two main sucrose transporters expressed in the roots: AtSUC1 and AtSUC2. A study of the KO mutant *suc1* and a study on grafted plants with the KO mutation of the *AtSUC2* gene only in the roots (micro-graft) were carried out on adult plants (30 to 32 days after sowing) grown in rhizobox. In addition, the localization of the expression of the genes and proteins of transporters were carried out in the roots of adult plants for the first time. The localization of *AtSUC1* expression in the root tips allowed us to conclude on a potential role of AtSUC1 in sucrose distribution in root growth areas and/or a role in carbohydrate signalisation, probably related to abscisic acid. The results also showed that AtSUC2 has a role in root development and certainly *via* sucrose phloem unloading in root elongation's areas and in the phloem reloading along the roots (especially in sites of emergence of lateral roots). In addition, AtSUC2 may have a role in the local increase of hexoses associated with the emergence of lateral roots. Finally, our results indicate a contradiction between the localization of the *AtSUC2* gene expression found in the cortical parenchyma and the localization of the protein that is not found in these cells. Nevertheless the two approaches agree on the localization in the companion cells.

Key words: AtSUCs, sucrose, roots, transport, phloem

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Sylvie Dinant et Philippe Nacry pour avoir accepté de juger mon travail ainsi que Nathalie Ollat et Marie-Pascale Prud'homme de participer à mon jury de thèse. Je remercie aussi Sarah Cookson, Laurent Leport et une nouvelle fois Sylvie Dinant pour leur participation à mon comité de suivi de thèse.

Je remercie le Ministère de l'Enseignement Supérieur de m'avoir accordé la confiance nécessaire en finançant mes travaux.

J'adresse aussi mes remerciements à Rossitza Atanassova et Didier Bouchon pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe SEVE et du laboratoire EBI.

Je remercie grandement Nathalie Pourtau, Laurence Maurousset et Rémi Lemoine pour m'avoir guidé et encadré durant mon stage de M2 et ces trois années de thèse. Vous m'avez tout du long laissé une grande liberté, gérant mes expérimentations comme je le souhaitais mais vous étiez toujours là quand j'avais besoin de conseils et de discussions autour de mes résultats. Ceci étant vraiment des conditions idéales pour effectuer des travaux de recherche. J'ai appris énormément de choses à plein de niveaux différents durant ces années qui sont passées sans que je les vois. Je vous remercie aussi tous les trois pour les corrections et la relecture de ce manuscrit mais aussi pour mes précédentes communications (le poster de la SFBV, le rapport de comité de thèse, la communication orale en Suède...). Vos corrections sont toujours pertinentes et j'espère avoir appris de celles-ci (même si ça a pris du temps). Merci à toi Nathalie pour ce voyage en Suède très sympathique et enrichissant et pour m'avoir « couvé » sur toute la partie enseignement. Merci à toi Rémi pour ta disponibilité et tes réponses avisées à toutes mes questions. Et merci à toi Laurence pour ta bonne humeur et tes corrections orthographiques plus que nécessaires.

Je remercie très chaleureusement Benoit Porcheron pour toute son aide dans les différentes expérimentations : l'arrosage des plantes, le remplissage, le lavage et la maintenance des rhizobox, Les récoltes, les extractions et dosages des sucres, les mesures de surfaces foliaires et du nombre de feuilles, l'architecture racinaire, la réalisation des greffes et je suis sûr que j'oublie plein de choses ! Ça a été vraiment très agréable de travailler avec toi tout au long de ma thèse. Au niveau des expérimentations je remercie aussi Nathalie, Laurence et Rémi pour votre aide sur les récoltes, les arrosages quotidiens le week-end et sur les manips de transport. Je remercie aussi Florence Thibault pour toute l'aide fournie en microscopie et les belles images que j'ai pu acquérir grâce à toi ainsi que pour toutes les discussions qu'on a pu avoir. Je tiens à remercier Vincent Lebeurre qui a surveillé et arrosé mes plantes ainsi que préparé la terre pour mes expériences et récolté toutes les graines des

plantes que j'ai pu produire mais aussi avec qui j'ai passé beaucoup de temps à discuter de sujets divers. Florence, Vincent et Benoit, surtout gardez votre bonne humeur qui m'a été essentielle à certains moments. Je remercie aussi Caroline Paillot avec qui il a été très agréable de partager mon laboratoire. De plus, je veux remercier Cécile Gaillard, tu as toujours été extrêmement disponible pour toutes mes questions au sujet des manip ou du matériel et surtout tu m'as beaucoup aidé dès que j'avais des problèmes (en biomol par exemple).

Je veux aussi remercier le duo du secrétariat, Geneviève Harika et Sylvie Clercy-Morel qui m'ont aidé dans toutes mes tâches administratives et même plus, comme l'impression de mes rapports de stage ou de comité de thèse.

Je tiens à remercier toute l'équipe pédagogique que j'ai côtoyée durant mes deux ans d'enseignement pour leur aide et leurs conseils. Il m'a vraiment été agréable de donner des cours dans ces conditions. Et je remercie encore une fois Nathalie de m'avoir pris sous son aile et beaucoup aidé pour mes cours.

Je n'oublierai pas de remercier les stagiaires que j'ai pu encadrer et qui ont grandement participé aux résultats de cette thèse : Thomas Roulé et Estéban Trestard, vous avez été des stagiaires excellents dans vos domaines respectifs et je vous souhaite bonne chance dans votre avenir, j'espère que l'on se recroisera.

Je remercie aussi les anciens doctorants (ou ingénieur) du labo que j'ai pu côtoyer, Jonathan, Mickaël, Florian, Chloé, Gaétan et Lucie. Ce fut de très bons moments passés avec vous que ce soit au labo ou en dehors. Mickaël je te remercie particulièrement pour avoir eu la patience de me former en M2 et avec Florian merci de m'avoir autant aidé et conseillé durant le début de ma thèse. Je remercie bien évidemment aussi les thésards arrivés après moi, Antoine et Abir et vous souhaite bon courage pour la suite, vous en aurez besoin ☺. Antoine et Chloé c'est avec vous que j'ai passé le plus de temps, merci pour toutes les discussions qu'on a pu avoir dans le bureau ou pendant les repas (et surtout merci de m'avoir suivi du côté snack au RU ☺).

Enfin je remercie infiniment tous mes proches qui ne sont pas au labo mais qui m'ont soutenu durant ces quelques années. Ce ne fut pas évident de tous vous voir surtout ces derniers temps mais vous vous êtes toujours débrouillés pour passer me voir ou être présents d'autres façons et je vous en remercie.

Pour finir, je remercie ma petite famille, Jenny pour ta patience, pour être toujours positive et pour me soutenir de manière inconditionnelle, Arthur pour être le plus parfait des petits garçons. Je

vais bientôt avoir plus de temps à vous consacrer. Vous me procurez une joie incommensurable : je vous aime !

Abréviations

ABA	Acide Abscissique
ABI5	ABA-Insensitive 5
ADNc	Acide DesoxyriboNucléique complémentaire
ARN	Acide RiboNucléique
AtBRI1	<i>Arabidopsis thaliana</i> BRassinosteroid Insensitive1 (At4G33430)
AtCAB1	<i>Arabidopsis thaliana</i> Chlorophyll A/B-Binding protein1 (At1G29930)
AtCIN	<i>Arabidopsis thaliana</i> Cytosolic Invertase
AtCWIN	<i>Arabidopsis thaliana</i> Cell-Wall Invertase
AtERD6-like	<i>Arabidopsis thaliana</i> Early Response to Dehydratation6-like
AtINT	<i>Arabidopsis thaliana</i> INositol Transporter
ATP	Adénosine TriPhosphate
AtpGlucT	<i>Arabidopsis thaliana</i> plastidic Glucose Transporter
AtPMT	<i>Arabidopsis thaliana</i> Polyols/Monosaccharides Transporter
AtRBCS	<i>Arabidopsis thaliana</i> Ribulose Bisphosphate Carboxylase Small chain1a (At1G67090)
AtRD29a	<i>Arabidopsis thaliana</i> Responsive to Desiccation29a (At5G52310)
AtSAG29	<i>Arabidopsis thaliana</i> Senescence-Associated Gene29 (aussi nommé AtSWEET15, At5G13170)
AtSTP	<i>Arabidopsis thaliana</i> Sugar Transporteur Protein
AtSUC	<i>Arabidopsis thaliana</i> SUcrose Carrier
AtTIP1.2	<i>Arabidopsis thaliana</i> Tonoplast Intrinsic Protein 1.2 (At3G26520)
AtTMT	Tonoplast Monosaccharide Transporter
AtTST	Tonoplast Sugar Transporter
AtVGT	<i>Arabidopsis thaliana</i> Vacuolar Glucose Transporter
AtVIN	<i>Arabidopsis thaliana</i> Vacuolar Invertase
AtWOX7	<i>Arabidopsis thaliana</i> WUSCHEL related HHomeobox7 (At5G05770)
Bar	Bialaphos resistance
BSA	Bovine Serum Albumin
Col-0	Columbia ecotype
CR	CRispr
CRISPR-Cas9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats- CRISPR associated protein9
dNTP	desoxyriboNucléotide TriPhosphate

dpm	Desintégration par minute
EDTA	ÉthylèneDiamineTétraAcétique
F	Forward (amorce sens)
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
GAM	Goat Anti-Mouse
GAR	Goat Anti-Rabbit
GFP	Green Fluorescent Protein
GUS	β -glucuronidase
HRM	High Resolution Meltingcurve
JAS	Jours Après Semis
kb	Kilobase
KO	Knock-Out
MF	Matière Fraiche
MFS	Major Facilitator Superfamily
micro-ROC	Microscopy Rhizosphere Chambers
milieu MS	Milieu Murashige et Skoog
MML-V	Moloney Murine Leukemia Virus
MS	Matière Sèche
MST	MonoSaccharide Transporters
NADP	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NG	Non Greffé
NGS	Normal Goat Serum
PAR	Photosynthetic Active Radiation
PBS	Phosphate Buffered Saline
<i>pCmGAS1</i>	promoteur de <i>Cucumis melo</i> Galactinol Synthase1
<i>pDe-Cas9</i>	plasmide de Destination-Cas9
<i>pEnC1.1</i>	plasmide Entrée Chimera1.1
<i>pEnChimera</i>	plasmide Entrée Chimera
pH	potentiel Hydrogène
PPUs	Pore Plasmodesmata Units
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction

R	Reverse (amorce antisens)
R/S	Root Shoot ratio
REB	RNA Extraction Buffer
ROS	Reactive Oxygène Species
RuBisCO	Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygénase
RWC	Relative Water Content
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
sgRNA	single guide RiboNucleic Acid
St	carence hydrique (Stress)
SUT	Sucrose Transporters
SWEET	Sugar Will Eventually be Exported Transporter
T-DNA	transfer DeoxyriboNucleic Acid
Tm	Témoin
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
WC	Water Content
X-Glu	5-Bromo-4Chloro-3-indolyl-B-Dglucopyranoside
Xoo	<i>Xanthomonas oryzae pv. Oryzae</i>
YFP	Yellow Fluorescent Protein
ZmSUT1	<i>Zea mays</i> SUcrose Transporter1

Table des matières

Chapitre I : Introduction bibliographique	1
1 Synthèse et transport des sucres dans les végétaux supérieurs	2
1.1 Production des sucres	2
1.2 Organes sources et organes puits	2
1.3 Anatomie du phloème.....	3
1.4 Chargement du phloème.....	3
1.5 Transport à longue distance	4
1.6 Déchargement du phloème.....	5
1.7 Répartition du carbone entre les différents puits	6
2 Transporteurs de sucres	7
2.1 Transporteurs de saccharose (SUC).....	7
2.2 Transporteurs d'hexoses (MST).....	10
2.3 Transporteurs de type SWEET (Sugar Will Eventually be Exported Transporter)	11
3 Déficit hydrique	13
3.1 Réponses au niveau des feuilles	14
3.2 Réponses au niveau cellulaire	15
3.3 Réponses au niveau des racines	15
4 La racine des plantes supérieures	16
4.1 Anatomie de la racine chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
4.2 Architecture racinaire.....	17
4.3 Le sucre dans les racines	18
5 Objectifs de l'étude	33
Chapitre II : Matériel et méthodes	35
1 Matériel végétal	36
2 Culture et récolte des plantes	36
2.1 Culture des plantes cultivées intégralement en Rhizobox	36
2.2 Application d'une carence hydrique en rhizobox.....	38
2.3 Réalisation de micro-greffes.....	38
3 Suivi des plantes	40
3.1 Suivi des flux de carbone dans les plantes : Etude de l'allocation du ¹⁴ C.....	40
3.2 Suivi phénotypique et physiologique des plantes	41
3.3 Suivi biochimique des plantes	42
3.4 Suivi de l'expression des gènes dans les plantes.....	44

4 Localisation des transporteurs de saccharose AtSUC1 et AtSUC2	45
4.1 Etude de la localisation de l'expression <i>via</i> l'utilisation de plantes exprimant le gène GUS (β -glucuronidase).....	45
4.2 Immunohistochimie : localisation des protéines AtSUC1 et AtSUC2 dans les racines	46
5 Obtention de mutants à l'aide de la technique CRISPR/Cas9	47
Chapitre III : Etude des transporteurs de saccharose et de la répartition du carbone chez <i>Arabidopsis thaliana</i> en cas de contrainte hydrique	49
1 « Water deficit enhances C export to the roots in <i>A. thaliana</i> plants with contribution of sucrose transporters in both shoot and roots ».....	50
2 Bilan	71
Chapitre IV : AtSUC1.....	73
1 Résultats.....	74
1.1 Etude du mutant KO <i>suc1</i>	74
1.2 Localisation de l'expression du gène et de la protéine	93
2 Discussion.....	96
2.1 Impact de la carence hydrique sur Col-0 : comparaison 2018 vs 2016	97
2.2 Etude du mutant <i>suc1</i> en condition hydrique témoin.....	99
2.3 Etude du mutant <i>suc1</i> lors de la carence hydrique	103
2.4 Une complémentation fonctionnelle d'AtSUC1 ?	108
3 Bilan	109
Chapitre V : AtSUC2.....	111
1 Résultats.....	112
1.1 Etude de la mutation du gène <i>AtSUC2</i> dans les racines.....	112
1.2 Localisation de l'expression du gène et de la protéine AtSUC2	127
2 Discussion.....	132
2.1 Effets de la greffe sur les plantes	133
2.2 Localisation de l'expression du gène <i>AtSUC2</i> et de la protéine AtSUC2	136
2.3 Rôle d' <i>AtSUC2</i> dans le déchargement du saccharose du phloème dans les racines.....	139
3 Bilan	142
Chapitre VI : Conclusion et Perspectives	143
1 Evaluation des techniques	144
1.1 Architecture racinaire.....	144
1.2 Rhizobiome.....	145
1.3 Micro-greffes	145
1.4 Flux de carbone	146
2 Rôle d'AtSUC1 chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	147

3 Rôles hypothétiques d'AtSUC2 dans les racines	147
4 Conclusion de la thèse	149
Références bibliographique	150
Annexes	163
Annexe I : « Influence of the plant culture system, pot vs rhizobox, on <i>Arabidopsis thaliana</i> growth and root microbiome »	164
.....	175
Annexe II : Obtention de mutants par la technique CRISPR/Cas9	192
4.1 Mutants CRsuc1-suc2F	192
4.2 Mutants CRsuc5 et suc1-CRsuc5	193
4.3 Mutants <i>CRsweets</i>	195

Chapitre I : Introduction bibliographique

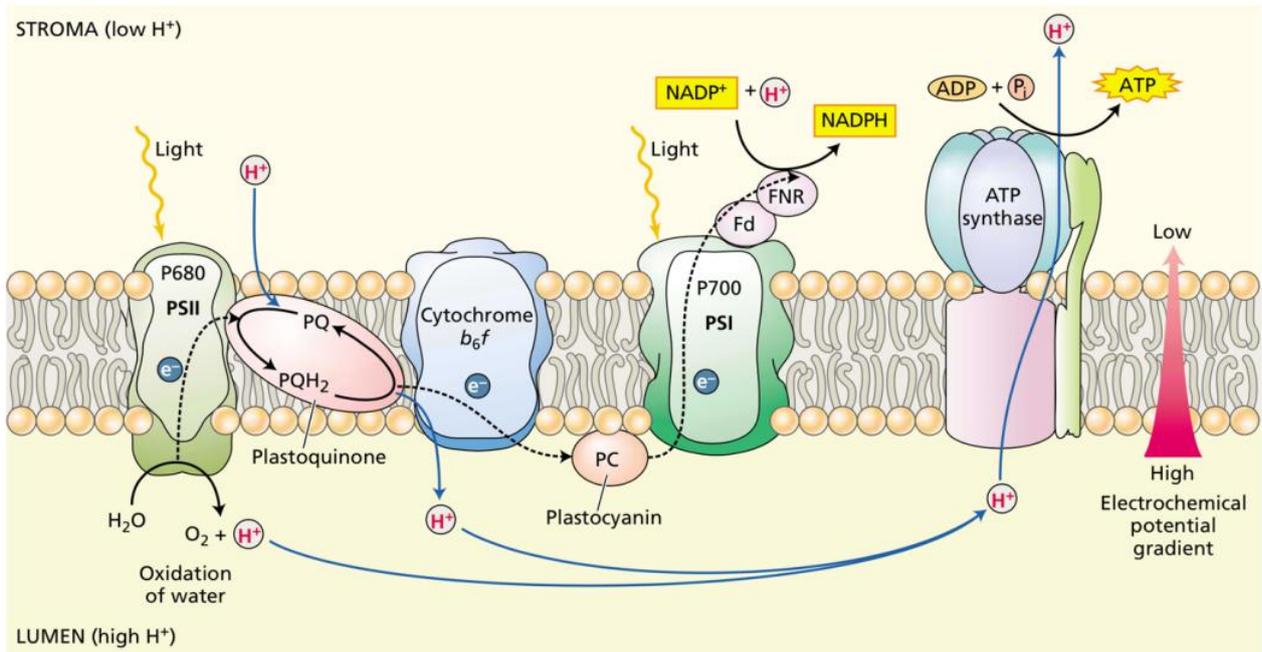


Figure 1. Schéma de la première phase de la photosynthèse : transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique (Taiz et Zeiger, 2010).

Le transfert d'électrons et de protons dans la membrane des thylakoïdes est réalisé vectoriellement par quatre complexes protéiques. L'eau est oxydée et les protons sont libérés dans le lumen par le PSII. Le PSI réduit le NADP^+ en NADPH dans le stroma, *via* l'action de la ferredoxine (Fd) et de la flavoprotéine ferredoxine-NADP réductase (FNR). Les protons sont également transportés dans le lumen par l'action du cytochrome P700. Ces protons doivent ensuite diffuser vers l'ATP synthase, où leur diffusion dans le gradient de potentiel électrochimique est utilisée pour synthétiser l'ATP dans le stroma. Les électrons des plastoquinones (PQH₂) et des plastocyanines sont respectivement transférés au cytochrome b₆f et au PSI. Les lignes pointillées représentent le transfert d'électrons ; les lignes pleines représentent le mouvement des protons.

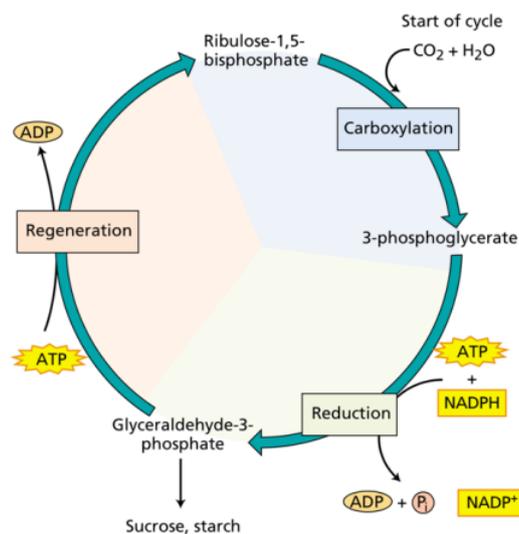


Figure 2. Deuxième phase de la photosynthèse : le cycle de Calvin (Taiz et Zeiger, 2010).

Le cycle de Calvin se déroule en trois étapes : (1) la carboxylation, au cours de laquelle le CO_2 est lié de manière covalente à un squelette carboné ; (2) la réduction, au cours de laquelle un triose-phosphate se forme ; et (3) la régénération, au cours de laquelle l'accepteur de CO_2 , le ribulose-1,5-bisphosphate se reforme.

1 Synthèse et transport des sucres dans les végétaux supérieurs

1.1 Production des sucres

Les sucres sont des structures carbonées permettant de fournir de l'énergie chimique, pouvant servir de molécule signal et permettant de constituer des molécules de taille plus importantes comme celles constituant les parois cellulaires. La particularité du règne végétal est son autotrophie vis-à-vis du carbone, c'est-à-dire sa capacité à réduire du carbone atmosphérique (CO_2) en matière organique (sucres). Ce processus, la photosynthèse, utilise l'énergie lumineuse et de l'eau pour former de l'énergie chimique (**Figure 1**) puis des sucres (**Figure 2**). Plus globalement, 6 CO_2 (dioxyde de carbone) et $6 \text{ H}_2\text{O}$ (eau) donnent $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (sucre) et 6 O_2 (oxygène). La photosynthèse se déroule principalement dans les chloroplastes des feuilles. L'activité photosynthétique la plus importante a lieu dans les cellules du mésophylle des feuilles matures. Les trioses phosphates qui résultent de la photosynthèse vont être ensuite stockés sous forme d'amidon (polysaccharide dont les chaînes sont composées de glucose) dans le chloroplaste ou exportés vers le cytosol pour être convertis en saccharose (disaccharide composé de glucose et de fructose). L'amidon est principalement une forme de stockage des sucres, synthétisé et stocké le jour et consommé la nuit pour compenser l'absence de photosynthèse. Le saccharose est la principale forme de sucre transportée vers les organes nécessitant de l'énergie dans la majorité des végétaux supérieurs (Lemoine, 2000), car c'est un sucre non réducteur.

1.2 Organes sources et organes puits

Chez les végétaux supérieurs, il est possible de distinguer deux types d'organes, les organes « sources » et les organes « puits ». Les organes sources sont des organes où la quantité de sucres produite par la photosynthèse est supérieure à la quantité de sucres consommée pour la maintenance des fonctions et le développement de l'organe (Wardlaw, 1990) mais ce peut être aussi des organes de stockage qui réexpédient les sucres accumulés. Ces organes sont principalement les feuilles matures, les tiges et les tubercules dans certains cas. A l'inverse des organes sources, les organes puits sont des organes nécessitant des sucres provenant des organes sources pour se développer, soit parce que la photosynthèse ne produit pas assez de sucres dans ces organes, soit parce qu'il n'y a pas de photosynthèse du tout. Les organes puits sont généralement les racines, les jeunes feuilles, les fleurs et les graines. Un transfert de sucre (saccharose) va donc s'effectuer des organes sources vers les organes puits *via* le phloème.

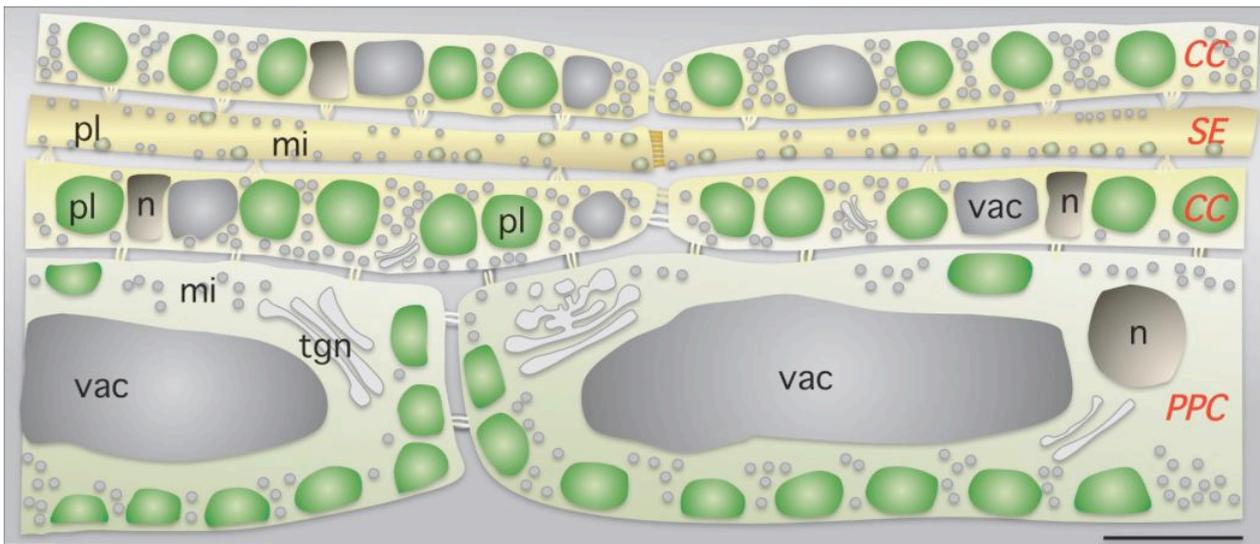


Figure 3. Organisation du phloème dans les feuilles matures d'*Arabidopsis thaliana* (Cayla et al., 2015).

Un critère pour différencier les cellules du parenchyme phloémien (**PPC**), les cellules compagnes (**CC**) et les éléments du tube criblé (**SE**) est la présence et la position des plastes (**pl**). Dans les CC, les plastes sont alignés et occupent une large proportion du volume de la cellule. De nombreuses mitochondries (**mi**) sont aussi présentes dans chaque type cellulaire. Les noyaux (**n**) et les vacuoles (**vac**) ont des formes et des positions inhabituelles dans les CC. La taille des plastes diffère suivant les types cellulaires (1 μm dans SE, 3 μm dans CC et 4 μm dans PPC), contrairement aux mitochondries dont la taille varie peu (0,6 μm dans SE, 0,6 μm dans CC et 0,7 μm dans PPC).

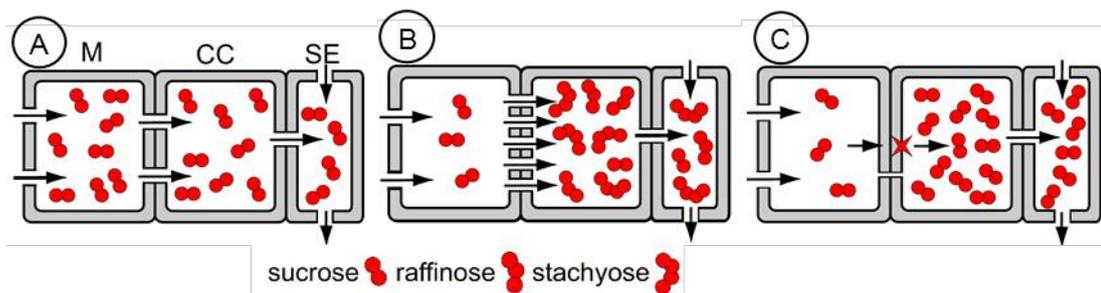


Figure 4. Différentes stratégies du chargement du phloème. Adapté de Rennie et Turgeon, 2009.

A. Chargement symplasmique : le saccharose se déplace par les plasmodesmes suivant le gradient de concentration. Ceci nécessite une forte concentration en saccharose dans les cellules du mésophylle (**M**). **B.** Chargement symplasmique avec piège moléculaire : le saccharose se déplace par les plasmodesmes suivant le gradient de concentration. Ce gradient est créé par la transformation du saccharose en raffinose ou en stachyose dans les cellules intermédiaires. **C.** Chargement apoplasmique : le saccharose est exporté des cellules du mésophylle vers l'apoplasme grâce à des transporteurs passifs. Il est ensuite récupéré par des transporteurs actifs de type SUC (**étoile rouge**) vers le cytoplasme des cellules compagnes (**CC**).

Le saccharose passe dans les trois cas des cellules compagnes aux éléments du tube criblé (**SE**) par diffusion passive par les plasmodesmes.

1.3 Anatomie du phloème

Arabidopsis thaliana étant l'un des modèles végétal le plus étudié en recherche fondamentale mais aussi celui choisi pour cette étude, les mécanismes seront principalement décrits dans cette plante.

Le phloème est composé de trois types de cellules, les éléments du tube criblé, les cellules compagnes et les cellules du parenchyme phloémien (**Figure 3**). Les cellules du parenchyme phloémien sont des cellules de parenchyme classique se trouvant proche des cellules compagnes et pouvant réaliser la photosynthèse. Les éléments du tube criblé sont des cellules spécialisées permettant le transport de la sève phloémienne, assemblées en files de cellules, avec de larges connections entre elles. Ces cellules n'ont ni noyau, ni vacuoles et n'ont généralement pas de ribosomes ou d'appareil de Golgi, mais ce sont quand même des cellules vivantes (elles possèdent encore leur membrane plasmique et des mitochondries). Ces cellules nécessitent donc d'autres cellules pour synthétiser leurs protéines et fournir de l'énergie. Les cellules compagnes vont assurer ce rôle, possédant de très nombreuses mitochondries et plastes (Imlau *et al.*, 1999). Les cellules compagnes vont aussi avoir un rôle important dans le chargement de la sève phloémienne en sucres et possèdent de très nombreuses connections (plasmodesmes spécialisés nommés « Pore Plasmodesmata Units » ou PPU ; van Bel, 1996 ; Oparka et Turgeon, 1999 ; Heo *et al.*, 2014) avec les éléments du tube criblé.

1.4 Chargement du phloème

Après sa synthèse dans les cellules du mésophylle, le saccharose peut être transporté à longue distance *via* le phloème. Pour cela il est nécessaire que le saccharose soit transporté des cellules du mésophylle vers les cellules compagnes et les tubes criblés du phloème, c'est ce que l'on appelle le chargement du phloème. Ce chargement peut se faire de manière symplasmique ou apoplasmique suivant les espèces végétales (Truernit, 2001 ; Rennie et Turgeon, 2009).

Le chargement symplasmique implique un continuum cytoplasmique, c'est-à-dire que le saccharose passe de cellule en cellule, du mésophylle aux cellules compagnes, par les plasmodesmes, suivant un gradient de concentration. Ce passage peut se réaliser de manière passive (**Figure 4, A**) comme il a été décrit chez de nombreuses espèces d'arbres (Rennie et Turgeon, 2009), par exemple le saule (*Salix babylonica*) ou le pommier (*Malus domestica*). Dans ce cas, les concentrations de soluté dans les cellules du mésophylle sont très élevées pour créer un gradient de concentration et le soluté diffuse, par les plasmodesmes, des cellules du mésophylle vers les cellules compagnes (Rennie et Turgeon, 2009). Un autre système de chargement symplasmique du phloème existe et ne nécessite pas de fortes différences de concentration en soluté, c'est le chargement symplasmique avec piège

moléculaire (**Figure 4, B**). Le principe de ce système est de transformer le saccharose en une autre molécule après la sortie du saccharose de la cellule du mésophylle, afin qu'il y ait toujours plus de saccharose dans les cellules du mésophylle que dans les cellules compagnes et donc de maintenir un gradient de concentration (Rennie et Turgeon, 2009). Cette molécule formée doit être de taille suffisamment importante pour ne pas repasser dans les plasmodesmes vers les cellules du mésophylle. Cette molécule peut être le raffinose ou le stachyose, formés par l'addition d'un ou deux résidus galactinol sur une molécule de saccharose (par l'action de la raffinose synthase, des galactinol-raffinose galactosyltransferase et des stachyose synthetases), comme chez les coléus (*Coleus blumei*) (Rennie et Turgeon, 2009). Ces molécules sont formées dans des cellules situées entre les cellules du parenchyme et les éléments du tube criblé, nommées cellules intermédiaires.

Pour le chargement apoplasmique (**Figure 4, C**), le saccharose va passer des cellules du mésophylle aux cellules du parenchyme phloémien de manière symplasmique, par les plasmodesmes. Une fois dans le parenchyme phloémien, le saccharose est alors exporté vers l'apoplasme grâce à des transporteurs passifs. Chez *Arabidopsis thaliana*, ces transporteurs de saccharose découverts récemment sont des transporteurs de type SWEET (Chen *et al.*, 2012), AtSWEET11 et 12. Ces transporteurs fonctionnant comme facilitateurs, ils n'utilisent pas d'énergie. Une fois dans l'apoplasme, les molécules de saccharose doivent franchir la membrane des cellules compagnes du phloème. Cependant, la concentration en saccharose dans les cellules du système conducteur est bien supérieure à celle de l'apoplasme et le transfert nécessite alors une consommation d'énergie. Ce transport actif est assuré chez *Arabidopsis thaliana* par le transporteur de saccharose AtSUC2 (Stadler et Sauer, 1996 ; Gottwald *et al.*, 2000), de type SUC (SUcrose Carrier, ou nommé SUT, SUcrose Transporter), présent au niveau de la membrane plasmique des cellules compagnes (Sauer et Stolz, 1994). AtSUC2 assure ce transport du saccharose avec un proton, utilisant la force protomotrice créée par une pompe à proton (H^+ ATPase) permettant de fournir l'énergie nécessaire à l'entrée du saccharose contre son gradient de concentration (Sauer, 2007). Toutefois, la protéine homologue d'AtSUC2 chez d'autres espèces (notamment les solanacées) peut être localisée sur d'autres types cellulaires (Kühn *et al.*, 1997).

Dans tous les mécanismes de chargement du phloème, le saccharose ainsi chargé et accumulé dans les cellules compagnes diffuse ensuite par les plasmodesmes jusqu'aux éléments du tube criblé.

1.5 Transport à longue distance

Le saccharose, une fois dans les tubes criblés, est transporté par le phloème pour être acheminé vers les organes puits. Le déplacement de la sève phloémienne se fait suivant le modèle du

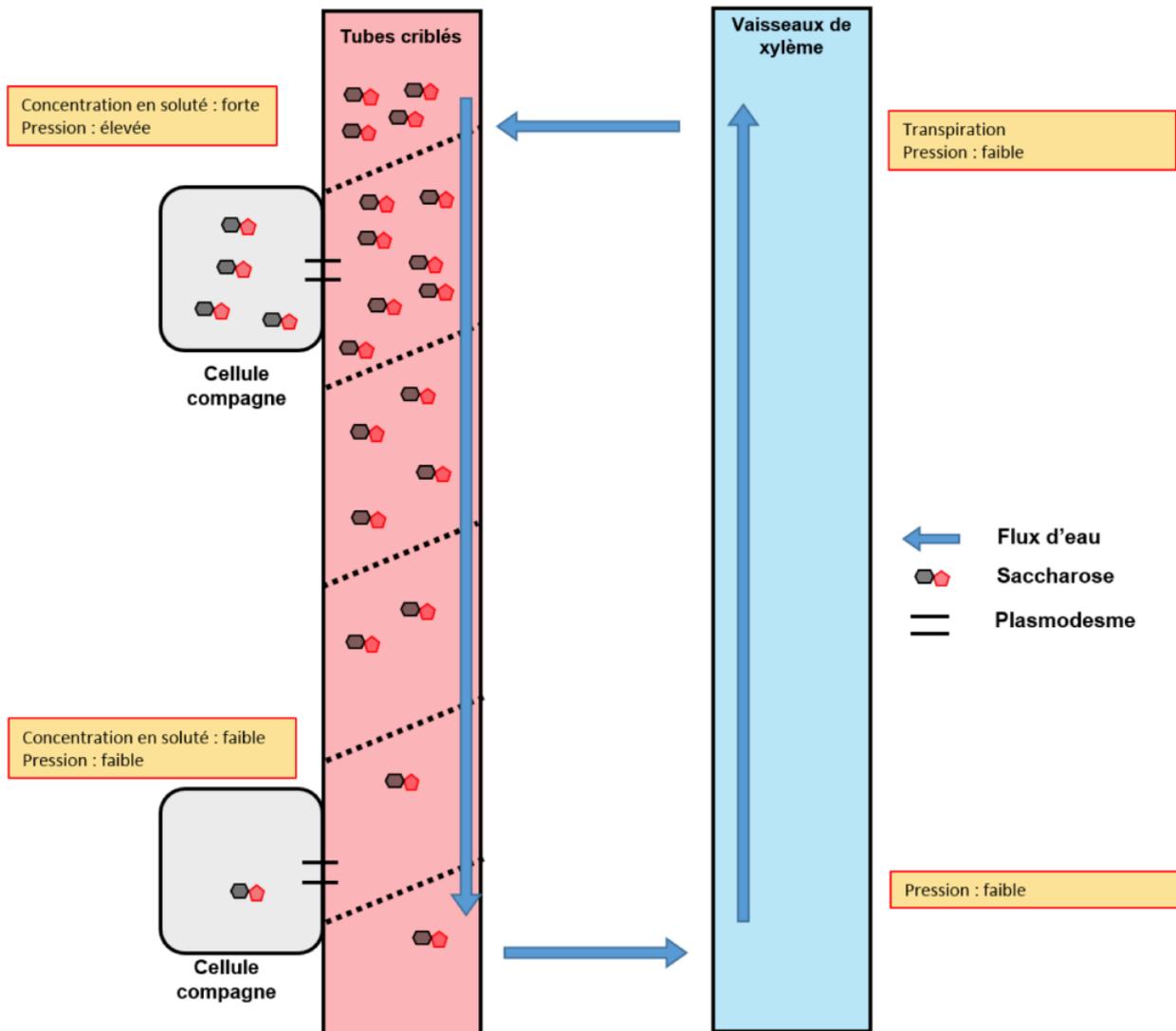


Figure 5. Transport de la sève phloémienne d'après la théorie des flux en masse (d'après Münch, 1930).

La concentration élevée en solutés dans les tubes criblés entraîne une entrée d'eau provenant du xylème, ce qui provoque une augmentation de la pression de turgescence dans les tubes criblés. La faible concentration en soluté dans certaines zones entraîne une sortie d'eau des tubes criblés vers le xylème, ce qui a pour conséquence de réduire la pression de turgescence. La sève phloémienne se déplace des zones à forte pression de turgescence vers les zones à plus faible pression de turgescence.

flux en masse proposé par Münch (1930). Ce modèle (**Figure 5**) indique que la différence de pression de turgescence au sein du phloème entre organes source (forte pression) et puits (basse pression) engendre le mouvement de la sève de la source vers le puits. Cette turgescence du côté des organes source est due à l'accumulation en soluté dans les tubes criblés, et notamment en sucres, résultant du chargement du phloème et entraînant une entrée d'eau dans les cellules.

Le long du phloème de transport (terme désignant le phloème n'étant ni dans une zone de chargement, ni de déchargement du phloème), des molécules de saccharose peuvent sortir du tube criblé. Une partie de ce saccharose sert à alimenter en carbone organique les cellules environnantes (Hafke *et al.*, 2005), une autre partie est réabsorbée dans les tubes criblés. Chez *Arabidopsis thaliana*, AtSUC2 serait impliqué dans la récupération du saccharose et dans sa réintroduction dans le phloème de transport (Gould *et al.*, 2012 ; Srivastava *et al.*, 2008).

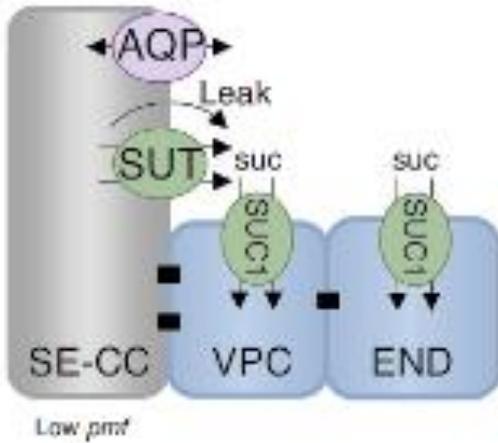
1.6 Déchargement du phloème

Le déchargement du phloème peut se faire, tout comme le chargement, de manière symplasmique ou apoplasmique. Dans la majorité des puits, le déchargement est symplasmique comme dans les pétales, les anthères, les graines (Imlau *et al.*, 1999), dans le limbe des jeunes feuilles (Roberts *et al.*, 1997, Imlau *et al.*, 1999 ; Haupt *et al.*, 2001), dans les tubercules de pomme de terre (Oparka et Santa Cruz, 2000 ; Viola *et al.*, 2001) et dans les pointes racinaires (Oparka *et al.*, 1994, Knoblauch *et al.*, 2015). Dans le reste de la plante (tiges, racines au-dessus des pointes ou pétioles) le mécanisme dominant est le déchargement apoplasmique mais les mécanismes peuvent passer de apoplasmique à symplasmique de manière réversible en fonction de la proportion d'organes source ou puits dans toute la plante (Milne *et al.*, 2018). Le déchargement du phloème au niveau des racines est plus précisément décrit dans la **partie 4.3** de ce chapitre.

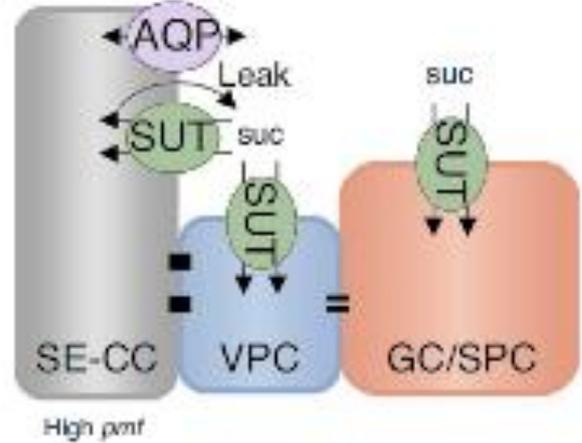
Le mécanisme symplasmique implique un continuum cytoplasmique : le saccharose passe des tubes criblés vers les cellules puits par les plasmodesmes suivant un gradient de concentration.

Il existe plusieurs mécanismes de déchargement apoplasmique du phloème (**Figure 6**) qui sont encore peu connus mais nécessitent obligatoirement des transporteurs de saccharose, soit pour la sortie du saccharose du phloème, soit pour la récupération du saccharose ou de ses produits de dégradation présents dans l'apoplasme (Milne *et al.*, 2018). Des transporteurs de type SUC pourraient être impliqués dans le déchargement du phloème (**Figure 6, (a)**) quand la force proton motrice serait faible (dans les racines) puisqu'il a été montré que ZmSUT1 (homologue d'AtSUC2 chez le maïs, *Zea mays*) pouvait avoir un rôle dans le transport vers l'extérieur des tubes criblés dans ces conditions (Carpaneto *et al.*, 2005). D'autres transporteurs de type SUC pourraient être impliqués dans la

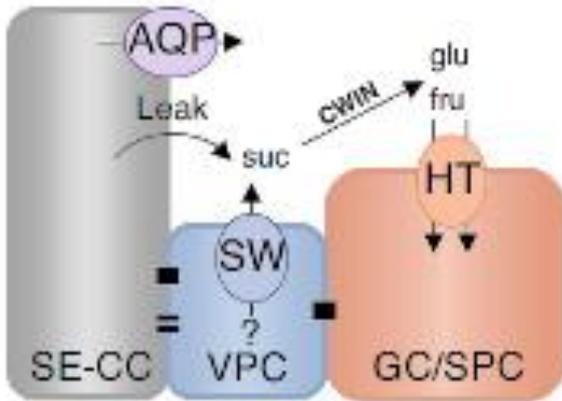
(a) Phloème de transport/déchargement dans les racines



(b) Phloème de transport dans les tiges/hampes



(c) Déchargement du phloème dans les tiges/hampes



(d) Déchargement du phloème dans les fruits charnus

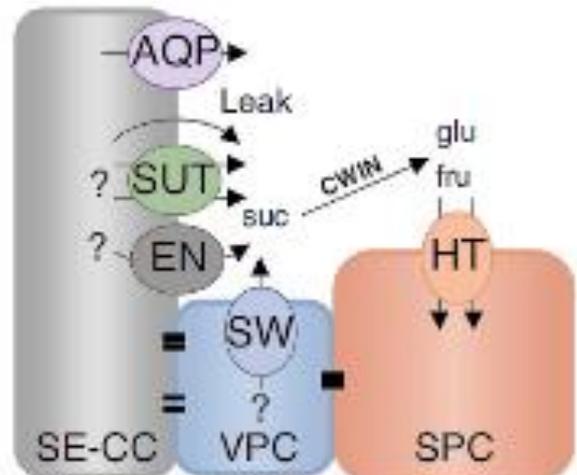


Figure 6. Mécanismes du déchargement apoplasmique du phloème (Milne *et al.*, 2018).

Les mécanismes de déchargement apoplasmique du phloème dans des puits spécifiques partagent tous une diffusion passive du saccharose et des échanges d'eau facilités pas les aquaporines (AQP).

(a) Le déchargement apoplasmique dans les racines lorsque la force proton motrice (pmf) est faible et que l'activité des transporteurs de saccharose (SUT) est inversée. La récupération du saccharose de l'apoplasme vers les cellules du parenchyme vasculaire (VPC) et l'endoderme (END) pourrait se faire grâce à SUC1.

(b) Le déchargement apoplasmique du phloème de transport de la tige peut se produire uniquement par une fuite passive. Des SUT, localisés au niveau du complexe cellules compagnes-éléments du tube criblé (SE-CC) et des VPC, pourrait être en compétition pour le saccharose apoplasmique avec des SUT présents dans d'autres types cellulaires (Ground-cell (GC) ou des cellules parenchymateuses spécialisées (SPC)).

(c) Déchargement apoplasmique du phloème de la tige par des SWEET (SW) localisés sur les VPC. Dans les tiges de monocotylédones, le saccharose déchargé est hydrolysé en hexoses (glucose et fructose) par des invertases pariétales (CWIN) et absorbé dans les GC / SPC par des symporteurs d'hexose (HT).

(d) Le déchargement apoplasmique dans les fruits charnus peut être dû à l'inversion des SUT, la présence de SW et de transporteurs actifs non identifiés (EN). Des CWIN clivent le saccharose déchargé en hexoses qui sont repris dans les SPC par les HT. Plasmodesmes ouverts : =; plasmodesmes fermés : ■.

récupération du saccharose apoplasmique, soit pour recharger le phloème, soit pour alimenter les cellules puits (**Figure 6, (a) et (b)**). Les transporteurs de type SWEET (et plus précisément AtSWEET11 et 12) pourraient avoir un rôle dans la sortie du saccharose des cellules du parenchyme phloémien (Le Hir *et al.*, 2015 ; Durand *et al.*, 2016) bordant les tubes criblés dans les cas où il y a bien une continuité symplasmique entre ces types cellulaires (**Figure 6, (c) et (d)**). Cela serait le cas dans les tiges et les fruits charnus. Enfin, des transporteurs d'hexoses pourraient être impliqués dans la récupération de sucres dans l'apoplasme après action d'invertases sur le saccharose, le clivant en glucose et fructose (**Figure 6, (c) et (d)**). Ces transporteurs d'hexoses pourraient être chez *Arabidopsis thaliana* AtSTP1, 2, 4, 6, 9, 11 et/ou 14 puisqu'ils ont tous été retrouvés dans différents organes puits (Büttner, 2007).

1.7 Répartition du carbone entre les différents puits

Le transport du saccharose à longue distance permet d'alimenter tous les organes puits en carbone nécessaire à leur métabolisme et à leur développement. Il va donc s'opérer une compétition entre les puits pour « attirer » les sucres vers eux et il va s'installer une hiérarchie en fonction du type d'organe et du stade de développement (Lemoine *et al.*, 2013). Les racines et les jeunes feuilles seront des puits majeurs durant les premiers stades de développement de la plante, alors que les tubercules, les fruits et les graines le deviendront au stade reproductif (Wardlaw, 1990 ; Durand *et al.*, 2018). Cette capacité à « attirer » les sucres du phloème, qui va permettre de hiérarchiser les puits, est nommée force du puits (ou force d'appel du puits) (Ho, 1988). Cette force du puits est la capacité d'un organe à diminuer la concentration en photoassimilats dans les éléments du tube criblé au niveau des puits, créant ainsi un gradient de concentration de solutés favorable entre le puits et la source (Wardlaw, 1990). Les deux stratégies principales pour diminuer cette concentration en saccharose sont la métabolisation ou le stockage (Bihmidine *et al.*, 2013). Pour la métabolisation, les invertases (plus que les sucroses synthases, Barratt *et al.*, 2009) vont jouer un rôle clef, clivant le saccharose en glucose et fructose, molécules directement utilisées pour le métabolisme ou la synthèse d'autres sucres (Ruan, 2014). Le stockage peut se faire directement sous forme de saccharose, comme chez la canne à sucre (*Saccharum officinarum*) et la betterave (*Beta vulgaris*, Hennion *et al.*, 2018), ou sous d'autres formes après métabolisation comme chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) sous forme d'amidon ou chez le colza (*Brassica napus*) sous forme d'acides gras et chez le soja (*Glycine max*) sous forme de protéines (Ludewig et Flügge, 2013). Des transporteurs de sucres sont potentiellement impliqués quel que soit le mécanisme, pour importer et réguler les quantités de sucres dans les différents compartiments (Kühn et Grof, 2010).

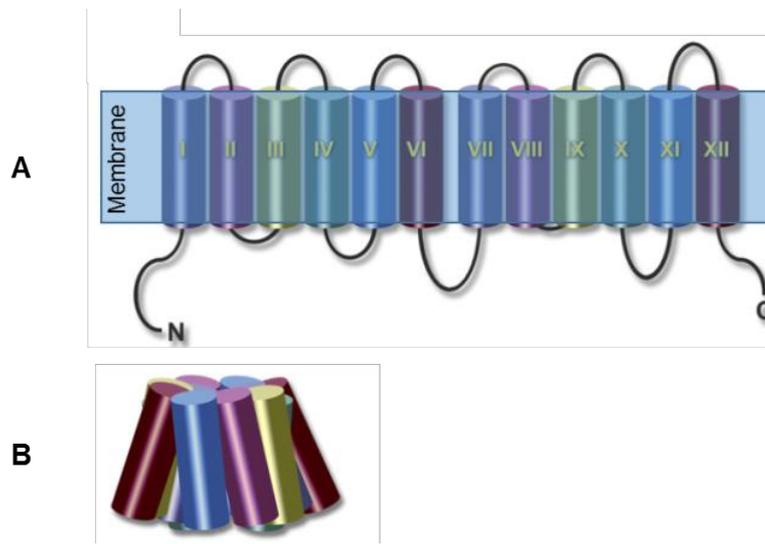


Figure 7. Représentation de la structure des SUC et MST. Adapté de Sauer, 2007.
A, Représentation linéaire des 12 segments transmembranaires. **B,** représentation 3D de la protéine.

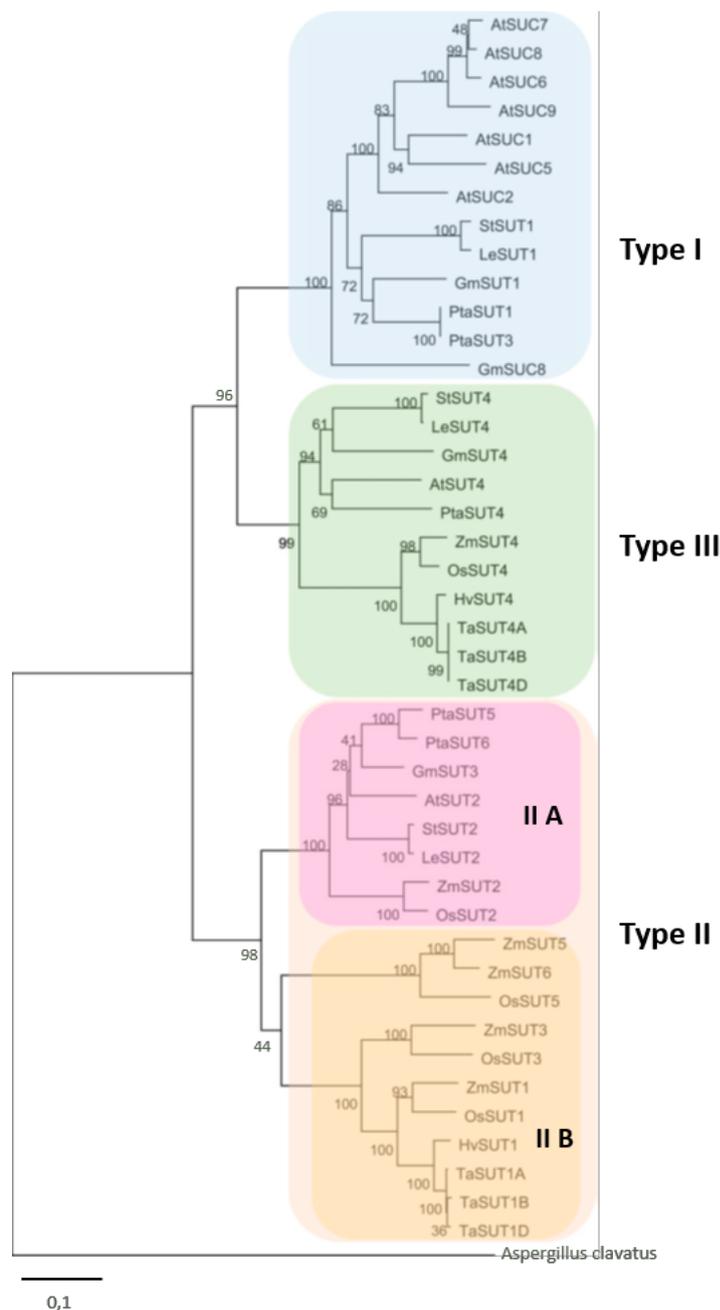


Figure 8. Arbre phylogénétique des transporteurs SUC, basé sur la similarité des séquences protéiques (Xu et al., 2018).
 Les transporteurs de types I et II B ont des fonctions similaires mais dans des espèces des dicotylédones (type I) ou de monocotylédones (type II B). Les transporteurs de type III sont majoritairement localisés sur le tonoplaste.

2 Transporteurs de sucres

Les sucres ont un rôle vital pour les végétaux supérieurs, que ce soit comme source d'énergie, comme base carbonée pour leur métabolisme ou même comme molécule signal. Les transporteurs de sucres vont donc avoir une importance capitale dans l'acheminement des sucres et dans la régulation des flux de ces sucres. Ces transporteurs transmembranaires peuvent se situer sur la membrane plasmique des cellules, sur le tonolaste des vacuoles ou sur la membrane des plastides.

Les transporteurs de sucres appartiennent à deux grandes familles. La première est la superfamille des MFS (Major Facilitator Superfamily) comprenant divers transporteurs pouvant utiliser de nombreux substrats dont les sucres. La seconde est la famille des SWEET (Sugar Will Eventually be Exported Protein) plus récemment découverte (Chen *et al.*, 2010), pouvant transporter des hexoses ou du saccharose. Dans la superfamille des MFS, deux familles transportent des sucres : la famille des SUC (Sucrose Carrier, aussi appelés SUT pour Sucrose Transporters,) transportant du saccharose et la famille des transporteurs d'hexoses MST (MonoSaccharide Transporters). Le transport de type symport substrat/H⁺ et le fait d'avoir deux unités de 6 domaines transmembranaires chacune, reliées entre elles par une boucle cytoplasmique (**Figure 7**) (Lemoine, 2000) sont les points communs entre les SUC et les MST.

2.1 Transporteurs de saccharose (SUC)

Les transporteurs de la famille des SUC sont donc tous des transporteurs membranaires de type symport saccharose/H⁺. Ils transportent le saccharose contre son gradient de concentration en utilisant la force proton-motrice, nécessitant donc de l'énergie. Le fonctionnement en sens inverse a été montré chez le maïs pour un membre de cette sous-famille, ZmSUT1 (Carpaneto *et al.*, 2005). Chez *Arabidopsis thaliana*, il existe 9 transporteurs de ce type (**Figure 8**), numérotés de 1 à 9 (Sauer, 2007). La localisation et le rôle de ces 9 transporteurs sont détaillés ci-après et récapitulés dans le **tableau 1**.

L'expression du gène *AtSUC1* a été retrouvée au niveau du pollen (Stadler *et al.*, 1999), des trichomes (Sivitz *et al.*, 2007), des racines (Sivitz *et al.*, 2007 ; Durand *et al.*, 2016), des feuilles et des hampes florales à tous les stades de développement de la plante (Durand *et al.*, 2018). *AtSUC1* aurait un rôle dans la croissance du tube pollinique et dans le contrôle de la déhiscence des anthères en lien avec la signalisation glucidique (Stadler *et al.*, 1999 ; Sivitz *et al.*, 2008). Dans les racines, *AtSUC1* est le transporteur de saccharose le plus exprimé mais son expression est régulée négativement en cas de contrainte hydrique (Durand *et al.*, 2016, Xu *et al.*, 2018). Toujours dans les racines, Sivitz *et al.* (2008) ont montré que *AtSUC1* est plus fortement exprimé lorsque du saccharose est présent dans le milieu *in vitro*, suggérant une régulation par son substrat. De plus, la présence de saccharose dans le milieu

Tableau 1. Récapitulatif des principales informations sur les transporteurs de saccharose de la famille des SUC.

Nom	Localisation subcellulaire	Localisation tissulaire	Principaux rôles	Rôles putatifs	Références
AtSUC1	Membrane plasmique	Pollen, trichomes, racines, feuilles, hampes florales	Croissance du tube pollinique, contrôle de la déhiscence des anthères	Senseur	Sauer et Stolz, 1994; Stadler <i>et al.</i> , 1999; Sivitz <i>et al.</i> , 2007; Sivitz <i>et al.</i> , 2008; Durand <i>et al.</i> , 2018
AtSUC2	Membrane plasmique	Feuilles, hampes florales, sépales, siliques, racines	Chargement du phloème, récupération du saccharose le long du phloème	Déchargement du phloème dans certains cas	Sauer et Stolz, 1994; Truernit et Sauer, 1995; Stadler et Sauer, 1996; Gottwald <i>et al.</i> , 2000; Carpaneto <i>et al.</i> , 2005; Srivastava <i>et al.</i> , 2008; Srivastava <i>et al.</i> , 2009; Gould <i>et al.</i> , 2012; Wippel et Sauer, 2012; Durand <i>et al.</i> , 2016; Durand <i>et al.</i> , 2018
AtSUC3	Membrane plasmique	Feuilles, hampes florales, siliques, racines, cellules de garde, trichomes, pollen	-	Récupération du saccharose le long du phloème, senseur	Barker <i>et al.</i> , 2000; Meyer <i>et al.</i> , 2000; Meyer <i>et al.</i> , 2004; Durand <i>et al.</i> , 2018
AtSUC4	Membrane tonoplasmique	Stèle racinaire, anthères, méristèmes des parties aériennes	Efflux de saccharose de la vacuole vers le cytoplasme	Induction de la germination des graines	Endler <i>et al.</i> , 2006; Schulz <i>et al.</i> , 2011; Li <i>et al.</i> , 2012; Schneider <i>et al.</i> , 2012; Durand <i>et al.</i> , 2016
AtSUC5	Membrane plasmique	Graines, feuilles, racines	Transport de biotine dans l'embryon		Baud <i>et al.</i> , 2005; Pommerrenig <i>et al.</i> , 2013; Durand <i>et al.</i> , 2016
AtSUC6	Membrane plasmique	Tissus reproducteurs	-	Chargement de saccharose et maltose dans les tubes polliniques	Sauer <i>et al.</i> , 2004; Rottmann <i>et al.</i> , 2018
AtSUC7	Membrane plasmique	-	Pseudogène	-	Sauer <i>et al.</i> , 2004; Rottmann <i>et al.</i> , 2018
AtSUC8	Membrane plasmique	Tissus floraux	-	-	Sauer <i>et al.</i> , 2004
AtSUC9	Membrane plasmique	Tissus floraux	Implication dans l'accumulation d'ABA	-	Sauer <i>et al.</i> , 2004; Sivitz <i>et al.</i> , 2007; Jia <i>et al.</i> , 2015; Durand <i>et al.</i> , 2018

entraîne une augmentation de l'expression des gènes de synthèse d'anthocyanes (Solfanelli *et al.*, 2006), ce qui n'est pas le cas chez le mutant KO *suc1*. Ceci suggérerait un rôle potentiel d'AtSUC1 en tant que senseur du signal saccharose (Sivitz *et al.*, 2008), comme par exemple en cas de stress hydrique, qui est connu pour engendrer une accumulation d'anthocyanes dans les feuilles (Sperdoui et Moustakas, 2012). Enfin, il a été mis en évidence une régulation négative d'AtSUC1 par la signalisation de l'acide abscissique (ABA) par le facteur de transcription ABI5 (Hoth *et al.*, 2010). L'ABA participe à la réponse à différents stress dont la carence hydrique.

Pour le transporteur de saccharose AtSUC2 (SUT1 chez les Solanacées), l'expression du gène chez *Arabidopsis thaliana* a été relevée au niveau des feuilles, des hampes florales, des sépales, des siliques et des racines (Truernit et Sauer, 1995) à tous les stades de développement (Durand *et al.*, 2018). AtSUC2 est le deuxième transporteur de saccharose le plus exprimé dans les racines et son expression est régulée positivement en carence hydrique (Durand *et al.*, 2016). L'affinité d'AtSUC2 pour le saccharose (Sauer et Stolz, 1994) est supérieure à celle d'AtSUC3 (SUT2, Schulze *et al.*, 2000) et d'AtSUC4 (SUT4, Weise *et al.*, 2000). Dans les feuilles, AtSUC2 est plus précisément localisé sur la membrane plasmique des cellules compagnes du phloème (Stadler et Sauer, 1996). Ce transporteur permet le chargement du saccharose de l'apoplasme vers les cellules compagnes (Stadler et Sauer, 1996 ; Gottwald *et al.*, 2000), comme expliqué dans la **partie 1.4** de ce chapitre. Cette fonction est très importante dans la plante puisque chez le mutant KO *suc2*, un retard de croissance très important (au niveau des organes source et puits) et une accumulation de sucres solubles et d'amidon au niveau des feuilles sont observés (Gottwald *et al.*, 2000 ; Srivastava *et al.*, 2008). Ce mutant, longtemps considéré comme létal, peut dans certains cas accomplir son cycle de développement et produire une faible quantité de graines (Srivastava *et al.*, 2009 ; ainsi que notre expérience au laboratoire). Comme expliqué dans la **partie 1.5**, AtSUC2 a aussi un rôle dans la collecte du saccharose « s'échappant » le long du phloème de transport (Gould *et al.*, 2012 ; Srivastava *et al.*, 2008). Enfin, des travaux sur l'homologue d'AtSUC2 chez le maïs (*Zea mays*), ZmSUT1, montrent un rôle potentiel de cette protéine dans le déchargement du saccharose au niveau des racines, lorsque la force proton motrice est faible (Carpaneto *et al.*, 2005). Les gènes *AtSUC1* et *AtSUC2* ont des séquences proches : lorsque la séquence d'*AtSUC1* sous le contrôle du promoteur *AtSUC2* a été insérée dans le mutant KO *suc2*, le phénotype sauvage a été rétabli (Wippel et Sauer, 2012).

AtSUC3 (SUT2) est exprimé dans les feuilles, les racines, les hampes florales et les siliques (Durand *et al.*, 2018) mais aussi dans les cellules de garde, les trichomes, les grains de pollen et les pointes racinaires (Meyer *et al.*, 2004 ; Meyer *et al.*, 2000). AtSUC3 est moins exprimé qu'AtSUC1 et AtSUC2 dans les racines et dans les feuilles (Durand *et al.*, 2018). La protéine AtSUC3 a été localisée dans les éléments du tube criblé du phloème. Cette localisation implique un rôle potentiel dans la

récupération du saccharose lors du transport à longue distance (Meyer *et al.*, 2004). Le gène codant la protéine AtSUC3 est induit en cas de blessure (Meyer *et al.*, 2004). Enfin, Barker *et al.* (2000) présentent AtSUC3 comme un potentiel senseur du saccharose.

L'expression du gène *AtSUC4 (SUT4)* a été retrouvée au niveau de la stèle de la racine, des anthères en développement et des tissus méristématiques des parties aériennes (Durand *et al.*, 2016 ; Schneider *et al.*, 2012). Au niveau subcellulaire, AtSUC4 est localisé sur la membrane tonoplastique (Endler *et al.*, 2006), où elle serait responsable de l'efflux de saccharose de la vacuole vers le cytosol (Schulz *et al.*, 2011). De plus, AtSUT4 participerait positivement à lever l'inhibition de la germination de la graine, induite par le saccharose/glucose (Li *et al.*, 2012).

L'expression d'*AtSUC5* est particulièrement localisée dans les graines en développement, au niveau de l'endoderme (Baud *et al.*, 2005). L'expression d'*AtSUC5* est aussi retrouvée faiblement au niveau des feuilles et des racines (Durand *et al.*, 2016). Le mutant KO *suc5* présente un retard de développement de l'embryon et une diminution transitoire des triacylglycérols (Baud *et al.*, 2005). Ceci peut être expliqué par le fait qu'*AtSUC5* transporte aussi de la biotine (Pommerrenig *et al.*, 2013), nécessaire à la synthèse de triacylglycérols utilisés par l'embryon.

Les gènes *AtSUC6*, *AtSUC7* et *AtSUC8* partagent un haut degré d'homologie de séquence tant au niveau de la partie codante qu'au niveau des introns et des extrémités 5' et 3' (Sauer *et al.*, 2004). Cependant, *AtSUC6* et *AtSUC7* ont été montrés comme non fonctionnels en 2004 (Sauer *et al.*), mais une étude récente valide le fait que *AtSUC7* est un pseudogène (sans fonction de transport *a minima*), mais prouve qu'*AtSUC6* transporte bien du saccharose ainsi que du maltose et ce, à un pH particulièrement faible (Rottmann *et al.*, 2018). De plus, *AtSUC6* est exprimé fortement dans les tissus reproducteurs où il pourrait avoir un rôle dans le chargement du saccharose dans les tubes polliniques.

AtSUC8 et *AtSUC9* sont tous les deux fonctionnels et sont exprimés au niveau des tissus floraux (Sauer *et al.*, 2004). De plus, *AtSUC9* est exprimé dans hampes florales à tous les stades de développement (Durand *et al.*, 2018). Le mutant KO *suc9* présente une floraison précoce suggérant un rôle d'*AtSUC9* induisant un retard de floraison (Sivitz *et al.*, 2007). *AtSUC9* possède une faible spécificité de substrats et transporte un grand nombre de glucosides (Sivitz *et al.*, 2007). Enfin, *AtSUC9* est induit par des niveaux faibles de saccharose et il régulerait la distribution de saccharose et induirait l'accumulation d'ABA pour améliorer la résistance aux stress abiotiques (Jia *et al.*, 2015).

Les transporteurs de saccharose de type SUC sont régulés au niveau post-traductionnel, leurs ARNm ont une durée de vie courte, permettant une réponse rapide et sont régulés entre-autre par les rythmes circadiens et la qualité de la lumière (pour revue Liesche *et al.*, 2011). De plus, Il a été montré

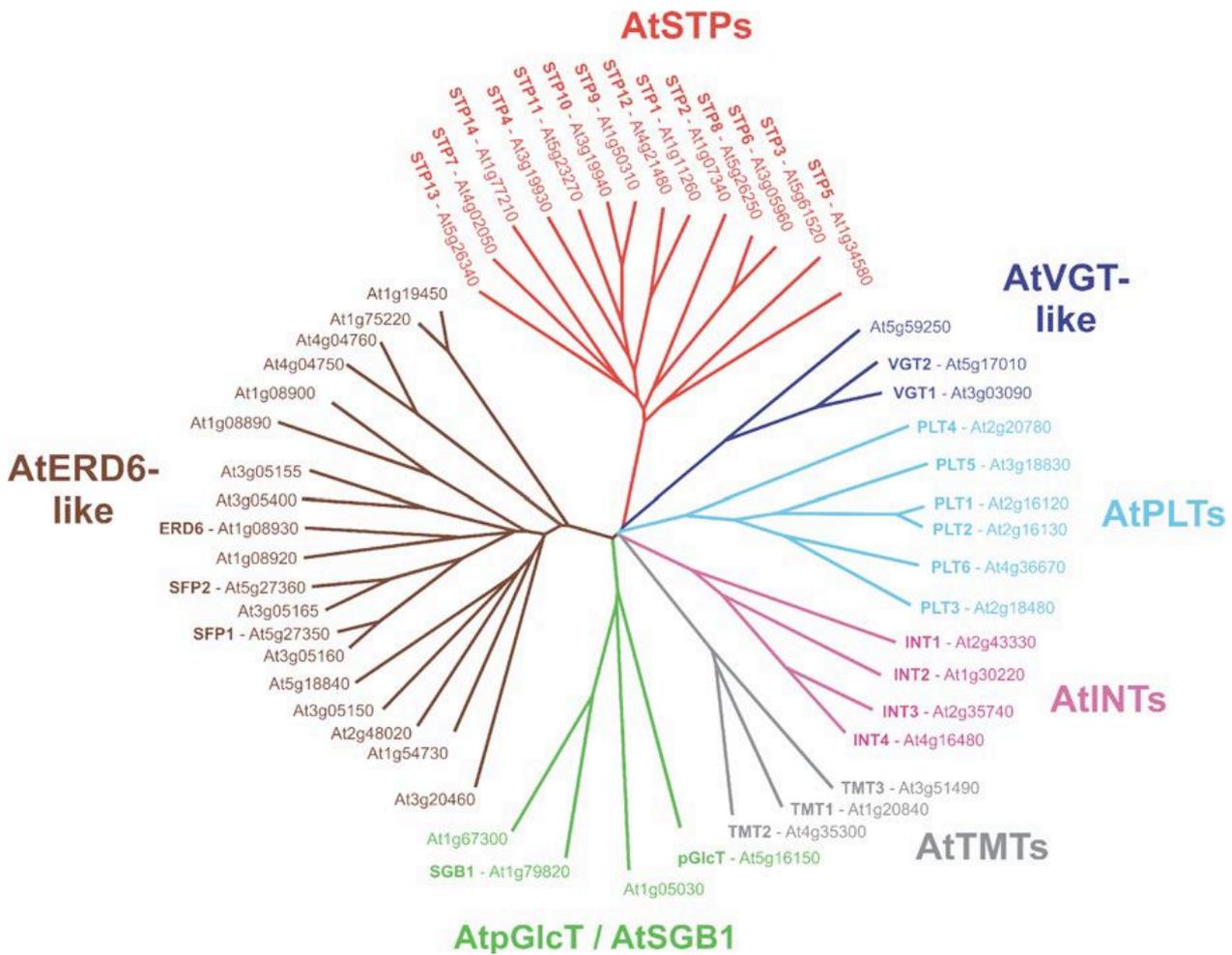


Figure 9. Arbre phylogénétique des transporteurs de monosaccharides identifiés chez *Arabidopsis thaliana* (Büttner, 2007).

Les 53 séquences protéiques sont regroupées en 7 sous-familles : les AtSTPs (Sugar Transport Proteins), les AtVGT-like (Vacuolar Glucose Transporters), les AtPLT (Polyols Transporters), les AtINTs (Inositol Transporters), les AtTMTs (Tonoplast Monosaccharide Transporters, nouvellement appelée TST, Tonoplast Sugar Transporter), les AtpGlcT/AtSGB1 (Plastidic Glucose Transporter/Suppressor of G protein B1) et les AtERD6-like (Early Responsive to Dehydration).

que ces ARNm pouvaient se déplacer par les plasmodesmes et pouvaient être retrouvés dans la sève phloémienne. Une régulation post-transcriptionnelle de ces transporteurs est aussi possible. En effet, il a été montré que la durée de vie des protéines pouvait être modifiée par des facteurs environnementaux. Enfin, des interactions protéine-protéine ont été montrés sur les transporteur de saccharose de type SUC, ce qui indique aussi une régulation post-transcriptionnelle (Krügel et Kühn, 2013).

2.2 Transporteurs d'hexoses (MST)

Les transporteurs de la famille des MST sont impliqués dans la répartition subcellulaire des hexoses, notamment dans les organes puits où leur expression est élevée (Büttner, 2007). Ces transporteurs sont très nombreux ; chez *Arabidopsis thaliana* il a été retrouvé 53 gènes, classés en 7 familles (**Figure 9**) (Büttner, 2007).

La sous-famille des AtSTP (Sugar Transporteur Protein) est la sous-famille la mieux caractérisée. Elle est composée chez *Arabidopsis thaliana* de 14 membres (notés d'AtSTP1 à AtSTP14), (Büttner, 2010). Ils sont tous localisés sur la membrane plasmique et participent à l'influx d'hexose, de l'apoplasme vers le cytosol. La majorité transporte du glucose et du galactose, mais certains vont aussi transporter du mannose, du fructose ou du xylose. Certains ont un rôle dans les réponses aux stress biotiques, comme *AtSTP13* dont l'expression est induite en cas d'infection par des pathogènes (Lemonnier *et al.*, 2014 ; Veillet *et al.*, 2017).

Les polyols, formes réduites d'oses non réducteurs, ne sont pas présents dans le phloème d'*Arabidopsis thaliana* (Klepek *et al.*, 2005). Toutefois, la sous-famille AtPMT (Polyols/Monosaccharides Transporter) est composée de 6 gènes possédant des homologies de séquence avec des transporteurs de polyols d'autres espèces, notés *AtPMT1* à 6 (Büttner, 2007). Seuls AtPMT1, 2 et 5 ont été caractérisés comme des symporteurs couplés à un gradient de protons (Reinders *et al.*, 2005 ; Klepek *et al.*, 2004 ; Klepek *et al.*, 2010). Ils transportent un large spectre de substrats tels que le sorbitol, l'inositol, le glucose, le fructose ou encore les sucres en C5. Cette faible spécificité de substrat peut impliquer de nombreux rôles potentiels au sein de la plante. Etant donné que peu de AtSTPs transportent efficacement le fructose, les AtPMTs pourraient ainsi avoir un rôle dans le transport de ce sucre, notamment au niveau de tissus où une forte activité des invertases pariétales est notable.

La sous-famille des AtERD6-like (Early Response to Dehydration six-like) est représentée par 19 membres chez *Arabidopsis thaliana* (Büttner, 2007 ; Slewinski, 2011). Elle est encore très peu étudiée, seuls six membres ont été partiellement caractérisés.

La sous-famille des INT (Inositol Transporter) est représentée par quatre protéines chez *Arabidopsis thaliana* (AtINT1 à 4). AtINT1 est localisé sur la membrane tonoplastique (Büttner, 2007) tandis qu'AtINT2 et 4 sont localisés sur la membrane plasmique (Schneider *et al.*, 2006 ; Schneider *et al.*, 2007). AtINT3 code une protéine tronquée et est donc considéré comme un pseudogène (Schneider *et al.*, 2007).

La sous-famille AtTST (Tonoplast Sugar Transporter), anciennement appelée AtTMT, comprend 3 membres, tous localisés sur le tonoplaste chez *Arabidopsis thaliana* (Endler *et al.*, 2006 ; Büttner, 2007). Ils sont de type antiport sucre/H⁺ permettant l'import d'hexoses et de saccharose dans la vacuole (Schulz *et al.*, 2011). Les AtTSTs ont un rôle dans l'allocation du carbone entre tissus sources et puits (Wingenter *et al.*, 2010).

La sous-famille des AtVGT (Vacuolar Glucose Transporter) est composée de 3 membres (AtVGT1 à 3), très proches des AtSTP (Aluri et Büttner, 2007 ; Büttner, 2007). AtVGT1 et 2 sont localisés sur le tonoplaste et participent à l'import de glucose et de fructose grâce à un système d'antiport sucre/H⁺ (Aluri et Büttner, 2007). Avec les AtTST, ce sont les seules sous-familles des MST pour lesquelles il a été démontré que ce n'était pas des symporteurs. Enfin, AtVGT3 serait localisé sur la membrane des plastes (Büttner, 2007).

Pour finir, la sous-famille des AtpGlucT (Plastidic Glucose Transporter) participe à l'export de sucres produits par la dégradation de l'amidon des chloroplastes vers le cytoplasme dans les feuilles (Cho *et al.*, 2011). AtpGlucT est situé au niveau de la membrane chloroplastique et transporte du glucose (Weber *et al.*, 2000). Il est aussi exprimé dans des tissus hétérotrophes, suggérant un autre rôle que l'export dans ces tissus. Il pourrait en effet être impliqué dans l'import de carbone dans certains tissus hétérotrophes (ex : statolithes dans les pointes racinaires) (Fischer et Weber, 2002).

2.3 Transporteurs de type SWEET (Sugar Will Eventually be Exported Transporter)

Même si depuis les années 70 un efflux de sucres ne nécessitant pas d'énergie avait été envisagé, ce n'est que relativement récemment que les acteurs impliqués ont été identifiés (Chen *et al.*, 2010) : les SWEETs. Ces transporteurs sont retrouvés dans tout le vivant, chez les animaux et les végétaux où ils sont proches mais aussi chez les bactéries où ils sont nommés SemiSWEET de par leur taille protéique inférieure (uniquement trois domaines transmembranaires, Feng et Frommer, 2015). Les SWEETs diffèrent notamment des transporteurs MFS par leur structure. En effet, ceux-ci ont 7 domaines transmembranaires (**Figure 10**) contre 12 pour les MFS. Les SemiSWEET ont seulement 3 domaines transmembranaires (**Figure 10, A**) et la structure des SWEET peut laisser penser à une fusion

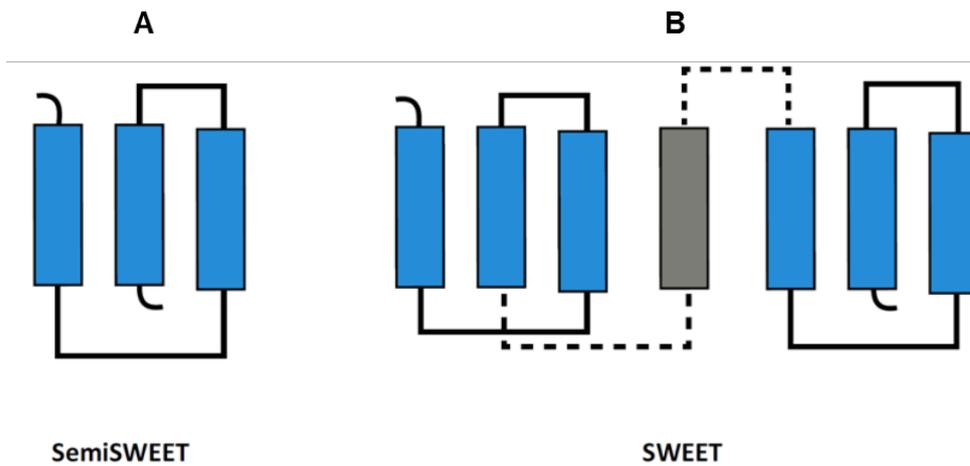


Figure 10. Représentation de la structure des SemiSWEETs et des SWEETs (Feng et Frommer, 2015).

A, Les semiSWEETs sont formés de trois hélices transmembranaires. B, Les SWEETs sont composés de sept hélices transmembranaires, formés par deux SemiSWEETs reliés par une hélice.

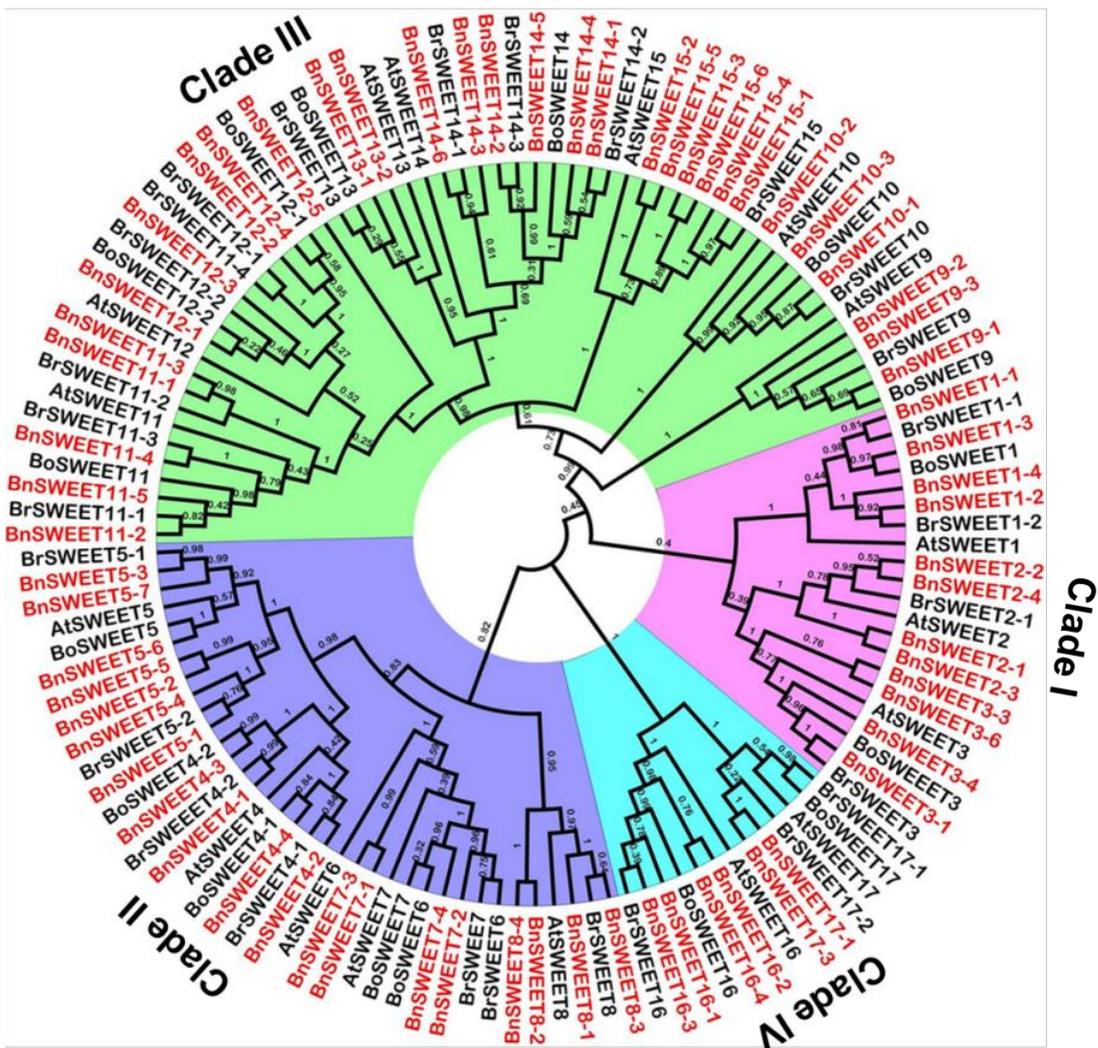


Figure 11. Arbre phylogénétique des protéines SWEET chez *Arabidopsis thaliana*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa* et *Brassica napus* (Jian et al., 2016).

Les transporteurs des clades I, II et IV transportent majoritairement des hexoses. Les transporteurs du clade III transportent majoritairement du saccharose.

de deux SemiSWEET (**Figure 10, B**) lors de l'évolution (Chen *et al.*, 2010). Hu *et al.* (2016) ont confirmé cette hypothèse. Les SWEETs sont des uniporteurs de type facilitateurs, fonctionnant de manière bidirectionnelle et permettant un transport de sucres à travers les membranes plasmiques ou tonoplastiques. Chez *Arabidopsis thaliana*, on retrouve 17 membres de cette famille, notés de AtSWEET1 à 17 (Chen *et al.*, 2010) et divisés en 4 clades (**Figure 11**). Les clades I, II (AtSWEET1 à 8) et IV (AtSWEET16 et 17) transportent majoritairement des hexoses et le clade III (AtSWEET9 à 15) du saccharose même si certains transportent aussi des hexoses (Feng et Frommer, 2015 ; Le Hir *et al.*, 2015). Les transporteurs AtSWEET ont principalement été localisés sur la membrane plasmique : AtSWEET1, 8, 9, 11, 12 et 15 (Chen *et al.*, 2010 ; Chen *et al.*, 2012 ; Chen *et al.*, 2015 ; Lin *et al.*, 2014 ; Seo *et al.*, 2011) mais aussi sur l'appareil de Golgi : AtSWEET 9 et 15 ou sur le tonoplaste : AtSWEET2, 16 et 17 (Chardon *et al.*, 2013 ; Klemens *et al.*, 2013 ; Chen *et al.*, 2015). Ne seront détaillés ici que quelques exemples des rôles des SWEETs des clades III et IV.

Les SWEETs sont impliqués dans de nombreux et divers phénomènes physiologiques. AtSWEET9 est requis pour la sécrétion du nectar en transportant le saccharose vers l'apoplasme où il est clivé en glucose et fructose utilisés pour former le nectar (Lin *et al.*, 2014). Le rôle primordial d'AtSWEET11 et 12 dans le chargement apoplasmique du phloème (Chen *et al.*, 2012) a déjà été évoqué dans la **partie 1.4** de ce chapitre. Le double mutant KO *sweet11/sweet12* présente un léger retard de développement ainsi qu'une accumulation d'amidon et de sucres solubles dans les feuilles (Chen *et al.*, 2012). Ces phénotypes sont bien moins importants que ceux observés pour le mutant KO *suc2* (Gottwald *et al.*, 2000). Ceci suggère l'induction ou l'activité native d'autres AtSWEET permettant de transporter le saccharose vers l'apoplasme. L'idée est soutenue par le fait que des AtSWEETs sont très proches de AtSWEET11 et 12 au niveau des séquences protéiques et présentent des redondances fonctionnelles, tel que AtSWEET13 qui semble surexprimé chez le double mutant *sweet11/sweet12* (Chen *et al.*, 2012). AtSWEET11 et AtSWEET12 sont aussi importants pour l'export des sucres (saccharose, glucose et fructose) requis pour la formation de la paroi lors du développement vasculaire de la hampe florale (Le Hir *et al.*, 2015). AtSWEET11 est le transporteur de type SWEET du clade III le plus exprimé dans les feuilles, de plus il est régulé positivement par la carence hydrique (Durand *et al.*, 2016). Dans les racines, AtSWEET11 et AtSWEET13 sont tous deux régulés positivement par la carence hydrique de manière très importante (Durand *et al.*, 2016). Au niveau de la graine, AtSWEET11, 12 et 15 semblent avoir un rôle important dans le chargement de sucres dans l'embryon. En effet, chez le triple mutant *sweet11/12/15*, de l'amidon s'accumule dans l'enveloppe de la graine mais pas dans l'embryon (Chen *et al.*, 2015). AtSWEET13 et 14 auraient un rôle dans la régulation des réponses physiologiques liées aux gibbérellines (Kanno *et al.*, 2016). Chez le maïs (*Zea mays*) ce sont les trois paralogues de ZmSWEET13 (a, b et c) qui sont directement impliqués dans l'efflux de saccharose dans

l'apoplasme pour le chargement du phloème (Bezruczyk *et al.*, 2018). Dans les feuilles, *AtSWEET15* est surexprimé en cas de déficit hydrique (Durand *et al.*, 2016). Ce gène a longtemps été nommé SAG29 (Senescence-Associated Gene 29) et est utilisé comme marqueur de la sénescence, le nombre de transcrits augmentant avec ce phénomène (Seo *et al.*, 2011). Les SWEETs auraient un rôle dans la disponibilité des sucres pour les pathogènes (Chen *et al.*, 2010). Par exemple, chez le riz (*Oryza sativa*) *OsSWEET11* est induit par une molécule du pathogène *Xoo* (*Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*), augmentant la sécrétion de sucres dans l'apoplasme, créant ainsi un environnement propice au développement du pathogène. Ce phénomène existerait aussi pour *OsSWEET 13* et *14*, encore une fois avec le pathogène *Xoo* (Chen 2014). La surexpression du transporteur vacuolaire *AtSWEET16* améliore la germination et la tolérance au froid (Klemens *et al.*, 2013). *AtSWEET17* est exprimé dans le parenchyme et les tissus vasculaires où il est localisé au niveau de la vacuole. Il fonctionne comme un transporteur de fructose exportant le fructose de la vacuole et contrôlant ainsi le contenu en fructose dans les feuilles (Chardon *et al.*, 2013). Le mutant *sweet17* présente un retard de croissance et une plus faible production de graines, faisant de *AtSWEET17* un transporteur impliqué dans l'allocation des sucres dans la plante (Chardon *et al.*, 2013).

3 Déficit hydrique

Le contexte actuel de changement climatique risque de provoquer de plus grands épisodes de sécheresse sur certaines zones de la planète. L'étude des réponses des plantes à la sécheresse est un point clef pour l'avenir de l'agronomie voire de l'humanité. La sécheresse se traduit par un déficit hydrique qui peut être défini comme un manque d'eau disponible pour les plantes. Le potentiel hydrique du sol va diminuer et l'eau sera moins facilement absorbable par les racines. Les racines vont percevoir la diminution du potentiel hydrique du sol et la plante va pouvoir mettre en place des réponses moléculaires, biochimiques, physiologiques et morphologiques pour limiter l'impact de la carence hydrique et continuer à se développer dans cet environnement. Ce phénomène de réponse d'un individu à une contrainte afin de pouvoir survivre et grandir dans un environnement malgré le stress s'appelle l'acclimatation.

Le déficit hydrique peut être aussi un outil permettant d'étudier les relations sources-puits au sein de la plante. En effet, le déficit hydrique est connu pour modifier les relations sources-puits pour le carbone au niveau des rosettes et des racines (Muller *et al.*, 2011 ; Lemoine *et al.*, 2013 ; Durand *et al.*, 2016).

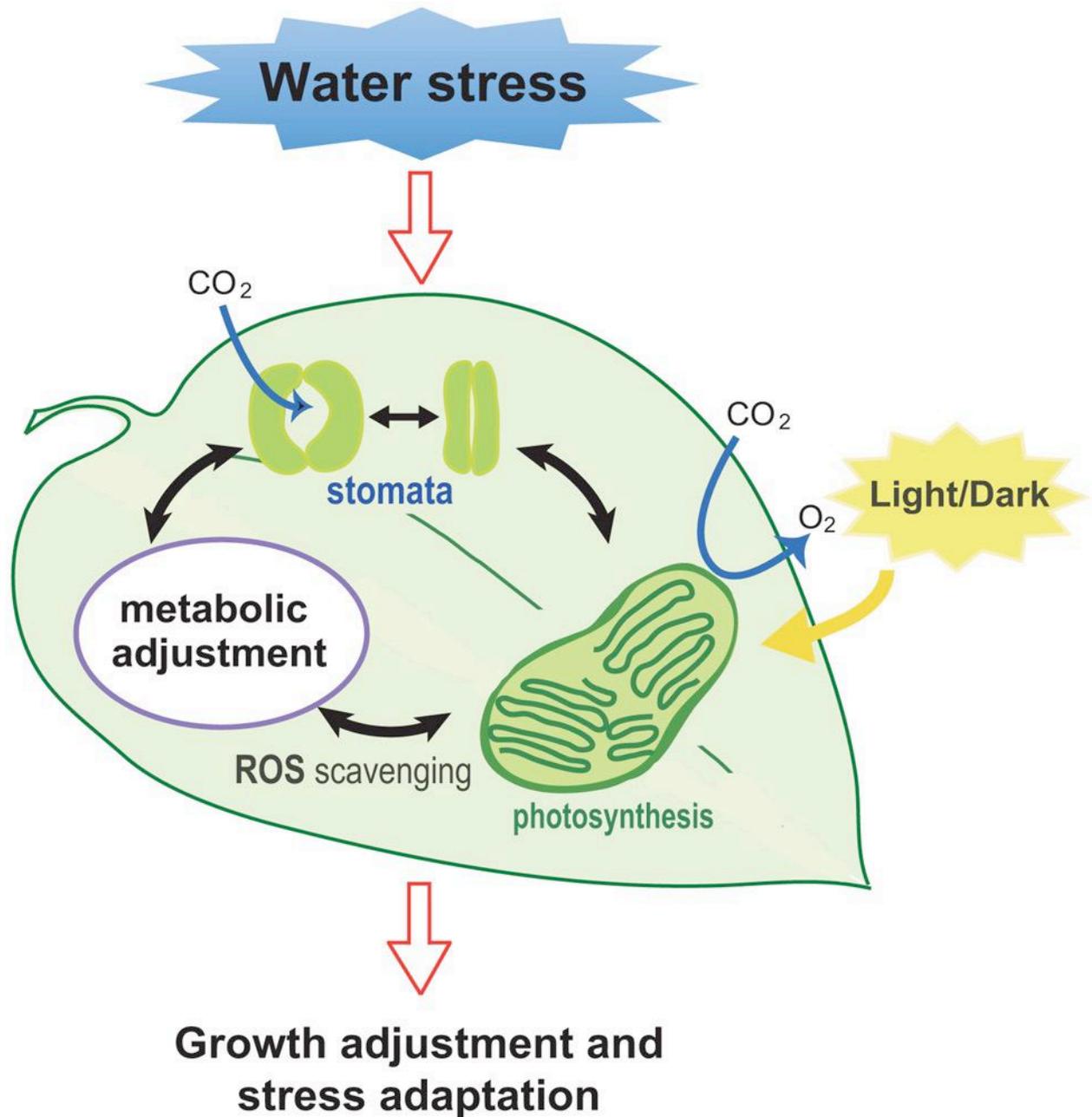


Figure 12. Illustration de la réponse foliaire des plante à la carence hydrique (Osakabe *et al.*, 2014).

La réponse des stomates, le piégeage des ROS (Reactive oxygen species : dérivés réactifs de l'oxygène), les changements métaboliques et photosynthétiques sont tous impliqués dans la réponse à la carence hydrique. Cette réponse collective mène à une diminution du développement foliaire.

Les travaux présentés dans la suite de cette thèse utiliseront le déficit hydrique comme outil d'étude des relations source-puits.

Les réponses précoces à la contrainte hydrique vont permettre la survie de la plante à court terme, mais l'acclimatation faisant appel à de nouvelles capacités structurelles et métaboliques régulées par la modification de l'expression de gènes, va permettre à la plante de se développer sous la contrainte hydrique (Chaves *et al.*, 2002).

Il existe des plantes adaptées aux milieux secs (et donc adaptées à vivre avec peu de ressources en eau), comme les xérophytes, qui ont au cours de l'évolution adapté leur anatomie et leur fonctionnement afin de résister à ces conditions. D'autres plantes vont avoir un cycle de vie court afin d'éviter les périodes de sécheresse régulières. Nous n'approfondirons pas ces deux aspects et nous nous focaliserons sur les mécanismes d'acclimatation des plantes en général.

3.1 Réponses au niveau des feuilles

En cas de carence hydrique les plantes vont très rapidement fermer leurs stomates, ce qui va limiter les pertes d'eau par transpiration (Chaves *et al.*, 2003). Ce phénomène est déclenché après la perception de la diminution du potentiel hydrique du sol par les racines. Le signal est transmis des racines vers les feuilles par une voie de signalisation impliquant l'ABA (Davies et Zhang, 1991). Cette fermeture des stomates va avoir des conséquences négatives pour la plante : une diminution de l'absorption de CO₂ mais aussi une augmentation de la température des feuilles. La diminution de l'entrée de CO₂ dans la feuille va en plus entraîner la diminution de l'activité photosynthétique (**Figure 12**), ce qui va provoquer une augmentation des dérivés réactifs de l'oxygène (Reactive Oxygène Species, ou ROS) qui ont un effet négatif sur les cellules (Osakabe *et al.*, 2014). Ces ROS sont formés suite à la limitation en CO₂ pour la photosynthèse, qui entraîne une diminution de la régénération du NADP⁺ (cycle de Calvin, **Figure 2**), ce qui engendre un excès d'électron qui vont donc créer les ROS (Cruz de Carvalho, 2008). Des ajustements métaboliques vont avoir lieu pour permettre de limiter la propagation et la toxicité des ROS.

Une réduction de la surface foliaire est aussi observée lors de la contrainte hydrique. Celle-ci peut s'expliquer par plusieurs facteurs. D'une part, le déficit hydrique va entraîner une diminution de la pression de turgescence (moteur de la croissance cellulaire) des cellules foliaires, ce qui va diminuer la taille des cellules (Tardieu, 2013). D'autre part, les parois cellulaires sont moins extensibles en cas de carence hydrique, ce qui diminue aussi la croissance cellulaire (Tardieu, 2013). Enfin, le taux de division cellulaire est diminué (Tardieu, 2013). La réduction de la surface foliaire va aussi engendrer la réduction de la transpiration foliaire.

Ces phénomènes vont avoir pour impact de limiter la production mais aussi la consommation de sucres dans les feuilles (Muller *et al.*, 2011), ce qui va conduire à une balance positive de carbone dans les feuilles (Hummel *et al.*, 2010). L'augmentation de la disponibilité des sucres va avoir un impact sur l'ajustement osmotique en réponse au déficit hydrique mais aussi sur la disponibilité des sucres nécessaire à la croissance racinaire.

3.2 Réponses au niveau cellulaire

Au niveau cellulaire, l'ajustement osmotique est un mécanisme majeur de tolérance à la contrainte hydrique (Morgan, 1984). Le principe est d'accumuler des molécules de faible poids moléculaire afin de diminuer le potentiel hydrique et limiter l'efflux d'eau des cellules, voire de créer un influx d'eau dans les cellules (Hare *et al.*, 1998). Ceci va permettre de maintenir une pression de turgescence nécessaire à l'expansion cellulaire. Ces molécules de faible poids moléculaire peuvent être des ions, des acides aminés ou des sucres (Chaves *et al.*, 2003). Ils participeraient aussi à la protection des structures cellulaires et à l'intégrité des protéines (Hare *et al.*, 1998). Chez *Arabidopsis thaliana* ce sont principalement du saccharose et des hexoses qui sont accumulés au niveau des feuilles lors de contraintes hydriques (Hummel *et al.*, 2010 ; Durand *et al.*, 2016).

3.3 Réponses au niveau des racines

Les racines sont les premiers organes à être confrontés à la carence hydrique, puisque ce sont elles qui vont percevoir la diminution du potentiel hydrique du sol. Ensuite un signal dépendant de l'ABA va entraîner différentes réponses dans la plante, comme la fermeture des stomates dans les feuilles ou la réduction de la surface foliaire. Mais il va y avoir aussi des réponses au niveau des racines, celles-ci sont dépendantes de l'intensité du stress mais aussi de sa durée. En cas de carence hydrique, la croissance des racines est toujours moins impactée que celle des feuilles (Chaves *et al.*, 2002) voire augmentée dans certain cas (Sharp et Davies, 1989). Cette différence d'impact va augmenter le rapport entre le poids des racines et le poids des feuilles (« root/shoot ratio ») (Verslues *et al.*, 2006). Ceci est confirmé par le fait qu'en cas de déficit hydrique, plus de carbone est transporté vers les racines afin de fournir le carbone nécessaire au développement des racines (Durand *et al.*, 2016). La croissance foliaire va être complètement inhibée dans le cas d'une carence hydrique relativement faible (-0,5 MPa) alors que la croissance de la racine principale va être active au moins jusqu'à -1,5 MPa (stress hydrique fort) (Sharp *et al.*, 2004). Même si la formation de primordia de racines latérales est maintenue en cas de carence hydrique (Deak et Malamy, 2005), l'élongation des racines latérales est réprimée en cas de stress hydrique fort (Van der Weele *et al.*, 2000 ; Roycewicz et Malamy, 2012). Des

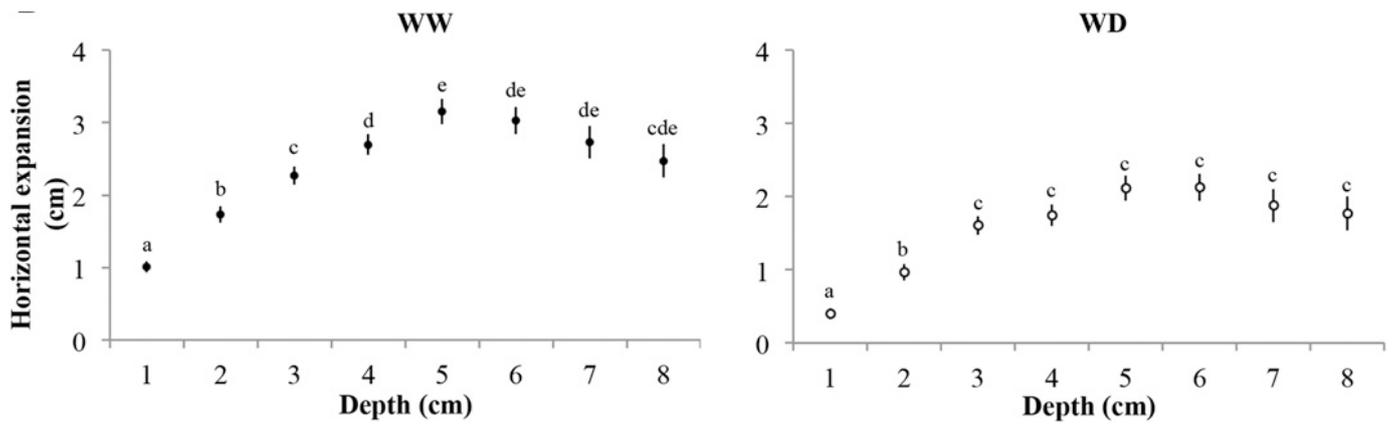


Figure 13. Evolution de l'expansion horizontale de la forme moyenne du système racinaire dans les plantes en fonction de l'état hydrique du sol (Durand *et al.*, 2016).

Toutes les mesures ont été effectuées sur des plantes **WW** (Well Watered (condition hydrique témoin), points noirs) et **WD** (Water Deficit (Condition de carence hydrique), points blancs) à 30 jours après le semis. L'analyse a été moyennée d'un côté de la racine en rassemblant les données des côtés gauche et droit avec une résolution de 1 cm de profondeur. L'ensemble de données utilisé comprend 32 systèmes racinaires par condition. Différentes lettres représentent des groupes qui étaient significativement différents comme déterminé par un test de Wilcoxon suivi d'un test de comparaison multiple (P : 0,05).

résultats analysant l'architecture racinaire vont dans le même sens (**Figure 13**) : en cas de carence hydrique, les racines tendront à moins se développer en largeur mais autant en longueur (Durand *et al.*, 2016) comparé à des plantes cultivées en condition hydrique témoin.

Favoriser la croissance racinaire au détriment des feuilles, est un avantage permettant aux racines d'« explorer » des zones de sol contenant plus d'eau comme, par exemple, dans des horizons plus profonds (Durand *et al.*, 2016).

4 La racine des plantes supérieures

La racine est un organe très important des plantes supérieures. Elle permet l'ancrage au sol, assure le prélèvement de l'eau et des nutriments qui seront transportés *via* le xylème mais c'est aussi un lieu de synthèse de phytohormones qui régulent le développement et la structuration de la plante. La racine est un organe non-photosynthétique (hétérotrophe pour le carbone) et nécessite un apport en sucres des feuilles pour son développement, c'est donc un organe puits. Dans certains cas, la racine peut devenir un organe source, lorsque des réserves s'y sont accumulées et que les parties aériennes ont besoin de beaucoup d'énergie. Cette exception ne sera pas abordée ici.

4.1 Anatomie de la racine chez *Arabidopsis thaliana*

Le système racinaire d'*Arabidopsis thaliana* est composé d'une racine principale d'où partent des racines secondaires (ou latérales). De ces racines secondaires peuvent se développer des racines tertiaires.

La pointe de la racine principale est composée de la même manière que les pointes des racines latérales. A l'extrémité de la pointe racinaire se trouve la coiffe (**Figure 14**) qui est constituée de plusieurs couches cellulaires et dont la fonction est de protéger les cellules situées derrière celle-ci et jouent un rôle dans la perception du gravitropisme. Ces cellules sont endommagées rapidement lors de la croissance de la racine du fait de la friction avec le sol et un renouvellement rapide est nécessaire. Les cellules de la coiffe produisent une gaine de mucilage polysaccharidique (**Figure 14**) jouant un rôle de lubrifiant pour faciliter la progression de la racine dans le sol lors de sa croissance (Read *et al.*, 1999).

Juste au-dessus de la coiffe se trouve le centre quiescent et le méristème fondamental. Le centre quiescent est une zone où peu de divisions cellulaires ont lieu et qui possède un rôle très important dans le contrôle des méristèmes et dans le maintien de leur identité cellulaire (Petricka *et*

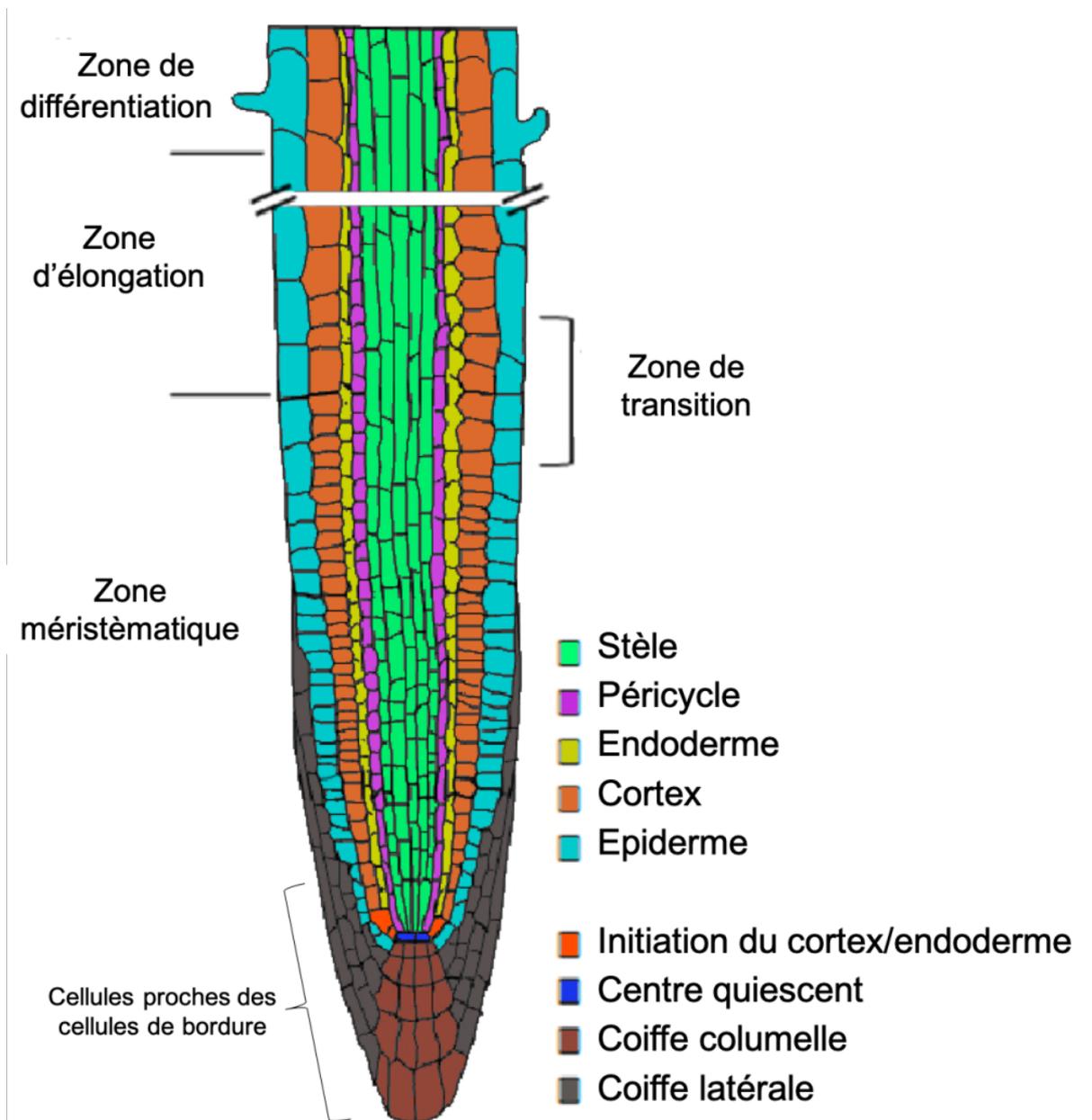


Figure 14. Le méristème apical racinaire (D'après De Smet *et al.*, 2015).

Schéma représentant les premiers millimètres de l'extrémité d'une racine. L'extrémité est constituée des cellules de la coiffe et vers l'extérieur, des cellules proches des cellules de bordure. Au-dessus se trouve le centre quiescent et les cellules initiateurs des cellules du cortex et de l'endoderme. Ensuite sont situées les cellules constituant la stèle, le péricycle, l'endoderme, le cortex et l'épiderme. Toute cette zone est la zone méristématique où les cellules vont se diviser fortement. Au-dessus, les zones d'élongation et de différenciation cellulaires sont discernables. Le passage d'une zone à la suivante se fait de façon progressive.

al., 2012). Le méristème fondamental est une région de forte division cellulaire, qui vont former les différents types cellulaires constituant la stèle, le péricycle, l'endoderme, le cortex et l'épiderme.

Au-dessus de la zone méristématique se trouve la zone d'élongation, où les cellules ne se divisent plus mais croissent en taille. Cette zone est la principale responsable de la croissance racinaire.

Enfin, la zone de différenciation est située au-dessus de la zone d'élongation. La zone de différenciation est la région dans laquelle les cellules se spécialisent en cellules rhizodermiques (épiderme ou poils absorbants), en cellules de l'écorce ou en cellules conductrices. L'ensemble des cellules conductrices est entouré d'une couche cellulaire nommée péricycle et forme un cylindre au centre de la racine nommé stèle (ou cylindre central) occupant une grande partie de la largeur de la racine. Les autres tissus composant la racine forment l'écorce (ou cortex).

Au-dessus de la zone de différenciation, se trouve la zone d'émergence des racines latérales. Les racines latérales (primordia) sont initiées au niveau du péricycle (Atkinson *et al.*, 2014).

Les différentes zones présentées sont des zones théoriques qui, dans la réalité, se chevauchent légèrement.

4.2 Architecture racinaire

L'émergence des racines latérales et le développement de celles-ci ainsi que de la racine principale sont des facteurs qui influencent l'architecture du système racinaire.

Les phytohormones jouent un rôle clef dans le développement racinaire et dans la modification de l'architecture du système racinaire en fonction de l'environnement. L'auxine contrôle positivement la formation des primordia racinaires (De Rybel *et al.*, 2010 ; Moreno-Risueno *et al.*, 2010) et la croissance des racines (Bhalerao *et al.*, 2002). Les cytokinines et l'ABA ont un rôle antagoniste à l'auxine sur les primordia (Aloni *et al.*, 2006).

Les sucres jouent aussi un rôle dans l'architecture racinaire. En effet, la présence locale d'hexoses a été montrée comme inductrice de l'élongation racinaire et du départ de racines latérales (Freixes *et al.*, 2002). De plus, la présence de glucose dans le milieu induit des changements d'architecture racinaire dont la voie de signalisation de la réponse implique les phytohormones telles que l'auxine ou les brassinostéroïdes (Singh *et al.*, 2014).

Des facteurs environnementaux tels que le déficit hydrique (Durand *et al.*, 2016), la carence en nutriments (Hammond et White, 2008) ou l'intensité lumineuse (Singh *et al.*, 2014) sont connus pour avoir un impact sur l'architecture racinaire.

4.3 Le sucre dans les racines

Comme rappelé précédemment, les racines sont des organes puits très importants tout au long du cycle de vie des plantes (Durand *et al.*, 2018). Celles-ci vont importer des sucres des parties aériennes grâce au phloème pour leur développement, le stockage mais elles permettent aussi des échanges de carbone avec le microbiome racinaire. Une vue globale des découvertes récentes au niveau des sucres dans les racines (transport, métabolisme, stockage) est présentée dans l'article de revue suivant.

Sugars en route to the roots. Transport, metabolism and storage within plant roots and towards microorganisms of the rhizosphere

Nils Hennion^{a,†}, Mickael Durand^{b,†}, Cécile Vriet^a, Joan Doidy^a, Laurence Maurousset^a, Rémi Lemoine^a and Nathalie Pourtau^{a,*} 

^aUniversité de Poitiers, UMR CNRS 7267 EBI Ecologie et Biologie des Interactions, Equipe "Sucres & Echanges Végétaux-Environnement", TSA 51106, 86073, Poitiers Cedex 9, France

^bINRA-AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR1318, ERL CNRS 3559, Saclay Plant Sciences, 78026, Versailles, France

Correspondence

*Corresponding author,
e-mail: nathalie.pourtau@univ-poitiers.fr

Received 31 January 2018;
revised 24 April 2018

doi:10.1111/ppl.12751

In plants, the root is a typical sink organ that relies exclusively on the import of sugar from the aerial parts. Sucrose is delivered by the phloem to the most distant root tips and, en route to the tip, is used by the different root tissues for metabolism and storage. Besides, a certain portion of this carbon is exuded in the rhizosphere, supplied to beneficial microorganisms and diverted by parasitic microbes. The transport of sugars toward these numerous sinks either occurs symplastically through cell connections (plasmodesmata) or is apoplastically mediated through membrane transporters (MST, monosaccharide transporters, SUT/SUC, H⁺/sucrose transporters and SWEET, Sugar will eventually be exported transporters) that control monosaccharide and sucrose fluxes. Here, we review recent progresses on carbon partitioning within and outside roots, discussing membrane transporters involved in plant responses to biotic and abiotic factors.

Introduction

Roots have multiple roles: they anchor plants to the soil and are responsible for the uptake of water and ions but they are also very important for the flux of carbon from the atmosphere to the soil, a major component of the carbon sink strength of terrestrial ecosystems (Kell 2012). Plants are autotrophic and use light energy to convert CO₂ into carbohydrates which are essential for fundamental plant growth processes (Sulpice et al. 2009). Sugars represent the primary source of energy for all eukaryotic organisms. In plants, they are involved in most metabolic and signaling pathways controlling growth, development and stress tolerance (i.e. fitness). Therefore, the transport and partitioning of sugars from

phototrophic leaves (source) to heterotrophic organs (sink) through the phloem are major parameters controlling crop productivity (Ainsworth and Bush 2011). The export of sucrose from source leaves is tightly regulated by the photosynthetic activity, the metabolism of starch in chloroplasts and the transient storage of sugars inside vacuoles. Besides, environmental factors, both biotic and abiotic, also affect the allocation of sugars towards the root and microorganisms of the rhizosphere (Lemoine et al. 2013).

From the germination of seeds, roots will depend exclusively on energy in the form of photosynthates supplied from the aerial parts of the plant. During most of their development plants tend to be sink-limited, as photosynthesis exceeds root growth capacity

Abbreviations – AGPase, ADP-glucose pyrophosphorylase; AM, arbuscular mycorrhiza; CWI, cell-wall invertase; PEG, poly-ethylene-glycol; PGPR, plant growth promoting rhizobacteria; SBE, starch branching enzyme; SuSy, sucrose synthase; SPS, sucrose phosphate synthase; SS, starch synthase; STP, monosaccharide transporters; SWEET, Sugar Will Eventually be Exported Transporter; TMT, tonoplast monosaccharide transporter; VGT, Vacuolar Glucose Transporter.

[†]These authors equally contributed to this work.

(Patrick 2013). Besides, roots must be supplied with sucrose for metabolic maintenance, even when root growth has ceased. Roots are therefore a typical sink organ, especially at early developmental stages and will be competing with other sinks during later stages (Durand et al. 2018).

Here we will focus on the fate of sugars in the root, from the unloading of sucrose from the phloem to the flux of sugars within and outside the root. We will also review major molecular players involved in carbon partitioning in the root as well as the effects of both biotic and abiotic factors on this process (Fig. 1A).

Sugar unloading pathway in roots

Supply in sucrose and amino acids, not to mention hormones or other signal molecules, occurs via the phloem sap, according to the mass flow theory of Münch (Patrick 2013). As in other sink organs, sucrose can exit the phloem following two pathways for unloading: either symplastic or apoplastic. The type of sink (utilization vs storage) may also determine the path of unloading. For instance, in utilization sinks (e.g. growing roots and fibrous roots in trees) sucrose is used for metabolism (growth and maintenance functions), creating a steep sucrose gradient, that together with numerous plasmodesmata between phloem and sink cells, is in favor of a symplastic unloading pathway (Ho 1988). The best characterized unloading mechanism has been described in the root tips (Fig. 1B) where symplastic unloading was clearly demonstrated using fluorescent probes that were unable to exit the phloem unless symplastic connections with surrounding cells exist (Oparka et al. 1994). In root tips, phloem unloading occurs in the protophloem, a transient tissue connected with the conducting phloem. Recently, new methods have allowed to characterize more precisely the unloading pathways in the root tip of *Arabidopsis thaliana* (Ross-Elliott et al. 2017) (Fig. 1B). Sucrose and macromolecules are unloaded in the phloem-pole pericycle cells and sucrose and small molecules can diffuse further to surrounding cells, while larger molecules are confined to these cells. This defines a protophloem unloading zone in the root tip (Ross-Elliott et al. 2017). One hypothesis for the symplastic phloem unloading mechanism in root tip is the 'high-pressure manifold model' proposed by Fisher (Patrick 2013). This model suggests that the hydrostatic pressure in sieve tubes is only marginally lower in sink than in source organs, leading to a steep drop in pressure between the protophloem sieve elements and surrounding cells in the phloem unloading zone. However, some experiments do not support this model: Knoblauch et al. (2016) showed that a drop in hydrostatic pressure exists

in the sieve elements between source and sink due to friction within the sieve elements. Recently, Ross-Elliott et al. (2017) proposed a new model of convective phloem unloading through plasmodesmata, combining bulk flow (requiring a pressure differential) as the dominant mechanism, with also diffusion induced in parallel to bulk flow. In contrast, no symplastic unloading occurs from metaphloem, therefore supporting the existence of an apoplastic unloading pathway beyond the root tip (Milne et al. 2018).

Apoplastic transport is best characterized for phloem loading in source leaves and involves a rather limited set of sucrose transporters namely SWEET11 (Sugar Will Eventually be Exported Transporters), SWEET12 and SUC2 (sucrose carrier) in *Arabidopsis* (Gottwald et al. 2000, Chen et al. 2012). Interestingly, many of the sucrose transporter genes that are expressed in the leaf phloem are also expressed in roots where their exact role (reloading of sucrose into the phloem or unloading of sucrose from the phloem) is not clearly defined and may be linked to the localization of the corresponding proteins. Due to the high-sucrose concentration in sieve tubes, sucrose exit does not require energy, therefore, either facilitators (such as SWEET proteins; Durand et al. 2016) or H⁺/sucrose cotransporters functioning as effluxers (such as SUC/SUT transporters; Carpaneto et al. 2005, Milne et al. 2018) may be involved. Once unloaded in the apoplast, the fate of sucrose depends on the presence of cell-wall invertases (CWI): if present, sucrose is cleaved to hexoses and taken up by specific transporters (monosaccharide transporters, STPs or SWEETs); if absent, sucrose is directly taken up, as in sugar beet (see below and Lemoine et al. 2013). A final membrane step occurs at the tonoplast where either sucrose transporters (SUC4, TMT1 and 2, tonoplast monosaccharide transporter) or hexose transporters (VGT, vacuolar glucose transporter; TMT1,2; SWEET2) mediate sugar fluxes in and out of the vacuole (Hedrich et al. 2015). These pathways and the transporters involved will be reviewed here in an effort to better understand their complex roles in roots.

Unloading pathways have been well studied in root organs specialized in storing sugars. There, apoplastic unloading occurs both in primary phloem (metaphloem) and in secondary phloem (storage sinks). For instance, in sugar beet and carrot the multicambial nature of the tap-root facilitates an easy retrieval of sucrose by phloem parenchyma cells (Fig. 1C). Sucrose is then transferred symplastically to storage parenchyma cells where it accumulates in vacuoles (Patrick 1997). Godt and Roitsch (2006) linked the type of unloading pathway to the root developmental stage in carrot and radish

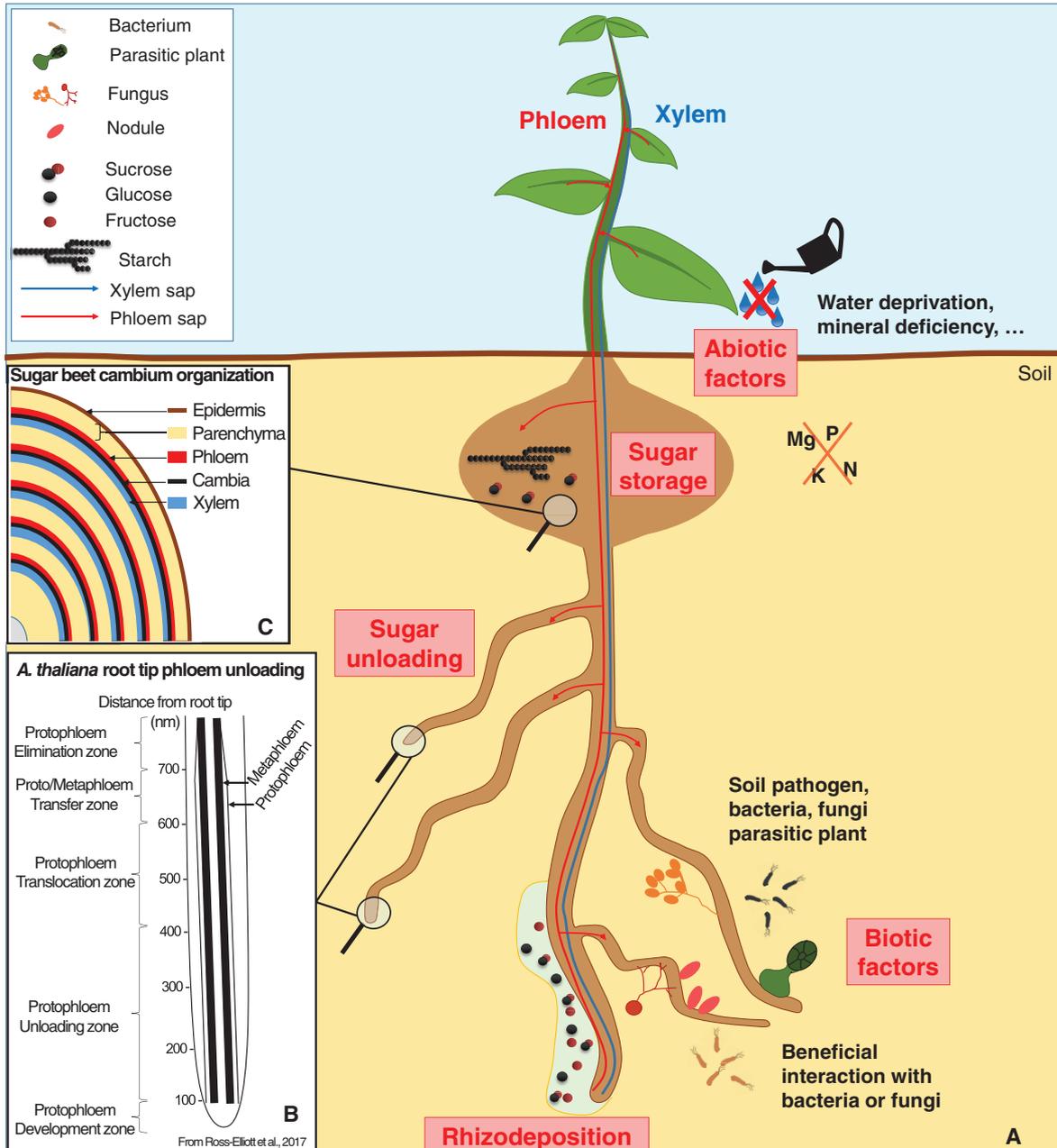


Fig. 1. Overview of sucrose delivery and fate in the roots. (A) Sucrose synthesized in leaves is transported to the roots via the phloem sap (red line). It will transit to the farthest end of primary root tip. There, sucrose is symplastically unloaded via plasmodesmata from protophloem to the surrounding cells. A significant part of sugars passing through the roots will be effluxed to the rhizosphere where they will feed both beneficial bacteria and fungi. In many cases, microorganisms or parasite plants will feed directly from root tissues. Root development and sucrose transport will also be affected by the availability of water and mineral elements in the soil. (B) Details of the phloem specialization at the root tip of *Arabidopsis* according to Ross-Elliott et al. (2017). In the other parts of the roots, sucrose is unloaded from metaphloem cells apoplastically (Milne et al. 2018). These unloading pathways are found also in lateral roots. Unloaded sucrose can be used for growth, respiration or storage, in different forms including starch. (C) In tuberized roots, the multi cambial structure allows radial growth and storage of sucrose in parenchyma cells (sugar beet organization in middle insert).

plants. In young developing tap-root, the high-CWI activity is indicative of apoplastic unloading. At later developmental stages, root starts to accumulate sucrose and sucrose synthase (SuSy) activity becomes prominent. The unloaded sucrose is thus cleaved by SuSy and the resulting hexoses are further converted to sucrose by sucrose phosphate synthase to be stored in the vacuole (Godt and Roitsch 2006).

Transport of sucrose and root development

Root elongation depends directly on the carbon supply as root elongation and branching are increased in conditions of high-photosynthetic activity. In *Arabidopsis*, primary root elongation rate is dependent on sugar concentration in the medium. High-sucrose concentration in the medium could be mimicked by high-photon flux densities (Freixes et al. 2002). The effect was less obvious for secondary root elongation rate because of a high variability. Nevertheless, Freixes et al. (2002) measured a higher hexose concentration in the apical and secondary root elongation zones. A good correlation between the elongation rate and hexose – but not sucrose – content in both primary and secondary roots was also found. In addition, sugar content is higher in the elongating zone of the seminal root of maize seedlings (Ogawa et al. 2009). Even if several genes involved in root development have been linked with the sugar status of the root, including *Lateral Root Development (LRD3)*; Ingram et al. 2011) and *Wuschel related homeobox (WOX7)*; Kong et al. 2016), a clear picture on the interaction between sugar and root initiation and development is far from being deciphered.

Sugars transported via the phloem also transmit long-distance signals at all plant development stages. In young developing seedling root of *Arabidopsis*, Kircher and Schopfer (2012) demonstrated that sucrose transported from cotyledons acts as a necessary and sufficient signal regulating root elongation together with light, independently of hormones. Furthermore, sugars that derive from the diurnal degradation of leaf starch are involved in the circadian control of root growth (Yazdanbakhsh et al. 2011).

Fate of sugar inside and outside the root

Photoassimilates can be directly used for growth and respiration or stored in leaves during the day, and for a longer time in roots and seeds (Jung et al. 2015). Starch is an important form of C storage that plays an important role in regulating the carbon status of the plant during the day/night cycle and in response to environmental cues (Durand et al. 2016). In addition,

a fine regulation of C allocation between source and sink organs (roots, flowers, fruits and seeds) occurs throughout plant development (Durand et al. 2018). A specific sugar storage process is implicated in a number of plant species that develop storage organs (Fig. 1C). Indeed, many crop species are cultivated for their capacity to store sugars in specific organs such as tuberous roots that derive from primary roots in carrot (*Daucus carota*), sugar beet (*Beta vulgaris*), cassava (*Manihot esculenta*) and sweet potato (*Ipomoea batatas*), or from stem in potato (*Solanum tuberosum*). The major sugar storage compound in tap-root is starch, with the exception of sugar beet producing sucrose during tap-root development.

Starch storage

Starch is composed of glucose polymers (amylose and amylopectin) and accumulates in plastids in the form of insoluble granules. Its metabolism is under the controlled actions of numerous enzymes, including the ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) that catalyzes the formation of ADP-glucose, the first step dedicated to starch synthesis. The next steps require a combination of soluble (STS) and granule-bound starch synthases (GBS) and starch branching enzymes (SBE) activities. Starch degradation involves a set of debranching enzymes and amylases (Lloyd and Kossmann 2015; see others references therein for review) but the regulation of starch biosynthesis/degradation needs to be further elucidated. In sweet potato, a study on sucrose metabolism suggests that the transition from fibrous root to storage root is linked with starch accumulation (Li and Zhang 2003). Moreover, *SuSy* gene expression is more important in storage than in fibrous roots and correlates with *AGPase* expression. This highlights the correlation between *SuSy* expression and sink strength in sweet potato storage root. Conversely, a strong invertase activity has been recorded in fibrous root, and to a lesser extent in young immature storage root, probably linked with cell growth (Li and Zhang 2003). More recently, microarray and RT-PCR analyses on cassava tuberous root uncovered several carbohydrate metabolism-related genes linked with root development and tuberization (Yang et al. 2011). A proteomic approach also confirmed a significant up-regulation of enzymes involved in starch and sucrose metabolism during tuberous root enlargement and starch storage. This study also indicated an important role of three 14-3-3 proteins isoforms (enzymes involved in the regulation of primary metabolism and cellular processes by protein–protein interactions) in this process (Wang et al. 2016). Finally, a comparative study of two cassava cultivars, one with low (Huanan 124, H124),

another with high (Fuxuan 01, F01) root starch content indicated that difference in starch accumulation in both cultivars was not linked with soluble sugar amounts in leaves, stem and roots, but rather with a higher starch synthesis activity and a lower amylase activity in roots (Li et al. 2016). The authors also showed that a higher starch accumulation in tuberous root is related to a higher phloem transport due to an up-regulation of the expression of sugar transporter genes in stem. Moreover, this study showed that a more compact arrangement of the xylem bundles combined with a limited amount of callose in sieve tubes resulted to more dynamic fluxes and higher sugar export towards tuberous root, thereby yielding cultivars with higher starch content (Li et al. 2016).

Sucrose storage

Most taproots species accumulate C resources as starch, with the exception of sugar beet which produces sucrose during tap-root development. The reason why beet root accumulates sucrose instead of starch is not well understood but may come from the adaptation of the wild ancestor to saline growth conditions (Turesson et al. 2014). Recent data showed the absence of granule accumulation in both sugar beet and in the sea beet ancestor (*B. vulgaris ssp. maritima*), even though four main enzymes implicated in starch synthesis (phosphoglucomutase, AGPase, starch synthase and SBE) were found active in tap-root. The authors speculated that starch deficiency in sugar beet may be related to high-degradation activities but, surprisingly, further analyses revealed the expression level of the enzymes implicated in this process was lower in beetroot than in parsnip (*Pastinaca sativa*), a starch-storing tuber. Therefore, the lack of starch accumulation in sugar beet remains unexplained (Turesson et al. 2014).

Sugar beet is a biennial crop species in which the tap-root formation occurs during the first year. Sugar beet root enlargement starts from the central cambium localized between the primary xylem and phloem and continues with the initiation of 12–15 supernumerary secondary cambium rings (Fig. 1C). Sucrose mainly accumulates during the first part of its development, while tap-root mass increases in the later stage of tuber development. A spatial gradient in cell growth and sucrose accumulation has been noticed from the inner to the outer zones during beetroot development. In the outer zones, small and undifferentiated cells – but ready to accumulate sucrose and to start their proliferation – have been identified with a specific expression of genes implicated in cell growth, primary metabolism

and distribution of metabolites. Moreover, a transcript of a sucrose-related protein was found expressed in these tissues probably linked with a role in maintaining sucrose flow. The expression of three sugar transporters correlated with the period of high-sugar accumulation (Bellin et al. 2007; see references therein for review). Finally, the most abundant sugar transporter in *B. vulgaris* tonoplast, BvTST2.1 (Tonoplast Sucrose Transporter), was found to play a central role in sucrose accumulation (Jung et al. 2015). Its transcript accumulates in high sucrose-containing tissues of the taproot and the authors suggested it may be used as a marker gene by breeders to increase sugar yields in sugar beet and other sugar storing species (Jung et al. 2015).

Another essential question for C storage is the fate of sugars after harvest. In some starch accumulating species, it has been shown that sucrose may accumulate at low temperature because of activation of starch degrading enzymes by cold (see for review Bufler 2013). Indeed, carrot has been considered for a long time as containing negligible amounts of starch, and sucrose was proposed as the major transport and storage carbohydrate in this crop. However, microscopy analyses revealed amyloplasts are present in parenchyma cells around the phloem of freshly harvested carrots and disappear following cold storage. The authors concluded that starch is the main sugar reserve in carrot, representing a mobilizable energy source to face pre-harvest and post-harvest stresses (Bufler 2013).

Carbon rhizodeposition

Rhizodeposition describes the loss of carbon from plants (Grayston et al. 1997). The amount of root exudation is estimated to vary between 10 and 40% of assimilated C. This loss occurs into the rhizosphere which constitutes 2–3% of soil volume (Grayston et al. 1997). Six main sites of rhizodeposition are described: (1) loss of root cap and border cells, (2) loss of insoluble mucilage, (3) loss of soluble root exudates, (4) loss of volatile organic C, (5) loss of C towards microorganisms and (6) loss of C due to lysis of epidermal and cortical root cells (Jones et al. 2009). Root exudation cannot be accurately measured as it is difficult to discriminate between root and microbial exudates, even in axenic cultures. In Arabidopsis hydroponic cultures, we traced source-to-sink C partitioning at different stages of development by measuring the [U-¹⁴C] sucrose transport (Durand et al. 2018). Our results showed high C exudation (around 20%) at the vegetative stage, then exudation decreased at the reproductive stage. Root exudation is not only affected during developmental stages but also by several other factors, such as interspecific biological features

(annual/perennial, herbaceous/tree), and environmental conditions (atmospheric CO₂, temperature, pH, water and nutrients availability, light, presence of microorganisms or herbivores; Rasmann and Turlings 2016). Among root exudates, sugars are not the main compounds, as shown by Badri et al. (2013). In root exudates of 18–21 days old *Arabidopsis*, sugars represent only 3.1% of whole exudates, sugar alcohols 3.8%, amino acids 10%, phenolics 18.5% while unknown compounds represented almost 65% of total exudates. It has been shown that sugars, amino acids and sugar alcohols act as general chemoattractants and among sugars, glucose and fructose are the most efficient (Badri et al. 2013), whereas phenolics act as specific substrates for specific microorganisms. Several authors have proposed that root exudation increases when sugar concentration is high in roots (Durand et al. 2018; see other references therein). However, the molecular mechanisms involved in sugar transport from phloem unloading to soil deposition remain largely unknown. There is evidence that glucose and sucrose efflux from the epidermal cells of *Arabidopsis* root tips may occur by passive diffusion (Chaudhuri et al. 2008). Although not demonstrated yet, transporters of the SWEET family may be involved in such sugar movement. In addition, several results indicate that the influx of sucrose from the soil into the roots (at least in *in vitro* conditions) involves CWI and hexose transporters (Veillet et al. 2016).

Sugar transport in response to biotic factors

Plants are naturally surrounded by complex populations of microorganisms aboveground as well as belowground with which the plants establish multiple types of associations, including mutualistic and parasitic interactions. In the rhizosphere, plants establish symbioses with several microorganisms such as arbuscular mycorrhizal fungi (AM symbiosis), nitrogen-fixing bacteria of the genus *Rhizobium* (Legume-Rhizobia symbiosis), and a diverse set of non-pathogenic rhizobacteria, thereafter referred as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). Root colonization by heterotrophic microorganisms increases the sink strength and creates an additional carbon sinks for the host plant. These interactions are not limited to microorganisms as a recent study points out the role of sugar transporters during infection by root nematodes in tomato plants (Zhao et al. 2018). Furthermore, the ability of plants to modulate sugar transport and export from roots may be a key determinant of the critical balance between defending against pathogens and recruiting beneficial microorganisms in the rhizosphere (Doidy et al. 2012a).

Sugar transportome in beneficial plant-microorganism interactions

Sugar exchanges in arbuscular mycorrhizal symbiosis

Mycorrhizal fungi are ubiquitous soil microorganisms living in symbiotic association with plant roots, AM being the most widespread plant-fungal interaction. In AM symbiosis, the fungus provides nutrients (mainly phosphorus and nitrogen) to the plant, and in return receives C derived from the host photosynthetic activity. The symbiotic tree-shaped interface, called arbuscule, constitutes key structures of the interaction as they represent the site of reciprocal exchanges between the two partners (Fig. 2A). Both the plant and fungal transportome control the mutual exchanges, ensuring benefits for both partners (Garcia et al. 2016). A study carried out by Kiers et al. (2011) showed that *Medicago* plants could supply more carbohydrates to more cooperative fungal species that transfer greater phosphate resources. In addition, AM colonization of roots is expected to increase when sucrose supply is enhanced. Recent studies showed that several *SUT* genes present a fine-tuning regulation of their expression in response to AM inoculation in different plant species (Boldt et al. 2011, Doidy et al. 2012b). The studies of Bitterlich et al. (2014) and Gabriel-Neumann et al. (2011) provided evidence that plant sucrose transporters are functionally involved in this process. Constitutive overexpression of *SUT1* type sucrose transporter gene in potato plants increased AM root colonization (under high-soil phosphorus availability; Gabriel-Neumann et al. 2011). By contrast, transgenic tomato plants with reduced expression of *SISUT2* exhibited increased mycorrhization and the positive effect of the interaction was at least partially abolished (Bitterlich et al. 2014). These results suggest a sucrose retrieval function for *SISUT2*, controlling the diversion of sugars at the symbiotic interface. Furthermore, the authors also demonstrated that brassinosteroid phytohormones may increase mycorrhization by activating *SISUT2* internalization, thereby inhibiting the retrieval of sugars towards plant cells.

Today large efforts are still required to identify the plant exporters involved in the transfer of sugars towards the fungus at the periarbuscular membrane (PAM). The SWEET transporters stand out as 'usual suspects', because they represent the main components for the export of sucrose, glucose and fructose within plants and towards rhizospheric microorganisms (Chen et al. 2010, Chen 2014). So far, only a single study focused on SWEET transporters in mycorrhizal systems. Manck-Gotzenberger and Requena (2016) showed that the SWEET family in potato comprises 35 StSWEET and that 22 StSWEET genes were differentially

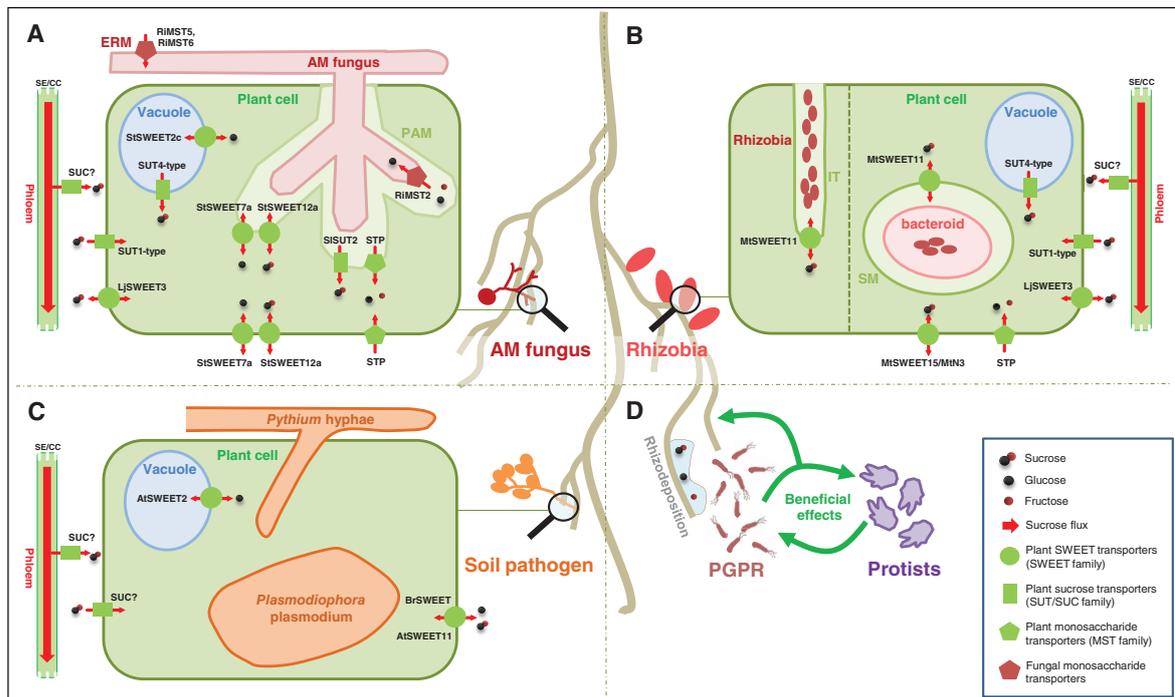


Fig. 2. Sugar transport in plant root-microorganism interactions. During symbioses with mycorrhiza and rhizobia, plants deliver nutrients (sugars, organic acids and lipids), and in return, receive phosphate, nitrogen and/or other nutrients from microorganisms. A growing body of evidence reveals that the transfer of plant photosynthates towards symbiotic partners involves a set of sugar transporters of the SWEET, SUT/SUC and MST families. Only a few transporters in this process have been functionally characterized to date, many more are likely to be involved according to transcriptional analyses. (A) In AM symbiosis, sugars are transported towards arbuscule-containing plant cells, notably via plasma membrane SUT1-type or STP transporters, as both sucrose and monosaccharide transporters show fine regulation of their expression in AM roots. In parallel, vacuolar sugar transporters (SUT4-type and StSWEET2c) are also activated in colonized cells, suggesting a remobilization of intracellular reserve. Sugars are then exported towards the symbiotic interface, across the PAM, possibly via sucrose effluxers of the SWEET family (e.g. StSWEET7a and StSWEET12a in *S. tuberosum*). Sugars, mainly glucose, are then taken up by the fungus (via RiMST2), but plants regulate this sugar delivery as sucrose and monosaccharides can be retrieved back into the plant cells (SISUT2 in *Solanum lycopersicum* and STP in *M. truncatula*). (B) Several sugar transporters are also likely to be involved in the symbiosis between legume plants and nitrogen-fixing Rhizobia (e.g. SWEET15/MtN3, SWEET11 and STP13 in *M. truncatula*). Our overview suggests a common transport pathway shared between arbuscular and rhizobial symbioses (e.g. SWEET3 in *L. japonicus*, vacuolar SUT4-type sucrose transporters and monosaccharide STP transporters). (C) Plant sugars are also diverted towards soil pathogenic microbes, but these processes are better characterized in leaf pathogens. So far, only a handful of transporters (AtSWEET2 and AtSWEET11 in *A. thaliana* and BrSWEET in *B. rapa*) have been investigated in the interactions between plant roots and soil-borne pathogens. AtSWEET2 is a vacuolar facilitator that plays an important role in plant resistance to the pathogenic oomycote *Pythium*, modulating the pool of sugars exuded from roots. Similarly, AtSWEET11 has recently been shown to be involved in disease resistance against the obligate biotrophic protist *P. brassicae*, the causal agent of clubroot. (D) Rhizodeposition including sugar exudation may also represent an important carbon source for plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and other beneficial organisms living in the rhizosphere, such as protozoa. Most molecular players involved in carbon partitioning in soil microbial communities remain to be identified. Other abbreviations: ERM, extraradical mycelium; IT, infection threat; SM, symbiosis membrane.

regulated in response to AM symbiosis. Both plasma membrane (StSWEET7a and StSWEET12a) and tonoplast (StSWEET2c) transporters are specifically relocalized in plant cells colonized by fungal arbuscules.

On the fungal side, the symbiont receives plant photosynthates mainly in the form of glucose (and to a lower extent fructose) at the arbuscular interface. The sugar transportome of the reference AM fungus *Rhizophagus irregularis* comprises five monosaccharide

transporters (GiMST/RiMST) and a single sucrose transporter of unknown function (GiSUC1). GiMST2 is the major component for glucose uptake at the arbuscular interface and seems indispensable for a functional AM symbiosis (Helber et al. 2011), while RiMST5 and RiMST6 are involved in sugar uptake directly from the soil in the extraradical mycelium (Ait Lahmidi et al. 2016). The rapid progress of next generation sequencing technologies will enable an

exponential release of mycorrhizal fungal genomes (Tisserant et al. 2013, Martin et al. 2016) and will refine the current picture (Fig. 2A) of the symbiotic sugar transportome.

Sugar transport in plant-rhizobacteria interactions

In legume-rhizobia symbiosis, the soil bacteria called rhizobia provide reduced nitrogen to the host plant and receive reduced C from plant photosynthesis (Udvardi and Poole 2013). The importance of sucrose metabolism for this symbiotic N₂-fixation that occurs in root nodules has been demonstrated in several studies (Baier et al. 2007, Horst et al. 2007). Furthermore, two recent studies reveal that several SWEET genes in *Lotus japonicus* (*LjSWEET3*) and in *Medicago truncatula* (*MtSWEET11* and *MtN3/MtSWEET15c*) are induced during nodule development and may have a role in symbiotic rhizobial nutrition (Kryvoruchko et al. 2016, Sugiyama et al. 2016) (Fig. 2B).

PGPR promote plant growth and in return are expected to receive carbohydrates as well as amino acid and organic acid resources from the host plant (in the form of root exudates by rhizodeposition and/or directly at the apoplastic space in case of endophytic rhizobacteria). Possibly, these processes may involve PGPR-triggered changes in plant sugar transport and metabolism that could lead to a regulated pool of sugars available for the PGPR, and contribute to establishing and maintaining the plant-PGPR interaction and its beneficial effects on plant productivity (Fig. 2D). A few studies (Schwachtje et al. 2011, Miotto-Vilanova et al. 2016) tend to favor these hypotheses.

One challenging question based on the current knowledge in the field is to identify whether a common sugar transport pathway is shared by beneficial plant-microorganism interactions (Rhizobia, PGPR, mycorrhizae, Fig. 2). Another key research area heads towards the comprehension of the nutrient fluxes inside rhizospheric communities, including bacteria, fungi and protozoa (Koller et al. 2013).

Sugar transportome in negative interactions

Diversion of photosynthates by soil pathogens

The retrieval of nutrients, especially sugars, from the host is one of the key mechanisms by which pathogenic microorganisms survive and reproduce. Recent evidence suggests that pathogens manipulate the sugar transport machinery of the host plant to increase the diversion of sugars (Zhao et al. 2018). In return, plants have developed mechanisms to limit the availability of apoplastic sugars to pathogens, thus restricting their proliferation

and the subsequent progression of the disease (Ruan 2014).

A recent study shows that sugars secreted from roots may act as carbon supply to support the growth of pathogenic microorganisms in the rhizosphere (Chen et al. 2015). The sugar facilitator *AtSWEET2* is localized to the tonoplasts of root cells, particularly in the cortex and epidermis, where it plays a role in vacuolar glucose sequestration, thereby limiting the efflux of C from roots (Fig. 2C). The expression of *AtSWEET2* in roots is induced more than 15-fold during infection with the soil-borne pathogen *Pythium irregulare*, a parasitic oomycete responsible for common root rot and damping-off diseases. Moreover, the loss of function *sweet2* mutant displayed an enhanced susceptibility to this pathogen. Altogether, these findings reveal an important function for *AtSWEET2* in modulating the availability of sugars in the rhizosphere, and in contributing to the plant resistance to root pathogens (Chen et al. 2015).

More recently, several *BrSWEET* genes have been shown to be transcriptionally regulated in response to infection by the soil borne pathogen *Plasmodiophora brassicae*, the causal agent of clubroot, in *Brassica rapa* (Li et al. 2018). Furthermore, the authors showed a delayed progression of clubroot development in the *sweet11* mutant in comparison to that of the wild-type plants, suggesting a role for *SWEET11* in the plant root disease resistance.

Parasitic plants

Up to now, 4000 parasitic plants species belonging to 20 families have been listed as root parasites and shoot parasites. The Orobanchaceae family, including *Orobanche*, *Phelipanche* and *Striga* genus exhibits all forms of root-parasitism (Westwood et al. 2010). The relationships between *Phelipanche ramosa* and its host has been studied by Abbes et al. (2009). In this study, sucrose was found to be the main compound transferred from the host to *Phelipanche*. The parasite establishes direct phloem connection at the interface with its host, as the symplastic fluorescent dye, carboxyfluorescein, applied on a leaf of the host could be traced in both tubercle and shoot of the parasite (Péron et al. 2016). In these organs, the apoplastic phloem unloading pathway is dominant, except in adventitious root apices where a symplastic pathway occurs. Here, the apoplastic phloem unloading can be an efficient way to keep phloem unloading and parasite growth during sugar accumulation and to prevent symplastic backflow. In this sense, two sucrose transporters (PrSUT) were identified and localized in *Phelipanche* tissues. In shoot, PrSUT1

is localized to the plasma membrane in phloem and sink cells, while PrSUT3 was suggested as a vacuolar transporter but its exact role in sucrose transport is not yet uncovered (Péron et al. 2016).

Root sugar transport in response to abiotic factors

Abiotic constraints have been widely described as major factors affecting C source-sink relationships (Lemoine et al. 2013). Here, we provide an update focusing on sugar transport in root in response to abiotic factors with an emphasis on mineral deficiency and water deprivation.

Mineral deficiency

In case of mineral deficiency, two situations can be clearly distinguished: one where plants respond by allocating more sugars to root, and the other where sugar allocation between leaves and roots is not impaired. This is especially the case in conditions of magnesium (Mg) and potassium (K) deficiency, during which plants accumulate sugars in leaves while their sucrose export to root is impaired. This confirms the importance of the push hypothesis (sink limitation) in the management of C allocation between source and sink organs like the root (Hermans et al. 2006). Currently, enhanced carbohydrate transport to the root has been demonstrated for nitrogen (N) and phosphorus (P) limitation (Hermans et al. 2006). In the case of P limitation in common bean (*Phaseolus vulgaris*), it has been recently confirmed that secondary root growth is impaired in favor of root elongation, thus optimizing P acquisition under low P conditions (Strock et al. 2018). This preferential C investment in primary root growth was also reported for *Arabidopsis* submitted to low Pi (Hanlon et al. 2018). So far, it remains unclear whether the regulation of sugar transporters and related enzymes (i.e. invertase, SuSy) is involved in the increased C allocation in response to N and P deprivation.

Water deprivation

It is well established that water deficit disturbs sugar source-sink relationship (Lemoine et al. 2013). Indeed, several studies focusing on C fluxes between source and sinks have shown that the transport of recently assimilated C from source leaves to sinks is delayed by water deficit (Li et al. 2003, Ruehr et al. 2009). Moreover, results from a modeling experiment suggest that a decrease in water potential in xylem under water deficit also limits sugar transport in the phloem, due to

impaired xylem-phloem water exchange (Holtta et al. 2009, Sevanto 2014). Conversely, many studies show that water deficit induces an increase in root to shoot ratio, a response that may be interpreted as a reallocation of sugars towards roots. Hence, Hummel et al. (2010) suggested that water deficit leads to an excess of assimilated C in leaf that may be exported towards roots. In agreement with this hypothesis, it has been recently shown that mild water deficit enhances C export from source leaves to sink roots in *Arabidopsis* on a relative basis, despite an overall decrease in C assimilation (Durand et al. 2016; Fig. 3, #1 and 2). Moreover, the C export to the roots was so enhanced that it exceeded the C demand for root growth because sugars and C accumulated in roots under water deficit (Fig. 3, #4). Plants challenged with water shortage also exhibited higher transcripts levels of *AtSUC2* and *AtSWEET11-15* in comparison to well-watered control plants, both in leaves (Fig. 3, #2; except for *AtSWEET14* which is not expressed in leaves) and in roots (Fig. 3, #4). Durand et al. (2016) suggested that these sucrose transporters may be involved in the exit (*AtSWEET11-15*; Ludewig and Flügge 2013, Chen 2014) and retrieval (*AtSUC2*; Gould et al. 2012) of sucrose across the transport phloem, but also in the release phloem in the root where they may unload sucrose (*AtSUC2* and *AtSWEET11-15*; Fig. 3, #3 and 4). In addition, this higher release of sucrose under water deficit may be interpreted as a strategy to speed up phloem sap fluxes, thus maintaining the hydrostatic pressure gradient between leaves and roots.

Conversely, Durand et al. (2018) did not observe any change in C reallocation toward roots in response to a poly-ethylene-glycol (PEG) osmotic stress applied on adult *Arabidopsis* plants grown hydroponically. Indeed, they showed that [^{14}C] sucrose transport decreased and that the main sucrose transporters expressed in roots (*AtSUC2*, *AtSWEET11-13* and *15*) were down-regulated. The authors argue that this trend indicates a strong impairment of C allocation from leaves to roots subjected to the PEG osmotic stress likely because of the chemical impact of the PEG solution on plant physiology. They finally hypothesize that downregulation of *AtSUC2* and several *AtSWEET* genes in PEG osmotic stressed was associated with the reduced [^{14}C] sucrose transport between leaves and roots.

Overall, recent studies investigating root sugar transport under water deprivation tend to show a tight relationship between C flux from leaves to root and the transcriptional regulation of several sucrose transporters in root. Large efforts are still required to clearly determine the functional role of these transporters and the fate of sugars in adaptive response to drought.

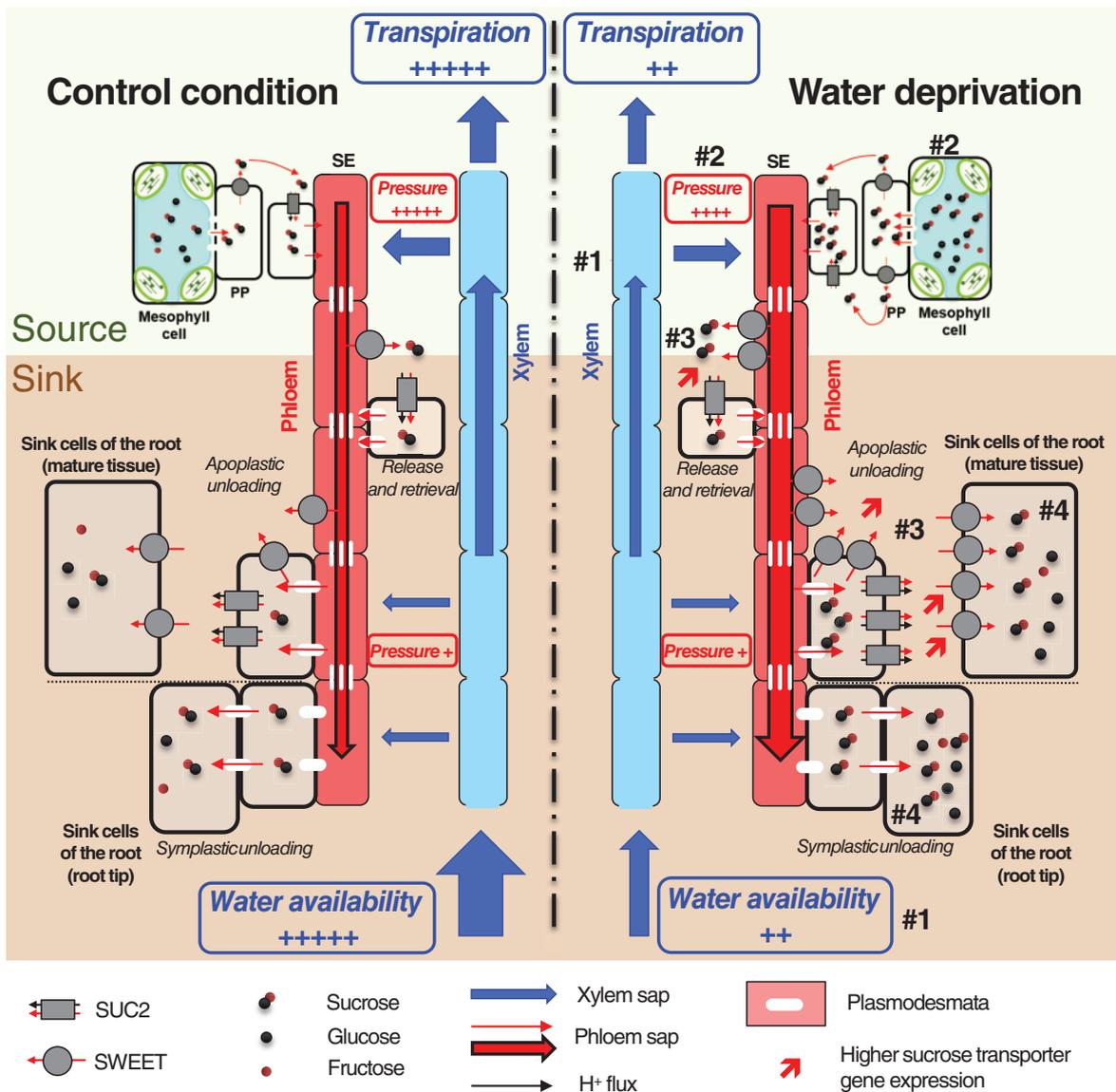


Fig. 3. Putative model of carbon allocation under water deprivation. Water deficit reduces water availability triggering a strong reduction in leaf growth (#1). Leaf growth is more affected than photosynthesis leading to sugar accumulation in aerial parts (#2). Higher gene expression for *AtSUC2*, *AtSWEET11* and *AtSWEET12* combined to the accumulation of sugar might facilitate enhanced carbon export to root. Higher gene expression of *AtSUC2* and *AtSWEET11-15* in roots is likely linked to the enhanced C export (#3). The presence of this set of sucrose transporters might help to drain the C to and in the root (Durand et al. 2016). This would contribute to maintain phloem sap movement by facilitating sucrose efflux from the phloem (Carpaneto et al. 2005), likely because C investment in the root is greater than C demand, sugars accumulate in the root under water deficit (#4) (Durand et al. 2016).

Conclusion and future prospects

In this paper we reviewed the current knowledge on the mechanisms of sugar unloading from the phloem in roots and the fate of sugars inside and outside the roots, as well as their importance for several key plant growth and

development processes. The root system is a typical C sink, especially in tissues storing starch and sucrose. Sugars are also involved in several signaling pathways regulating root initiation and elongation (Kong et al. 2016), therefore shaping the plasticity of root architecture in response to environmental factors. We focused on the

molecular players (MST, SUT and SWEET sugar transport proteins) known to regulate the partitioning of C in plants. We discussed how these membrane transport proteins contribute to C allocation when roots face changing conditions, in response to biotic and abiotic challenges. Such transporters may represent 'key markers' for breeders to improve crop production, thereby yielding energy, environmental and health benefits (Schroeder et al. 2013). Moreover, characterizing how this C transport circuitry shapes the roots and the rhizosphere microbiome represent a key research area in agro-ecology (Sasse et al. 2017).

Author contributions

All authors contributed to the proof reading of the manuscript. N. H. contributed to the part on unloading pathways and designed Fig. 1; M. D. wrote the part on abiotic factors and designed Fig. 3; C. V and J. D. wrote on biotic factors and designed Fig. 2; L. M. wrote on rhizodeposition and parasitic plants; R. L. wrote the introduction and the part on unloading; N. P. wrote the part on starch and sucrose storage and managed the whole editing of the manuscript.

Acknowledgements – This work was supported by the University of Poitiers, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the French Ministry for Research and Higher Education (grants to N. H. and M. D.) and the 2015–2020 State-Region Planning Contracts (CPER), European Regional Development Fund (FEDER).

References

- Abbes Z, Kharrat M, Delavault P, Chaïbi W, Simier P (2009) Nitrogen and carbon relationships between the parasitic weed *Orobancha foetida* and susceptible and tolerant faba bean lines. *Plant Physiol Biochem* 47: 153–159
- Ainsworth EA, Bush DR (2011) Carbohydrate export from the leaf: a highly regulated process and target to enhance photosynthesis and productivity. *Plant Physiol* 155: 64–69
- Ait Lahmidi N, Courty P-E, Brulé D, Chatagnier O, Arnould C, Doïdy J, Berta G, Lingua G, Wipf D, Bonneau L (2016) Sugar exchanges in arbuscular mycorrhiza: RiMST5 and RiMST6, two novel *Rhizophagus irregularis* monosaccharide transporters, are involved in both sugar uptake from the soil and from the plant partner. *Plant Physiol Biochem* 107: 354–363
- Badri DV, Chaparro JM, Zhang R, Shen Q, Vivanco JM (2013) Application of natural blends of phytochemicals derived from the root exudates of *arabidopsis* to the soil reveal that phenolic-related compounds predominantly modulate the soil microbiome. *J Biol Chem* 288: 4502–4512
- Baier MC, Barsch A, Küster H, Hohnjec N (2007) Antisense repression of the *Medicago truncatula* nodule-enhanced sucrose synthase leads to a handicapped nitrogen fixation mirrored by specific alterations in the symbiotic transcriptome and metabolome. *Plant Physiol* 145: 1600–1618
- Bellin D, Schulz B, Soerensen TR, Salamini F, Schneider K (2007) Transcript profiles at different growth stages and tap-root zones identify correlated developmental and metabolic pathways of sugar beet. *J Exp Bot* 58: 699–715
- Bitterlich M, Krugel U, Boldt-Burisch K, Franken P, Kühn C (2014) The sucrose transporter SISUT2 from tomato interacts with brassinosteroid functioning and affects arbuscular mycorrhiza formation. *Plant J* 78: 877–889
- Boldt K, Pörs Y, Haupt B, Bitterlich M, Kühn C, Grimm B, Franken P (2011) Photochemical processes, carbon assimilation and RNA accumulation of sucrose transporter genes in tomato arbuscular mycorrhiza. *J Plant Physiol* 168: 1256–1263
- Bufler G (2013) Accumulation and degradation of starch in carrot roots. *Sci Hortic (Amsterdam)* 150: 251–258
- Carpaneto A, Geiger D, Bamberg E, Sauer N, Fromm J, Hedrich R (2005) Phloem-localized, proton-coupled sucrose carrier ZmSUT1 mediates sucrose efflux under the control of the sucrose gradient and the proton motive force. *J Biol Chem* 280: 21437–21443
- Chaudhuri B, Hormann F, Lalonde S, Brady SM, Orlando DA, Benfey P, Frommer WB (2008) Protonophore- and pH-insensitive glucose and sucrose accumulation detected by FRET nanosensors in *Arabidopsis* root tips. *Plant J* 56: 948–962
- Chen L-Q (2014) SWEET sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition. *New Phytol* 201: 1150–1155
- Chen LQ, Hou BH, Lalonde S, Takanao H, Hartung ML, Qu XQ, Guo WJ, Kim JG, Underwood W, Chaudhuri B, Chermak D, Antony G, White FF, Somerville SC, Mudgett MB, Frommer WB (2010) Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* 468: 527–532
- Chen LQ, Qu XQ, Hou BH, Soso D, Osorio S, Fernie AR, Frommer WB (2012) Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* 335: 207–211
- Chen HY, Huh JH, Yu YC, Ho LH, Chen LQ, Tholl D, Frommer WB, Guo WJ (2015) The *Arabidopsis* vacuolar sugar transporter SWEET2 limits carbon sequestration from roots and restricts *Pythium* infection. *Plant J* 83: 1046–1058

- Doidy J, Grace E, Kühn C, Simon-Plas F, Casieri L, Wipf D (2012a) Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. *Trends Plant Sci* 17: 413–422
- Doidy J, van Tuinen D, Lamotte O, Corneillat M, Alcaraz G, Wipf D (2012b) The *Medicago truncatula* sucrose transporter family. Characterization and implication of key members in carbon partitioning towards arbuscular mycorrhizal fungi. *Mol Plant* 5: 1346–1358
- Durand M, Porcheron B, Hennion N, Maurousset L, Lemoine R, Pourtau N (2016) Water deficit enhances c export to the roots in *Arabidopsis thaliana* plants with contribution of sucrose transporters in both shoot and roots. *Plant Physiol* 170: 1460–1479
- Durand M, Mainson D, Porcheron B, Maurousset L, Lemoine R, Pourtau N (2018) Carbon source-sink relationship in *Arabidopsis thaliana*: the role of sucrose transporters. *Planta* 247: 587–611
- Freixes S, Thibaud MC, Tardieu F, Muller B (2002) Root elongation and branching is related to local hexose concentration in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Environ* 25: 1357–1366
- Gabriel-Neumann E, Neumann G, Leggewie G, George E (2011) Constitutive overexpression of the sucrose transporter SoSUT1 in potato plants increases arbuscular mycorrhiza fungal root colonization under high, but not under low, soil phosphorus availability. *J Plant Physiol* 168: 911–919
- Garcia K, Doidy J, Zimmermann SD, Wipf D, Courty P-E (2016) Take a trip through the plant and fungal transportome of mycorrhiza. *Trends Plant Sci* 21: 937–950
- Godt D, Roitsch T (2006) The developmental and organ specific expression of sucrose cleaving enzymes in sugar beet suggests a transition between apoplasmic and symplasmic phloem unloading in the tap roots. *Plant Physiol Biochem* 44: 656–665
- Gottwald JR, Krysan PJ, Young JC, Evert RF, Sussman MR (2000) Genetic evidence for the *in planta* role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13979–13984
- Gould N, Thorpe MR, Pritchard J, Christeller JT, Williams LE, Roeb G, Schurr U, Minchin PE (2012) AtSUC2 has a role for sucrose retrieval along the phloem pathway: evidence from carbon-11 tracer studies. *Plant Sci* 188: 97–101
- Grayston SJ, Vaughan D, Jones D (1997) Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Appl Soil Ecol* 5: 29–56
- Hanlon MT, Ray S, Saengwilai P, Luthe D, Lynch JP, Brown KM (2018) Buffered delivery of phosphate to *Arabidopsis* alters responses to low phosphate. *J Exp Bot* 69: 1207–1219
- Hedrich R, Sauer N, Neuhaus HE (2015) Sugar transport across the plant vacuolar membrane: nature and regulation of carrier proteins. *Curr Opin Plant Biol* 25: 63–70
- Helber N, Wipfel K, Sauer N, Schaarschmidt S, Hause B, Requena N (2011) A versatile monosaccharide transporter that operates in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus sp* is crucial for the symbiotic relationship with plants. *Plant Cell* 23: 3812–3823
- Hermans C, Hammond JP, White PJ, Verbruggen N (2006) How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends Plant Sci* 11: 610–617
- Ho LC (1988) Metabolism and Compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39: 355–378
- Holtta T, Mencuccini M, Nikinmaa E (2009) Linking phloem function to structure: analysis with a coupled xylem-phloem transport model. *J Theor Biol* 259: 325–337
- Horst I, Welham T, Kelly S, Kaneko T, Sato S, Tabata S, Parniske M, Wang TL (2007) TILLING mutants of *Lotus japonicus* reveal that nitrogen assimilation and fixation can occur in the absence of nodule-enhanced sucrose synthase. *Plant Physiol* 144: 806–820
- Hummel I, Pantin F, Sulpice R, Piques M, Rolland G, Dauzat M, Christophe A, Pervent M, Bouteille M, Stitt M, Gibon Y, Muller B (2010) *Arabidopsis* plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: an integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. *Plant Physiol* 154: 357–372
- Ingram P, Dettmer J, Helariutta Y, Malamy JE (2011) *Arabidopsis Lateral Root Development 3* is essential for early phloem development and function, and hence for normal root system development. *Plant J* 68: 455–467
- Jones DL, Nguyen C, Finlay RD (2009) Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil–root interface. *Plant and Soil* 321: 5–33
- Jung B, Ludewig F, Schulz A, Meißner G, Wöstefeld N, Flügge U-I, Pommerrenig B, Wirsching P, Sauer N, Koch W, Sommer F, Mühlhaus T, Schroda M, Cuin TA, Graus D, Marten I, Hedrich R, Neuhaus HE (2015) Identification of the transporter responsible for sucrose accumulation in sugar beet taproots. *Nat Plants* 1: 1–6
- Kell DB (2012) Large-scale sequestration of atmospheric carbon via plant roots in natural and agricultural ecosystems: why and how. *Philos T Roy Soc B* 367: 1589–1597
- Kiers ET, Duhamel M, Beesetty Y, Mensah JA, Franken O, Verbruggen E, Fellbaum CR, Kowalchuk GA, Hart MM, Bago A, Palmer TM, West SA, Vandenkoornhuys P, Jansa J, Bucking H (2011) Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science* 333: 880–882

- Kircher S, Schopfer P (2012) Photosynthetic sucrose acts as cotyledon-derived long-distance signal to control root growth during early seedling development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 11217–11221
- Knoblauch M, Knoblauch J, Mullendore DL, Savage JA, Babst BA, Beecher SD, Dodgen AC, Jensen KH, Holbrook NM (2016) Testing the Münch hypothesis of long distance phloem transport in plants. *eLife* 5: e15341
- Koller R, Rodriguez A, Robin C, Scheu S, Bonkowski M (2013) Protozoa enhance foraging efficiency of arbuscular mycorrhizal fungi for mineral nitrogen from organic matter in soil to the benefit of host plants. *New Phytol* 199: 203–211
- Kong D, Hao Y, Cui H (2016) The WUSCHEL related Homeobox protein WOX7 regulates the sugar response of lateral root development in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* 9: 261–270
- Kryvoruchko IS, Sinharoy S, Torres-Jerez I, Sosso D, Pislariu CI, Guan D, Murray J, Benedito VA, Frommer WB, Udvardi MK (2016) MtSWEET11, a nodule-specific sucrose transporter of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* 171: 554–565
- Lemoine R, La Camera S, Atanassova R, Dedaldechamps F, Allario T, Pourtau N, Bonnemain JL, Laloi M, Coutos-Thevenot P, Maurousset L, Faucher M, Girousse C, Lemonnier P, Parrilla J, Durand M (2013) Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Front Plant Sci* 4: 272
- Li XQ, Zhang D (2003) Gene expression activity and pathway selection for sucrose metabolism in developing storage root of sweet potato. *Plant Cell Physiol* 44: 630–636
- Li TH, Li SH, Wang J, Yu KS (2003) Effects of water stress at different deficit intensities on transport and distribution of ¹⁴C-assimilates in micropropagated apple plants. *Eur J Horti Sci* 68: 227–233
- Li YZ, Zhao JY, Wu SM, Fan XW, Luo XL, Chen BS (2016) Characters related to higher starch accumulation in cassava storage roots. *Sci Rep* 6: 19823
- Li H, Li X, Xuan Y, Jiang J, Wei Y, Piao Z (2018) Genome wide identification and expression profiling of sweet genes family reveals its role during *Plasmodiophora brassicae*-induced formation of clubroot in *Brassica rapa*. *Front Plant Sci* 9: 207
- Lloyd JR, Kossmann J (2015) Transitory and storage starch metabolism: two sides of the same coin? *Curr Opin Biotechnol* 32: 143–148
- Ludewig F, Flüge U-I (2013) Role of metabolite transporters in source-sink carbon allocation. *Front Plant Sci* 4: 231
- Manck-Gotzenberger J, Requena N (2016) Arbuscular mycorrhiza symbiosis induces a major transcriptional reprogramming of the potato SWEET sugar transporter family. *Front Plant Sci* 7: 487
- Martin F, Kohler A, Murat C, Veneault-Fourrey C, Hibbett DS (2016) Unearthing the roots of ectomycorrhizal symbioses. *Nat Rev Microbiol* 14: 760–773
- Milne RJ, Grof CPL, Patrick JW (2018) Mechanisms of phloem unloading: shaped by cellular pathways, their conductances and sink function. *Curr Opin Plant Biol* 43: 8–15
- Miotto-Vilanova L, Jacquard C, Courteaux B, Wortham L, Michel J, Clement C, Barka EA, Sanchez L (2016) *Burkholderia phytofirmans* PsJN confers grapevine resistance against *Botrytis cinerea* via a direct antimicrobial effect combined with a better resource mobilization. *Front Plant Sci* 7: 1236
- Ogawa A, Ando F, Toyofuku K, Kawashima C (2009) Sucrose metabolism for the development of seminal root in maize seedlings. *Plant Prod Sci* 12: 9–16
- Oparka KJ, Duckett CM, Prior DAM, Fisher DB (1994) Real-time imaging of phloem unloading in the root tip of *Arabidopsis*. *Plant J* 6: 759–766
- Patrick JW (1997) Phloem unloading: sieve element unloading and post-sieve element transport. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 191–222
- Patrick J (2013) Does Don Fisher's high-pressure manifold model account for phloem transport and resource partitioning? *Front Plant Sci* 4: 184
- Péron T, Candat A, Montiel G, Veronesi C, Macherel D, Delavault P, Simier P (2016) New insights into phloem unloading and expression of sucrose transporters in vegetative sinks of the parasitic plant *Phelipanche ramosa* L. (Pomel). *Front. Plant Sci* 7: 2048
- Rasmann S, Turlings TCJ (2016) Root signals that mediate mutualistic interactions in the rhizosphere. *Curr Opin Plant Biol* 32: 62–68
- Ross-Elliott TJ, Jensen KH, Haaning KS, Wager BM, Knoblauch J, Howell AH, Mullendore DL, Monteith AG, Paultre D, Yan D, Otero S, Bourdon M, Sager R, Lee J-Y, Helariutta Y, Knoblauch M, Oparka KJ (2017) Phloem unloading in *Arabidopsis* roots is convective and regulated by the phloem-pole pericycle. *eLife* 6: e24125
- Ruan YL (2014) Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Ann Rev Plant Biol* 65: 33–67
- Ruehr NK, Offermann CA, Gessler A, Winkler JB, Ferrio JP, Buchmann N, Barnard RL (2009) Drought effects on allocation of recent carbon: from beech leaves to soil CO₂ efflux. *New Phytol* 184: 950–961
- Sasse J, Martinoia E, Northen T (2017) Feed your friends: do plant exudates shape the root microbiome? *Trends Plant Sci* 23: 25–41
- Schroeder JI, Delhaize E, Frommer WB, Gueriot ML, Harrison MJ, Herrera-Estrella L, Horie T, Kochian LV, Munns R, Nishizawa NK, Tsay Y-F, Sanders D (2013)

- Using membrane transporters to improve crops for sustainable food production. *Nature* 497: 60–66
- Schwachtje J, Karojet S, Thormahlen I, Bernholz C, Kunz S, Brouwer S, Schwochow M, Kohl K, van Dongen JT (2011) A naturally associated rhizobacterium of *Arabidopsis thaliana* induces a starvation-like transcriptional response while promoting growth. *PLoS One* 6: e29382
- Sevanto S (2014) Phloem transport and drought. *J Exp Bot* 65: 1751–1759
- Strock CF, Morrow de la Riva L, Lynch JP (2018) Reduction in root secondary growth as a strategy for phosphorus acquisition. *Plant Physiol* 176: 691–703
- Sugiyama A, Saida Y, Yoshimizu M, Takanashi K, Sosso D, Frommer WB, Yazaki K (2016) Molecular characterization of LJSWEET3, a sugar transporter in nodules of *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol* 58: 298–306
- Sulpice R, Pyl E-T, Ishihara H, Trenkamp S, Steinfath M, Witucka-Wall H, Gibon Y, Usadel B, Poree F, Piques MC, Von Korff M, Steinhauser MC, Keurentjes JJB, Guenther M, Hoehne M, Selbig J, Fernie AR, Altmann T, Stitt M (2009) Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 10348–10353
- Tisserant E, Malbreil M, Kuo A, Kohler A, Symeonidi A, Balestrini R, Charron P, Duensing N, Frei dit Frey N, Gianinazzi-Pearson V, Gilbert LB, Handa Y, Herr JR, Hijri M, Koul R, Kawaguchi M, Krajinski F, Lammers PJ, Masclaux FG, Murat C, Morin E, Ndikumana S, Pagni M, Petitpierre D, Requena N, Rosikiewicz P, Riley R, Saito K, San Clemente H, Shapiro H, van Tuinen D, Bécard G, Bonfante P, Paszkowski U, Shachar-Hill YY, Tuskan GA, Young JPW, Sanders IR, Henrissat B, Rensing SA, Grigoriev IV, Corradi N, Roux C, Martin F (2013) Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 20117–20122
- Tureson H, Andersson M, Marttila S, Thulin I, Hofvander P (2014) Starch biosynthetic genes and enzymes are expressed and active in the absence of starch accumulation in sugar beet tap-root. *BMC Plant Biol* 14: 104
- Udvardi M, Poole PS (2013) Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Ann Rev Plant Biol* 64: 781–805
- Veillet F, Gaillard C, Coutos-Thévenot P, La Camera S (2016) Targeting the *AtCWIN1* gene to explore the role of invertases in sucrose transport in roots and during *Botrytis cinerea* infection. *Front Plant Sci* 7: 1899
- Wang X, Chang L, Tong Z, Wang D, Yin Q, Wang D, Jin X, Yang Q, Wang L, Sun Y, Huang Q, Guo A, Peng M (2016) Proteomics profiling reveals carbohydrate metabolic enzymes and 14-3-3 proteins play important roles for starch accumulation during cassava root tuberization. *Sci Rep* 6: 19643
- Westwood JH, Yoder JI, Timko MP, dePamphilis CW (2010) The evolution of parasitism in plants. *Trends Plant Sci* 15: 227–235
- Yang J, An D, Zhang P (2011) Expression profiling of cassava storage roots reveals an active process of glycolysis/gluconeogenesis. *J Integr Plant Biol* 53: 193–211
- Yazdanbakhsh N, Sulpice R, Graf A, Stitt M, Fisahn J (2011) Circadian control of root elongation and C partitioning in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* 34: 877–894
- Zhao D, You Y, Fan H, Zhu X, Wang Y, Duan Y, Xuan Y, Chen L (2018) The role of sugar transporter genes during early infection by root-knot nematodes. *Int J Mol Sci* 19: 302

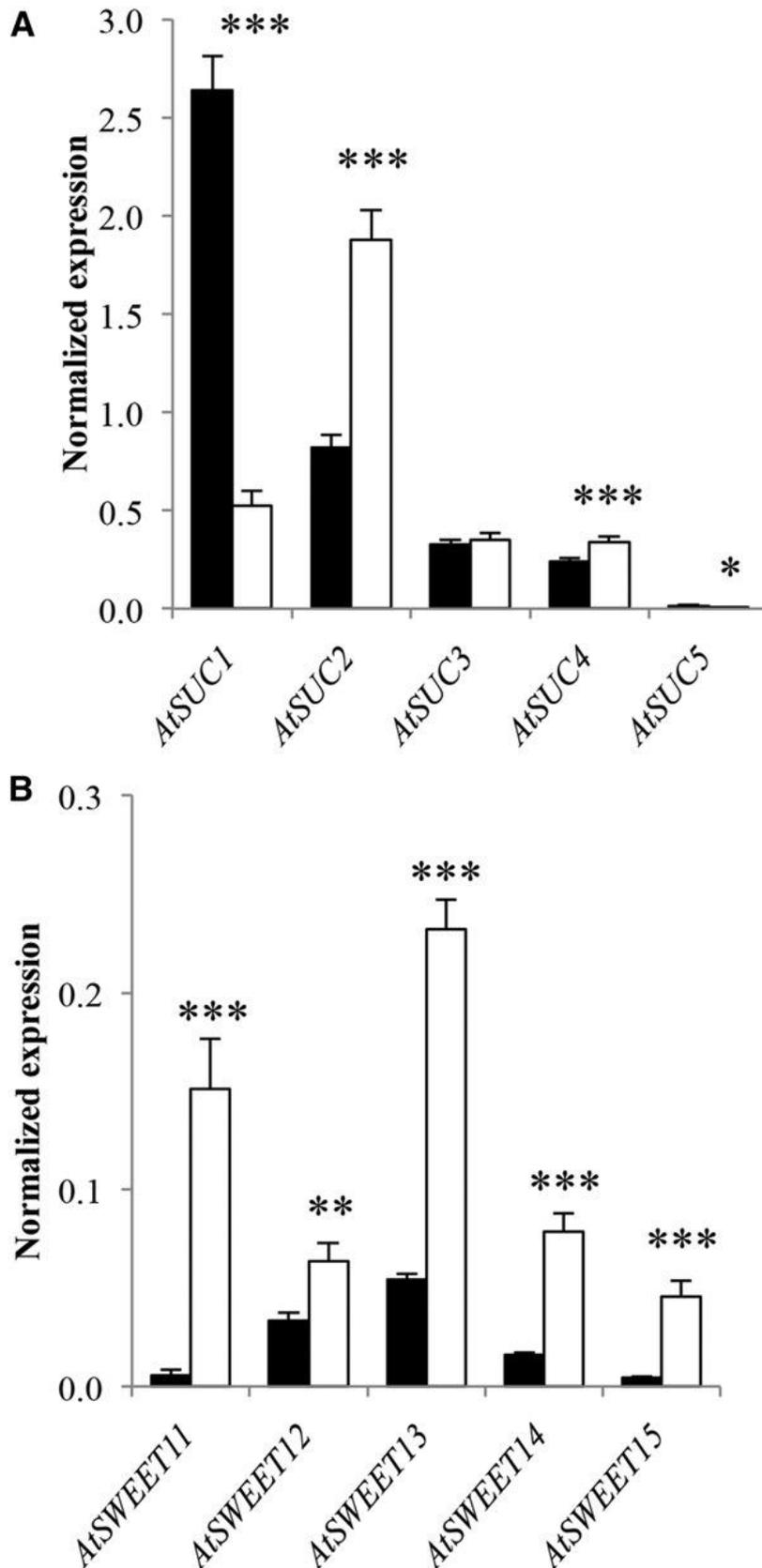


Figure 15. Expression des gènes AtSUC et AtSWEET dans les racines en conditions de carence hydrique (barres blanches) et en condition témoin (barres noires) (Durand *et al.*, 2016).

L'expression relative des AtSUCs (A) et AtSWEETs (B) a été mesurée par RT-qPCR. Les données sont normalisées (pas d'unité) au niveau d'expression du gène de référence At5g12240 (Czechowski *et al.*, 2005) et sont des moyennes (+/- erreur standard) obtenues à partir du pool de plantes (n = 12) de 11 expériences indépendantes. Les astérisques représentent des différences significatives par rapport aux plantes témoins, telles que déterminées par un test de Two / K (*, P, 0,05; **, P, 0,01 et ***, P, 0,005).

5 Objectifs de l'étude

Le groupe de recherche que j'ai intégré pour effectuer ma thèse s'intéresse à l'allocation du carbone dans la plante et les relations source-puits. La plante modèle utilisée est *Arabidopsis thaliana* et le puits étudié est la racine. Les transporteurs de saccharose sont étudiés pour leur implication dans les relations source-puits. Deux thèses précédemment effectuées dans ce groupe (Dany Mainson, 2013 ; Mickaël Durand, 2015) servent de base à mon travail. Un des leitmotivs de ce groupe a été de travailler sur des plantes adultes et non des plantules, que ce soit en hydroponie (Durand *et al.*, 2018) ou en rhizobox (voir **chapitre II, partie 2**) afin de se placer à un stade où les organes sont plus développés. L'objectif de ces travaux était de comprendre le rôle des transporteurs de saccharose dans l'allocation du carbone dans les racines. Dans ce but, des mesures de transport à longue distance, des mesures de teneurs en sucres et des suivis phénotypiques ont été réalisés.

Ces travaux précédents ont permis d'identifier les transporteurs de saccharose exprimés au niveau des racines, soit par approche microarray, soit par qRT-PCR. Ainsi, l'expression des transporteurs *AtSUC1* à *5* et *AtSWEET11* à *15* a été trouvée dans les racines (**Figure 15, barres noires**). *AtSUC1* y est le plus exprimé pour les transporteurs de type SUC, suivi par *AtSUC2*. Pour les transporteurs SWEETs, *AtSWEET12* et *13* y sont les plus exprimés. De plus, l'étude des transporteurs de saccharose dans les racines d'*Arabidopsis thaliana* a été effectuée en cas de stress osmotique (en hydroponie) ou en carence hydrique (en rhizobox). Il a été observé dans les racines de fortes différences d'expression en cas de carence hydrique (**Figure 15, barres blanches**). Pour les transporteurs SUC, *AtSUC2* y est plus exprimé qu'*AtSUC1* et pour les SWEETs, *AtSWEET13* est fortement induit et *AtSWEET11* est le second plus exprimé (Durand *et al.*, 2016). *AtSUC1* et *2* et *AtSWEET11*, *12* et *13* sont donc des candidats intéressants pour étudier l'allocation du carbone dans les racines puisque ce sont les transporteurs de saccharose les plus exprimés dans ce compartiment et que l'expression de certains de ces gènes est modulée par des stress connus pour modifier les relations source-puits. Même si le rôle de ces transporteurs est relativement bien connu au niveau foliaire, leur rôle est encore peu élucidé au niveau racinaire.

Dans ce contexte, l'objectif de mes travaux de thèse est de comprendre le rôle des transporteurs de saccharose dans les racines et de trouver leur localisation racinaire. L'étude a été focalisée sur les transporteurs de type SUC les plus exprimés dans les racines, *AtSUC1* et *AtSUC2*.

La première partie des travaux présentés dans cette thèse (**Chapitre III**) est une publication qui a permis d'orienter les travaux ultérieurs et à laquelle j'ai participé *via* mes travaux de master 2.

La deuxième partie des travaux présentés (**Chapitre IV**) est l'étude du rôle et la localisation d'*AtSUC1* par une approche de génétique inverse, *via* l'étude du mutant *suc1*. Des observations des

phénotypes, des analyses des flux de saccharose et de l'expression des gènes codant des transporteurs de saccharose ont été réalisées sur des plantes bien hydratées et en cas de carence hydrique pour faire varier les relations sources-puits. Pour pouvoir étudier les racines, cette étude a été effectuée sur des plantes cultivées en rhizobox. De plus, afin de travailler sur des plantes adultes ces plantes ont été récoltées après 30 jours de culture pour les diverses analyses. La localisation au niveau des racines de l'expression a été effectuée grâce à un gène rapporteur (GUS) et la localisation de la protéine a été amorcée par immunolocalisation.

Dans une troisième partie (**Chapitre V**), l'étude porte sur *AtSUC2* via l'utilisation d'un mutant KO *suc2*. Pour celle-ci, il a été utilisé une technique de micro-greffe afin d'observer l'impact dans les feuilles et les racines de la mutation spécifiquement dans le compartiment racinaire. Comme pour l'étude de *suc1*, les phénotypes, les flux de carbone et l'expression des transporteurs de saccharose ont été analysés sur des plantes âgées de 30 jours, cultivées en rhizobox. L'expression du gène *AtSUC2* ainsi que la protéine *AtSUC2* a été localisée au niveau racinaire.

Enfin, en vue de poursuivre l'étude des transporteurs de saccharose, l'obtention de mutants multiples a été amorcée par la technique CRISPR-Cas9. L'objectif à long terme est d'obtenir les doubles mutants *suc1/suc2* et *suc1/suc5* ainsi que des mutants pour *AtSWEET11, 12, 13, 14* et *15*, allant du simple mutant au quintuple mutant. Ces travaux n'étant pas achevés, ils sont présentés en **Annexe II**.

L'objectif global de cette étude est de mieux comprendre le rôle des transporteurs de saccharose dans les racines et de les intégrer dans les relations sources-puits au niveau de la plante entière.

Chapitre II : Matériel et méthodes

Tableau 2 : Liste et détails des différentes lignées utilisées au cours des expérimentations

Nom	Identifiant	Type	Écotype/Fond génétique	Source
Col-0	-	Sauvage	Col-0	Centre des ressources biologiques de Versailles
<i>suc1</i>	GK-139B11#05	Mutant Knock-Out	Col-0	Sivitz <i>et al.</i> , 2008
<i>suc2-2</i>	SALK_038124	Mutant Knock-Out	Col-0	Sivitz <i>et al.</i> , 2008
<i>suc2F</i>	<i>pCmGAS::cSUC2</i>	Mutant Knock-Out Complémenté	SALK_038124 (<i>suc2-2</i>)	Srivastava <i>et al.</i> , 2008
SUC1-GUS #7	<i>pAtSUC1::SUC1::GUS</i>	Rapporteur	Col-0	Sivitz <i>et al.</i> , 2008
SUC1-GUS #12	<i>pAtSUC1::SUC1::GUS</i>	Rapporteur	Col-0	Sivitz <i>et al.</i> , 2008
SUC2-GUS 4-2	<i>pAtSUC2::GUS</i>	Rapporteur	Col-0	F.Vilaine, non publié
SUC2-GUS 8-2	<i>pAtSUC2::GUS</i>	Rapporteur	Col-0	F.Vilaine, non publié
SUC2-GFP	<i>pAtSUC2::GFP</i>	Rapporteur	C-24	Imlau <i>et al.</i> , 1999
SUC2-RED TIDE	<i>pAtSUC2::H2B-2xCherry</i>	Rapporteur	Col-0	Marquès-Bueno <i>et al.</i> , 2016

1 Matériel végétal

Les expérimentations ont été réalisées sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Famille des Brassicaceae, Ordre des Brassicales, Clade des Rosidées, Eudicotylédones), écotype Col-0 pour toutes les plantes, sauvages ou transformées, excepté pour la lignée transformée exprimant la *GFP* sous le contrôle du promoteur du gène *AtSUC2*, d'écotype C24. Les graines sauvages et les graines des mutants ont été fournies par différents laboratoires. Les différentes lignées utilisées ainsi que leurs origines et leurs caractéristiques sont présentées dans le **tableau 2**.

La lignée *suc1* correspond au mutant *Atsuc1* dans un fond génétique Col-0. Le T-DNA a été inséré dans le dernier intron du gène *AtSUC1* (Sivitz *et al.*, 2008).

La lignée *suc2.2* correspond à un mutant *Atsuc2* dans un fond génétique Col-0, créé par l'insertion d'un T-DNA dans le deuxième intron du gène *AtSUC2* (Srivastava *et al.*, 2008).

La lignée *suc2F* (Srivastava *et al.*, 2008) correspond à une lignée « knock out » pour *AtSUC2* (*suc2.2*), complétée avec le gène *AtSUC2* sous le contrôle du promoteur de la galactinol synthase du melon (*pCmGAS1*), ne s'exprimant que dans les fines nervures des feuilles matures. Cette lignée permet d'avoir des plantes partiellement complétées pour la mutation *suc2* au niveau des feuilles et présentant moins de retard de développement que le mutant *Atsuc2*.

Les lignées SUC1-GUS #7 et #12 (*pAtSUC1::SUC1::GUS*), expriment le gène rapporteur GUS sous le contrôle du promoteur de *AtSUC1* (2 kb) fusionné au gène *AtSUC1*, introns et exons compris (Sivitz *et al.*, 2007).

Les lignées SUC2-GUS 4-2 et 8-2 (*pAtSUC2::GUS*) expriment le gène rapporteur GUS sous le contrôle du promoteur de *AtSUC2* (2,3 kb) (Truernit et Sauer, 1995).

La lignée SUC2-GFP (*pAtSUC2::GFP*) exprime le gène de la GFP sous le contrôle du promoteur de *AtSUC2* (0,9 kb) (Stadler *et al.*, 2005).

La lignée SUC2-RED TIDE (*pAtSUC2::H2B-2xCherry*) (Marquès-Bueno *et al.*, 2016) porte deux copies de la mCherry (fluorochrome, excitation 587 nm/émission 610 nm) sous le contrôle de promoteur de *AtSUC2* et la protéine est adressée au noyau des cellules grâce au gène *H2B*.

2 Culture et récolte des plantes

2.1 Culture des plantes cultivées intégralement en Rhizobox

Les plantes destinées à l'étude du mutant *suc1* ainsi que les plantes destinées à la localisation (gène rapporteur ou immunohistochimie) ont été cultivées en rhizobox comme décrit ci-après.

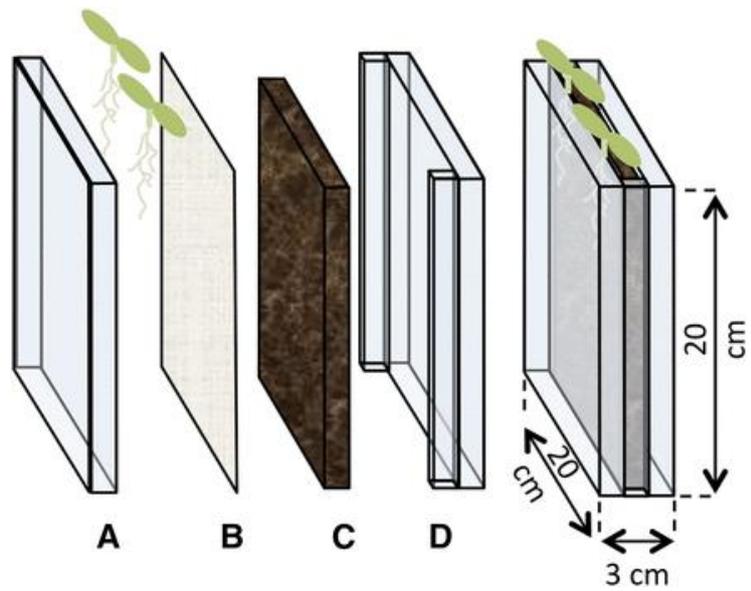


Figure 16 : Système de culture d'*Arabidopsis thaliana*, en rhizobox (Thèse Mickaël Durand, 2015).

A et D : paroi de Plexiglas, B : membrane de nylon de 7 µm de taille de pore, C : terreau.

Le système de culture (**Figure 16**) permet d'étudier le développement racinaire des plantes en obtenant des racines propres, tout en s'approchant des conditions de culture en pleine terre. Il a été mis au point par Xiong *et al.* (2006) et adapté au laboratoire au cours d'études précédentes (Thèse Dany Mainson, 2012 ; thèse Mickael Durand, 2015 ; Durand *et al.*, 2016). La rhizobox est constituée de deux plaques de Plexiglas (20 x 20 x 1 cm) dont une plaque amovible (**Figure 16, A**) et l'autre fixe, séparées par deux espaceurs en Plexiglas (20 x 1 x 1 cm) (**Figure 16, D**) ainsi que d'une membrane de nylon ($\varnothing = 7 \mu\text{m}$, Sefar Nitex 03-7/2, Buisine) (**Figure 16, B**) (Wenzel *et al.*, 2001) placée entre la plaque amovible et le terreau. Cette membrane maintient les racines séparées du terreau, tout en permettant les échanges d'eau et de sels minéraux. La rhizobox est maintenue fermée grâce à deux pinces (Wolfcraft, Leroy Merlin). Dans le but de maintenir le compartiment racinaire des plantes à l'obscurité et ainsi limiter l'apparition d'autres organismes comme des algues, une bande de ruban adhésif noir est placée sur la tranche supérieure de chaque plaque constituant la rhizobox et un sac de plastique noir (20 x 20 cm) enveloppe le système. Le terreau utilisé pour remplir les rhizobox est le terreau « LP502 » de la société Peltracom pour toutes les expérimentations, sauf pour celles concernant Atsuc1 où le terreau « 276-BP 4 Argile » de chez Klasmann a été utilisé. Le terreau est tout d'abord tamisé pour éliminer les gros morceaux puis autoclavé (1h à 120°C) pour limiter les contaminations (les mouches du terreau par exemple). De l'eau additionnée d'engrais à 1 mg.l⁻¹ (Peters Professional, Everris) est ensuite ajoutée au terreau (200 ml d'eau pour 1 litre de terreau « LP502 » ou 150 ml pour 1 litre de terreau « 276-BP 4 Argile ») et, pour chaque rhizobox, un volume de 500 ml de terreau est mesuré puis étalé sur la plaque de Plexiglas fixe. La quantité d'eau apportée au terreau permet de se placer à la capacité au champ, c'est-à-dire à la quantité maximum d'eau que la terre peut retenir (ici 0,8 g d'eau pour 1 g de terreau). Le tamisage et l'humidification du terreau permettent d'obtenir un remplissage homogène de la rhizobox. De cette manière la formation de plis, de fissures ou de bulles d'air entre la membrane de nylon et le terreau est limitée, ceux-ci pouvant biaiser le développement racinaire naturel des plantes. La membrane de nylon est ensuite placée contre le terreau puis les rhizobox sont refermées. Les rhizobox sont pesées avant et après remplissage de la terre afin de connaître précisément la masse de la terre ajoutée. Afin de maintenir le taux d'humidité de la terre, la quantité d'eau perdue par évaporation (terreau) et évapotranspiration (plantes) est estimée *via* la pesée des rhizobox et la masse d'eau manquante est ajoutée par arrosage sur la partie supérieure, quotidiennement pendant toute la durée de l'expérimentation.

Dans les rhizobox, trois emplacements de plantes (**Figure 17, A**) sont prévus sauf pour les rhizobox dont les plantes sont destinées aux expérimentations sur l'allocation du ¹⁴C où seuls deux emplacements de plantes (**Figure 17, B**) sont prévus afin d'éviter le chevauchement des racines. Ces

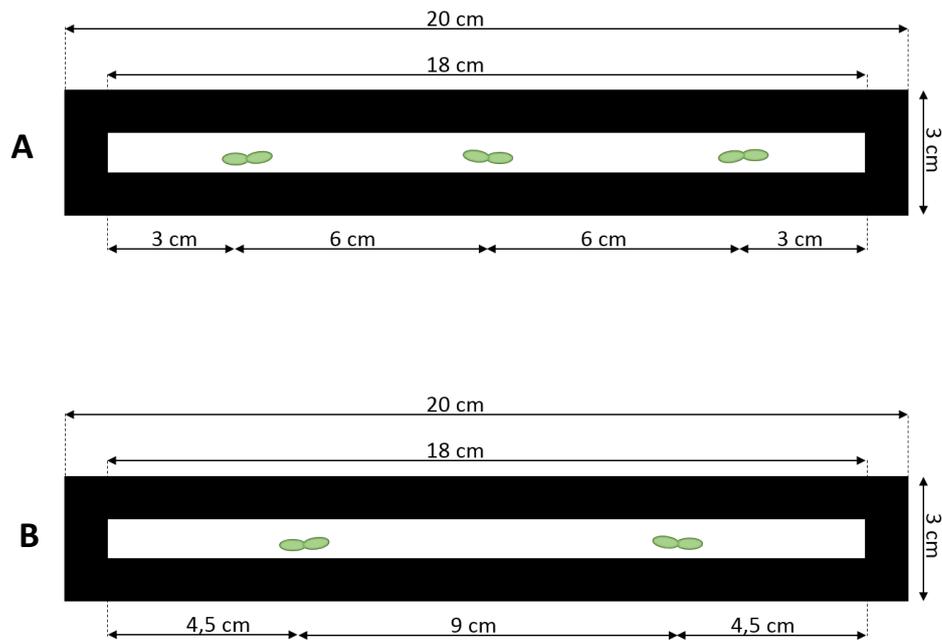


Figure 17 : Schéma de la disposition des plantes en rhizobox (Vue de dessus d'une rhizobox).

A : Emplacement dans le cas où il y a trois plantes par rhizobox, **B** Emplacement dans le cas où il y a deux plantes par rhizobox.

emplacements sont définis de manière à ce que toutes les plantes d'une même rhizobox aient une place équivalente pour se développer.

Le semis est réalisé par dépôt de 5 graines environ par emplacement, entre la membrane de nylon et la plaque de Plexiglas, dans une goutte de gélose (milieu MS 1/2 : « Murashige and Skoog » (M0233, Duchefa Biochemie), agar 0,7%). La gélose permet de maintenir une humidité autour de la graine et de fournir des microéléments pour ainsi favoriser sa germination. Jusqu'à la germination des graines, un plastique transparent est positionné à la surface des rhizobox pour maintenir une forte humidité à la surface du terreau et favoriser la germination. Après germination, une suppression des plantules excédentaires est effectuée de manière à ne laisser qu'une plante par emplacement.

Les rhizobox sont placées dans un phytotron (10 h de jour / 14 h de nuit ; T° : 23°C le jour / 18°C la nuit ; humidité relative : 50% le jour / 70% la nuit ; intensité lumineuse au niveau des plantes : environ 80 $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PAR).

La récolte des plantes se fait à heure fixe (4h30 après le début de l'éclairage des plantes) afin d'éviter les fluctuations dues au rythme circadien et de se placer dans des conditions de photosynthèse optimales. Les racines et la rosette sont pesées séparément pour l'étude phénotypique et rapidement congelées dans de l'azote liquide. Ces échantillons seront destinés soit à la mesure des masses sèches et au dosage des sucres après lyophilisation, soit à l'analyse de l'expression des gènes. Tous les échantillons sont conservés à -80°C.

2.2 Application d'une carence hydrique en rhizobox

Il a été réalisé une expérimentation de carence hydrique en rhizobox sur le mutant *suc1*. Le déficit hydrique est présent dès le début et jusqu'à la fin de l'expérimentation, du semis jusqu'à 30 jours après. La préparation des rhizobox est identique à celle présentée précédemment mais la terre est mise à sécher sous hotte à flux laminaire pour atteindre une teneur en eau du sol de 0,4 g d'eau par gramme de terreau c'est-à-dire 50% de la capacité au champ. La hotte à flux laminaire est utilisée afin d'accélérer le séchage du terreau et limiter des contaminations du terreau.

2.3 Réalisation de micro-greffes

Des micro-greffes ont été réalisées afin d'étudier l'effet de la suppression de l'expression d'un gène soit dans les feuilles soit dans les racines. Cette technique est simple comparée à l'utilisation de promoteur spécifique des feuilles ou des racines pour réaliser la même étude. La technique de micro-greffe a été adaptée d'après Marsch-Martínez *et al.* (2013). Le protocole est réalisé de la manière la

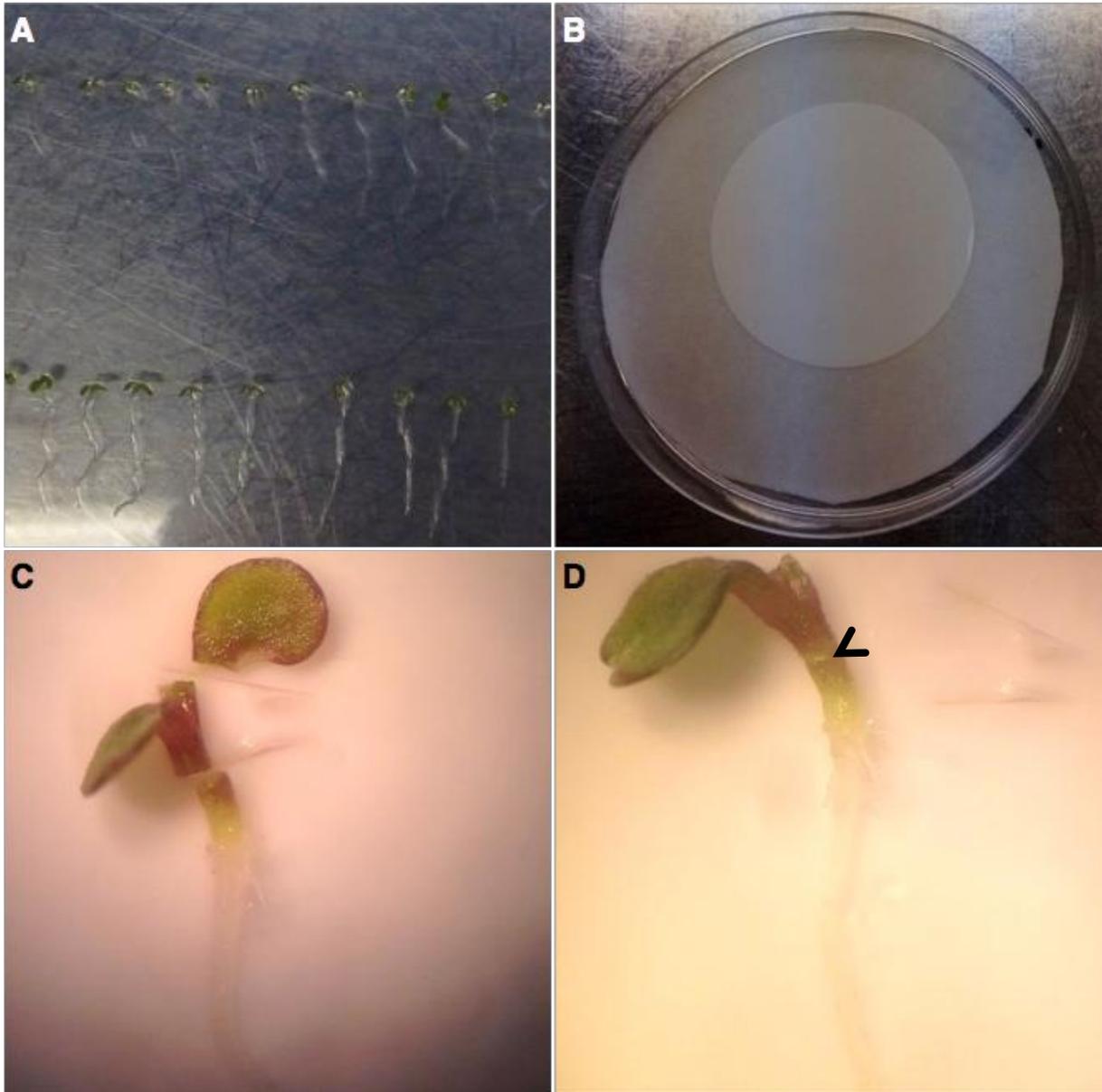


Figure 18 : Différentes étapes de la réalisation de greffes.

A : plantules de 5 jours, servant à la réalisation des greffes. **B** : boîtes de Pétri, papier Whatmann et membrane de nitrocellulose utilisés lors des greffes. **C** : plantule coupée au niveau de l'hypocotyle et d'un cotylédon. **D** : plantule après jonction des parties coupées, la flèche correspond à cette jonction.

plus stérile possible afin de limiter le développement de microorganismes autour des plantules. Tout d'abord, les graines de plantes sauvages (Col-0) ou de plantes mutantes ont été stérilisées par un lavage à l'éthanol 70% (1 min) puis un rinçage à l'hypochlorite de sodium (eau de javel) diluée au quart (5 min) et enfin quatre rinçages d'une minute à l'eau distillée stérile. Une centrifugation brève est réalisée entre chaque étape afin de sédimenter les graines et faciliter les pipetages. Les graines stérilisées sont ensuite disposées en lignes sur une boîte de Pétri contenant un milieu MS : « Musrashige and Skoog » (M0233, Duchefa Biochemie) dilué au demi avec 0,5% ou 2% de saccharose et 0,7% d'agar. Les boîtes sont ensuite placées à l'obscurité à 4°C pendant un à deux jours (stratification) pour homogénéiser la germination puis placées de manière verticale dans une chambre climatique (Snijders scientific, 16 h de jour/8 h de nuit, 50% humidité le jour, 70% la nuit, intensité lumineuse : $120 \mu\text{mol de photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Cinq jours après (**Figure 18, A**), les plantules sont disposées sur un disque de papier filtre de nitrocellulose (Millipore, pore : $0,45\mu\text{m}$) lui-même placé sur un disque de papier Whatmann 3MM humidifié, dans une boîte de Pétri (**Figure 18, B**). Un cotylédon par plantule est sectionné permettant une meilleure disposition de celle-ci sur le support pour faciliter les étapes suivantes. La plantule est ensuite coupée en deux au niveau de l'hypocotyle quelques millimètres sous la base des cotylédons (**Figure 18, C**). Cette opération est réalisée sur deux plantules différentes, de manière à ce que soient isolées la rosette (le cotylédon restant et le méristème apical) d'une plante et la racine d'une seconde plante. Ces deux parties sont ensuite rapprochées le plus possible (dans le prolongement de leur fragment d'hypocotyle) et de manière à ce que leurs sections coïncident parfaitement (**Figure 18, D, Flèche**) La boîte est ensuite refermée et scellée avec du film plastique puis placée dans la chambre climatique de manière légèrement inclinée.

Les plantules sont ensuite repiquées en rhizobox. Le remplissage avec du terreau des rhizobox est réalisé comme décrit dans le paragraphe 2.1 de ce chapitre (avant la partie semis). Le succès de la greffe est vérifié avant repiquage sous loupe, en testant si la rosette ne se détache pas de la racine, à l'aide d'une paire de pinces. Le repiquage est réalisé par dépôt des plantules dans une goutte de gélose, entre la membrane et la paroi de Plexiglas, environ 5 à 6 jours après la greffe. Après repiquage des greffes, la pesée des rhizobox est réalisée et les quantités d'eau réajustées.

Les plantes sont récoltées 21 jours après le repiquage, soit 30 ou 31 jours après la sortie de stratification. La récolte des plantes se déroule comme décrit précédemment, c'est à dire 4h30 après le début de leur éclaircissement. Les racines et la rosette sont pesées séparément pour l'étude phénotypique et rapidement mises dans des tubes dans de l'azote liquide. Ces échantillons seront destinés soit à la mesure des masses sèches et au dosage des sucres, soit à l'analyse de l'expression des gènes. Les échantillons de feuilles et racines sont broyés finement dans de l'azote liquide. Tous les échantillons sont conservés à -80°C.

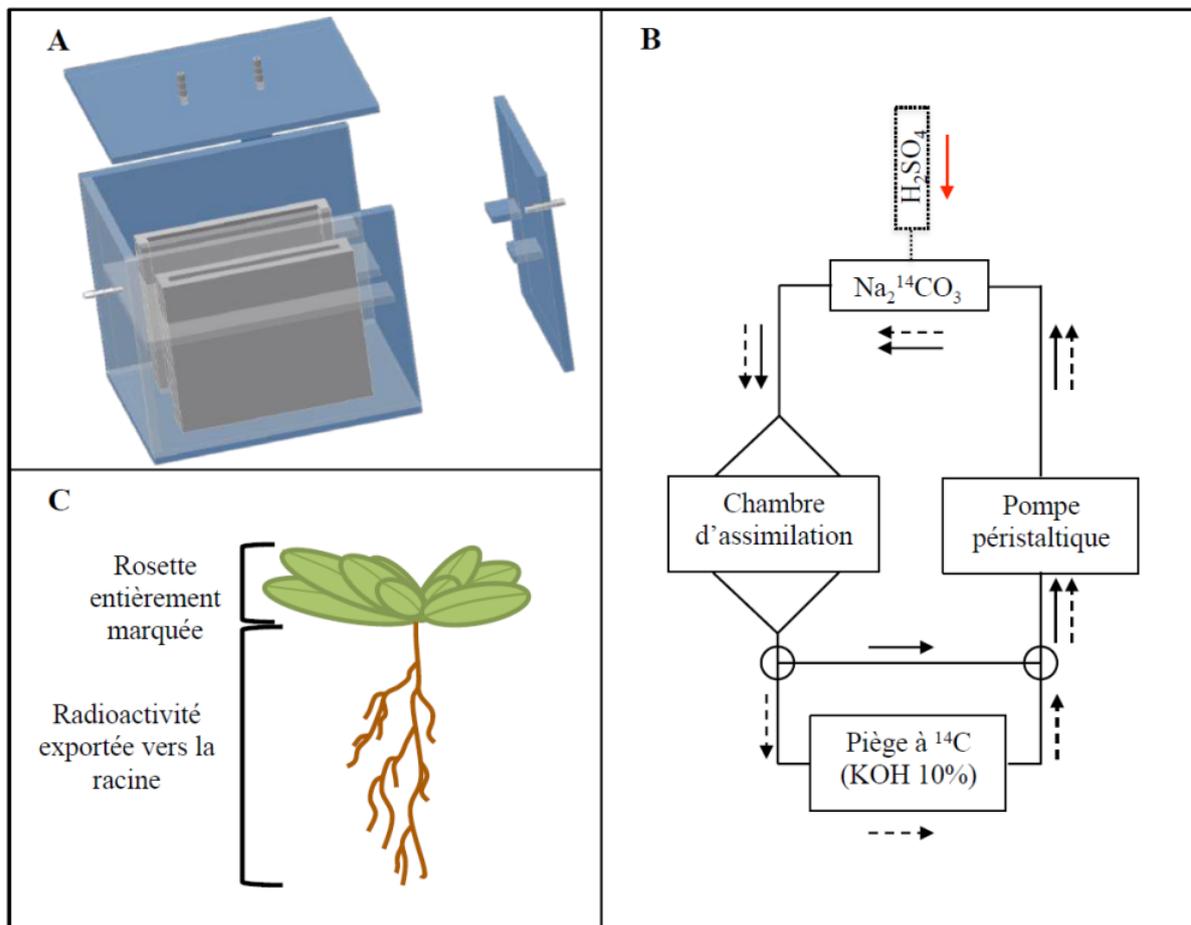


Figure 19 : Système utilisé pour l'étude de l'allocation du ^{14}C (Durand *et al.*, 2016).

A : Chambre d'assimilation conçue pour contenir deux rhizobox. **B** : Schéma du circuit de l'air dans le système d'assimilation. La phase de « Pulse » (flèches noires pleines), initiée par l'ajout d'acide sulfurique (flèche rouge) au bicarbonate de soude radiomarqué, est suivie par une période de piégeage du ^{14}C (flèche noires en pointillés). **C** : Après la période de chasse, la radioactivité retrouvée dans la racine correspond à la radioactivité exportée depuis les feuilles vers les racines.

Pour la suite de ce manuscrit, les constructions de greffe seront annotées en indiquant le génotype de la rosette en numérateur et le génotype des racines en dénominateur (exemple : une plante constituée de feuilles Col-0 greffées sur des racines de mutant *suc2-2* sera annotée « Col-0/*suc2-2* »).

Lors de l'adaptation de la technique de greffe au laboratoire, une expérimentation a été réalisée afin de vérifier le succès des greffes en observant des échanges (notamment phloémiens) entre les feuilles et racines d'une plante après greffe. Pour cela la lignée transformée exprimant la GFP soluble sous le contrôle du promoteur du gène *AtSUC2* (*pAtSUC2::GFP*) a été greffée. Différentes constructions de greffe ont été observées au microscope (microscope : Olympus MVX10, caméra : Hamamatsu ORCA 03G, source lumineuse : X-Cite series 120PCQ), sur des plantes cultivées pendant 21 jours en rhizobox (après repiquage). Les différentes constructions utilisées sont : *pAtSUC2::GFP/pAtSUC2::GFP*, Col-0/*pAtSUC2::GFP*, *pAtSUC2::GFP/Col-0* et le témoin Col-0/Col-0.

3 Suivi des plantes

3.1 Suivi des flux de carbone dans les plantes : Etude de l'allocation du ^{14}C

Les expériences de marquage de la plante entière ont été effectuées sur des plantes âgées de 30 jours, à l'intérieur d'une enceinte de Plexiglas (**Figure 19, A**) placée sous une rampe lumineuse ($80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Cette enceinte, dont la partie supérieure d'un volume de 5 L va contenir l'air additionné de $^{14}\text{CO}_2$, a spécifiquement été construite pour accueillir deux rhizobox. Les rosettes se trouvent dans la partie supérieure et seront en contact avec le $^{14}\text{CO}_2$, alors que les systèmes racinaires sont dans la partie inférieure. Les deux parties sont séparées par une plaque empêchant l'entrée du $^{14}\text{CO}_2$ dans la partie inférieure. L'enceinte de Plexiglas est incluse dans un système étanche permettant de faire circuler le $^{14}\text{CO}_2$ (**Figure 19, B**). Il est à noter que les plantes sont placées sous une rampe lumineuse ($80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) dans la salle habilitée à la manipulation de la radioactivité 24 heures avant l'expérimentation afin de les acclimater aux nouvelles conditions de culture (température et humidité non régulées). Le $^{14}\text{CO}_2$, initialement présent sous forme de $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$ avec une activité spécifique de $54 \text{ mCi} \cdot \text{mmol}^{-1}$, est libéré dans la chambre étanche en acidifiant le bicarbonate de soude ($20 \mu\text{Ci}$) *via* l'ajout de 1 mL d'acide sulfurique 10% (**Figure 19, B**). La phase de libération du $^{14}\text{CO}_2$, aussi appelée phase de « pulse », génère une augmentation de la teneur en CO_2 inférieure à 2 ppm dans le système. La teneur en CO_2 dans la pièce est habituellement de 480 ppm. Le $^{14}\text{CO}_2$ est distribué à l'ensemble du système *via* la pompe péristaltique. Après une période de « pulse » de 15 minutes, le flux d'air est dirigé vers le piège à CO_2 (KOH 10%) pendant 5 minutes pour supprimer toute trace de radioactivité dans l'air circulant dans le circuit (**Figure 19, B**). La chambre est ensuite ouverte et les plantes sont



Figure 20 : Différentes étapes pour la mesure de la surface foliaire projetée.

A : Image initiale, **B :** Image après élimination des pixels autres que le vert, **C :** Image après la transformation des pixels vert en pixels noirs.

ensuite déplacées sous une rampe lumineuse ($80 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) pour effectuer la période de « chasse » d'une durée de 45 min durant laquelle la radioactivité sera transportée dans la plante (**Figure 19, C**). A la fin de la période de « chasse », la rosette est immédiatement séparée de la racine et les organes sont ensuite placés entre une feuille de papier Whatman® 3MM et une feuille de Mylar. L'ensemble est disposé entre deux plaques d'acier préalablement refroidies à -80°C .

Les échantillons sont congelés à -30°C puis lyophilisés (1 semaine, -30°C) (Freezone6, Labconco). Après lyophilisation, la répartition de la radioactivité est visualisée en exposant les échantillons sur des écrans PhosphorImager (Storage Phosphor Screen, Molecular Dynamics). Après 5 jours d'exposition, le marquage est révélé, à une résolution de $25 \mu\text{m}$ par pixel, à l'aide d'un scanner (Scanner Typhoon, GE Healthcare). La quantité de radioactivité présente dans chacun des organes est ensuite déterminée. Les rosettes et les racines sont pesées indépendamment et incubées dans $200 \mu\text{L}$ de tampon de digestion (Acide perchlorique-Eau oxygénée 30%-Triton X100 0,1% ; 56-17-27 ; v-v-v) à 55°C pendant 24 h. Le milieu de scintillation (Ecolite™) est ensuite ajouté (4 ml) et la radioactivité est quantifiée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (Tri-Carb2910, Perkin Elmer).

3.2 Suivi phénotypique et physiologique des plantes

3.2.1 Nombre de feuilles et surface projetée

Le nombre de feuilles et la surface foliaire projetée ont été établis à partir des photographies des plantes prises du dessus de la rhizobox avec une règle graduée pour déterminer l'échelle.

Le nombre de feuilles a ensuite été déterminé en comptant manuellement les feuilles à partir des photographies.

La surface foliaire projetée a été déterminée sur la base des photographies des plantes (**Figure 20, A**) en utilisant logiciel d'analyse d'image ImageJ et le plugin « Threshold Color ». La première étape de l'analyse consiste à éliminer tous les pixels différents du vert (**Figure 20, B**) afin d'isoler les rosettes. Puis les pixels restants (les pixels verts) sont transformés en pixels noirs (**Figure 20, C**). Un outil de sélection des formes de couleur noire permet ensuite de sélectionner les rosettes alors entièrement constituées de pixels noirs. Enfin, un outil de mesure du nombre de pixels sélectionnés calcule l'aire de la rosette en pixel, qui avec le calibrage de l'échelle (règle graduée), est convertie en unité de mesure de surface (cm^2 ou mm^2). Le protocole utilisé est préalablement décrit dans la thèse de Dany Mainson (2013).

Les mesures de nombre de feuilles et de surface foliaire projetée ont été réalisées sur 7 à 10 plantes par condition pour chaque réplicat biologique pour les expérimentations sur AtSUC1. Au

niveau des expérimentations sur AtSUC2, 21 à 42 plantes par condition pour chaque réplicat biologique ont été utilisées pour les mesures. Le test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer les valeurs obtenues des conditions, deux à deux.

3.2.2 Mesure de la longueur de la racine principale

Pour mesurer la longueur de la racine principale, les images des systèmes racinaires radiomarqués, obtenues lors de l'étude de l'allocation du ^{14}C (Cf. 3.1.1) ont été utilisées. Les images étant obtenues lors de la récolte, les plantes sont âgées de 30 jours après le semis ou 21 jours après repiquage pour les greffes. Ces images sont scannées avec une résolution de 25 μm par pixel ce qui permet d'avoir l'échelle. La longueur est mesurée grâce au logiciel ImageJ en retraçant la racine principale avec l'outil de sélection linéaire.

L'analyse de la longueur totale du système racinaire et du nombre de racines latérales a été abandonnée au vu de la complexité du système racinaire à 30 jours et des grands risques d'erreur qui en découlent et surtout du manque d'outils disponibles pour des mesures sur des plantes de cet âge.

3.2.3 Teneur en eau (couramment nommé Water Content, « WC »)

Le WC a été évalué dans les feuilles et les racines lors des expériences de carence hydrique appliquée en rhizobox. Pour déterminer le WC, la masse fraîche (MF) de l'organe considéré a immédiatement été mesurée après séparation de la racine et de la rosette. La masse sèche (MS), elle, a été mesurée après lyophilisation (5 jours, $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Freezone6, Labconco). Le WC est ensuite déterminé comme suit : $\text{WC} = (\text{MF} - \text{MS}) / (\text{MF})$. Pour les rosettes, les mesures ont été effectuées sur plante individuelle. Quant aux racines, les mesures ont été effectuées sur des pools de 3 à 9 plantes pour des raisons de précision de pesée du matériel lyophilisé.

Pour les expérimentations sur AtSUC1, les mesures de teneur en eau ont été réalisées sur 3 à 9 plantes par condition, pour chaque réplicat biologique. Au niveau des expérimentations sur AtSUC2, 8 à 12 plantes par condition pour chaque réplicat biologique ont été utilisées pour les mesures. Le test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer les valeurs obtenues des conditions, deux à deux.

3.3 Suivi biochimique des plantes

3.3.1 Extraction et dosage des sucres solubles

L'extraction est réalisée sur des racines et des rosettes broyées (voir dans ce chapitre, partie 2.1 et 2.3) et préalablement lyophilisées (5 jours, $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Freezone6, Labconco), suivant le protocole d'extraction établi par Dickson (1979). Trois extractions successives au Méthanol-Chloroforme-Eau

Tableau 3 : Volumes (en μl) utilisés dans les réactions de dosages de saccharose, glucose et fructose avec le kit Megazyme « Sucrose, D-Fructose and D-Glucose ».

	Réaction saccharose		Réaction glucose	
	sucres extraits	Blanc	Sucres extraits	Blanc
Echantillon	10	/	10	/
Eau	40	50	60	70
B-Fructosidase	20	20	/	/
Agitation forte 1 min (minimum) + incubation 15min puis MIX (180μl/puits)				
Eau	160			
Tampon	10			
NADP+/ATP	10			
Agitation forte 1 min (minimum) puis incubation 3min, lecture $\lambda=340\text{ nm}$				
Hexokinase/G6PDH / 2	4			
Agitation forte 1 min (minimum) puis incubation 15min, lecture $\lambda=340\text{ nm}$				
PGI / 2	/		4	
Agitation forte 1 min (minimum) puis incubation 10min, lecture $\lambda=340\text{ nm}$				
Volume total	254.0		258.0	

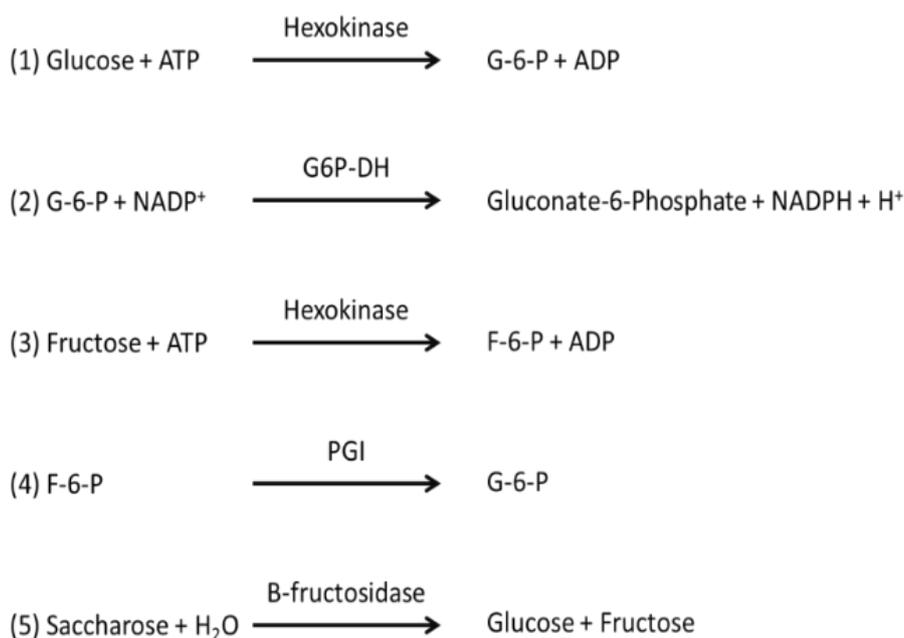


Figure 21 : Equations de la méthode de dosage des sucres solubles par Megazyme.

G6P : Glucose-6-Phosphate ; F6P : Fructose-6-Phosphate ; G6P-DH : Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase ; PGI : Glucose-6-Phosphate Isomérase.

(12-5-3 v/v/v) de l'extrait broyé sont réalisées (1,5 ml et deux fois 0,5 ml). Les surnageants obtenus sont regroupés et 0,6 fois leur volume en eau est ajouté. Après une brève centrifugation, la phase aqueuse (supérieure) est récupérée et mise à évaporer à 30°C (MiVac Quattro, Genevac). Le culot obtenu est repris dans 500 µl d'eau pour les feuilles et 200 µl d'eau pour les racines.

Les teneurs en sucres solubles (saccharose, glucose et fructose) des extraits sont déterminées grâce au kit de dosage « Sucrose, D-Fructose and D-Glucose » (Megazyme) et les volumes utilisés sont présentés dans le **tableau 3**. Les dosages ont été miniaturisés par rapport aux instructions du kit pour être adaptés en plaque de 96 puits durant ma première année de thèse, ainsi la lecture des absorbances a été réalisée avec un lecteur de plaques (MultiskanGO, Thermo Scientific).

Au cours d'une première série de dosages, le glucose endogène présent dans les extraits est tout d'abord phosphorylé en glucose-6-phosphate par une hexokinase (**Figure 21, (1)**) puis converti en gluconate-6-phosphate par la glucose-6-phosphate deshydrogénase (**Figure 21, (2)**). Ceci entraîne la réduction de NADP^+ en NADPH. Cette réaction est stœchiométrique avec la quantité de glucose. La teneur en NADPH est calculée à partir de la mesure d'absorbance au spectrophotomètre ($\lambda = 340 \text{ nm}$). Concernant le fructose, celui-ci est dans un premier temps phosphorylé en fructose-6-phosphate par une hexokinase (**Figure 6, (3)**) puis converti en glucose-6-phosphate par la glucose-6-phosphate isomérase (**Figure 21, (4)**). Le glucose-6-phosphate formé réagit ensuite avec le NADP^+ pour former le NADPH dont la quantité est mesurée.

Dans une seconde série de dosages, le saccharose est dégradé en glucose et fructose par la β -fructosidase (invertase) (**Figure 21, (5)**) et le glucose est de nouveau dosé, de la même manière que durant la première série de dosages (**Figure 21, (1), (2), (3) et (4)**). Ainsi, en soustrayant la quantité de glucose totale mesurée suite à la dégradation du saccharose à la valeur trouvée en glucose endogène, est obtenue la quantité de saccharose présent dans les extraits. Ceci est dû au fait que la dégradation d'une molécule de saccharose donne exactement une molécule de glucose (plus une molécule de fructose), donc le nombre de molécules de glucose formées correspond au nombre de molécules de saccharose initial.

3.3.2 Dosage de l'amidon

Le culot obtenu suite à l'extraction des sucres solubles au Méthanol-Chloroforme-Eau (12-5-3 v/v/v) contient les sucres non-solubles et en particulier l'amidon. Pour le quantifier, celui-ci est dégradé en unités glucose, par ajout successif d'amylase (Megazyme) et d'amyloglucosidase (Megazyme). Le glucose résultant est dosé grâce au kit de dosage « D-Glucose » (Megazyme) dont les volumes utilisés sont présentés dans le **tableau 4**.

Tableau 4 : Volumes (en μl) utilisés dans les réactions de dosages du glucose pour le dosage de l'amidon avec le kit Megazyme « D-Glucose ».

	Réaction glucose	
	sucres extraits	Blanc
Echantillon	20	/
Eau	/	20
B-Fructosidase	/	/
Mix (230μl/puits)		
Eau	210	
Tampon	10	
NADP+/ATP	10	
Agitation forte puis incubation 15min, lecture $\lambda=340$ nm		
Hexokinase/G6PDH / 2	4	
Agitation forte puis incubation 20min, lecture $\lambda=340$ nm		
Volume total	254.0	

3.4 Suivi de l'expression des gènes dans les plantes

3.4.1 Analyse de l'expression des gènes

Les ARN totaux des feuilles et des racines sont extraits à partir du matériel (entre 20 et 200 µg) préalablement congelé dans l'azote liquide puis broyé (TissueLyser II, Quiagen) suivant la méthode d'extraction au REB (RNA Extraction Buffer : Tris HCl 25 mM, pH 8 ; EDTA 25 mM ; NaCl 75 mM ; SDS 1% p/v ; β-mercaptoethanol 7,8% v/v) adapté de Kay *et al.* (1987). Après extraction, la quantité et la qualité des ARN ont respectivement été évaluées à une absorbance de 260 nm et en électrophorèse en gel d'agarose.

Les ADNc sont synthétisés à partir de 1 µg d'ARN après traitement DNase (1 µL soit 1 unité) (Sigma-Aldrich) en utilisant la MML-V (Moloney Murine Leukemia Virus) reverse transcriptase (1µL soit 200 unités) (Promega).

La réussite de la retro-transcription est vérifiée par PCR (40 cycles, 95°C, 30 s; 60°C, 30 s; 72°C, 30 s) en utilisant le gène de référence *At5g12240* (Czechowski *et al.*, 2005). La réaction est réalisée en utilisant 0,2 µl (1 unité) de GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega), 5 µL d'ADNc, 4 µL de tampon Flexi 5X, 1,6 µL de MgCl₂ 25 mM, 0,4 µL de dNTP 10 mM, 0,6 µL d'amorces sens (F) 10 µM, 0,6 µL d'amorces antisens (R) 10 µM, 10,6 µL d'eau. Les amplicons sont ensuite analysés en électrophorèse sur gel d'agarose 2%.

L'expression des gènes d'intérêt a été étudiée par qPCR en utilisant les couples d'amorces présentés dans le **tableau 5**, ces amorces ont été conçues par notre laboratoire sauf les trois dernières qui sont tirées de Czechowski *et al.* (2005). La qPCR a été effectuée dans un volume total de 15 µL par puit (7,5 µL de SYBRGREEN GoTaq® Master Mix 2X (Promega), 0,5 µL d'amorce sens (F) 10 µM, 0,5 µL d'amorce anti-sens (R) 10 µM, 1,5 µL d'eau milliQ et 5 µL d'ADNc dilué au 1/10) en plaque de 96 puits. Le programme de qPCR comprend :

- Une première étape d'activation de la polymérase et de séparation des brins d'ADN (95°C, 2 min)
- Une deuxième étape d'amplification des ADNc (40 cycles ; 95°C, 15 s ; 60°C, 60 s)
- Une troisième étape visant à déterminer les courbes de fusion des amplicons produits (95°C, 15 s ; 60°C à 95°C, 20 min ; 95°C, 15 s).

L'expression des gènes étudiés est normalisée en utilisant la méthode décrite par Vandesompele *et al.* (2002) par la moyenne de trois gènes de référence *At5g12240*, *At4g26410* et *Actin2* (*At3g18780*) (Czechowski *et al.*, 2005). L'expression de ces gènes est constante dans les plantes témoins au cours du temps. L'expression relative est définie selon la méthode du 2-ΔCt.

Tableau 5 : Liste des couples d'amorces utilisées en RT-qPCR

Gène	Locus	Séquence sens (Forward)	Séquence anti-sens (reverse)
AtSUC1	AT1G71880	GACCTTTCGACGCCTTGTC	AATACTCCACTAATCGCCGCTG
AtSUC2	AT1G22710	GGTAAGTGGTGTATTGGCGTTG	GAGCCAAACAACCACTGCTAAA
AtSUC3	AT2G02860	CAAGAACCCGACGCCGTAATC	CTTGACCGCCACCGGAAT
AtSUC4	AT1G09960	AGTGTCAAGCGAGGAACGCATA	AGTCACACGAGAAGCCATTGC
AtSUC5	AT1G71890	GGGCTATGGGATTCCATTAG	TAAAAGACAGACGACCAAGG
AtSUC6	ATG543610	TCCTGTCTCCGGCCTGCTT	AGGCGCCCATAGCGATGA
AtSUC7	AT1G66570	GTCTTTAAGAGACAAGCCCAC	AGACTGTCTATCCACAGTCGT
AtSUC8	AT2G14670	CTAGCTCCATAATCTCAAGT	TTGGTAAGTTTCCACCTCCAAAA
AtSUC9	AT5G06170	GTGGTTCCTGATGAGCCG	GAGAAGCTGAACGTATGGG
AtSWEET9	AT2G39060	ACGCCGTCAATGTGTTCTTT	TGCTAGTTGGTTCTCTGTTGGC
AtSWEET10	AT5G50790	AACTCCTTTCCTTTGTCGTACA	GTCAACACGAAGATTGCGCC
AtSWEET11	AT3G48740	TCCTTCTCCTAACAACTTATATACCATG	TCCTATAGAACGTTGGCACAGGA
AtSWEET12	AT5G23660	AAAGCTGATATCTTTCTACTACTTCGAA	CTTACAAATCCTATAGAACGTTGGCAC
AtSWEET13	AT5G50800	CTTCTACGTTGCCCTTCCAAATG	CTTTGTTTCTGGACATCCTTGTGA
AtSWEET14	AT4G25010	AAACGCTGTGGGATGCTTCA	TTCAAGAGCCCAAGAACCTTCA
AtSWEET15	AT5G13170	CAATGACATATGCATAGCGATTCCAA	GGACTCATCACGACAATACTCTTAAG
AtCWINV1	At3g13790	CGGAAGTGGGAATGTGGGAAT	TGAAACCATTGTCCGGTACG
AtCWINV2	At3g52600	ACATGGTCCGGTTCAGCTAC	CTTGAGGTATGGGTCCGAAA
AtCWINV4	At2g36190	CAATCGTACCGGGAAAAGGA	CCGTCTTTGGAGAACCAAGC
AtCWINV5	At3g13784	GGGTCCGTAATGGAGTTCA	AGCCCGTTCAATCACATCT
AtVIN1	At1g62660	CGGCGTCGTTTACGGTCT	TCATCAGGTGCTGGAAGGAA
AtVIN2	At1g12240	GCATTCGGACAAGGTGGAAG	TAACCGTCGCATCAAGAGCA
AtCIN1 (AtCING)	AT1G35580	CGGTGGGCGAGACTTGTAGG	GTCACAGCCAGTAACGATGCG
AtCIN2 (AtCINI)	AT4G09510	TTGTGTCTCCATCCTTTCTCTCT	TCTCGCCTACTAGCTCCTCC
AtSUS1	At5g20830	ACCAAGGGTGCCTTTGTCCA	TTTGCAAGTGGCGAAAAGTCG
AtSUS2	At5g49190	ACGCAATGAGCTCCTCTCTC	CAGCTGGTGGGACTGCAATA
AtSUS3	At4g02280	CACGTCACTTGTAGCGAAAACA	TCGAATCACCACGATTGCTAC
AtSUS4	At3g43190	TCCTTCGCCAGTACTTTCC	GCCTTTGGCTTCAACCCCTG
AtSUS5	At5g37180	ATTGAGAATGGCAGAAGGGTG	CGGGGTTCTCTTACTGCG
AtSUS6	At1g73370	ATCCTTGAGGGGCTGTTGG	GCTAGTGCAACAAACGGTGG
AtSAG12	AT5G45890	TGGATACGGCGAATCTACTAACG	GCTTTCATGGCAAGACCACATAG
AtRD29a	AT5G52310	GAAAGGAGGAGGAGGAATGGTT	GGAGCCAAGTGATTGTGGAGA
AtRBCS	AT1G67090	ACGGTACTGGACAATGTGG	CGAATCCGATGATCCTAATG
AtCAB1	AT1G29930	CCAGAGGCATTCGCTGAGTTG	CCTTACCAGTGACGATGGCTTG
AtTIP1.2	AT3G26520	CAAGAACGGTAGTCTCGGAACA	GACCAGCCCAGTAAACCCAGT
octanoyltransferase	AT5G12240	AATATCGCTTTGCAGCTTCTG	GATTTTGCAAGGCTTTGAG
AtRGS1	At4g26410	GAGCTGAAAGTGGCTTCCATGAC	GGTCCGACATACCCATGATCC
AtACT2	At3G18780	CTTGCACCAAGCAGCATGAA	CCGATCCAGACACTGTACTTCTT

4 Localisation des transporteurs de saccharose AtSUC1 et AtSUC2

4.1 Etude de la localisation de l'expression *via* l'utilisation de plantes exprimant le gène GUS (β -glucuronidase)

La localisation de l'expression d'*AtSUC1* et *AtSUC2* a été réalisée dans les racines de plantes après 30 jours de culture en rhizobox. Lorsque le but est de localiser l'expression de manière globale, au niveau du système racinaire entier, les racines sont laissées sur la membrane afin de conserver l'architecture racinaire et la membrane est pliée et mise dans un tube de 50 ml. Lorsque l'étude de la localisation de l'expression est plus précise (au niveau d'une zone de la racine) les racines sont soit décollées de la membrane et plongées directement dans un tube de 5 ml, soit les racines sont découpées suivant des zones d'intérêt et les fragments sont placés dans un tube de 2 ml. Dans tous les cas, les racines sont plongées dans une solution d'acétone 90% pendant 30 minutes à -20°C. Ensuite deux rinçages successifs sont réalisés avec du tampon sodium-phosphate (NaP, 50 mM, pH 7). Puis, les échantillons sont immergés dans une solution (Tampon NaP, 50mM ; K₄[Fe(CN)₆], 0,5 mM ; K₃Fe(CN)₆, 0,5 mM ; X-glu, 1 mM ; Triton X100 0,1%) contenant du X-Glu (5-Bromo-4Chloro-3-indolyl-B-Dglucopyranoside), substrat qui, une fois dégradé par le gène de la β -glucuronidase, se colorera en bleu, indiquant spécifiquement l'endroit où le gène s'exprime. Les tubes sont placés sous une cloche à vide pendant 5 minutes pour faciliter l'infiltration du tampon dans les tissus. Enfin, l'incubation est réalisée à l'obscurité à 37°C pendant 3 à 12h afin que la coloration bleue soit bien visible. La réaction est arrêtée en rinçant les échantillons avec du tampon NaP (50 mM, pH 7), puis l'échantillon est décoloré dans de l'alcool 96% et finalement conservé dans de l'alcool à 70% à température ambiante. Lorsque la racine est laissée sur la membrane, l'acquisition des images est faite directement par prise de photo au microscope (microscope : Olympus MVX10, caméra : Hamamatsu ORCA 03G).

Pour les racines individuelles entières ou fragmentées, l'échantillon est monté entre lame et lamelle avec de l'eau. L'observation est réalisée à l'aide d'un microscope (MOTIC BA 400) et les photos prises grâce à une caméra (TOUPCAM).

Suite à la coloration GUS, des racines ont été incluses en résine Spurr (Sigma). Pour cela, les racines sont déshydratées dans deux bains (10 min) successifs d'alcool à 95° et à 100°. Les échantillons sont ensuite imprégnés à 4°C dans la résine progressivement : deux bains de 2h30 de mélange 1/3 résine, 2/3 alcool 100° puis un bain de 12 h et un de 7 h de mélange 2/3 résine, 1/3 alcool 100° et enfin un bain de 12 h et un de 7 h de résine pure. Un léger vide est réalisé sous une cloche à vide tous les deux bains. Les racines sont placées dans de la résine dans des petits moules adaptés et polymérisées pendant 24 h à 60°C. Les coupes sont réalisées à l'ultramicrotome (EMUC6, Leica) pour une épaisseur de 1,5 μ m à 1,75 μ m. Les coupes sont ensuite colorées avec du réactif de Schiff ce qui permet de faire

Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés lors des expérimentations d'immunohistochimie pour la localisation des protéines AtSUC1 et AtSUC2

Anticorps	Animal	Protéine ciblée	Séquence ciblée	Localisation sur la protéine	Source
RS6	Monoclonaux souris	ENOD-protéine	-	-	Kerafast Khan et al., 2007
SD-22	Polyclonaux lapin	SUC2	SHPMEKAANGASACETQGTGELD	Séquence N-Ter	Protéogénix
P1A2	Polyclonaux lapin	SUC1	DEKTSSUPLFG	Boucle cytoplasmique, 7 ^{ème} segment	Protéogénix

ressortir les parois en les colorant en violet. Les coupes sont recouvertes d'acide périodique 10 % pendant 1 h dans un environnement humide, puis rincées à l'eau distillée et recouvertes de réactif de Schiff pendant 6 h. Les coupes sont finalement rincées et montées entre lame et lamelle avec du milieu 50 % glycerol, 50 % eau.

4.2 Immunohistochimie : localisation des protéines AtSUC1 et AtSUC2 dans les racines

Au laboratoire, des anticorps spécifiques d'AtSUC1 et AtSUC2 (**Tableau 6**) sont disponibles. Le protocole d'immunohistochimie est résumé en **figure 22**. Les racines utilisées proviennent de plantes âgées de 30 jours. La rhizobox est ouverte et un morceau de racine de 1 à 2 cm à partir du collet est découpé. Ce morceau est placé le plus droit possible dans une gouttière de 5,8 x 0,4 x 0,4 cm (L x l x h), creusée dans un bloc de téflon. Les extrémités de la gouttière sont fermées à l'aide de ruban adhésif. De la gélose 2 % (Agar de type A, Sigma) est ensuite coulée dans la gouttière afin de recouvrir le morceau de racine. Celui-ci est donc inclus dans un bâtonnet de gélose. Une fois la gélose polymérisée, les excédents de gélose sont retirés de chaque côté de la racine. Le bâtonnet de gélose contenant la racine est par la suite placé dans un tube de 1,5ml dans lequel on coule une gélose à 4% (Agar de type A, Sigma) afin d'avoir une structure assez rigide pour pouvoir être facilement coupée au vibratome. Un cylindre de gélose de plus grand diamètre avec la racine au centre est alors obtenu. Le cylindre est collé sur un support métallique qui vient se placer dans la cuve du vibratome (Microm HM650V, Thermo Scientific). La cuve du vibratome est remplie avec une solution de PBS (Phosphate Buffered Saline) 1 X pH 7.2 (137 mM NaCl ; 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ ; 1,76 mM KH₂PO₄). Le vibratome est ensuite programmé pour effectuer des coupes de 85 µm d'épaisseur. Les coupes obtenues sont récupérées et placées dans un sachet en filtre de nylon avec des mailles de 100 µm, assez fines pour retenir les coupes mais suffisamment larges pour laisser passer les solutions. Le sachet va permettre de faciliter le déplacement des coupes d'une solution à une autre sans perte.

Toutes les étapes sont réalisées à 4°C, sous agitation. La fixation des coupes est effectuée dans une solution de paraformaldéhyde 1%, PBS 1X (30 min). La fixation est suivie de 6 rinçages de 10 min dans du PBS 1X. Une perméabilisation est réalisée grâce à un bain de 15 min dans une solution de PBS 1X ; Tween 0,1% (v/v), glycine 0,2% (v/v), suivi d'un bain de 10 min dans du PBS 1X ; Triton 0,1% (v/v). La saturation est ensuite effectuée dans du PBS 1X, Tween 0,2% (v/v), BSA (Bovine Serum Albumine) 0,5% (p-v), NGS (Normal Goat Serum) 5% (p/v) durant 45 min. Les coupes sont ensuite placées dans la solution de saturation additionnée de l'anticorps primaire dilué au 1/100 pendant une nuit. Le lendemain les coupes sont rincées trois fois 10 min dans du PBS 1X, Tween 0,1% (v/v) puis une seconde

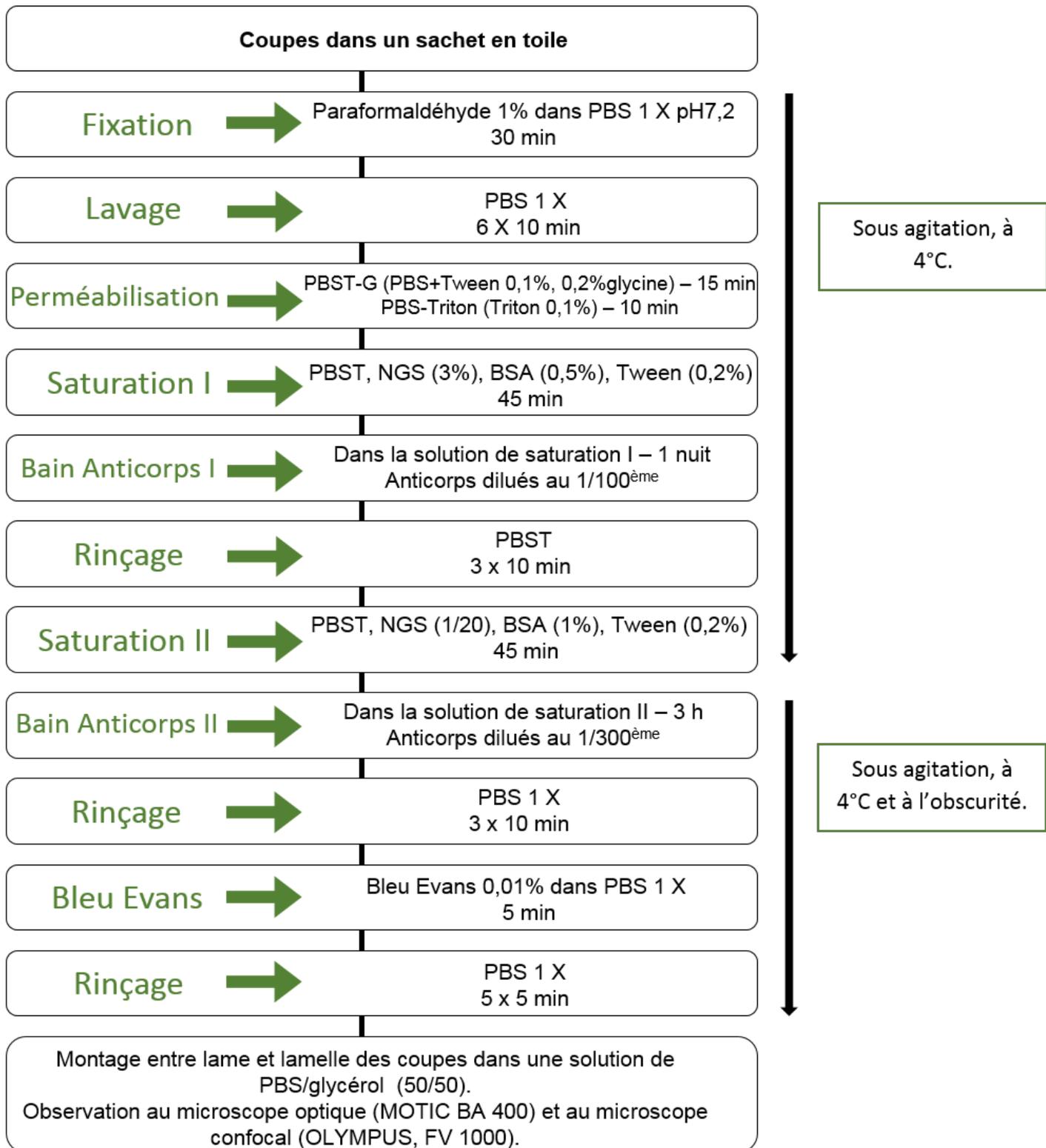


Figure 22 : Schéma du protocole d'immunohistochimie.

PBS : Phosphate Buffered Saline ; PBST : PBS + Tween ; PBST-G : PBST + glycine ; BSA : Bovine Serum Albumine ; NGS : Normal Goat Serum.

saturation est réalisée du PBS 1X, Tween 0,2% (v/v), BSA 1% (p/v), NGS 5% (p/v) pendant 45 min. Ensuite les coupes sont placées dans une solution de saturation identique à la précédente avec ajout de l'anticorps secondaire dilué au 1/300, durant 3h à l'obscurité. Les coupes sont rincées dans du PBS 1X trois fois 10 min et colorées durant 5 min dans une solution de Bleu Evans (0,01%), toujours à l'obscurité et finalement rincées dans du PBS 1X (5 fois, 5 min). Le Bleu Evans permet de colorer les parois des coupes et ainsi de pouvoir les visualiser plus facilement. Les coupes peuvent alors être conservées à l'obscurité à 4°C jusqu'à une semaine. Les coupes sont ensuite montées entre lame et lamelle dans une solution de PBS 1X, glycérol 50% (v/v) et observées au microscope optique confocal (FV1000, Olympus).

Cette technique se base sur la reconnaissance d'un antigène spécifique d'une protéine par un anticorps dit primaire. L'étape de blocage des sites non spécifiques est donc très importante. Ici l'utilisation de la BSA couplée avec la NGS va permettre une bonne saturation des sites non spécifiques, de plus, la glycine (ajoutée lors de l'étape de perméabilisation) va se fixer sur les groupes aldéhyde libres. Ensuite un anticorps dit secondaire portant un marqueur fluorescent va reconnaître l'anticorps primaire et s'y fixer. Ainsi il sera possible de localiser la protéine ciblée. Dans le cas d'une co-localisation les deux anticorps primaires sont mis en même temps dans un même bain. C'est le même processus pour les anticorps secondaires.

Les anticorps primaires utilisés contre AtSUC1 et AtSUC2 ont été générés dans un lapin. Il a donc été utilisé un anticorps secondaire GAR (Goat Anti Rabbit) dirigé contre les anticorps produits par les lapins et couplé au fluorophore Alexa 488 (excitation 490 nm, émission 525 nm). L'anticorps primaire RS6 (marqueur des tubes criblés) a été produit dans une souris, c'est pourquoi un anticorps GAM (Goat Anti Mouse) couplé au fluorophore Alexa 555 (excitation 555 nm, émission 580 nm) a été utilisé.

Les omissions (c'est-à-dire les contrôles négatifs) ont été réalisées en omettant les anticorps primaires lors du bain d'anticorps.

5 Obtention de mutants à l'aide de la technique CRISPR/Cas9

Afin de générer des mutants KO pour les gènes *AtSUC5*, *AtSUC1* et *AtSWEET13* à 15, la technique CRISPR/Cas9 a été utilisée. Pour chaque gène à muter, une séquence de 20 pb (appelée « spacer » ou sgRNA) complémentaire du locus ciblé est construite sous forme simple brin sens et anti-sens avec des adaptateurs spécifiques de l'enzyme de digestion BbsI (brin sens: 5'-ATTG + spacer ; anti-sens :5'-AAAC + reverse-complement du spacer). Ces amorces ciblent la zone qui sera coupée par le système Cas9. Après hybridation des amorces, afin d'obtenir une structure double brins, le duplex

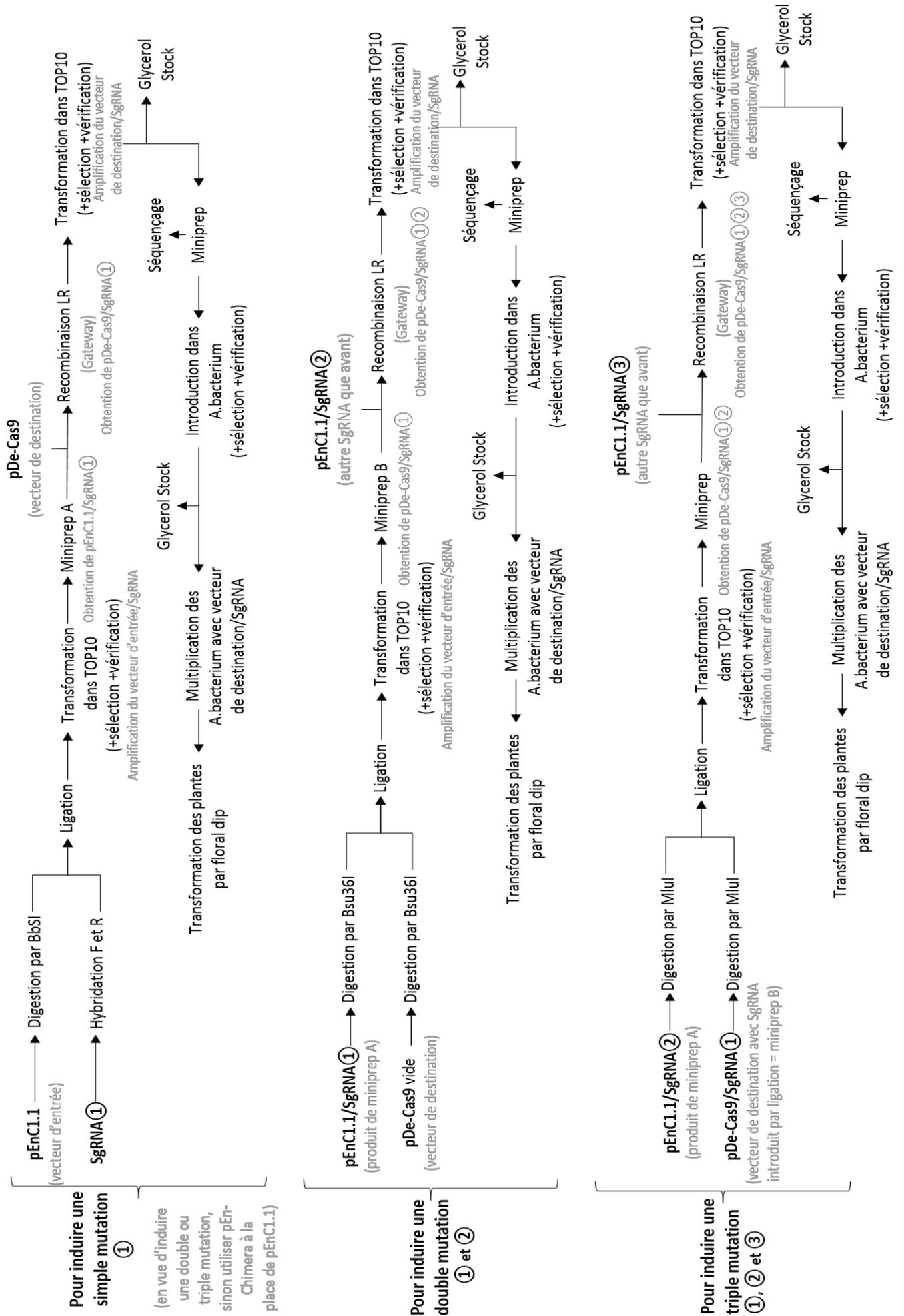


Figure 23 : schéma des expérimentations à réaliser pour l'obtention des plasmides en vue de l'induction de simple, double ou triple mutation par la technique de CRISPR/Cas9

formé est ligué (T4 DNA ligase, Promega) dans le vecteur d'entrée pEn-Chimera (Fauser *et al.*, 2014), préalablement digéré par l'enzyme BbsI (Thermo Scientific). Pour chaque construction, une recombinaison de type LR (système de clonage Gateway, Invitrogen) entre le vecteur d'entrée pEn-Chimera et le vecteur de destination pDe-Cas9 (Fauser *et al.*, 2014) est réalisée. Les différents vecteurs obtenus ont été séquencés par la technique Sanger avec le kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) pour vérifier la bonne intégration des différents éléments dans le vecteur de destination. Les vecteurs utilisés (pEn-Chimera et pDe-Cas9) dans cette partie ont été fournis par le laboratoire du Docteur Puchta (Botanisches Institut II, Karlsruhe, Allemagne). Un protocole détaillé est disponible dans l'article de Schiml *et al.* (2016). L'induction de double ou triple mutations par cette technique nécessite des étapes supplémentaires afin d'introduire plusieurs spacers et l'utilisation du vecteur d'entrée pEnC1.1 à la place de pEnChimera. Un schéma des différentes étapes de clonage pour l'obtention des vecteurs servant à la transformation des plantes est présenté en **figure 23**.

Le vecteur de destination pDe-Cas9 est introduit dans la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMp90) par choc thermique. La méthode de « floral dipping » (Clough et Bent, 1998) est utilisée pour transformer *Arabidopsis thaliana*. La sélection des transformants primaires (T1) est réalisée par la pulvérisation de l'herbicide Basta (Bayer) à la concentration de 0,1 % (v/v). En effet, les plantes ayant intégré le transgène sont résistantes à la phosphinothricine (molécule active contenue dans le Basta) grâce au gène Bar présent sur le plasmide pDe-Cas9. En deuxième génération (T2), l'ADN des plantes est extrait afin d'effectuer un génotypage. Les plantes ayant perdu le transgène par ségrégation mendélienne sont identifiées par PCR en utilisant des amorces spécifiques du gène *Cas9*. L'ADN de ces plantes est ensuite analysé par HRM (High Resolution Melting- curve) pour détecter la présence éventuelle de mutations au niveau du locus ciblé. Les résultats ont été confirmés par un séquençage Sanger (BigDye Terminator v3.1, Applied Biosystems).

Chapitre III : Etude des
transporteurs de saccharose et de
la répartition du carbone chez
Arabidopsis thaliana en cas de
contrainte hydrique

La racine est un organe très important pour les plantes supérieures, non seulement elle permet son ancrage dans le sol mais permet aussi de puiser l'eau et les nutriments dans l'environnement. Leur développement et leur architecture va avoir des conséquences sur la résistance d'une plante aux contraintes de son environnement. C'est pourquoi leur développement est régulé par la plante. La compréhension des réponses des plantes face au déficit hydrique est un enjeu majeur pour l'agriculture future.

Après avoir étudié les relations source-puits pour le carbone au cours de la contrainte osmotique sur des plantes cultivées en hydroponie lors de thèses précédentes, une étude a été réalisée pour analyser l'allocation du carbone chez *Arabidopsis thaliana* en réponse à la contrainte hydrique. Pour cela, une expérimentation en rhizobox a été menée en condition hydrique témoin (100 % de la capacité au champ) et en condition de carence hydrique (50 % de la capacité au champ). L'architecture racinaire en réponse à la contrainte hydrique a été étudiée grâce au système de culture en rhizobox. Les contenus en sucres ont aussi été étudiés dans les feuilles et dans les racines, dans les deux conditions hydriques de culture. De plus, l'allocation du carbone a été analysée grâce à l'utilisation du transport à longue distance *via* une expérience de « pulse-chase » au $^{14}\text{CO}_2$. Enfin, l'étude de l'expression des transporteurs de saccharose a été effectuée dans les feuilles et les racines en réponse à la contrainte hydrique.

Ces résultats permettent d'avoir une vision intégrée de la répartition du carbone dans la plante en cas de contrainte hydrique.

Cette étude sert de base à la suite de mes travaux. Elle a notamment permis d'identifier les transporteurs de saccharose exprimés dans les racines dont l'expression varie en fonction de la contrainte hydrique, connue pour modifier les relations sources-puits.

1 « Water deficit enhances C export to the roots in *A. thaliana* plants with contribution of sucrose transporters in both shoot and roots »

Water Deficit Enhances C Export to the Roots in *Arabidopsis thaliana* Plants with Contribution of Sucrose Transporters in Both Shoot and Roots¹[OPEN]

Mickaël Durand, Benoît Porcheron, Nils Hennion, Laurence Maurousset, Rémi Lemoine*, and Nathalie Pourtau

Université de Poitiers, Unité Mixte de Recherche Centre National de la Recherche Scientifique 7267, Ecologie et Biologie des Interactions, 86073 Poitiers cedex 9, France

ORCID ID: 0000-0001-9877-3682 (N.H.).

Root high plasticity is an adaptation to its changing environment. Water deficit impairs growth, leading to sugar accumulation in leaves, part of which could be available to roots via sucrose (Suc) phloem transport. Phloem loading is widely described in *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), while unloading in roots is less understood. To gain information on leaf-to-root transport, a soil-based culture system was developed to monitor root system architecture in two dimensions. Under water deficit (50% of soil water-holding capacity), total root length was strongly reduced but the depth of root foraging and the shape of the root system were less affected, likely to improve water uptake. ¹⁴CO₂ pulse-chase experiments confirmed that water deficit enhanced carbon (C) export to the roots, as suggested by the increased root-to-shoot ratio. The transcript levels of *AtSWEET11* (for sugar will eventually be exported transporter), *AtSWEET12*, and *AtSUC2* (for Suc carrier) genes, all three involved in Suc phloem loading, were significantly up-regulated in leaves of water deficit plants, in accordance with the increase in C export from the leaves to the roots. Interestingly, the transcript levels of *AtSUC2* and *AtSWEET11* to *AtSWEET15* were also significantly higher in stressed roots, underlying the importance of Suc apoplastic unloading in *Arabidopsis* roots and a putative role for these Suc transporters in Suc unloading. These data demonstrate that, during water deficit, plants respond to growth limitation by allocating relatively more C to the roots to maintain an efficient root system and that a subset of Suc transporters is potentially involved in the flux of C to and in the roots.

The root system is crucial for the development of sessile plants not only because it anchors them to their substrate but also provides them with water and nutrients. There has been a renewed interest in studying root traits in relation to their foraging capacities both in the context of increased yield (Hammer et al., 2009; Tian and Doerner, 2013) and increased productivity under conditions such as drought (Comas et al., 2013). The depth of rooting is an important parameter for foraging

capacities, but the overall distribution in roots in the soil (root system architecture [RSA]) has received attention in different research programs aimed at improving plant resistance to stress (Paez-Garcia et al., 2015).

The model plant *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) has been used to unravel the molecular basis of root traits because it can be easily cultured on agar medium. In *Arabidopsis*, the root system is formed through a reiterative program in which lateral roots are produced along the length of other roots. Despite this apparent simplicity, and even for genetically identical plants, root system development is highly plastic due to variations in its surrounding environment (e.g. nutrient shortage and water deficit; Satbhai et al., 2015).

When water availability is limited, *Arabidopsis* seedling primary root growth can be occasionally enhanced but usually reduced, depending on the constraint extent and its duration (van der Weele et al., 2000). Conversely, *Arabidopsis* lateral root growth is mainly inhibited in response to drought (Xiong et al., 2006). Restricting lateral proliferation and promoting depth growth is interpreted as an adaptive response to drought to improve water uptake. This root development pattern is partly associated with local soil water availability, since roots exhibit hydrotropism and hydropatterning (Takahashi et al., 2003; Bao et al., 2014).

Roots are a typical sink and depend exclusively on Suc imported from the source leaves. During the

¹ This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the University of Poitiers, the Région Poitou-Charentes, and the French Ministry of Research and Higher Education (to M.D. and N.H.).

* Address correspondence to remi.lemoine@univ-poitiers.fr.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantphysiol.org) is: Rémi Lemoine (remi.lemoine@univ-poitiers.fr).

M.D. performed most of the experiments, conceived experiments and research plans, analyzed the data, and wrote the article; B.P. and N.H. provided technical support; L.M. performed the ¹⁴CO₂ pulse-chase experiments and data analyses; R.L. supervised the experiments, conceived research plans, and complemented the writing; N.P. conceived the rhizobox system and experiments, supervised experiments and research plans, and complemented the writing; M.D., L.M., R.L., and N.P. discussed the data and revised the article.

[OPEN] Articles can be viewed without a subscription.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.15.01926

vegetative stage, herbaceous plants are usually composed of one source (mature leaves) and two sinks (developing leaves and roots). For this reason, Suc transport in young seedlings of *Arabidopsis* has been studied in detail, and the different players involved in this transport have been characterized. In the source leaves, Suc is first released from the cytosol of phloem parenchyma cells to the apoplast surrounding the sieve element/companion cell complex through both AtSWEET11 (for sugar will eventually be exported transporter) and AtSWEET12 Suc effluxers (Chen et al., 2012). Second, Suc is loaded into the companion cell through the activity of the AtSUC2 (for Suc carrier) H⁺: Suc symporter (Gottwald et al., 2000) and then passes across plasmodesmata to reach the sieve element, to be finally translocated to sink organs according to the bulk flow model (Münch, 1930). Suc unloading in sinks can occur along different pathways (Patrick, 1997), some of them involving Suc transporters. Any alteration in root growth due to environmental cues will immediately affect the demand on Suc from the source, leading to a new source/sink balance (Lemoine et al., 2013). For example, water deficit preferentially reduces shoot growth rather than root growth, causing an increased root-to-shoot (R/S) ratio because the growth of root and shoot exhibits different sensitivities to reduced water availability (Chaves et al., 2002; Sharp et al., 2004; Verslues et al., 2006). This supposes a reallocation of carbon (C) to the roots, even though C net assimilation rate is reduced because of the lower CO₂ diffusion caused by the limited stomatal aperture preventing water losses (Cornic, 2000). However, water deficit differentially alters rosette expansion and net photosynthesis, potentially resulting in an increased availability of C for the roots (Hummel et al., 2010).

The aim of this work was to investigate the C source/sink exchanges in *Arabidopsis* plants subjected to water shortage, with emphasis on the root system and on the Suc transporters involved in these exchanges. The expression of many Suc transporter genes has been reported in the roots of *Arabidopsis*, such as *SUC2* (Truernit and Sauer, 1995; Stadler and Sauer, 1996), *SUC1* (Sivitz et al., 2007, 2008), *SUC3* (Meyer et al., 2004), *SUC4* (Schneider et al., 2012), and *SUC5* (Baud et al., 2005). The expression of several *SWEET* Suc transporter genes has been suggested in roots since the demonstration of the proton-independent transport system of Suc in roots (Chaudhuri et al., 2008). However, the precise role of such Suc transporters in roots has been difficult to evaluate by experiments on mutants, especially for transporters with a strong activity in phloem loading (*SUC2*, *SWEET11*, and *SWEET12*), because the inhibition of phloem loading in leaves potentially masks effects in other organs such as roots.

The initial steps of root development in *Arabidopsis* are heavily documented (Casimiro et al., 2003; Luijten and Heidstra, 2009; Péret et al., 2009; Petricka et al., 2012), but most of those studies were run on young seedlings grown on agar plates *in vitro*. To be able to follow root development and architecture at later

stages, we developed a rhizobox system where the roots are separated from the soil by a porous membrane with a mesh width that allows an exchange of solutes but does not allow roots to penetrate the soil. The rhizobox system used in this study allowed an almost instant harvest of the root system (for physiological, biochemical, and molecular analyses) and a precise study of the RSA of *Arabidopsis* in two dimensions.

Taking advantage of this system, we investigated C partitioning between shoot and root in well-watered (WW; 100% soil water-holding capacity) and water deficit (WD; 50% soil water-holding capacity) conditions, two water supplies supposed to lead to discriminating C allocation to the roots (Hummel et al., 2010; Muller et al., 2011). The rhizobox allowed a comparison of the root shape in both conditions, indicating subtle changes in the repartition of roots, and revealed increased C partitioning between shoot and root that are discussed together with variations in Suc transporter gene expression in shoot but also in root.

RESULTS

Choice of the Experimental Procedure

While most studies on root growth and development in *Arabidopsis* were conducted on seedlings grown *in vitro*, the data presented in this work were obtained on adult plants (30 d old) grown in rhizoboxes. The rhizobox was first introduced by Kuchenbuch and Jungk (1982) and Youssef and Chino (1988) and consists of a soil culture system where the root is separated from the soil by a porous membrane with a mesh facilitating the exchange of solutes but preventing roots from penetrating the soil. This culture system allows the precise study of RSA over a long period of time through a transparent Plexiglas plate as well as molecular and biochemical measurements on a clean (devoid of soil) and integral (including the finest roots and root hairs) root system. Moreover, this culture system allows the full development of *Arabidopsis* plants, from germination to seed harvest, and also a quick harvest of roots, without the need for time-consuming washes to clean soil from them, a step that may induce a bias in subsequent measurements. With the rhizobox used in this work (Fig. 1) and adapted from Xiong et al. (2006) and Wenzel et al. (2001), the roots grew between a Plexiglas plate and a nylon membrane (Sefar Nitex 03-7/2; mesh width = 0.7 μm) separating the roots from the soil. For WD experiments, the soil was maintained at two water regimes, WW (0.8 g water g⁻¹ fresh soil) and WD (0.4 g water g⁻¹ fresh soil). It has to be pointed out that 0.8 g water g⁻¹ fresh soil corresponds to the water-holding capacity of the soil. Plants were grown until 30 d after sowing (DAS) to harvest sufficient amounts of material, especially in the case of WD roots. Beyond that date, roots of WW plants reached the bottom of the rhizobox, and this impeded RSA analysis.

Durand et al.

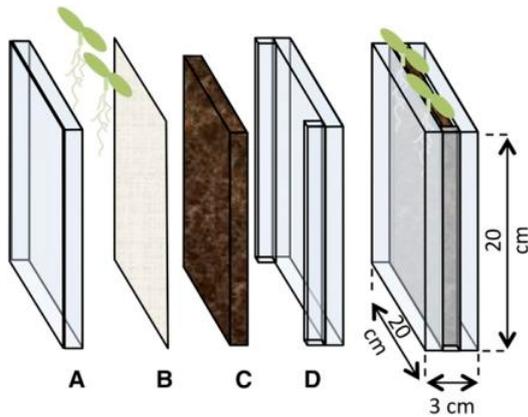


Figure 1. Description of the rhizobox growing system. Two to four plants are cultivated between a Plexiglas plate (A) and a nylon membrane (B) separating roots from the compost (C), itself enclosed in another Plexiglas plate (D). This system allows clean roots to be harvested and analysis of the two-dimensional RSA.

The RSA analysis (main and lateral root length, root system shape, and area colonized by roots) could not be performed directly on photographs of roots due to the lack of contrast preventing a clear separation of roots from the membrane background. Using high-resolution autoradiographs of the labeled root system, this problem was solved (see “Materials and Methods”).

$^{14}\text{CO}_2$ -labeling experiments were also run to study the dynamics of C source/sink allocation. A labeling

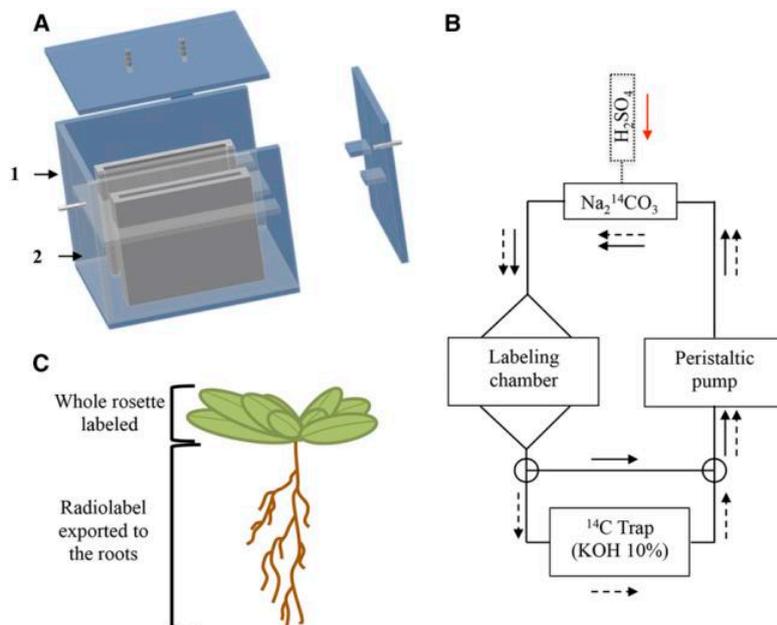
chamber specific for rhizoboxes was designed (Fig. 2A) and integrated in a standard labeling system (Fig. 2B). Whole rosettes were labeled during a 15-min pulse followed by a 45-min chase period in ambient air, and then ^{14}C exported from the leaves to the roots was determined by counting radioactivity in the different parts of the plant (rosette and roots; Fig. 2C). Preliminary kinetic experiments demonstrated that a 45-min chase was sufficient to allow radiolabel to reach root tips in WW plants.

Water Deficit Reduces Biomass, But Leaf Growth Is More Affected Than Root Growth

From 0 to 30 DAS, leaf development was followed by regularly taking photographs (Fig. 3) that clearly indicated that leaf growth was reduced in WD plants, although no sign of wilting was visible.

The impact of water deficit was evaluated through a set of parameters related to growth and water status, measured on roots and leaves at 30 DAS. Water deficit reduced final leaf area (Fig. 3) by 4-fold (Table I). This reduction in leaf expansion came with a 30% reduction in leaf number. Rosette biomass, expressed as fresh weight and dry weight, decreased by about 80% in WD plants compared with WW plants (Table I). To check leaf water status, water content and osmotic potential were measured in WW and WD plants. The 50% reduction of water supplied to soil was sufficient to diminish leaf water content in WD plants (0.898) compared with WW plants (0.915). Interestingly, the dispersion of rosette water content values was very

Figure 2. Description of the labeling chamber and protocol used for $^{14}\text{CO}_2$ pulse-chase experiments. A, The labeling chamber, built in Plexiglas, can contain two rhizoboxes and is separated into two compartments: one accessible to the radiolabeled air (1) and the other inaccessible (2). B, The system comprises a peristaltic pump, a vial containing the radiolabeled sodium bicarbonate ($^{14}\text{CO}_2$ generated with sulfuric acid injection; red arrow), the assimilation chamber, and a flask containing potash (10% KOH), which is dispersed in the system by the peristaltic pump (solid arrows for pulse, dashed arrows for trapping). C, Radiolabel measured in the roots corresponds to ^{14}C exported from the rosette to the roots.



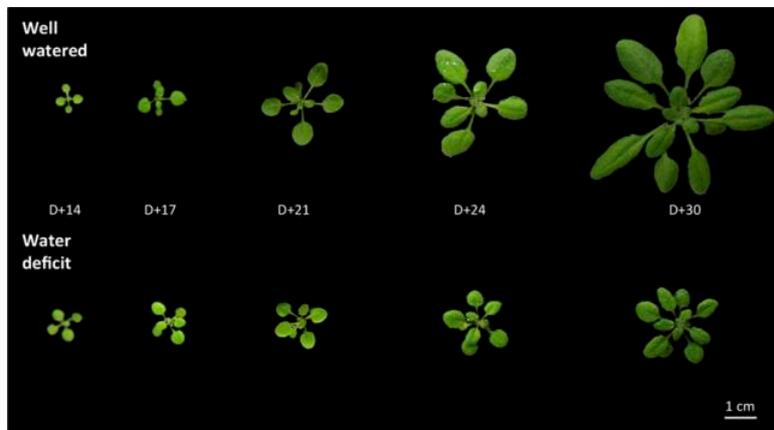


Figure 3. Top view of WW and WD whole rosettes. WW and WD whole rosettes are presented at selected DAS (D+14, D+21, D+24, and D+30). Water deficit started from sowing (D+0).

weak in WW and WD plants (Supplemental Fig. S1A). The rosette osmotic potential was also lower in WD plants (-1.101 MPa) than in WW plants (-0.898 MPa; Table I). The impact of water deficit was also evaluated at the molecular level in rosette by checking the expression of genes related to photosynthesis (*RIBULOSE BIPHOSPHATE CARBOXYLASE SMALL CHAIN1A* [*AtRBCS*] and *CHLOROPHYLL A/B-BINDING PROTEIN1* [*AtCAB1*]), to the establishment of water deficit (*RESPONSIVE TO DESICCATION29A* [*AtRD29a*]), and to senescence (*SENESCENCE-ASSOCIATED GENE12* [*AtSAG12*]). Water shortage negatively impacted *RBCS* expression (0.8-fold, $P < 0.01$), whereas *CAB1* expression was approximately the same in leaves of WW and WD plants (Fig. 4A). The transcript level of *RD29a*, a gene up-regulated by drought (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994), increased in response to water deficit in leaves compared with the control (1.7-fold, $P < 0.05$; Fig. 4B). *SAG12* was poorly expressed in WW

leaves, and its expression remained constant in response to water deprivation (Fig. 4C).

In parallel to rosette biomass reduction, the fresh weight and dry weight of WD roots were diminished by about 80% and 65%, respectively. The smaller difference in root dry weight compared with rosette was the consequence of the strong reduction in water content of stressed root (0.921 [WW] and 0.861 [WD]; Table I). It has to be pointed out that the dispersion of water content values was more important in roots than in shoots, whatever the conditions, although the dispersion was higher under water deficit (Supplemental Fig. S1A). Several correlations between the parameters in roots and shoots were tested, but only decreased root water content was tightly associated with decreased rosette dry weight in WD plants (Supplemental Fig. S1B). Although the decrease in water content was larger in roots than in rosette, the reduction of dry weight was less important in root (65%) than in rosette (80%). This

Table I. Impact of water deficit on a set of growth and water status parameters measured in roots and leaves

All measurements were performed at 30 DAS. Projected leaf area (28–46 plants), leaf number (28–46 plants), rosette fresh weight (11–14 plants), rosette dry weight (11–14 plants), and rosette water content (11–14 plants) were measured on whole rosettes. Rosette osmotic potential (eight plants) was measured on a pool of three to five leaves. Measurements could not be made on individual roots because of entanglement but rather were made on roots from one rhizobox (two to three root systems). Root fresh weight (five to six rhizoboxes), root dry weight (five to six rhizoboxes), root water content (five to six rhizoboxes), and R/S ratio (five to six rhizoboxes) were measured. Data are means and (SE) of three independent experiments. Asterisks represent significant differences from WW plants as determined by Student's *t* test (*, $P < 0.005$).

Parameter	Unit	Treatment	
		WW	WD
Projected leaf area	cm ²	12.8 (0.6)	3.3 (0.2)*
Leaf number	–	16.6 (0.3)	11.7 (0.3)*
Rosette fresh weight	mg	268.6 (23.3)	48.4 (5.9)*
Rosette dry weight	mg	22.7 (1.8)	4.9 (0.6)*
Rosette water content	g water g ⁻¹ fresh weight	0.915 (0.002)	0.898 (0.002)*
Rosette osmotic potential	MPa	-0.863 (0.025)	-1.101 (0.034)*
Root fresh weight	mg	61.1 (8.5)	13.3 (2.5)*
Root dry weight	mg	4.6 (0.5)	1.6 (0.2)*
Root water content	g water g ⁻¹ fresh weight	0.921 (0.004)	0.861 (0.012)*
R/S ratio	–	0.2 (0.01)	0.35 (0.02)*

Durand et al.

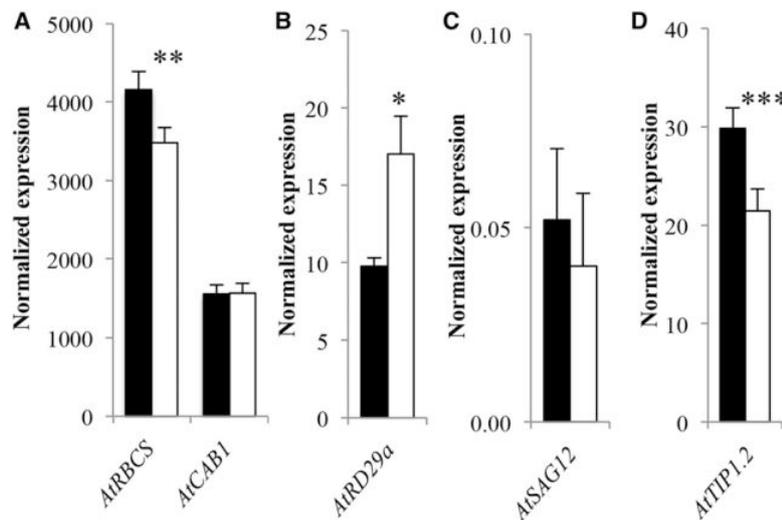


Figure 4. Impact of water deficit on a set of marker genes in leaves and roots. All measurements were performed in WW (black bars) and WD (white bars) plants at 30 DAS. Relative expression of *AtRBCS* and *AtCAB1* (A), *AtRD29a* (B), and *AtSAG12* (C) was measured by reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) in leaves; *AtTIP1.2* (D) expression was measured by RT-qPCR in roots. The expression of *AtRBCS* and *AtCAB1* (A), *AtRD29a* (B), *AtTIP1.2* (D), and *AtSAG12* (C) genes was measured to check photosynthesis (A), establishment of water deficit (B and D), and senescence (C). Data are normalized (no unit) to the expression level of the reference gene *At5g12240* (Czechowski et al., 2005) and are means \pm SE obtained from the pool of plants ($n \geq 12$) of 11 independent experiments. Asterisks represent significant differences from WW plants as determined by a Two/K sample permutation test (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; and ***, $P < 0.005$).

was confirmed by the much higher R/S ratio in WD plants (0.35) compared with WW plants (0.20; Table I). The higher R/S ratio was also specific to water shortage, since this ratio was also greater when calculated from WD and WW plants of different ages but exhibiting the same leaf area (data not shown). According to this, the water deficiency applied to plants grown in rhizoboxes impacted leaf growth more than root growth. The impact of water deficit was also evaluated at the molecular level by checking the expression of genes related to the establishment of water deficit in root (*TONOPLAST INTRINSIC PROTEIN1;2* [*AtTIP1;2*]). The transcript level of *TIP1.2*, a gene negatively regulated by strong water stress (Alexandersson et al., 2005), decreased slightly in WD roots (0.7-fold, $P < 0.005$; Fig. 4D).

Plants Tend to Optimize the Surface of Soil Colonized by Roots under Water Deficit

Because rhizoboxes allowed the study of root development in two dimensions, the effect of water deficit on RSA, primary and total lateral root length, the soil area colonized by roots, and root system shape were analyzed at 30 DAS on WW and WD plants. Total lateral root length reached almost 2.5 m, whereas primary root length was only 16.5 cm, in WW plants (Fig. 5, A and B). The modeling of root shape allowed us to measure the area colonized by the root system. The root system of an individual plant, which consists essentially of lateral

roots (93.5% of the total root length), colonized 13.4% of the available soil area (i.e. 48.3 cm² out of 360 cm² of total surface available [18×20 cm]; Fig. 5C).

Primary root length was reduced slightly in response to water deprivation (−9%), while total lateral root length was diminished dramatically in WD plants (−62%; Fig. 5, A and B). In contrast, soil area colonized by roots decreased only by about 35%, suggesting a better efficiency to colonize the wet soil of roots from the WD plants (Fig. 5C). Indeed, while 1 cm of WD roots explored on average 0.34 cm² of soil area, 1 cm of WW roots explored only 0.2 cm² of soil area. For each condition (WW and WD), 32 independent root systems were analyzed to model an average shape of the root system. This average shape showed that horizontal expansion of WD roots was reduced significantly down to 6 and 7 cm deep, on the right and left sides, respectively, compared with WW ones (Fig. 6A). This zone corresponds roughly to the shallow soil that alternately dries and wets because water was provided daily from the top of the rhizobox. Below 7 cm deep, no difference in horizontal expansion was observed between WW and WD roots. A statistical analysis of horizontal expansion as a function of depth was performed on shallow soil (to 8 cm deep), where significant differences were observed. Because the root system is approximately symmetric, analysis was averaged to one side by gathering data from the left and right sides of roots. From 0 to 5 cm deep, horizontal expansion

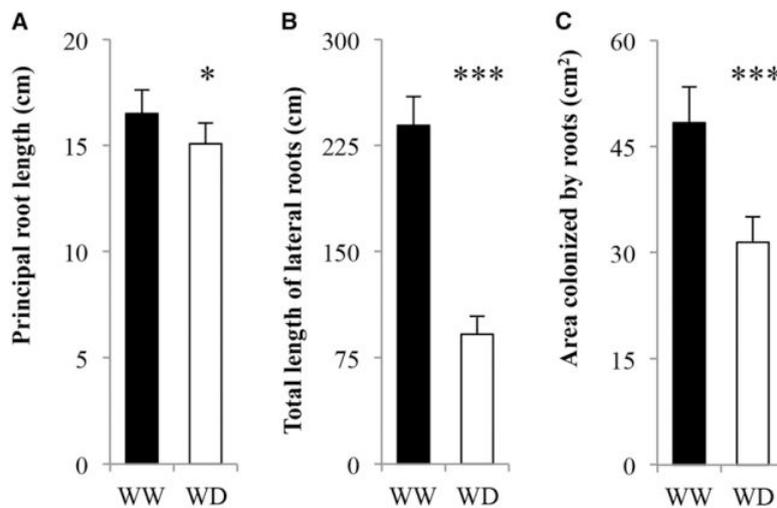


Figure 5. Impact of water deficit on RSA. All measurements were performed in WW (black bars) and WD (white bars) plants at 30 DAS. Length and area were measured on photographs of the radiolabeled root system scanned previously. A, Impact of water deficit on primary root length. B, Impact of water deficit on total length of lateral roots. C, Impact of water deficit on area colonized by roots. Data are means \pm se obtained from four to six plants of six independent experiments. Asterisks represent significant differences from WW plants as determined by a Two/K sample permutation test (*, $P < 0.05$ and ***, $P < 0.005$).

showed an increase, to reach 3.1 cm in WW plants. Then, horizontal expansion decreased progressively from 5 to 8 cm deep, to reach 2.5 cm (Fig. 6B). Horizontal expansion of WD plants was characterized by a smaller increase, to reach a maximum of 2.1 cm. Therefore, at 5 cm deep, horizontal expansion was reduced by 32% in WD root systems (Fig. 6B). Interestingly, below 10 cm, the lateral expansion of WD roots occasionally exceeded that of WW roots (Fig. 6A).

Taken together, these results show that differences in lateral root colonization were essentially caused by a lower expansion in WD roots compared with WW ones in the upper part of the soil. However, this resulted in a smaller reduction in colonized area compared with the reduction in root length, indicating a reshaping of root distribution.

Free Sugar Content Is Higher in Roots Than in Rosette and Increases in Source and Sink Organs after Water Deficit

The amounts of the three major soluble sugars (Suc, Glc, and Fru) and starch content were determined in leaves and roots of WW and WD plants. In the rosette, the sole source organ present at 30 DAS, Suc ($12.3 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight) was the most abundant sugar, followed by Glc ($9.1 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight) and Fru ($1.9 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight), in WW plants, and an important starch content ($324.8 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight) was detected (Fig. 7). All measurements were made on plants harvested at 1:30 PM, after 4.5 h of light, explaining the high starch content. In the root, an organ that fully depends on reduced C imported from the rosette, Suc ($17.8 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight) and Glc ($18.5 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight) are the two prominent sugars, followed by Fru ($5 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight), in WW plants (Fig. 7). Interestingly, the amounts of total soluble sugars were 1.8-fold higher in WW roots ($41.4 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight) than in WW leaves

($23.3 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight). In contrast, starch level was very low in the roots ($5.7 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight) compared with rosette (Fig. 7), a result expected, as the root is not a storage organ in *Arabidopsis* plants.

In WD plants, total soluble sugars increased dramatically in the rosette ($62.4 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight; i.e. an increase of 268% compared with WW). This increase was due mainly to Glc ($+26.2 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight; i.e. 67% of the increase) and to a lesser extent to Suc ($+9 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight; i.e. 23% of the increase; Fig. 7). It was interesting that sugar accumulation in leaves under water deficit had a marginal contribution to the osmotic potential (less than 2%). In parallel to the higher amount of free sugars in leaves, starch level decreased by about 25%. In the roots, free sugar contents increased also in response to water deprivation ($87.7 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight; +212%), but to a lesser extent than in the rosette (+268%; Fig. 7). In contrast to the leaves, the increase was mostly caused here by Suc ($+23.3 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight; i.e. 50% of the increase), although Glc still represented a significant part of the increase ($+17.2 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight; i.e. 37% of the increase). The starch level stayed very low and constant in the roots (Fig. 7).

Water Deficit Promotes the Export of Assimilated ¹⁴C from the Rosette to the Roots

To get a more dynamic view on the impact of water deficit on C partitioning between rosette and root, ¹⁴CO₂ pulse-chase experiments were performed on WW and WD plants. After the chase period, rosette and roots were separated, quickly frozen at -80°C , and lyophilized before autoradiography (Fig. 8A) and radiolabel counting (Fig. 8, B–F). At the end of the pulse-chase experiment, the whole rosette was labeled whatever the condition. The youngest leaves, considered

Durand et al.

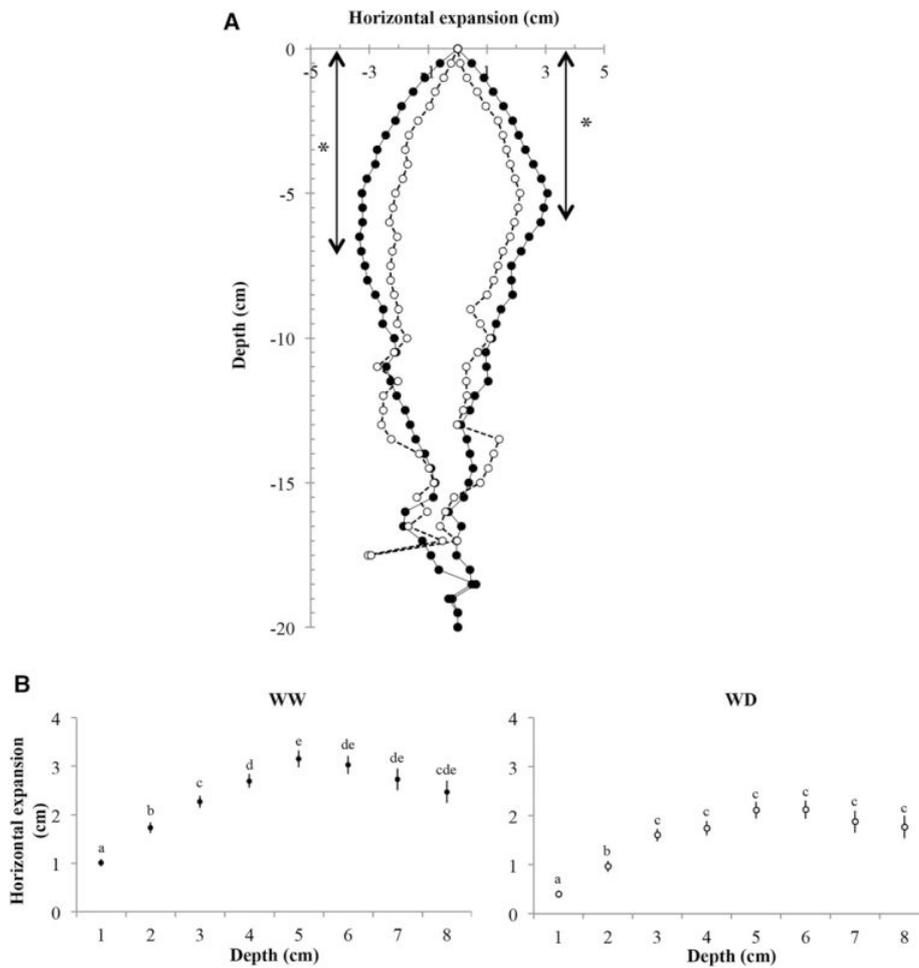


Figure 6. Impact of water deficit on the average shape of the root system. All measurements were performed in WW (black dots) and WD (white dots) plants at 30 DAS. A, Comparison of the average shape of the root system in WW and WD plants. The average shape of the root system is defined with a depth resolution (y coordinate) of 0.5 cm. The origin of the chart (0;0) corresponds to the point separating rosette from root. Data are means obtained from four to six plants of six independent experiments, and arrows accompanied by asterisks delimit the zone where lateral expansion of the WD root system is significantly different from lateral expansion of the WW root system, as determined by a Wilcoxon test (*, $P < 0.05$). B, Evolution of horizontal expansion of the average shape of the root system in WW and WD plants in shallow soil. Analysis was averaged to one side by gathering data from the left and right sides with a 1-cm depth resolution. The data set used comprises 32 root systems per condition. Different letters represent groups that were significantly different as determined by a Wilcoxon test followed by a multiple comparison test (false discovery rate adjustment; $P < 0.05$).

as sinks, were more intensively labeled because they imported ^{14}C during the chase period (red arrows in Fig 8A). Source leaves did not import ^{14}C during the chase period: if covered with aluminum foil during the pulse and chase to prevent photosynthesis, no labeling was detected. The root system was also entirely labeled, displaying the RSA (Fig. 8A). The fact that all roots were labeled was a good indication that they were all alive. In addition, a strong accumulation of radiolabel was noted in most root tips of WW plants, but this phenomenon was poorly observed in WD plants. Moreover, although

most roots displayed root hairs, those were not detectable on autoradiographs, but this may be due to the resolution of the scanner used. It has to be pointed out that no radiolabel was found in root systems when a pulse-chase experiment was performed on plants whose rosette was cut off, indicating that all radiolabel recovered in roots came from $^{14}\text{CO}_2$ assimilation in leaves.

Assimilation, which corresponds of the total amount of ^{14}C recovered in a plant (rosette + roots) per leaf area unit, was reduced significantly by about 40% in response to water shortage (Fig. 8B). While 98% of total

Sucrose Transport to Roots in Water Deficit Plants

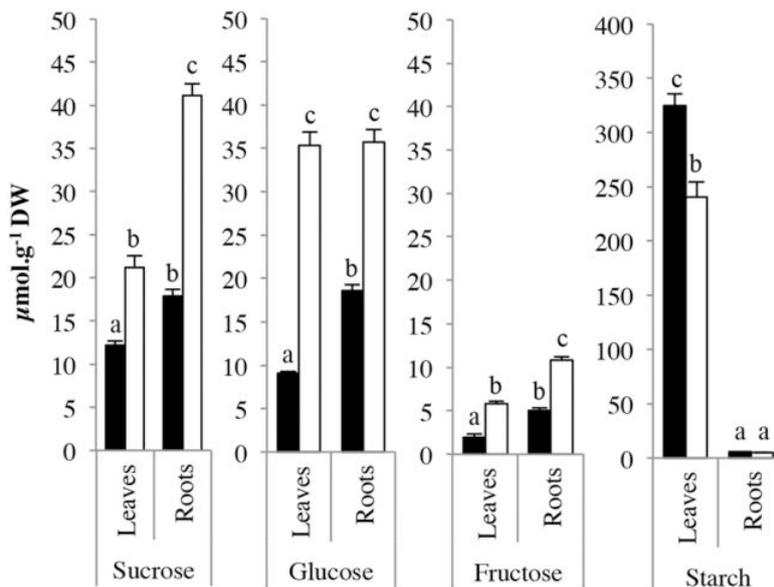


Figure 7. Impact of water deficit on sugar and starch contents in leaves and roots. All measurements were performed in WW (black bars) and WD (white bars) plants at 30 DAS. Sugar contents are expressed in $\mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight (DW). Starch content is expressed in $\mu\text{mol Glc equivalent g}^{-1}$ dry weight. Data are means \pm se obtained from the pool of plants ($n \geq 12$) of three independent experiments. Different letters represent groups that were significantly different as determined by a Wilcoxon test followed by a multiple comparison test (false discovery rate adjustment; $P < 0.05$).

^{14}C incorporated during the pulse remained in the rosette of WW plants, 94% of label was retained in the rosette of WD plants (Fig. 8C). As a consequence, in percentage, 3 times more ^{14}C was exported to the root in WD plants compared with WW plants (Fig. 8D). Exported ^{14}C per unit of rosette dry weight was multiplied by about 1.8 with water deprivation (Fig. 8E). Therefore, the amount of ^{14}C imported per root dry weight unit increased by about 40% (Fig. 8F).

Relationships between rosette dry weight and C partitioning were established to provide some insights into the fine-tuning of C allocation. The study was performed using Pearson correlations (Fig. 9). ^{14}C assimilation (Fig. 9A), percentage of ^{14}C exported to roots (Fig. 9B), and amount of ^{14}C exported to roots (Fig. 9C) were not correlated with rosette dry weight in WW plants. Thus, whatever the rosette size, ^{14}C assimilation and ^{14}C allocation to the root were not altered in WW plants. In contrast, while ^{14}C assimilation was positively correlated to rosette dry weight under water deficit (Fig. 9A), percentage of ^{14}C exported to the roots (Fig. 9B) and amount of ^{14}C exported to the roots (Fig. 9C) were negatively correlated. Thus, the more reduced the size of the rosette, the more ^{14}C was allocated to roots.

Water Deficit Changes Transcript Levels of Suc Transporter Genes

The C source/sink allocation was altered by water deficit, and export of Suc, the long-distance form of C transport, was enhanced between leaf and root. To gain further insights on the effect of water deficit on the C source/sink allocation, the transcript level of Suc

transporter genes was studied in roots and leaves of the same samples used for sugar analysis. Preliminary experiments were conducted to check for the absence/presence of expression of the nine *AtSUC* and seven *AtSWEET* (from clade III involved in Suc transport) genes in the leaves and roots of WW and WD plants by reverse transcription (RT)-PCR (primers are presented in Supplemental Table S1). Among the nine *AtSUC* genes, transcripts of *SUC6*, *SUC7*, *SUC8*, and *SUC9* were not detected in the roots and leaves in WD and WW conditions. No expression of *SWEET9* and *SWEET10* was detected in the leaves and roots, while *SWEET14* expression was measured in the roots but not in the leaves whatever the condition. In contrast, *SWEET11* expression was slightly or not detected in the root of WW plants. Following these results, the transcript levels of *SUC1*, *SUC2*, *SUC3*, *SUC4*, *SUC5*, *SWEET11*, *SWEET12*, *SWEET13*, and *SWEET15* were monitored by quantitative RT-PCR in both organs, while *SWEET14* expression was also assessed in roots.

In leaves, *AtSUC2*, a companion cell-specific Suc:H⁺ symporter, was the most expressed *SUC* gene (Fig. 10A), as expected from its essential role for Suc translocation (Gottwald et al., 2000). Water deficit significantly promoted the expression of *SUC2* (1.4-fold, $P < 0.005$) compared with the control. In contrast, transcript levels of the four other *SUC* genes were clearly lower than *SUC2* in WD and WW leaves. Besides, *SUC3* and *SUC5* transcript levels were low in WW leaves and were repressed slightly in response to water deprivation (0.8-fold, $P < 0.01$ and 0.7-fold, $P < 0.05$, respectively). No significant change in *SUC1* and *SUC4* expression was observed in the leaves in response to water deficit (Fig. 10A).

Durand et al.

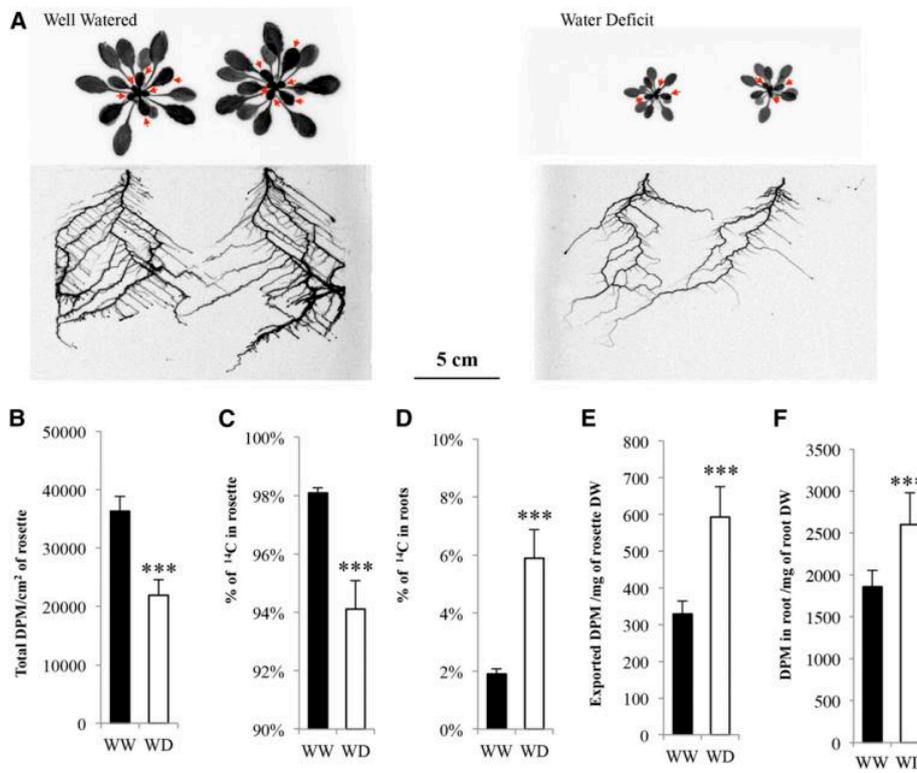


Figure 8. Impact of water deficit on $^{14}\text{CO}_2$ assimilation and ^{14}C export to the roots. All measurements were performed in WW (black bars) and WD (white bars) plants at 30 DAS. After a $^{14}\text{CO}_2$ pulse-chase experiment and lyophilization, plants were exposed on PhosphorImager screens (5 d) and scanned. A, Roots and rosettes of WW and WD plants were radiolabeled after a 45-min chase. Red arrows represent the most labeled leaves. B, Assimilated ^{14}C , defined as the total amount of ^{14}C measured in the plant per leaf area unit. C, Percentage of the total amount of ^{14}C found in rosette. D, Percentage of the total amount of ^{14}C found in root. E, Amount of ^{14}C exported per mg of rosette dry weight (DW). F, Amount of ^{14}C found in root per mg of root dry weight. Data are means \pm SE obtained from six to seven plants of six independent experiments. Asterisks represent significant differences from WW plants as determined by a Two/K sample permutation test (***, $P < 0.005$).

In parallel, the transcript levels of the Suc effluxer genes *SWEET11* and *SWEET12*, which catalyze Suc efflux to the apoplast during phloem loading (Chen et al., 2012), were up-regulated in WD leaves (1.4-fold, $P < 0.01$ and 2-fold, $P < 0.01$, respectively). *SWEET13* transcripts were also more abundant after water deficit in leaves (1.7-fold, $P < 0.005$). *SWEET15*, also named *SAG29*, which was the lowest expressed *SWEET* gene in control conditions, was overexpressed and became the most expressed *SWEET* gene in leaves in response to water deficit (Fig. 10B).

In WW roots, *SUC1* transcripts were the most abundant of *SUC* genes, closely followed by *SUC2*. Since *SUC1* and *SUC2* expression decreased (0.2-fold, $P < 0.005$) and increased (2.3-fold, $P < 0.005$), respectively, in WD roots compared with WW roots, *SUC2* became the most expressed *SUC* gene in roots of WD plants. *SUC4* was slightly overexpressed in response to water deprivation (1.4-fold, $P < 0.005$). *SUC5* expression, which was marginal in control conditions, was inhibited in the

stressed root compared with the control root (0.5-fold, $P < 0.05$). No significant change in *SUC3* expression was observed in the roots in response to water deficit (Fig. 11A).

Among the five *SWEET* genes studied in WW roots, *SWEET13* was the most expressed, followed by *SWEET12* and *SWEET14*, while the transcript levels of *SWEET11* and *SWEET15* were low. However, water shortage triggered a strong increase in transcript levels of *SWEET11* (27.3-fold, $P < 0.005$) and *SWEET15* (10.3-fold, $P < 0.005$), and to a lesser extent of *SWEET14* (5-fold, $P < 0.005$), *SWEET13* (4.2-fold, $P < 0.005$), and *SWEET12* (1.9-fold, $P < 0.01$), in the roots. Thus, *SWEET13* and *SWEET11* became the most expressed *SWEET* genes in the WD roots (Fig. 11B).

Generally, *SWEET* gene expression was lower than *SUC* gene expression in both organs and conditions. In addition, *SWEET* (*SWEET11*, *SWEET12*, *SWEET13*, *SWEET15*, and *SWEET14* if expressed) gene up-regulation was well coupled with *SUC2* gene overexpression in both organs under water deficit (Figs. 10 and 11).

Sucrose Transport to Roots in Water Deficit Plants

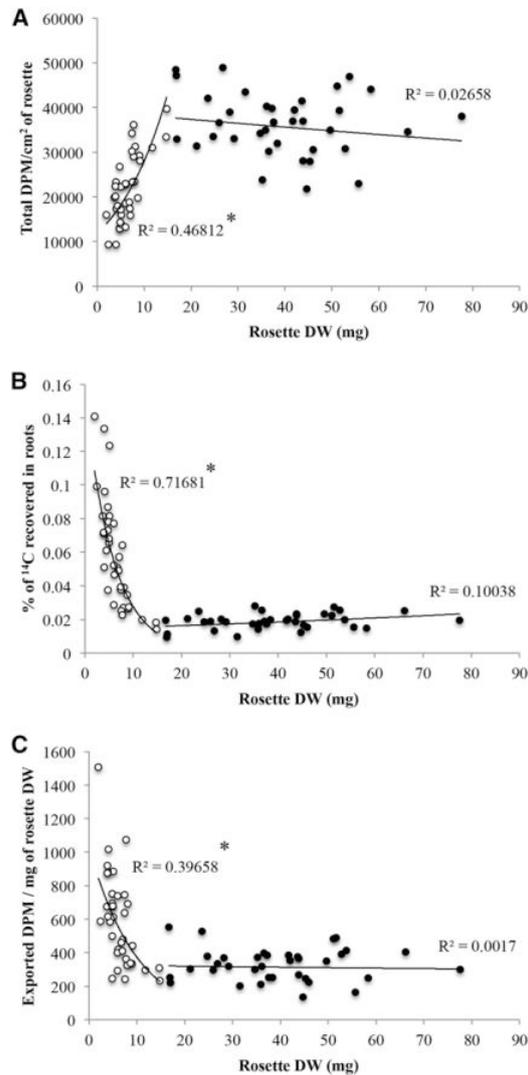


Figure 9. Relationship between rosette dry weight (DW) and ^{14}C partitioning parameters in WW and WD plants. A, ^{14}C assimilation as a function of rosette dry weight. B, Percentage of ^{14}C found in roots as a function of rosette dry weight. C, Amount of ^{14}C exported per rosette dry weight as a function of rosette dry weight. All measurements were performed in WW (black dots) and WD (white dots) plants at 30 DAS. Data used to perform correlations result from the $^{14}\text{CO}_2$ pulse-chase experiments displayed in Figure 7 ($n = 6$ or 7 ; six independent experiments). Asterisks represent significant correlations (*, $P < 0.005$) after a Pearson correlation test.

Water Deficit Delays Aging and Promotes Hexose Accumulation Independently from Senescence

Some elements, such as the up-regulation of the *SWEET15/SAG29* gene and the hexose accumulation noted in WD 30-d-old (30d) plants, are also reported in response to senescence-associated aging (Quirino et al.,

2001; Seo et al., 2011). To distinguish the effects of water deficit from those due to aging, the experiment was extended to 49 DAS. A phenotype comparison between WW and WD plants was performed. The contents of the three major free sugars (Suc, Glc, and Fru) and starch

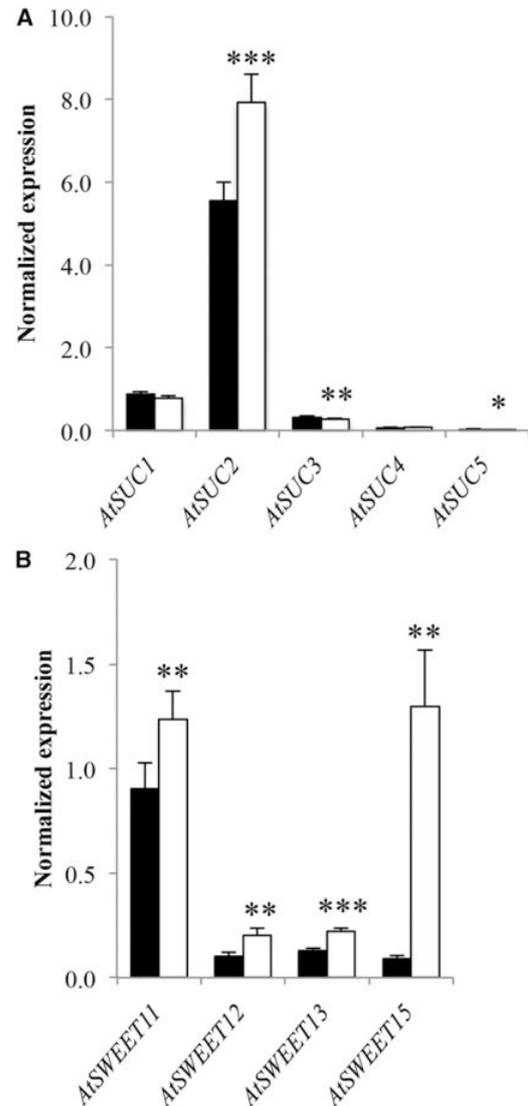


Figure 10. Impact of water deficit on specific *AtSUC* and *AtSWEET* genes expressed in leaves. All measurements were performed in WW (black bars) and WD (white bars) plants at 30 DAS. Relative expression of *AtSUC* (A) and *AtSWEET* (B) was measured by RT-qPCR. Data are normalized (no unit) to the expression level of the reference gene *At5g12240* (Czechowski et al., 2005) and are means \pm SE obtained from the pool of plants ($n \geq 12$) of 11 independent experiments. Asterisks represent significant differences from WW plants as determined by a Two/K sample permutation test (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; and ***, $P < 0.005$).

Durand et al.

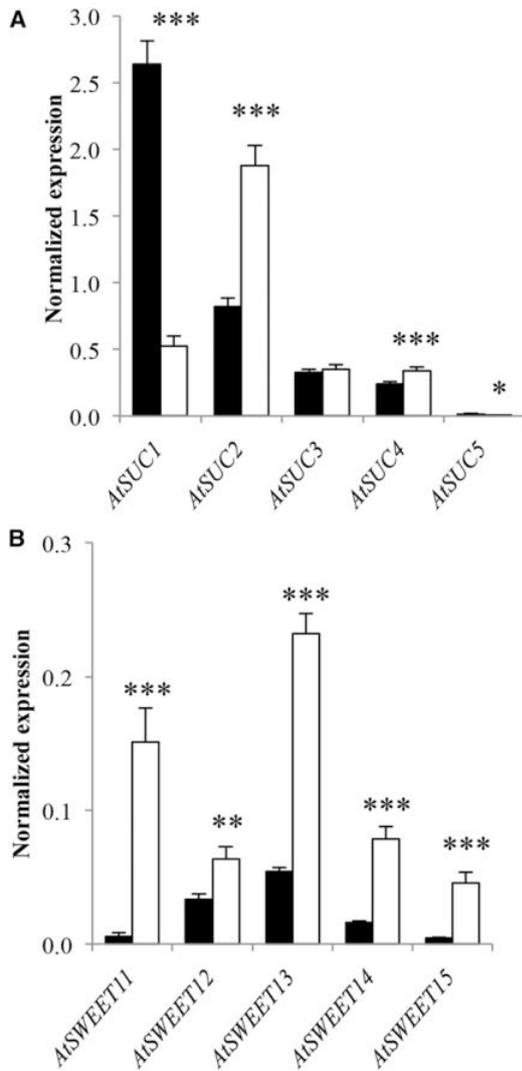


Figure 11. Impact of water deficit on specific *AtSUC* and *AtSWEET* genes expressed in roots. All measurements were performed in WW (black bars) and WD (white bars) plants at 30 DAS. Relative expression of *AtSUC* (A) and *AtSWEET* (B) was measured by RT-qPCR. Data are normalized (no unit) to the expression level of the reference gene *At5g12240* (Czechowski et al., 2005) and are means \pm SE obtained from the pool of plants ($n \geq 12$) of 11 independent experiments. Asterisks represent significant differences from WW plants as determined by a Two/K sample permutation test (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; and ***, $P < 0.005$).

content were determined and compared with corresponding 30d plants. In addition, the transcripts of genes related to photosynthesis (*RBCS* and *CAB1*) and senescence (*SAG12* and *SWEET15/SAG29*) as well as Suc transporter genes (*SUCs* and *SWEETs*) were monitored.

The phenotype observation on 49-d-old (49d) plants showed that WD plants were smaller than WW plants, as already noted at 30 DAS. A strong reddening was

observed at the level of petioles in WW plants at 49 DAS, a phenomenon that was not detected in WD plants. Interestingly, bolting was initiated in some WW plants, indicating a switch from the vegetative to the reproductive stage. Conversely, the absence of emerging inflorescences in stressed plants suggests that they were still in the vegetative stage (Fig. 12A).

While Suc content was still higher in WD 49d leaves than in WW 49d ones, Suc content remained unchanged with aging in WW (WW 30d, $12.7 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight; WW 49d, $13.1 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight) and WD (WD 30d, $22.1 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight; WD 49d, $20.5 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight) leaves (Fig. 12B). The same trend for Suc content was also observed for the roots, suggesting that aging did not impact Suc content during this time span in both organs regardless of the water regime (Fig. 12B).

Glc content increased dramatically (9.6-fold) with aging in WW leaves (30d, $8.6 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight; 49d, $82.7 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight). An increase in Glc content was also observed in WD leaves (30d, $31.5 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight; 49d, $66.1 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight) with aging, but to a lesser extent (2.1-fold). As a result, Glc content was higher in WW leaves than in WD leaves at 49 DAS, but the difference was not statistically significant. In the roots, a slight increase in Glc content was observed in WW plants (30d, $21.6 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight; 49d, $29 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight) and WD plants (30d, $33.9 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight; 49d, $41.24 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight). However, Glc accumulation in response to water deficit was still noted at both stages of development (Fig. 12B). Similarly, Fru content changed with the same pattern in both organs with aging in WW and WD plants, but at lower levels (Fig. 12B).

Starch content increased marginally in WW leaves with development (30d, $340.8 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight; 49d, $410.5 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight; Fig. 12B). In the same time span, starch content in WD leaves (30d, $231.9 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight; 49d, $174.9 \mu\text{mol g}^{-1}$ dry weight) decreased slightly (-25%) and remained always lower than in WW leaves. In root, starch content stayed weak and constant with development and water deficit (Fig. 12B).

The expression profile of Suc transporter genes in response to water deficit at 49 DAS was in agreement with the profile observed for 30d plants (Figs. 10 and 11). While *RBCS* transcript level decreased with aging in WW leaves, it remained stable in this time span in WD leaves. As a result, *RBCS* gene expression was lower in WW 49d leaves than in WD 49d leaves. In contrast, no change was seen in *CAB1* leaf expression, whether in response to water deprivation or aging (Fig. 12C). The *SAG12* gene, which was poorly expressed in WW 30d and WD 30d leaves, stayed at the same level in WD 49d leaves (Fig. 12C). However, its expression was clearly higher in WW 49d leaves. *SWEET15/SAG29* gene expression was weak and constant with development. In contrast, its expression remained always higher and constant in WD leaves than in WW ones, suggesting that its up-regulation in leaves was only due to water deficit and not aging.

Sucrose Transport to Roots in Water Deficit Plants

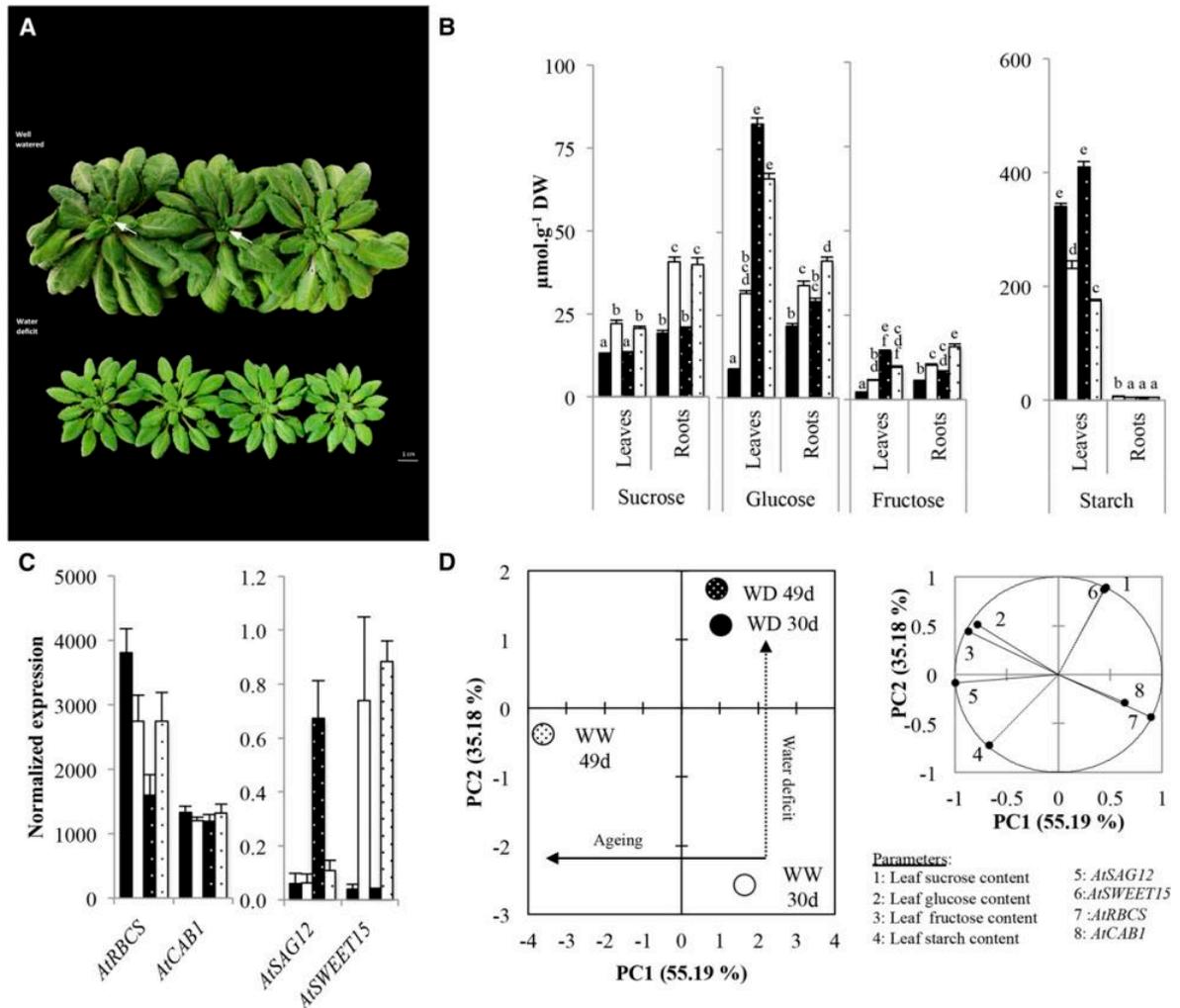


Figure 12. Comparison and impact of water deficit on shoot development, sugar and starch contents, and leaf gene expression at 30 and 49 DAS. A, Top view of WW and WD whole rosettes at 49 DAS. White arrows show inflorescence emergence. In B to D, black bars and circles, white bars and circles, black bars and circles with white dots, and white bars and circles with black dots represent 30d WW, 30d WD, 49d WW, and 49d WD plants, respectively. B, Comparison of sugar and starch contents at 30 and 49 DAS in leaves and roots. Different letters represent groups that were significantly different as determined by a Wilcoxon test followed by a multiple comparison test (false discovery rate adjustment; $P < 0.05$). C, Comparison of *AtSAG12*, *AtSWEET15*, *AtRBCS*, and *AtCAB1* gene expression at 30 and 49 DAS in leaves. D, Multivariate analysis of the impact of water deficit in leaves at 30 and 49 DAS on sugar and starch contents and gene expression related to senescence and photosynthesis in leaves. Principal component analysis shows the sample position in the plane defined by principal component 1 (PC1) and PC2, gathering 90% of the total variance (left). Dotted and solid arrows show the main trends relative to water deficit and aging, respectively. Variables used to perform principal component analysis are presented at right, with their projections in the plane defined by PC1 and PC2. Data at 30 DAS are from two experiments already presented in Figure 7 (sugar content) and Figures 4 and 10 (gene expression). Data are means \pm se obtained from the pool of plants ($n \geq 6$) of two independent experiments.

To further distinguish the effects of water deficit and aging on the rosette, a principal component analysis was performed using each condition as an individual and the parameters cited previously as variables (Fig. 12D). Principal components 1 and 2 explained 55.2% and 35.2% of the total variance. While principal

component 1 was associated mainly with leaf content in Glc and Fru and the relative expression of *SAG12* and *RBCS*, principal component 2 was linked to leaf content in Suc and starch and *SWEET15* relative expression. The effects of aging and water deficit were clearly distinguished in accordance with principal components

Durand et al.

1 and 2, respectively (Fig. 12D). Water deficit induced a shift in sample position in accordance with principal component 2 regardless of the development stage (30 or 49 DAS). In contrast, aging provoked a shift in sample position in accordance with principal component 1 for WW plants but not for WD plants.

DISCUSSION

Characterization of the Culture System

The aim of this work was the analysis of the shoot-root C partitioning in *Arabidopsis* in response to a mild and continuous water deficit, with an emphasis on events occurring in the roots. For this purpose, a culture system providing easy and quick access to the roots was required for molecular and biochemical analyses and for RSA monitoring. Moreover, plants had to be grown close to soil conditions, with the possibility of altering soil characteristics such as water content. Different culture systems, with only some of the desired characteristics, have been developed for *Arabidopsis*, based on plants grown on a thin layer of soil (Ara-rhizotron; Devienne-Barret et al., 2006) or on nylon membranes (rhizoponics; Mathieu et al., 2015). However, we decided to develop a system adapted from the rhizoboxes described by Xiong et al. (2006), where plants are separated from soil by a nylon membrane (Fig. 1). Plants were able to develop and produced seeds with no sign of mineral deficiency and with a healthy root system. Moreover, compared with plants grown *in vitro*, the roots were protected from light and were not fed with sugars in the medium.

Characterization of the Effects of Water Deficit Applied to Plants Grown in a Rhizobox

The plants were cultured with two different water regimes (WW and WD) corresponding to maximal and half-maximal water-holding capacity. The impact of water deficit on the physiological status of the roots and shoots was first characterized.

At the end of the experiment, the 30d WD plants displayed some of the typical responses of acclimation (Chaves et al., 2003), such as shoot growth inhibition (Fig. 3; Table I), increased R/S ratio (Table I), metabolic changes (Fig. 7), and variation in specific gene expression (Figs. 4, 10, and 11). The decrease in root water content (Table I) clearly reflected a reduction in soil water availability. Because roots are in direct contact with drying soil, they represent the first organ coping with soil moisture reduction. The water content was more reduced in the roots than in the rosette (Table I). Moreover, the scatter of rosette water content values around the mean was rather low but higher for root water content values in WD plants (Supplemental Fig. S1A). This may reflect an acclimation phenomenon to keep the rosette water content as stable as possible, while the root water content was adjusted to maintain

the flux of water, which is linked to the difference between the soil and root water potential (Tardieu and Davies, 1993). Interestingly, leaf biomass decreased concomitantly with root water content under water deficit (Supplemental Fig. S1B). Thus, root dehydration in drying soil altered leaf growth (Supplemental Fig. S1B), likely because less water was delivered to the leaves (Westgate and Boyer, 1985; Davies et al., 1990). However, despite a reduced rosette water content (Table I), no sign of wilting was noticed during the experiments (Fig. 3), regardless of the plants. This could be due to an osmotic adjustment, as suggested by the decrease in leaf osmotic potential (Table I), thus avoiding a strong drop in turgor pressure (Hare et al., 1998). Altogether, these results highlight a fine-tuning in water utilization and loss, presumably by adjusting water uptake, growth, and transpiration to acclimate plants to a reduced supply of water (Chaves et al., 2003).

A strong reduction in leaf area and biomass was induced by water shortage (Fig. 3; Table I), another acclimation phenomenon, to restrict water losses by transpiration (Chaves et al., 2002). The water deficit strongly reduced the rosette area and, to a lesser extent, the leaf number (Table I). Therefore, the reduction in rosette area was due mainly to a decrease in individual leaf expansion, indicating that growth was more affected than development.

Root growth was strongly diminished (Table I; Fig. 5), but less than shoot growth, as indicated by the increased R/S ratio. Differences in the sensitivity of growth for both organs have been reported for several crop species (Sharp et al., 2004) and *Arabidopsis* plants under osmotic stress (van der Weele et al., 2000) or water deficit (Hummel et al., 2010). Sustained root growth at the expense of leaf is a major acclimation mechanism to maximize the water uptake and minimize water losses (Chaves et al., 2003; Verslues et al., 2006). While root biomass and total length of the lateral roots were strongly reduced by water deprivation (Table I), the length of the primary root was only a little shorter (Fig. 5). Thus, in response to a moderate water deficit, the primary root still grew at an appreciable rate while the elongation rate of the lateral roots was inhibited (Fig. 5). This is in accordance with van der Weele et al. (2000) and could be interpreted as a strategy to improve the depth exploration of the soil to reach wetter zones. Experiments on root patterning allowed further investigation of root growth. The average shapes of both WW and WD roots were rather similar, except in shallow soil (Fig. 5). This indicates that the density of the roots was lower in WD plants but that the soil area explored was more or less maintained between both WD and WW plants. In maize (*Zea mays*), the study of recombinant inbred lines with contrasting lateral root number and length demonstrated that plants with reduced lateral root density were more tolerant to drought (Zhan et al., 2015). This was related to a reduced metabolic investment in soil exploration, thus favoring the acquisition of limited resources such

as water. Remarkably, those results were confirmed in field-grown plants and also in plants grown on mesocosms, a culture system with many similarities to the rhizobox used in this study. The soil area explored by roots was thus less affected than the total length of lateral roots, suggesting a more efficient positioning of roots for WD plants (Fig. 5), presumably to improve the likelihood of finding a wetter soil area. Indeed, it has been demonstrated that roots exhibit hydrotropism (Takahashi et al., 2003) and hydropatterning (Bao et al., 2014) to control root orientation and the positions of lateral roots along the main root, respectively. The reduction in the area explored by WD roots was observed mainly in shallow soil (Fig. 5), since the area colonized was similar deeper in the rhizobox (Fig. 6). In rhizoboxes as in natural conditions, soil dried from the surface in contact with air; thus, shallow soil was subjected to daily variations in water content caused by evaporation-watering cycles. In contrast, bottom soil was characterized by constant soil water content during plant growth. Deak and Malamy (2005) speculated that *Arabidopsis* plants optimize their root system by repressing root proliferation into regions where less water is available. This is in accordance with our data showing that the extent of lateral proliferation was clearly lower in shallow soil in response to water deficit (Fig. 6). Altogether, these data demonstrate that plants coping with water deficit acclimated by sustaining growth into deeper soil (Fig. 5), while lateral root proliferation was mostly inhibited in shallow soil (Fig. 6), to maintain soil exploration and water uptake in a metabolically efficient way. This confirms that plants exhibit a high degree of phenotypic plasticity by adjusting root growth rate, root growth direction, and root branching to efficiently explore soil (Satbhai et al., 2015).

Although the water deficit applied to plants grown in rhizoboxes was moderate, it generated changes in the expression of water deficit-responsive genes. Indeed, overexpression of the *RD29a* gene (Chen et al., 2005; Xiong et al., 2006; Ramírez et al., 2009; Sharma and Verslues, 2010; Yamada et al., 2011) in WD leaves (Fig. 4B) and down-regulation of the *TIP1.2* gene (Alexandersson et al., 2005; Boursiac et al., 2005) in WD roots (Fig. 4D) confirmed the occurrence of molecular perception of water deficit in both organs (Harb et al., 2010).

Taken together, our results give evidence that a continuous and moderate water deficit applied to plants grown in rhizoboxes produced classical responses to water shortage at the molecular and physiological levels in both shoots and roots and that rhizoboxes are well suited for studying the effect of water deficit, particularly in roots.

In Leaves, Water Deficit Triggered Higher Sugar Content, Which Could Support Enhanced Phloem Loading

An accumulation of sugars was observed in leaves under water deficit (Fig. 7), as reported already in

Arabidopsis (Taji et al., 2002; Hummel et al., 2010; Sperdoui and Moustakas, 2012), grapevine (*Vitis vinifera*; Cramer et al., 2007; Medici et al., 2014), and maize (Kim et al., 2000). In accordance with Hummel et al. (2010), this increase accounted for a marginal part of the decrease in leaf osmotic potential (less than 2%), suggesting another role for the accumulation of sugars in this organ. Starch content, although lower under WD, remained at an appreciable level at midday (Fig. 7). The changes in starch and free sugar contents (Fig. 7) suggest that moderate water deficit did not lead to sugar starvation, as reported in trees (McDowell, 2011), but rather to an increase in free sugars available, despite a reduced ^{14}C assimilation (Fig. 8B). The reduction in ^{14}C assimilated (Fig. 8B) on a leaf area basis is certainly caused by a restricted CO_2 diffusion (decreased stomatal conductance plus decreased mesophyll conductance; Flexas et al., 2006a) as a consequence of moderate water deficit. Nevertheless, a slight decrease in *RBCS* transcripts occurred (Fig. 4A), as in tobacco (*Nicotiana tabacum*; Kawaguchi et al., 2003) or tomato (*Solanum lycopersicum*; Bartholomew et al., 1991) subjected to water deficit. This suggests that metabolic impairment also may occur (Flexas et al., 2006a) through mechanisms involving gene repression when stomatal closure develops over several days (Flexas et al., 2006b). The reduction in *RBCS* transcripts (Fig. 4A) also could be related to higher soluble sugar contents (Fig. 7), since photosynthetic gene expression is inhibited by high carbohydrate contents (Sheen, 1990; Krapp et al., 1993; Van Oosten and Besford, 1994). In this context, higher sugar contents would represent a basic mechanism for the regulation of photosynthesis by sink organs (Krapp et al., 1993) when the production of photoassimilates significantly exceeds the sink capacity to use them. Indeed, leaf growth is reduced earlier and more intensively than photosynthesis (Muller et al., 2011), resulting in an increase in the content of soluble sugars (Fig. 7), despite photosynthesis decline under water deficit (Quick et al., 1992; Hummel et al., 2010). The products of photosynthesis are tightly tuned to the plant demand (Ainsworth and Bush, 2011), and despite a reduced C demand for growth, Suc increased (Fig. 7), although its level is reported to be rather constant (Stitt and Zeeman, 2012). Hummel et al. (2010) proposed that the excess C not used by the leaf for growth, respiration, and osmotic adjustment could be exported to the roots.

Based on this hypothesis, $^{14}\text{CO}_2$ pulse-chase experiments were carried out to establish if water deficit enhanced ^{14}C allocation to the roots. Pulse-chase experiments first demonstrated that $^{14}\text{CO}_2$ assimilation was reduced under water deficit (Fig. 8B), agreeing with decreased *RBCS* level transcripts (Fig. 4A) and leaf growth reduction (Fig. 3; Table I). As expected from the increased R/S ratio, a greater part of ^{14}C was allocated to roots in WD plants (Fig. 8D). In addition, even though $^{14}\text{CO}_2$ assimilation was reduced (Fig. 8B), greater amounts of ^{14}C per rosette dry weight unit were transferred to the roots under water deficit (Fig. 8E). In accordance with the hypothesis by Hummel et al.

Durand et al.

(2010), we demonstrate that a moderate water deficit enhanced C export from the leaves to the roots (Fig. 8), at least during the light period. In contrast, the lower proportion of root tips radiolabeled in WD plants might suggest that the velocity of phloem sap was reduced. Wardlaw (1969) underlined the tight relationship existing between the slower growth induced by water deficit and the reduced velocity of photoassimilate movement in wheat (*Triticum aestivum*). In addition, several studies focusing on the allocation of assimilated C between source and sinks found that the translocation of recently assimilated C from source leaves to sinks was delayed under water deficit (Plaut and Reinhold, 1965; Wardlaw, 1969; Deng et al., 1990; Li et al., 2003; Ruehr et al., 2009). A modeling experiment (Hölttä et al., 2009) suggested that decreasing xylem water potential under water deficit also limits sugar transport in the phloem, due to limited xylem-phloem water exchange (Sevanto, 2014). Our results indicate that C export to the roots was enhanced under water deficit (Fig. 8), even though the velocity of phloem sap was probably reduced, at least during the chase period. Because ^{14}C allocation to root depends on the rate of phloem loading and the velocity of phloem sap, we propose that phloem loading was enhanced, leading to a higher Suc concentration in the phloem sap in WD plants. The enhanced phloem loading is consistent with the fact that a higher sugar concentration is needed in the phloem to attract water from the xylem when water availability is reduced (Hölttä et al., 2009).

There was also a tight relationship between leaf growth and C export to the roots (Fig. 9). The rosette biomass under water deficit was negatively correlated with the proportion of ^{14}C recovered in the roots (Fig. 9B) and ^{14}C exported to the roots per leaf dry weight unit (Fig. 9C). Thus, the more reduced leaf growth was by water deficit, the greater proportion and amount (per g of leaf dry weight) of assimilated C were exported to the roots. This result highlights that the decrease in leaf growth may have resulted in a higher pool of C available for export to the roots, as suggested previously by Hummel et al. (2010).

The enhanced Suc phloem loading could be supported by an increased activity of Suc transporters. In *Arabidopsis*, Suc is apoplastically loaded into the phloem companion cell in minor and major veins of source leaves and translocated to sinks in the phloem sap. AtSWEET11 and AtSWEET12 (plasma-membrane Suc effluxers; Chen et al., 2012) release Suc from mesophyll cells or phloem parenchyma cells into the apoplast prior to loading. Then, the companion cell Suc-specific Suc:H⁺ symporter AtSUC2 loads Suc into the phloem (Truernit and Sauer, 1995; Stadler and Sauer, 1996; Gottwald et al., 2000). In potato (*Solanum tuberosum*), tobacco, and sugar beet (*Beta vulgaris*), transcript levels of *SUC2/SUT1* are tightly correlated to [^{14}C]Suc uptake in plasma membrane vesicles (Lemoine et al., 1996; Vaughn et al., 2002; Leggewie et al., 2003). In *Arabidopsis*, recent studies demonstrated that the up-regulation of *SUC2* results in enhanced [^{14}C]Suc uptake

into the veins of leaf discs, which entails higher phloem loading and a greater part of ^{14}C being exported to the roots (Dasgupta et al., 2014). Therefore, it is reasonable to conclude that the increase in Suc transporter gene expression relates to an increased Suc transport activity. In accordance with a putative increased phloem loading, our data confirmed that AtSWEET11, AtSWEET12, and AtSUC2 genes were up-regulated in leaves during water deficit (Fig. 10). SWEET13, a Suc effluxer that was up-regulated in the *sweet11/sweet12* double mutant and, therefore, could contribute to the first step of phloem loading (Chen et al., 2012), was also induced (Fig. 10), supporting this hypothesis. Several other results provide evidence that leaf Suc transporter gene expression is tuned by water deficit (Fig. 10), as in grapevine (Medici et al., 2014), rice (*Oryza sativa*; Ibraheem et al., 2011), and *Arabidopsis* (Gong et al., 2015). As source strength is defined as the ability to export sugar to sinks, our data demonstrate that the leaves of WD plants were a stronger source when the data were weighted by leaf mass. The enhanced C export to roots could be interpreted as a fine-tuned way to maintain phloem transport under reduced water availability.

Roots under Water Deficit: Highlight on the Hidden Half of the Plant

The growth and development of sink organs, such as roots, depend on C supply by sources. The growth and development of roots are related to local hexose concentration, released from unloaded and cleaved Suc, in *Arabidopsis* (Freixes et al., 2002). Indeed, the elongation rate of primary and secondary root is under the control of C availability when water supply is not limited (Freixes et al., 2002; Muller et al., 2011). However, this tight relationship between C availability and root growth seemed to disappear under water deficit. Reduced WD root growth did not seem to be caused by carbon starvation, as sugars and ^{14}C accumulated in the roots (Figs. 7 and 8F). Indeed, C export to the roots was even enhanced, resulting in a higher R/S ratio, suggesting that the WD plants invested more C in their roots. Increasing C allocation to roots has been described as a strategy to resist water deficit in a drought-tolerant genotype of wheat (Nicolas et al., 1985).

However, it has to be pointed out that sugar accumulation also could be linked to changes in metabolism. For example, Nicolas et al. (1985) reported that lower root respiration of the drought-tolerant genotype of wheat compared with the sensitive one contributed to more sugar accumulation in roots of the tolerant genotype under drought.

Nevertheless, sugars have to be unloaded in the root cells in order to sustain the hydrostatic pressure gradient between source and sink organs and maintain phloem sap flow. Phloem unloading occurs in a symplastic way on a relatively small proportion of the root (i.e. the growing root tip; Oparka et al., 1994). Indeed, phloem transport seems to be symplastically isolated

(Kempers et al., 1998), suggesting apoplastic unloading along the whole phloem path. Since Suc apoplastic unloading requires Suc transporters, we investigated which of those were expressed in roots and responsible for this function.

In 30d WW roots, the analysis of transcript levels of the nine *SUCs* revealed that five of them were expressed in roots, namely *SUC1*, *SUC2*, *SUC3*, *SUC4*, and *SUC5*, even though the latter was poorly expressed. *SUC1*-induced transport of Suc in the pollen tube was tightly linked to an increased turgor of the pollen tube for growth (Stadler et al., 1999). A similar function in the root cannot be excluded, since *SUC1* is expressed in growing areas of the roots (Sivitz et al., 2007). Therefore, decreased *SUC1* expression (Fig. 11A) might be associated with the reduced root growth observed (Fig. 6; Table I) and, more particularly, with a reduction in the proportion of growing areas of the root (fewer lateral roots). *SUC4*, as a Suc:H⁺ symporter, translocates Suc from the vacuole to the cytosol in the natural environment of the *Arabidopsis* cell (Schulz et al., 2011). Under water deficit, its up-regulation (Fig. 11A) may contribute to regulating the transport and vacuolar storage of Suc into the root cells. However, *SUC2* is important for the retrieval of leaked Suc into the phloem of *Arabidopsis* (Srivastava et al., 2008; Gould et al., 2012). A higher transcript level of *SUC2* (Fig. 11A) could be associated with a greater need for Suc retrieval along the phloem pathway, since C export to the root was enhanced (Fig. 8), under water deficit. Because *ZmSUT1*, an ortholog of *AtSUC2* in maize, has been demonstrated to mediate Suc efflux into sinks (Carpaneto et al., 2005), *SUC2* also may be involved in phloem unloading. Thus, its up-regulation in roots (Fig. 11A), under water deficit, also may favor Suc unloading in the "release phloem". As a result, this would allow phloem sap movement by maintaining the hydrostatic pressure gradient between leaves and roots. *SWEET11* to *SWEET15* were overexpressed in WD roots (Fig. 11B), perhaps to support the increased Suc efflux from the transported phloem to the surrounding tissue, as it has been proposed that *SWEETs* might be involved in Suc leakage during phloem transport (Ludewig and Flüggé, 2013; Chen, 2014). *AtSWEET11* and *AtSWEET12* were recently demonstrated to transport hexoses and participate in the delivery of sugars to secondary xylem (Le Hir et al., 2015). The root systems of 30d plants contained large secondary structures in their conducting tissues; therefore, we cannot rule out a similar role for *AtSWEET11* and *AtSWEET12*. Interestingly, as observed in the rosette, there was a co-up-regulation of *SUC2* and *SWEET* genes in the roots under water deficit, underlying a similar response pattern in source and sink organs, a quite unexpected result.

These data provide evidence for a transcriptional regulation of root Suc transporter expression in response to water deficit (Fig. 11). The origin of this regulation remains unknown but could be related either to the increase in sugar concentration in the roots or to a not yet demonstrated direct regulation by water status.

However, according to the push hypothesis of shoot-root interaction (Farrar and Jones, 2000), the up-regulation of *SUC2* and *SWEET11* to *SWEET15* genes in WD root (Fig. 11) could contribute to draining the C from the shoot. Water deficit seemed to enhance source strength, but it cannot be excluded that root sink strength was also increased to support the increased C export.

Overexpression of the *SWEET15/SAG29* Gene in Leaves Was Water Deficit Dependent

SWEET15/SAG29 gene induction in leaves was described previously as a senescence-associated process (Quirino et al., 1999), and induction of leaf senescence by abiotic stress has been widely reported (Buchanan-Wollaston, 1997; Lim et al., 2007; Wingler and Roitsch, 2008). Therefore, *SWEET15/SAG29* induction in WD leaves, together with an increase in sugar, could be attributed to either water deficit or accelerated senescence. To clearly distinguish both effects, the water deficit experiment was extended to 49 d to check if senescence-associated events would be induced further. Sugar accumulation is tightly correlated to leaf senescence in *Arabidopsis* (Quirino et al., 2001) because senescence is responsive to sugars (Pourtau et al., 2006). In WW leaves, a stronger hexose accumulation with aging, coupled with a higher *AtSAG12* transcript level, a highly senescence-specific gene (Gan and Amasino, 1995), indicate leaf aging-related senescence at 49 DAS (Fig. 12, B and C). In addition, *RBCS* expression decreased in WW plants, and many plants displayed bolting. On the contrary, in WD plants, the *AtSAG12* transcript level stayed low and constant and *RBCS* expression remained stable (Ludewig and Sonnewald, 2000). Finally, WD plants also displayed a late flowering time (Fig. 12A), which is in agreement with a delay in senescence, since senescence induction is linked to floral initiation in *Arabidopsis* (Wingler and Roitsch, 2008). Delaying floral initiation allows more time to accumulate vegetative biomass to be remobilized later toward seeds (Metcalf and Mitchell-Olds, 2009). To conclude, there are numerous clues that *SWEET15/SAG29* up-regulation, in WD 49d leaves (Fig. 12C) displaying delayed senescence, was rather specific to moderate water deficit. Its potential role in the redistribution of Suc in plants may have to be reassessed in the light of these results.

CONCLUSION

The design and use of rhizoboxes allowed us to precisely study the response of the *Arabidopsis* root system to a mild drought and to relate this response to C allocation. Despite a much shorter total root length in WD plants, the surface explored by the roots was less affected than in WW plants. This is in agreement with previous results showing that plants can acclimate by reshaping their root systems. In parallel to this

Durand et al.

reshaping, a significant amount of C was reallocated to the roots. $^{14}\text{CO}_2$ pulse-chase experiments demonstrated a relative increase in phloem transport to the roots in agreement with the higher R/S ratio. This increase in Suc transport confirms, on a quantitative basis, the previous hypothesis suggesting that the excess of C, resulting from the higher effect of water deficit on growth than photosynthesis, could be available for export to the roots (Hummel et al., 2010). The enhanced export measured in our experiments could be linked to the higher transcript levels for *SUC2*, *SWEET11*, and *SWEET12* in the leaf. Unexpectedly, the same set of Suc transporter genes (*SUC2*, *SWEET11*, and *SWEET12*) was induced in the roots, raising questions about their role (phloem retrieval and/or phloem unloading?). The rhizobox system developed in this study appears perfectly suited for further studies to pinpoint the cellular localization of these transporters and determine their role in Suc fluxes in the roots.

Altogether, these data demonstrate that, when challenged with a mild and continuous soil water deficit, *Arabidopsis* plants reduced their growth because of the reduced water availability for cell expansion, but more C was allocated to the roots to sustain their development, albeit at a slower rate.

MATERIALS AND METHODS

Rhizobox, Plant Materials, Growth Conditions, and Harvest

The rhizobox was made with two Plexiglas plates (1 cm thick) of 20 cm \times 20 cm (width \times length) and spaced on both sides with 1-cm \times 20-cm (width \times length) bars cut from the same Plexiglas plate. The lower part was sealed with tape (pierced to allow water to flow through), and the upper part was left open. The rhizobox, in the open position, was filled with 500 mL of sieved organic compost. A nylon membrane with a 0.7- μm mesh width (Sefar Nitex 03-7/2) was placed inside the rhizobox on the front plate, and the rhizobox was then closed with two pliers. Rhizoboxes were maintained at two water regimes depending on the growth conditions (WW, 0.8 g water g $^{-1}$ compost; WD, 0.4 g water g $^{-1}$ compost) from sowing to plant harvest (30 or 49 DAS, depending on the experiment). *Arabidopsis thaliana* Columbia-0 ecotype seeds were sown in a drop of nutrient agar medium (0.65% (w/v) agar, Murashige and Skoog medium; M0232; Duchefa Biochemie) placed between the front Plexiglas plate and the nylon membrane at the top of the rhizobox (two to four plants per rhizobox). The top of the rhizobox was sealed with cellophane during 5 to 7 DAS to maintain a high hygrometry and prevent seedling dehydration. Rhizoboxes were wrapped with opaque plastic to avoid exposing roots to light and placed in a phytotron at 23°C/18°C, 10-h/14-h day/night, with a 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ light intensity at the level of plants and a 50%/70% day/night relative hygrometry. Rhizobox soil water content was kept constant by daily watering, with the amount of missing water determined by weighing rhizoboxes.

Harvests were performed at 30 and 49 DAS. Root and rosette were harvested separately and frozen in liquid nitrogen for RNA and sugar extractions. Additional plants (rosette and root) were also collected to measure physiological parameters (biomass and water status).

Leaf Area, Biomass, Water Content, Osmotic Potential, and R/S Ratio

The projected leaf area was determined with photographs of 30d plants with the threshold color plugin of ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Leaf number was counted on the same photographs.

Water content was determined as follows in rosette and root. Fresh weight was scored immediately after separation of root and rosette. Dry weight was

scored after 24 h at 80°C. Water content was then determined as (fresh weight – dry weight)/fresh weight. For rosette, fresh weight, dry weight, and water content were measured on individual plants. For root, fresh weight, dry weight, and water content were measured on pools of two to three plants grown in the same rhizobox. R/S ratio, defined as root dry weight/rosette dry weight, was determined on pools of two to three plants grown in the same rhizobox.

Rosette osmotic potential was measured on three to five excised leaves per plant pooled in 2-mL syringes. The syringes were frozen successively in liquid nitrogen and thawed at room temperature three times. Sap was then extracted and collected in 15-mL tubes by centrifugation (8,000g, 10 min). Ten microliters of the resulting sap was analyzed using a vapor pressure osmometer (Wescor Vapro 5520). Osmotic potential was calculated from osmolality using the Van't Hoff equation at 23°C.

Soluble Sugars and Starch Measurements

Glc, Fru, and Suc were extracted from approximately 10 mg of lyophilized tissue sample by three washings (1.5 mL and twice with 0.5 mL) in methanol: chloroform:water (12:5:3, v/v/v). Supernatants containing soluble sugars were pooled, mixed with 0.6 volume of water, and centrifuged. The upper aqueous phase was collected and evaporated at 50°C with a concentrator (MiVac Quattro; Genevac). Soluble sugars were resuspended in 500 μL of water and quantified using the Suc/Fru/D-Glc Assay Kit (Megazyme).

Starch content was measured from the pellet obtained after methanol: chloroform:water (12:5:3, v/v/v) washings using the Total Starch HK Assay Kit (Megazyme).

RNA Extraction and Complementary DNA Synthesis

Total RNA was extracted from frozen ground tissue (TissueLysor II; Qiagen) as described by Kay et al. (1987). RNA quantity and quality were checked by optical density at 260 nm and agar gel electrophoresis, respectively. The complementary DNA was synthesized from 1 μg of total RNA after DNase treatment (Sigma-Aldrich) using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega).

Gene Expression Analysis

A set of 16 genes coding for Suc transporters from two distinct families, *SUC* (*AtSUC1*, *AtSUC2*, *AtSUC3*, *AtSUC4*, *AtSUC5*, *AtSUC6*, *AtSUC7*, *AtSUC8*, and *AtSUC9*) and *SWEET* from clade III (*AtSWEET9*, *AtSWEET10*, *AtSWEET11*, *AtSWEET12*, *AtSWEET13*, *AtSWEET14*, and *AtSWEET15*), were studied in rosette and root. An initial screen for these genes was performed by RT-PCR after 40 cycles using GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega; 95°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 30 s) and was analyzed by 2% agar gel electrophoresis.

For further analyses by RT-qPCR, only Suc transporter genes that showed amplification in RT-PCR were studied. Quantitative PCR was performed on 96-well plates with a MasterCycler Realplex² (Eppendorf) using GoTaq qPCR Master Mix (Promega). Relative expression was determined according to the 2 $^{-\Delta\text{Ct}}$ method. Target gene expression was normalized to the expression of the plant gene *At5g12240* (Czechowski et al., 2005). The primers used are listed in Supplemental Table S1.

$^{14}\text{CO}_2$ Pulse-Chase Labeling

Labeling experiments of whole plants were performed on 30d plants grown in rhizoboxes in a sealed Plexiglas chamber (upper part exposed to the labeled air; 5 L) illuminated with a light intensity of 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The Plexiglas chamber always contained one rhizobox with two WW plants and one rhizobox with two WD plants. $^{14}\text{CO}_2$ with a specific activity of 54 mCi mmol $^{-1}$ (20 μCi or 74 kBq) was released in the sealed chamber by acidification of sodium bicarbonate (pulse), leading to an increase in the CO_2 level within the chamber lower than 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$. The ambient CO_2 concentration of the air was usually 480 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

After a 15-min pulse, the flux was directed to the trap (10% KOH) to clean the air of $^{14}\text{CO}_2$ during 5 min. Then, the chamber was opened and plants were removed from the assimilation chamber to be exposed under light (100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) to perform the chase during 45 min. When the chase was over, roots were separated from the rosette. Both were then lyophilized for 4 d, exposed on PhosphorImager screens (Storage Phosphor Screen; Molecular Dynamics), and scanned with a resolution of 25 $\mu\text{m pixel}^{-1}$ (Scanner Typhoon;

GE Healthcare). Tissues were then incubated in a digestion buffer (perchloric acid:30% hydrogen peroxide:0.1% Triton X-100, 56:17:27, v/v/v) at 55°C during 24 h. Scintillation cocktail (Ecolite) was then added, and samples were counted for radioactivity by scintillation spectroscopy (Tri-Carb2910; Perkin Elmer).

RSA Analysis

The analysis of length, area, and shape of the root was carried out on photographs of the radiolabeled root system scanned previously with a resolution of 25 $\mu\text{m pixel}^{-1}$.

To determine primary and lateral root lengths, the root system was entirely and manually drawn in white on a black background using The Gimp software. From the generated image, primary root and lateral root lengths were estimated using the RootReader2D software (Clark et al., 2013; Supplemental Fig. S2).

The root system shape was first built with multiple points using ImageJ software. (x ; y) coordinates of multiple points were used to model a raw root system shape, where point (0; 0) corresponds to the separation point between rosette and root. From the raw root system shape, (x ; y) coordinates were extracted with a 0.5-cm specific interval on the y axis using the PlotDigitizer software to produce the net root shape modeled with a 0.5-cm resolution on the y axis. For each root side, x coordinates with the same y coordinates were averaged to generate the mean shape of the root system for WW and WD plants (Supplemental Fig. S3).

From the modeling of the net root shape, the area colonized was determined by calculating integrals with a 0.5-cm-deep resolution on both sides of each root system (Supplemental Fig. S4).

Statistical Analysis

Depending on the sampling size, nonparametric and parametric tests were performed in an R environment. Principal component analysis was performed using XLSTAT software.

Supplemental Data

The following supplemental materials are available.

Supplemental Figure S1. Impact of water deficit on water content in both organs and relationship with rosette dry weight.

Supplemental Figure S2. Method to determine the principal and total lengths of lateral roots.

Supplemental Figure S3. Method to determine the average shapes of the WW and WD root systems.

Supplemental Figure S4. Method to determine the area colonized by the root system.

Supplemental Table S1. Specific primers used in this study.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Denis Couratin for help producing numerous rhizoboxes, Benoît Deslais for drawing Figure 1, Antoine Plasseraud Desgranges for help in the correction of the article, and all our colleagues for inspiring discussions.

Received December 8, 2015; accepted January 21, 2016; published January 22, 2016.

LITERATURE CITED

Ainsworth EA, Bush DR (2011) Carbohydrate export from the leaf: a highly regulated process and target to enhance photosynthesis and productivity. *Plant Physiol* 155: 64–69

Alexandersson E, Fraysse L, Sjövall-Larsen S, Gustavsson S, Fellert M, Karlsson M, Johanson U, Kjellbom P (2005) Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Mol Biol* 59: 469–484

Bao Y, Aggarwal P, Robbins NE II, Sturrock CJ, Thompson MC, Tan HQ, Tham C, Duan L, Rodriguez PL, Vernoux T, et al (2014) Plant roots use a patterning mechanism to position lateral root branches toward available water. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 9319–9324

Bartholomew DM, Bartley GE, Scolnik PA (1991) Abscisic acid control of rbcS and cab transcription in tomato leaves. *Plant Physiol* 96: 291–296

Baud S, Wuillème S, Lemoine R, Kronenberger J, Caboche M, Lepiniec L, Rochat C (2005) The AtSUC5 sucrose transporter specifically expressed in the endosperm is involved in early seed development in Arabidopsis. *Plant J* 43: 824–836

Boursiac Y, Chen S, Luu DT, Sorieul M, van den Dries N, Maurel C (2005) Early effects of salinity on water transport in Arabidopsis roots: molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiol* 139: 790–805

Buchanan-Wollaston V (1997) The molecular biology of leaf senescence. *J Exp Bot* 48: 181–199

Carpaneto A, Geiger D, Bamberg E, Sauer N, Fromm J, Hedrich R (2005) Phloem-localized, proton-coupled sucrose carrier ZmSUT1 mediates sucrose efflux under the control of the sucrose gradient and the proton motive force. *J Biol Chem* 280: 21437–21443

Casimiro I, Beekman T, Graham N, Bhalerao R, Zhang H, Casero P, Sandberg G, Bennett MJ (2003) Dissecting Arabidopsis lateral root development. *Trends Plant Sci* 8: 165–171

Chaudhuri B, Hörmann F, Lalonde S, Brady SM, Orlando DA, Benfey P, Frommer WB (2008) Protonophore- and pH-insensitive glucose and sucrose accumulation detected by FRET nanosensors in Arabidopsis root tips. *Plant J* 56: 948–962

Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS (2003) Understanding plant responses to drought: from genes to the whole plant. *Funct Plant Biol* 30: 239–264

Chaves MM, Pereira JS, Maroco J, Rodrigues ML, Ricardo CPP, Osório ML, Carvalho I, Faria T, Pinheiro C (2002) How plants cope with water stress in the field: photosynthesis and growth. *Ann Bot (Lond)* 89: 907–916

Chen LQ (2014) SWEET sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition. *New Phytol* 201: 1150–1155

Chen LQ, Qu XQ, Hou BH, Sosso D, Osorio S, Fernie AR, Frommer WB (2012) Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* 335: 207–211

Chen Z, Hong X, Zhang H, Wang Y, Li X, Zhu JK, Gong Z (2005) Disruption of the cellulose synthase gene, AtCesA8/IRX1, enhances drought and osmotic stress tolerance in Arabidopsis. *Plant J* 43: 273–283

Clark RT, Famoso AN, Zhao K, Shaff JE, Craft EJ, Bustamante CD, McCouch SR, Aneshansley DJ, Kochian LV (2013) High-throughput two-dimensional root system phenotyping platform facilitates genetic analysis of root growth and development. *Plant Cell Environ* 36: 454–466

Comas LH, Becker SR, Cruz VMV, Byrne PF, Dierig DA (2013) Root traits contributing to plant productivity under drought. *Front Plant Sci* 4: 442

Cornic G (2000) Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture—not by affecting ATP synthesis. *Trends Plant Sci* 5: 187–188

Cramer GR, Ergül A, Grimplet J, Tillett RL, Tattersall EA, Bohlman MC, Vincent D, Sonderegger J, Evans J, Osborne C, et al (2007) Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. *Funct Integr Genomics* 7: 111–134

Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol* 139: 5–17

Dasgupta K, Khadilkar AS, Sulpice R, Pant B, Scheible WR, Fisahn J, Stitt M, Ayre BG (2014) Expression of sucrose transporter cDNAs specifically in companion cells enhances phloem loading and long-distance transport of sucrose but leads to an inhibition of growth and the perception of a phosphate limitation. *Plant Physiol* 165: 715–731

Davies WJ, Mansfield TA, Hetherington AM (1990) Sensing of soil water status and the regulation of plant growth and development. *Plant Cell Environ* 13: 709–719

Deak KI, Malamy J (2005) Osmotic regulation of root system architecture. *Plant J* 43: 17–28

Deng X, Joly RJ, Hahn DT (1990) The influence of plant water deficit on photosynthesis and translocation of ^{14}C -labeled assimilates in cacao seedlings. *Physiol Plant* 78: 623–627

Devienne-Barret F, Richard-Molard C, Chelle M, Maury O, Ney B (2006) Ara-rhizotron: an effective culture system to study simultaneously root and shoot development of Arabidopsis. *Plant Soil* 280: 253–266

Farrar JF, Jones DL (2000) The control of carbon acquisition by roots. *New Phytol* 147: 43–53

Durand et al.

- Flexas J, Bota J, Galmés J, Medrano H, Ribas-Carbó M (2006a) Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photo-synthesis and respiration to water stress. *Physiol Plant* **127**: 343–352
- Flexas J, Ribas-Carbó M, Bota J, Galmés J, Henkle M, Martínez-Cañellas S, Medrano H (2006b) Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO₂ concentration. *New Phytol* **172**: 73–82
- Freixes S, Thibaud MC, Tardieu F, Muller B (2002) Root elongation and branching is related to local hexose concentration in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Environ* **25**: 1357–1366
- Gan S, Amasino RM (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* **270**: 1986–1988
- Gong X, Liu M, Zhang L, Ruan Y, Ding R, Ji Y, Zhang N, Zhang S, Farmer J, Wang C (2015) *Arabidopsis* AtSUC2 and AtSUC4, encoding sucrose transporters, are required for abiotic stress tolerance in an ABA-dependent pathway. *Physiol Plant* **153**: 119–136
- Gottwald JR, Krysan PJ, Young JC, Evert RF, Sussman MR (2000) Genetic evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 13979–13984
- Gould N, Thorpe MR, Pritchard J, Christeller JT, Williams LE, Roeb G, Schurr U, Minchin PE (2012) AtSUC2 has a role for sucrose retrieval along the phloem pathway: evidence from carbon-11 tracer studies. *Plant Sci* **188-189**: 97–101
- Hammer GL, Dong Z, Mclean G, Doherty A, Messina C, Schussler J, Zinselmeier C, Paszkiewicz S, Cooper M (2009) Can changes in canopy and/or root system architecture explain historical maize yield trends in the U.S. Corn Belt? *Crop Sci* **49**: 299–312
- Harb A, Krishnan A, Ambavaram MMR, Pereira A (2010) Molecular and physiological analysis of drought stress in *Arabidopsis* reveals early responses leading to acclimation in plant growth. *Plant Physiol* **154**: 1254–1271
- Hare PD, Cress WA, Van Staden J (1998) Dissecting the roles of osmolytes accumulation during stress. *Plant Cell Environ* **21**: 535–553
- Hölttä T, Mencuccini M, Nikinmaa E (2009) Linking phloem function to structure: analysis with a coupled xylem-phloem transport model. *J Theor Biol* **259**: 325–337
- Hummel I, Pantin F, Sulpice R, Piques M, Rolland G, Dauzat M, Christophe A, Pervent M, Boutellé M, Stitt M, et al (2010) *Arabidopsis* plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: an integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. *Plant Physiol* **154**: 357–372
- Ibraheem O, Dealtry G, Roux S, Bradley G (2011) The effect of drought and salinity on the expression levels of sucrose transporters in rice (*Oryza sativa* Nipponbare) cultivar plants. *Plant Omics Journal* **4**: 68–74
- Kawaguchi R, Williams AJ, Bray EA, Bailey-Serres J (2003) Water-deficit-induced translational control in *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Environ* **26**: 221–229
- Kay R, Chan AMY, Daly M, McPherson J (1987) Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* **236**: 1299–1302
- Kempers R, Ammerlaan A, Van Bel AJE (1998) Symplasmic constriction and ultrastructural features of the sieve element/companion cell complex in the transport phloem of apoplasmically and symplasmically phloem-loading species. *Plant Physiol* **116**: 271–278
- Kim JY, Mahé A, Brangeon J, Prioul JL (2000) A maize vacuolar invertase, IVR2, is induced by water stress: organ/tissue specificity and diurnal modulation of expression. *Plant Physiol* **124**: 71–84
- Krapp A, Hofmann B, Schäfer C, Stitt M (1993) Regulation of the expression of rbcS and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for the 'sink regulation' of photosynthesis? *Plant J* **3**: 817–828
- Kuchenbuch R, Jungk A (1982) A method for determining concentration profiles at the soil-root interface by thin slicing rhizospheric soil. *Plant Soil* **68**: 391–394
- Leggiewie G, Kolbe A, Lemoine R, Roessner U, Lytovchenko A, Zuther E, Kehr J, Frommer WB, Riesmeier JW, Willmitzer L, et al (2003) Over-expression of the sucrose transporter SoSUT1 in potato results in alterations in leaf carbon partitioning and in tuber metabolism but has little impact on tuber morphology. *Planta* **217**: 158–167
- Le Hir R, Spinner L, Klemens PAW, Chakraborti D, de Marco F, Vilaine F, Wolff N, Lemoine R, Porcheron B, Géry C, et al (2015) Disruption of the sugar transporters AtSWEET11 and AtSWEET12 affects vascular development and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Mol Plant* **8**: 1687–1690
- Lemoine R, Kühn C, Thiele N, Delrot S, Frommer WB (1996) Antisense inhibition of the sucrose transporter in potato: effects on amount and activity. *Plant Cell Environ* **19**: 1124–1131
- Lemoine R, La Camera S, Atanassova R, Dédaldéchamp F, Allario T, Pourtau N, Bonnemain JL, Laloi M, Coutos-Thévenot P, Maurousset L, et al (2013) Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Front Plant Sci* **4**: 272
- Li TH, Li SH, Wang J, Yu KS (2003) Effects of water stress at different deficit intensities on transport and distribution of ¹⁴C-assimilates in micropropagated apple plants. *Eur J Hortic Sci* **68**: 227–233
- Lim PO, Kim HJ, Nam HG (2007) Leaf senescence. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 115–136
- Ludewig F, Flügge UI (2013) Role of metabolite transporters in source-sink carbon allocation. *Front Plant Sci* **4**: 231
- Ludewig F, Sonnewald U (2000) High CO₂-mediated down-regulation of photosynthetic gene transcripts is caused by accelerated leaf senescence rather than sugar accumulation. *FEBS Lett* **479**: 19–24
- Luijten M, Heidstra R (2009) *Arabidopsis* root development. In T Beeckman, ed, *Annual Plant Reviews*, Vol 37. Wiley-Blackwell
- Mathieu L, Lobet G, Tocquin P, Périlleux C (2015) "Rhizoaponics": a novel hydroponic rhizotron for root system analyses on mature *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant Methods* **11**: 3
- McDowell NG (2011) Mechanisms linking drought, hydraulics, carbon metabolism, and vegetation mortality. *Plant Physiol* **155**: 1051–1059
- Medici A, Laloi M, Atanassova R (2014) Profiling of sugar transporter genes in grapevine coping with water deficit. *FEBS Lett* **588**: 3989–3997
- Metcalfe CJ, Mitchell-Olds T (2009) Life history in a model system: opening the black box with *Arabidopsis thaliana*. *Ecol Lett* **12**: 593–600
- Meyer S, Lauterbach C, Niedermeier M, Barth I, Sjölund RD, Sauer N (2004) Wounding enhances expression of AtSUC3, a sucrose transporter from *Arabidopsis* sieve elements and sink tissues. *Plant Physiol* **134**: 684–693
- Muller B, Pantin F, Génard M, Turc O, Freixes S, Piques M, Gibon Y (2011) Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. *J Exp Bot* **62**: 1715–1729
- Münch E (1930) *Die Stoffbewegungen in der Pflanze*. Fischer, Jena, Germany
- Nicolas ME, Lambers H, Simpson RJ, Dalling MJ (1985) Effect of drought on metabolism and partitioning of carbon in two wheat varieties differing in drought-tolerance. *Ann Bot (Lond)* **55**: 727–742
- Oparka KJ, Duckett CM, Prior DAM, Fisher DB (1994) Real-time imaging of phloem unloading in the root tip of *Arabidopsis*. *Plant J* **6**: 759–766
- Paez-García A, Motes C, Scheible WR, Chen R, Blancaflor E, Monteros M (2015) Root traits and phenotyping strategies for plant improvement. *Plants* **4**: 334–355
- Patrick JW (1997) Phloem unloading: sieve element unloading and post-sieve element transport. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 191–222
- Péret B, De Rybel B, Casimiro I, Benková E, Swarup R, Laplaze L, Beckman T, Bennett MJ (2009) *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci* **14**: 399–408
- Petricka JJ, Winter CM, Benfey PN (2012) Control of *Arabidopsis* root development. *Annu Rev Plant Biol* **63**: 563–590
- Plaut Z, Reinhold L (1965) The effect of water stress on [¹⁴C]sucrose transport in bean plants. *Aust J Biol Sci* **18**: 1143–1156
- Pourtau N, Jennings R, Felzer E, Pallas J, Wingler A (2006) Effect of sugar-induced senescence on gene expression and implications for the regulation of senescence in *Arabidopsis*. *Planta* **224**: 556–568
- Quick WP, Chaves MM, Wendler R, David M, Rodrigues ML, Passaharinho JA, Pereira JS, Adcock MD, Leegood RC, Stitt M (1992) The effect of water stress on photosynthetic carbon metabolism in four species grown under field conditions. *Plant Cell Environ* **15**: 25–35
- Quirino BF, Normanly J, Amasino RM (1999) Diverse range of gene activity during *Arabidopsis thaliana* leaf senescence includes pathogen-independent induction of defense-related genes. *Plant Mol Biol* **40**: 267–278
- Quirino BF, Reiter WD, Amasino RD (2001) One of two tandem *Arabidopsis* genes homologous to monosaccharide transporters is senescence-associated. *Plant Mol Biol* **46**: 447–457
- Ramírez V, Coego A, López A, Agorio A, Flors V, Vera P (2009) Drought tolerance in *Arabidopsis* is controlled by the OCP3 disease resistance regulator. *Plant J* **58**: 578–591

Sucrose Transport to Roots in Water Deficit Plants

- Ruehr NK, Offermann CA, Gessler A, Winkler JB, Ferrio JP, Buchmann N, Barnard RL (2009) Drought effects on allocation of recent carbon: from beech leaves to soil CO₂ efflux. *New Phytol* **184**: 950–961
- Satbhai SB, Ristova D, Busch W (2015) Underground tuning: quantitative regulation of root growth. *J Exp Bot* **66**: 1099–1112
- Schneider S, Hulpke S, Schulz A, Yaron I, Höll J, Imlau A, Schmitt B, Batz S, Wolf S, Hedrich R, et al (2012) Vacuoles release sucrose via tonoplast-localised SUC4-type transporters. *Plant Biol (Stuttg)* **14**: 325–336
- Schulz A, Beyhl D, Marten I, Wormit A, Neuhaus E, Poschet G, Büttner M, Schneider S, Sauer N, Hedrich R (2011) Proton-driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2. *Plant J* **68**: 129–136
- Seo PJ, Park JM, Kang SK, Kim SG, Park CM (2011) An Arabidopsis senescence-associated protein SAG29 regulates cell viability under high salinity. *Planta* **233**: 189–200
- Sevanto S (2014) Phloem transport and drought. *J Exp Bot* **65**: 1751–1759
- Sharma S, Verslues PE (2010) Mechanisms independent of abscisic acid (ABA) or proline feedback have a predominant role in transcriptional regulation of proline metabolism during low water potential and stress recovery. *Plant Cell Environ* **33**: 1838–1851
- Sharp RE, Poroyko V, Hejlek LG, Spollen WG, Springer GK, Bohnert HJ, Nguyen HT (2004) Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *J Exp Bot* **55**: 2343–2351
- Sheen J (1990) Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell* **2**: 1027–1038
- Sivitz AB, Reinders A, Johnson ME, Krentz AD, Grof CPL, Perroux JM, Ward JM (2007) Arabidopsis sucrose transporter AtSUC9: high-affinity transport activity, intragenic control of expression, and early flowering mutant phenotype. *Plant Physiol* **143**: 188–198
- Sivitz AB, Reinders A, Ward JM (2008) Arabidopsis sucrose transporter AtSUC1 is important for pollen germination and sucrose-induced anthocyanin accumulation. *Plant Physiol* **147**: 92–100
- Sperdoui I, Moustakas M (2012) Interaction of proline, sugars, and anthocyanins during photosynthetic acclimation of Arabidopsis thaliana to drought stress. *J Plant Physiol* **169**: 577–585
- Trivastava AC, Ganesan S, Ismail IO, Ayre BG (2008) Functional characterization of the Arabidopsis AtSUC2 sucrose/H⁺ symporter by tissue-specific complementation reveals an essential role in phloem loading but not in long-distance transport. *Plant Physiol* **148**: 200–211
- Stadler R, Sauer N (1996) The Arabidopsis thaliana AtSUC2 gene is specifically expressed in companion cells. *Bot Acta* **109**: 299–306
- Stadler R, Truernit E, Gahrz M, Sauer N (1999) The AtSUC1 sucrose carrier may represent the osmotic driving force for anther dehiscence and pollen tube growth in Arabidopsis. *Plant J* **19**: 269–278
- Stitt M, Zeeman SC (2012) Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. *Curr Opin Plant Biol* **15**: 282–292
- Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **29**: 417–426
- Takahashi N, Yamazaki Y, Kobayashi A, Higashitani A, Takahashi H (2003) Hydrotropism interacts with gravitropism by degrading amyloplasts in seedling roots of Arabidopsis and radish. *Plant Physiol* **132**: 805–810
- Tardieu F, Davies WJ (1993) Integration of hydraulic and chemical signalling in the control of stomatal conductance and water status of droughted plants. *Plant Cell Environ* **16**: 341–349
- Tian X, Doerner P (2013) Root resource foraging: does it matter? *Front Plant Sci* **4**: 303
- Truernit E, Sauer N (1995) The promoter of the Arabidopsis thaliana SUC2 sucrose-H⁺ symporter gene directs expression of beta-glucuronidase to the phloem: evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta* **196**: 564–570
- van der Weele CM, Spollen WG, Sharp RE, Baskin TI (2000) Growth of Arabidopsis thaliana seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *J Exp Bot* **51**: 1555–1562
- Van Oosten JJ, Besford RT (1994) Sugar feeding mimics effect of acclimation to high CO₂: rapid down regulation of RuBisCO small subunit transcripts but not of the large subunit transcripts. *J Plant Physiol* **143**: 306–312
- Vaughn MW, Harrington GN, Bush DR (2002) Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 10876–10880
- Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu JK (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J* **45**: 523–539
- Wardlaw IF (1969) The effect of water stress on translocation in relation to photosynthesis and growth. II. Effect during leaf development in *Lolium temulentum* L. *Aust J Biol Sci* **22**: 1–16
- Wenzel W, Wieshammer G, Fitz W, Puschenreiter M (2001) Novel rhizobox design to assess rhizosphere characteristics at high spatial resolution. *Plant Soil* **237**: 37–45
- Westgate ME, Boyer JS (1985) Osmotic adjustment and the inhibition of leaf, root, stem and silk growth at low water potentials in maize. *Planta* **164**: 540–549
- Wingler A, Roitsch T (2008) Metabolic regulation of leaf senescence: interactions of sugar signalling with biotic and abiotic stress responses. *Plant Biol (Stuttg) (Suppl 1)* **10**: 50–62
- Xiong L, Wang RG, Mao G, Koczan JM (2006) Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid. *Plant Physiol* **142**: 1065–1074
- Yamada K, Kanai M, Osakabe Y, Ohiraki H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2011) Monosaccharide absorption activity of Arabidopsis roots depends on expression profiles of transporter genes under high salinity conditions. *J Biol Chem* **286**: 43577–43586
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994) A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* **6**: 251–264
- Youssef RA, Chino M (1988) Development of a new rhizobox system to study the nutrient status in the rhizosphere. *Soil Sci Plant Nutr* **34**: 461–465
- Zhan A, Schneider H, Lynch JP (2015) Reduced lateral root branching density improves drought tolerance in maize. *Plant Physiol* **168**: 1603–1615

2 Bilan

Cette étude a permis de caractériser le développement d'*Arabidopsis thaliana* dans le système de culture en rhizobox au laboratoire pour pouvoir étudier spécifiquement les racines mais aussi, pour la première fois, d'appliquer une condition de carence hydrique en rhizobox.

Dans cette étude, l'impact de la carence hydrique a été mis en évidence au niveau du développement et de la physiologie des plantes, grâce à des différences sur l'allocation du carbone dans la plante. Premièrement, nous avons pu observer que même si la longueur totale des racines est affectée de manière négative par la contrainte hydrique, l'exploration du volume de sol par le système racinaire entier est peu affectée. Ensuite, nous avons mis en évidence que relativement plus de carbone est transporté des feuilles sources vers les racines des plantes cultivées en condition de contrainte hydrique. Ce résultat est soutenu par l'augmentation observée en sucres solubles et en amidon dans les feuilles et les racines des plantes cultivées en condition de carence hydrique, cohérente avec un transport plus important de saccharose dans les racines. Ces résultats montrent que les plantes peuvent s'acclimater à la contrainte hydrique en modulant leur architecture racinaire grâce à l'augmentation de l'export de carbone vers les racines.

Au niveau moléculaire, cette étude a permis de mettre en évidence les principaux transporteurs de saccharose exprimés dans les feuilles et dans les racines. AtSUC2 est le transporteur de saccharose dont le gène est le plus exprimé dans les feuilles. C'est aussi le deuxième gène codant un transporteur de saccharose le plus exprimé dans les racines. L'expression de ce gène dans les feuilles et les racines est plus importante dans les plantes cultivées en carence hydrique comparée aux plantes cultivées en condition hydrique témoin. AtSUC1 est le transporteur de saccharose dont le gène est le plus exprimé dans les racines et le deuxième plus exprimé dans les feuilles. L'expression de ce gène ne varie pas dans les feuilles lors de la contrainte hydrique, en revanche dans les racines, son expression est diminuée fortement en réponse à la contrainte hydrique. D'autre part, au niveau des gènes de transporteurs de type SWEET dans les feuilles, *AtSWEET11* est le plus exprimé en condition hydrique témoin. En condition de carence hydrique dans les feuilles, *AtSWEET11*, *12*, *13* et *15* sont induits et plus particulièrement *AtSWEET15* dont l'expression est augmentée plus de 10 fois comparé à celle mesurée dans les plantes cultivées en condition témoin. *AtSWEET15* est aussi connu sous le nom *AtSAG29* (Senescence-Associated Gene 29) comme marqueur de la senescence, l'expression de ce gène augmente lors de ce phénomène. L'étude de plante à 49 jours après semis montre que l'augmentation de l'expression du gène *AtSWEET15/SAG29* en cas de contrainte hydrique est plus corrélée à la contrainte hydrique qu'à la senescence. Dans les racines, pour les gènes codant des transporteurs de saccharose de type SWEET, *AtSWEET12* et *13* sont les plus exprimés. Comme dans les feuilles, l'expression des gènes codant les transporteurs de saccharose de type SWEET augmente en

cas de contrainte hydrique. Cette expression augmente particulièrement pour *AtSWEET11* et *13*. Néanmoins, ces gènes sont beaucoup moins exprimés dans ce compartiment que dans les feuilles en condition hydrique témoin, alors qu'en condition de carence hydrique, l'expression d'*AtSWEET13* dans les racines est aussi importante que dans les feuilles.

La présence de ces transporteurs de saccharose dans les racines et leur expression différentielle en fonction de la contrainte hydrique nous a mené à nous interroger sur le rôle des transporteurs de saccharose dans les racines. C'est pourquoi il nous a semblé intéressant de réaliser des investigations plus poussées sur *AtSUC1* et *2*, les deux transporteurs de saccharose les plus exprimés dans la racine.

Chapitre IV : AtSUC1

Au laboratoire nous avons mis en évidence qu'*AtSUC1* est le gène codant le transporteur de saccharose le plus exprimé dans les racines mais aussi le deuxième plus exprimé dans les feuilles après *AtSUC2* (Durand *et al.*, 2016 ; Durand *et al.*, 2018). De plus, nos résultats ont mis en évidence que l'expression du gène *AtSUC1* diminue en condition de carence hydrique dans les racines (Durand *et al.*, 2016), ce qui est confirmé par d'autres (Xu *et al.*, 2018). Des travaux antérieurs ont montré que l'expression du gène était localisée dans les organes floraux (Stadler *et al.*, 1999), dans les trichomes et dans les racines de jeunes plantules cultivées *in vitro* (Sivitz *et al.*, 2007). Le rôle de la protéine AtSUC1 est connu dans les organes floraux où elle joue un rôle dans la croissance du tube pollinique et la maturation des anthères (Stadler *et al.*, 1999) mais son rôle est inconnu dans les autres organes. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'étude du rôle d'AtSUC1 dans les racines de plantes âgées de 30 jours et cultivées en terre (rhizobox). Deux approches ont été utilisées pour élucider ce rôle racinaire : l'étude du mutant KO *suc1* en condition témoin et en condition de déficit hydrique et l'étude de la localisation de l'expression du gène *AtSUC1* et de la protéine AtSUC1.

1 Résultats

1.1 Etude du mutant KO *suc1*

1.1.1 Description de l'expérimentation

Afin de déterminer le rôle d'AtSUC1 dans les racines, une expérimentation sur un mutant KO *suc1* (mutant d'insertion dans le dernier intron, Sivitz *et al.*, 2008, GK-139B11#05) en comparaison avec le témoin sauvage Col-0 a été réalisée. En effet, une expression importante d'*AtSUC1* a été mise en évidence dans les racines d'*Arabidopsis thaliana* alors que sa répression a été observée lors de l'application d'une carence hydrique (Durand *et al.*, 2016 ; Durand *et al.*, 2018). Aussi, cette expérimentation a été réalisée afin de se placer dans les mêmes conditions de culture des plantes et la même carence hydrique que celle réalisée dans les expériences de Durand *et al.* (2016) a été appliquée. Cette étude a donc été réalisée sur des plantes de 30 jours (après semis) pour se placer à un stade de développement avancé des plantes afin de suivre le développement racinaire. Les plantes sont cultivées en rhizobox, ce qui permet la récolte d'un système racinaire propre pour les analyses phénotypiques (dont l'architecture racinaire), biochimiques et d'expression des gènes.

Des différences d'expression des gènes codant des transporteurs de saccharose ayant été observées en condition de carence hydrique (Durand *et al.*, 2016), les plantes des deux génotypes (Col-0 et *suc1*) ont été cultivées dans deux conditions hydriques différentes : en condition hydrique témoin (Tm) dans laquelle la terre est à 100 % de la capacité au champ et en condition de carence hydrique (St) dans laquelle la terre est à 50 % de la capacité au champ. Cependant, une différence par rapport aux conditions de culture des plantes des expérimentations relatées dans l'article de Durand *et al.*



Figure 24. Phénotype des rosettes des plantes de génotype Col-0 et *suc1* cultivées 30 jours en rhizobox en condition Tm et St.

(2016) est à noter : le changement de nature du terreau utilisé. En effet, le terreau utilisé pour les expérimentations de Durand *et al.* (2016) (« LP502 », Peltracom) a présenté des contaminations de champignons (surtout lors de culture en pots) malgré son autoclavage. Il a donc été décidé au niveau du laboratoire d'utiliser un terreau différent (« 276-BP 4 Argile », Klasmann) pour ne plus avoir ces champignons autour des plantes, bien que le phénomène soit faible en rhizobox. Les résultats obtenus lors de l'étude de Durand *et al.* (2016) seront par la suite utilisés comme référence et comparés à ceux obtenus dans cette thèse, puisque les deux études présentent des conditions d'expérimentation proches.

Au cours de cette thèse, l'expérimentation a été réalisée 4 fois de manière indépendante (4 réplicats biologiques différents), mais par manque de matériel végétal, certains paramètres n'ont pas pu être mesurés pour certains réplicats. Les données présentées sont donc les moyennes des plantes provenant de l'étude de 3 à 4 réplicats biologiques suivant le paramètre observé. Chaque réplicat biologique est composé de plusieurs plantes par condition, afin d'obtenir une moyenne des résultats. De plus, la faible quantité de matériel disponible à la récolte due à la taille des plantes (notamment les racines en condition St) nous a obligé à rassembler des plantes cultivées dans les mêmes conditions (« pooler ») afin d'avoir des masses de plantes suffisamment importantes pour obtenir une pesée fiable. Par exemple, pour l'obtention des masses sèches, 3 à 11 plantes ont été rassemblées et pesées afin d'avoir des masses suffisantes, en accord avec la précision des balances disponibles au laboratoire. Le fait de rassembler ainsi les plantes entraîne un moins grand nombre de valeurs par paramètre et donc une plus faible significativité lors des tests statistiques. Toutefois, les données sont robustes puisque ces valeurs sont finalement la moyenne obtenue à partir de mesures réalisées sur de nombreuses plantes. C'est pourquoi les différences non significatives statistiquement seront quand même décrites et discutées en termes de tendances. Un test de kruskal-walis a été réalisé sur les différents paramètres. En effet, l'utilisation d'un test non paramétrique était nécessaire dans notre cas puisque nous disposions d'un faible nombre d'échantillons.

1.1.2 Etat hydrique des plantes

L'observation du phénotype des rosettes des plantes Col-0 et *suc1* cultivées 30 jours en rhizobox en condition hydrique Tm et St (**Figure 24**), révèle une différence au niveau de la taille des rosettes. Les plantes Col-0 et les plantes *suc1* ont des rosettes plus petites en condition St qu'en condition Tm. Afin d'estimer l'intensité de la carence hydrique et donc l'état hydrique des plantes, deux approches ont été utilisées : une approche physiologique et une approche moléculaire. En effet, la mesure de la teneur en eau des plantes (WC) et l'analyse de l'expression de gènes marqueurs du statut hydrique des plantes ont été réalisées. La teneur relative en eau (RWC) est généralement

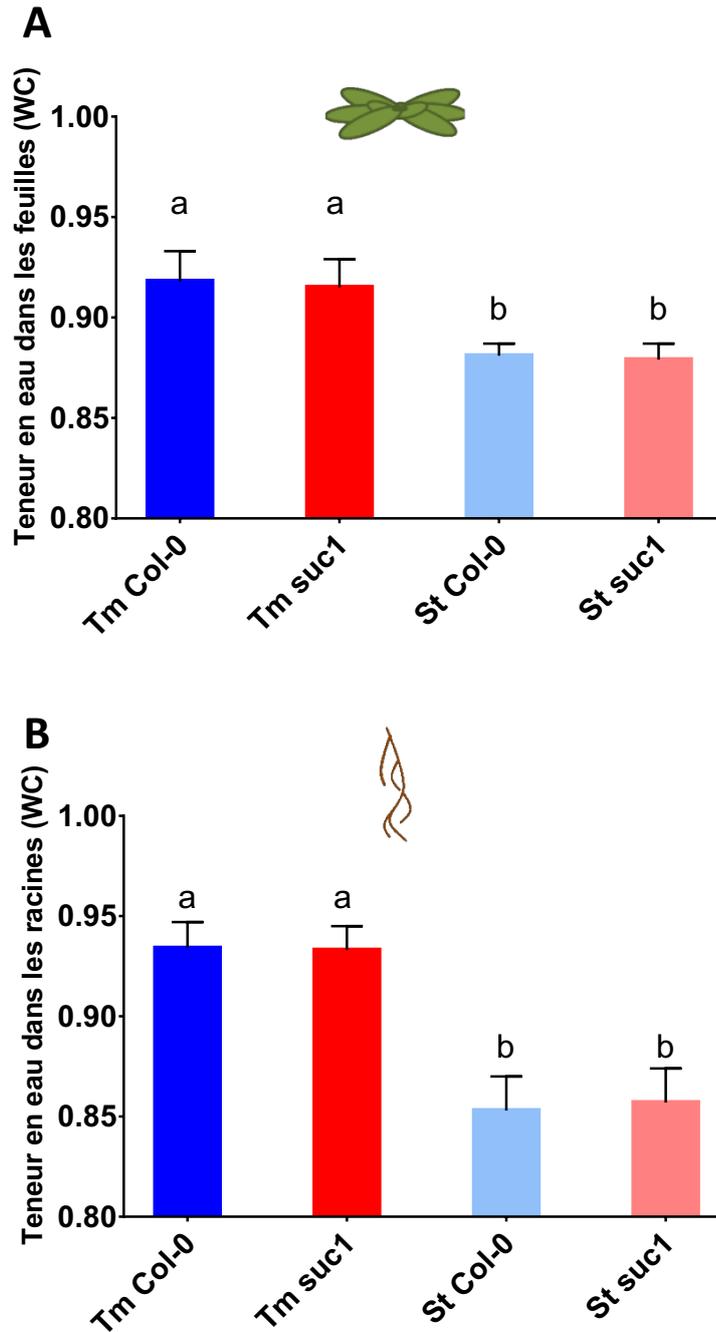


Figure 25. Teneur en eau (WC : Water Content) mesurée dans les feuilles et les racines de plantes de génotypes Col-0 et *suc1* cultivées en conditions Tm et St.

A. Teneur en eau dans les feuilles. **B.** Teneur en eau dans les racines.

Les valeurs correspondent à la moyenne (+/- erreur standard) de pools de plantes de 4 replicats (n=4) biologiques indépendants (3 à 27 plantes par replicat). Les lettres différentes sur les barres indiquent les différences significatives ($P < 0,05$) déterminées par un test de Kruskal-Wallis.

analysée lors d'études sur le stress hydrique. Pour calculer la RWC, l'obtention des masses turgides des organes est nécessaire, or, des expérimentations précédentes ont montré que l'obtention des masses turgides dans les racines était très peu précise. C'est pourquoi la teneur en eau (WC) est étudiée ici et non la teneur relative en eau (RWC).

Le WC a été calculé sur les plantes au moment de la récolte en mesurant les masses fraîches (MF) et sèches (MS) et d'après la formule : $WC = \frac{MF-MS}{MS}$. Les résultats (**Figure 25**) indiquent que dans les feuilles (**Figure 25, A**), les valeurs de WC sont inférieures dans les plantes cultivées en condition St comparées aux plantes Tm avec une différence d'environ 3,6 %. Les valeurs de WC ne diffèrent pas entre les plantes des deux génotypes (Col-0 et *suc1*), que ce soit pour les plantes cultivées en condition Tm (0,918 pour Col-0 et 0,915 pour *suc1*) ou St (0,881 pour Col-0 et 0,879 pour *suc1*). Dans les racines (**Figure 25, B**), les valeurs de WC sont inférieures chez les plantes cultivées en condition St comparées aux plantes Tm avec une différence d'environ 7,9 %. Les résultats indiquent que dans un organe donné, les valeurs de WC ne diffèrent pas entre les plantes des deux génotypes, que ce soit pour les plantes Tm ou St. En revanche, en conditions Tm, les WC sont légèrement supérieures dans les racines (0,934) comparées aux feuilles (0,916) quel que soit le génotype considéré. Ces teneurs sont inférieures dans les racines (0,855) comparées aux feuilles (0,880) pour les plantes des deux génotypes en condition St. La différence de WC entre les plantes Tm et St est plus marquée dans les racines que dans les feuilles.

Dans l'étude de Durand *et al.* (2016) les valeurs de WC des plantes Col-0 ont aussi été calculées dans les deux conditions hydriques (Tm et St). En condition Tm, les valeurs de WC sont comparables dans les feuilles des plantes présentées dans les deux études (0,915 et 0,916). Dans les racines sont retrouvées des WC plus élevées dans cette étude que dans celle de Durand *et al.* (2016) (respectivement, 0,934 et 0,921). En condition St, les WC retrouvées dans les plantes sont inférieures dans l'étude présentée dans ce chapitre comparée à l'étude menée par Durand *et al.* (2016) que ce soit dans les feuilles (respectivement, 0,880 et 0,898) ou dans les racines (respectivement, 0,855 et 0,861). La carence semble donc légèrement plus importante dans les conditions de l'étude présentée dans ce chapitre que dans l'étude présentée dans l'article de Durand *et al.* (2016).

L'état hydrique des plantes a aussi été évalué au niveau moléculaire, en analysant dans les feuilles l'expression d'*AtRD29a* (Responsive to Desiccation 29a) et dans les racines l'expression d'*AtTIP1.2* (Tonoplast Intrinsic Protein 1.2) (**Figure 26**). Il est connu que la carence hydrique induit l'expression du gène *AtRD29a* dans les feuilles (Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki, 1994). Une expression plus importante de ce gène est observée (**Figure 26, A**) dans les plantes cultivées en condition St comparées aux plantes cultivées en condition Tm, pour les deux génotypes. Cette différence est d'environ 40 % pour les plantes des deux génotypes. La différence d'expression du gène

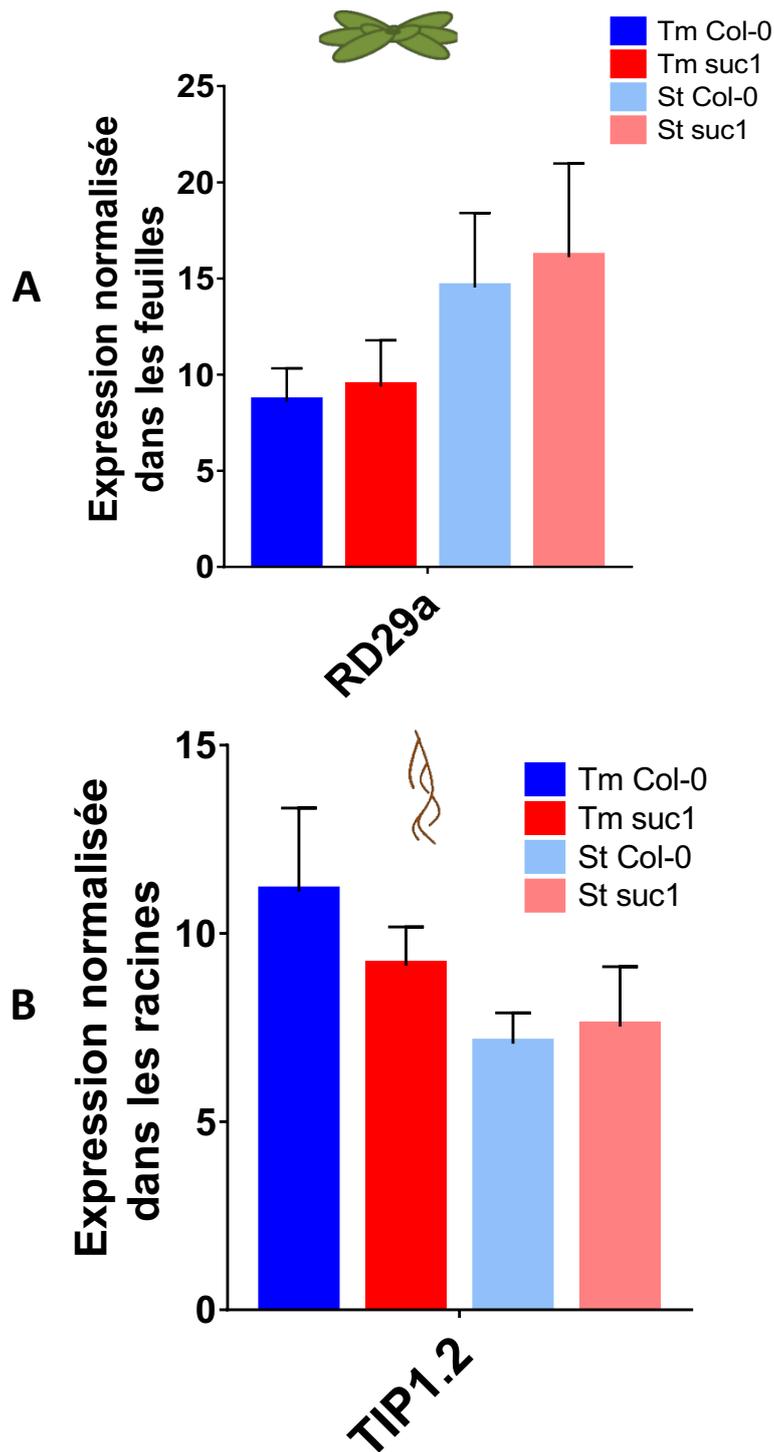


Figure 26. Expression de gènes marqueurs de stress hydrique dans les feuilles et les racines dans les plantes de génotypes Col-0 et *suc1* cultivées en conditions Tm et St.

A. Expression du gène *AtRD29a* dans les feuilles. **B.** Expression du gène *AtTIP1.2* dans les racines. Les données sont normalisées (pas d'unité) par la moyenne de 3 gènes de référence *At5g12240*, *At4g26410* et *At3g18780* (Czechowski *et al.*, 2005). Les valeurs correspondent à la moyenne (\pm erreur standard) de pools de plantes de 3 réplicats ($n=3$) biologiques indépendants (3 à 12 plantes par pool, 1 pool par réplicat). L'absence de lettres sur les barres indique une absence de significativité ($P < 0,05$) déterminées par un test de Kruskal-Wallis.

AtRD29a observée entre les plantes cultivées en condition Tm et St dans l'étude de Durand *et al.* (2016) et dans l'étude présentée ici est similaire. De plus, l'expression du gène est légèrement plus importante pour les plantes de génotype *suc1* comparée aux plantes de génotype Col-0 (environ 10 %), bien que les erreurs standard importantes rendent ces différences négligeables.

En cas de fort stress hydrique, il a été montré que l'expression d'*AtTIP1.2* est régulée négativement dans les racines (Alexandersson *et al.*, 2005). Une plus faible expression est observée (**Figure 26, B**) pour les plantes des deux génotypes cultivés en carence hydrique comparées au témoin. De plus, l'expression de ce gène est plus faible dans les plantes de génotype *suc1* comparées à celle de Col-0 en condition Tm. En revanche, l'expression du gène est légèrement plus importante chez les plantes de génotype *suc1* comparée à celle de Col-0 en condition St. La différence d'expression entre les plantes cultivées en condition Tm et en condition St est donc plus importante pour les plantes Col-0 (36 %) que pour les plantes de génotype *suc1* (17 %), bien que ces différences soient à nuancer étant donné l'erreur standard importante. La différence de WC entre les plantes Col-0 cultivées en condition Tm et en condition St est comparable à celle retrouvée pour les plantes présentées dans l'article de Durand *et al.* (2016) (33%).

Les teneurs en eau dans les feuilles et les racines (**Figure 25**) ainsi que l'expression du gène marqueur de la carence hydrique dans les feuilles *AtRD29a* (**Figure 26, A**) montrent que la carence hydrique est bien perçue par les plantes en condition St, dans les feuilles et dans les racines. De plus, ces résultats révèlent des conditions hydriques similaires pour les plantes Col-0 et *suc1* pour chacune des deux conditions hydriques. Les plantes perçoivent donc bien deux conditions hydriques différentes, une condition témoin et une condition en déficit hydrique par rapport à la condition témoin. Les deux génotypes perçoivent la carence hydrique de manière comparable. En revanche, l'analyse du gène marqueur de la carence hydrique dans les racines *AtTIP1.2* (**Figure 26, B**) montre une plus faible expression du gène dans les plantes *suc1* que dans les plantes Col-0 qui suggère une condition de « carence hydrique » pour les racines des plantes *suc1* déjà en condition témoin. Ce résultat, en contradiction avec les résultats de teneurs en eau dans les racines (**Figure 25, B**), sera discuté par la suite (**partie 2.1 de ce chapitre**).

1.1.3 Suivi phénotypique des plantes

L'étude phénotypique des plantes a été réalisée sur cette étude afin de comparer la croissance des plantes de génotype Col-0 et *suc1* en condition hydrique témoin et de carence. Pour ce suivi, la capacité germinative des graines en condition hydrique non carencée a été évaluée *in vitro*, à 3 et 8 jours après le semis. Les masses sèches des feuilles et des racines, les surfaces projetées des feuilles, le nombre de feuilles et la longueur de la racine principale ont été mesurées sur des plantes cultivées

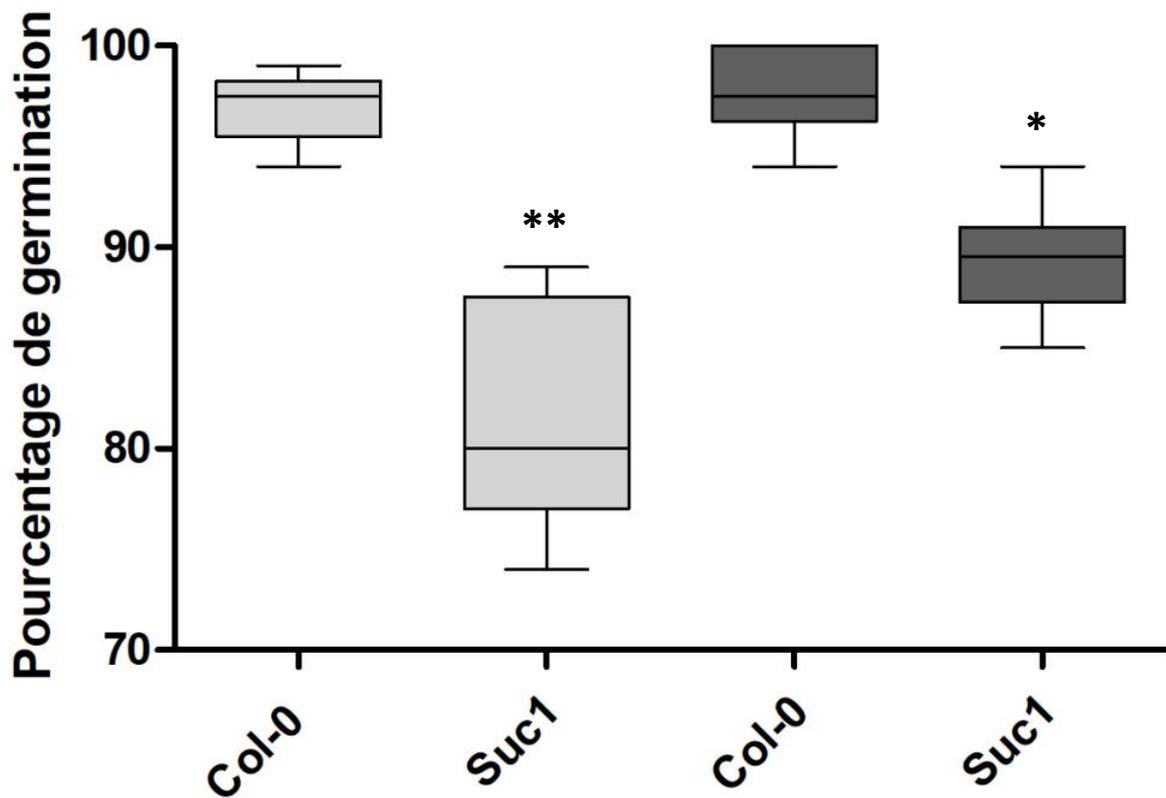


Figure 27. Diagramme en boîte du pourcentage de germination des graines sauvages (Col-0) et mutantes (*suc1*) à 3 jours après semis (boîtes gris clair) et 8 jours après semis (boîtes gris foncé) cultivées sur milieu gélosé.

Les graines ont été semées sur milieu gélosé et réparties dans 6 boîtes de Pétri (100 graines/boîte), n=6. Les astérisques représentent des différences significatives entre les génotypes déterminées par un test de Wilcoxon (*, $P < 0.05$ et **, $P < 0.005$).

30 jours après le semis (JAS) en rhizobox. De plus, le rapport entre la masse sèche des racines et la masse sèche des feuilles (ratio R/S) et le rapport entre la masse sèche foliaire et la surface projetée des feuilles ont été calculés.

Le test de germination permet d'estimer s'il existe des différences dans le développement précoce des graines de génotype Col-0 et *suc1*. En effet, les résultats de Sivitz *et al.* (2008) ont montré que les mutants *suc1* avaient un faible taux de germination. A 3 JAS, le taux de germination des graines sauvages est de 97 % et augmente peu à 8 JAS (97,7 %). Les graines mutées présentent un taux de germination de seulement 81,3 % à 3 JAS et qui atteint 89,3 % à 8 JAS. Les graines sauvages présentent un pourcentage de germination statistiquement supérieur aux graines mutées, plus marqué à 3 JAS qu'à 8 JAS (**Figure 27**), ce qui indique un taux plus faible de germination des graines *suc1* par rapport aux graines Col-0 et un retard de développement des graines *suc1* par rapport aux graines Col-0. De plus, à 3 JAS les graines *suc1* présentent de forts écarts de germination entre elles comparées aux graines Col-0 indiquant que la germination est hétérogène pour les graines *suc1*. Néanmoins, ces différences de germinations n'influencent pas ou peu nos résultats sur des plantes de 30 jours puisque lors de la culture en rhizobox, seules les premières graines germées sont conservées pour chaque emplacement de plantes. Ceci atténue par conséquent un potentiel retard de développement des plantes dû au retard de germination des graines *suc1*.

Les masses sèches des plantes récoltées à 30 JAS sont présentées en **figure 28** et non les masses fraîches afin de s'affranchir des différences d'état hydrique des plantes, et de comparer uniquement la masse de tissus sans prendre en compte les différences de teneur en eau. L'observation des valeurs de masse sèche des feuilles (**Figure 28, A**) indique qu'elles sont très inférieures en cas de carence hydrique comparées à celles en condition témoin, avec une différence de 85 % environ. De plus, pour une même condition hydrique, les plantes des deux génotypes, Col-0 et *suc1*, présentent des valeurs de masse sèche similaires (environ 0,018 g de matière sèche par rosette pour les deux génotypes en condition Tm, par exemple). Pour les racines, les valeurs de masse sèche (**Figure 28, B**) sont aussi très inférieures dans les plantes cultivées en condition St comparées aux plantes cultivées en condition Tm. En condition Tm, les valeurs de masse sèche sont équivalentes entre les plantes des deux génotypes (3,05 mg de matière sèche par système racinaire pour Col-0 et 2,95 mg de matière sèche par système racinaire pour *suc1*). En condition St, aux vues des erreurs standard, les valeurs de masse sèche sont proches pour les plantes de génotype *suc1* (0,79 mg de matière sèche par système racinaire) comparées à celles des plantes Col-0 (1,24 mg de matière sèche par système racinaire), les différences des valeurs de masse sèche racinaire entre les conditions Tm et St étant, pour les plantes de génotype *suc1*, de 73 % et pour les plantes Col-0, de 60 %. Les valeurs de masse sèche sont plus importantes pour les feuilles que pour les racines. De plus, la différence des valeurs de masse sèche entre conditions St et Tm est plus importante dans les feuilles (85 %) que dans les racines (60 à 73 %).

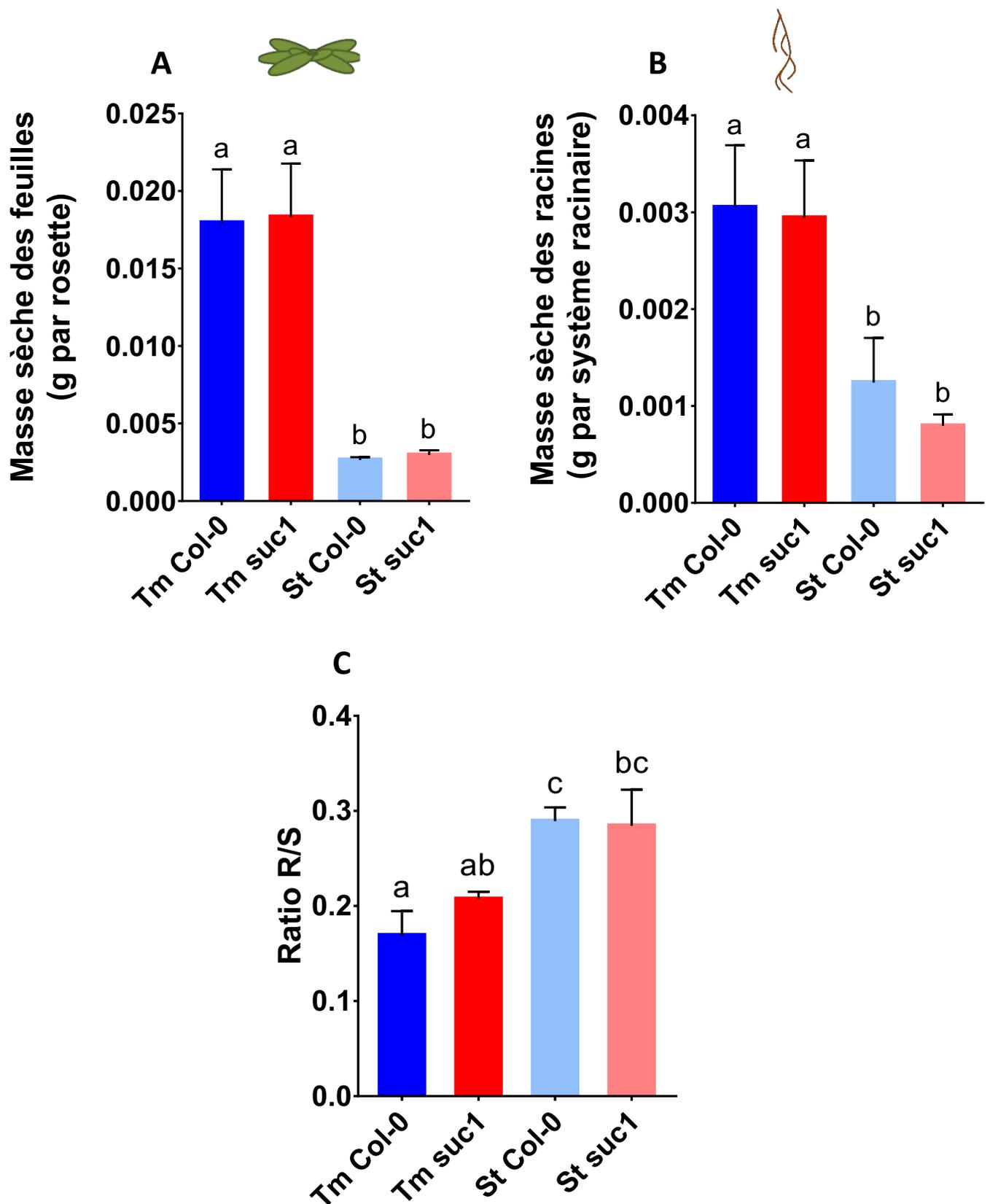


Figure 28. Masses sèches mesurées sur les feuilles et des racines de plantes de génotypes Col-0 et *suc1* cultivées en conditions St et Tm et ratio R/S correspondant.

A. Masse sèche des feuilles (g par rosette). **B.** Masse sèche des racines (g par système racinaire). **C.** Rapport entre les masses sèches des racines et des feuilles (Sans unité) ou Root/Shoot ratio (R/S).

Les valeurs correspondent à la moyenne (+/- erreur standard) de pools de plantes de 4 réplicats (n=4) biologiques indépendants (3 à 11 plantes par réplicat). Les lettres différentes sur les barres indiquent les différences significatives ($P < 0,05$) déterminées par un test de Kruskal-Wallis.

Le ratio R/S permet de comparer la proportion de la masse du système racinaire par rapport à la masse des rosettes et permet de préciser la part des racines dans la masse totale de la plante. Les résultats de ratio R/S présentés dans la **figure 28, C** indiquent que le ratio R/S est plus important pour les plantes cultivées en condition St qu'en Tm et ce, pour les deux géotypes étudiés. En condition Tm, un ratio légèrement plus important est observé pour les plantes de géotype *suc1* (0,21) comparé aux plantes Col-0 (0,17), mais ces différences sont négligeables. De même, pour les plantes cultivées en condition St, le ratio est équivalent entre les plantes des deux géotypes (0,28). Ces résultats indiquent que la proportion de la masse du système racinaire par rapport à la masse totale de la plante est supérieure dans les plantes cultivées en condition St comparées à celles cultivées en condition Tm. Cette différence est principalement due à la diminution de la masse des feuilles en condition St qui est plus importante que la diminution de la masse des racines en condition St. D'autre part, le ratio R/S est similaire pour les plantes Col-0 cultivées en condition Tm pour cette étude et pour l'étude présentée dans l'article de Durand *et al.* (2016) (respectivement 0,21 et 0,2). Toutefois, pour les plantes Col-0 cultivées en condition St, le ratio R/S est inférieur dans cette étude comparée à l'étude de Durand *et al.* (2016) (respectivement, 0,28 et 0,35). Dans les deux études, ce sont les masses foliaires qui sont plus impactées par la carence hydrique que les masses racinaires. De plus, dans l'étude présentée dans ce chapitre, la carence hydrique impacte plus les masses foliaires et moins les masses racinaires par rapport à la masse totale des plantes que dans l'étude présentée dans Durand *et al.* (2016).

Les valeurs de surface foliaire projetée (**Figure 29, A**) montrent que les plantes ont des surfaces foliaires plus faibles en condition St comparée à la condition Tm (**Figure 24**). En condition Tm, les plantes de géotype *suc1* ont des surfaces foliaires plus faibles ($6,5 \text{ cm}^2$) que les plantes de géotype Col-0 ($7,7 \text{ cm}^2$). En revanche, en condition St, les surfaces foliaires des plantes des deux géotypes sont très proches ($1,15 \text{ cm}^2$ pour *suc1* et $1,3 \text{ cm}^2$ pour Col-0). Toutefois, les différences de surface foliaire entre les plantes des conditions St et Tm sont comparables entre les plantes de géotype Col-0 (84 %) et les plantes *suc1* (80 %). Dans l'étude présentée dans l'article de Durand *et al.* (2016), les surfaces foliaires sont supérieures comparées aux plantes présentées dans cette étude, pour les plantes Col-0 cultivées en condition Tm (respectivement, $12,8 \text{ cm}^2$ et $7,7 \text{ cm}^2$) et St ($3,3 \text{ cm}^2$ et $1,15 \text{ cm}^2$). En revanche, la diminution de la surface foliaire des plantes cultivées en condition St comparée aux plantes cultivées en condition Tm est similaire entre les deux études (environ 80 %). Ceci signifie que la carence hydrique impacte la surface foliaire projetée de façon similaire dans les deux études.

Pour le nombre de feuilles par rosette (**Figure 29, B**), les plantes cultivées en condition Tm ont plus de feuilles que les plantes cultivées en condition St. En condition Tm, les plantes de géotype *suc1* ont un nombre de feuilles légèrement plus faible (12,9 feuilles) que les plantes de géotype Col-0 (14 feuilles). En condition St, la différence du nombre de feuilles est plus faible que celui mesuré en

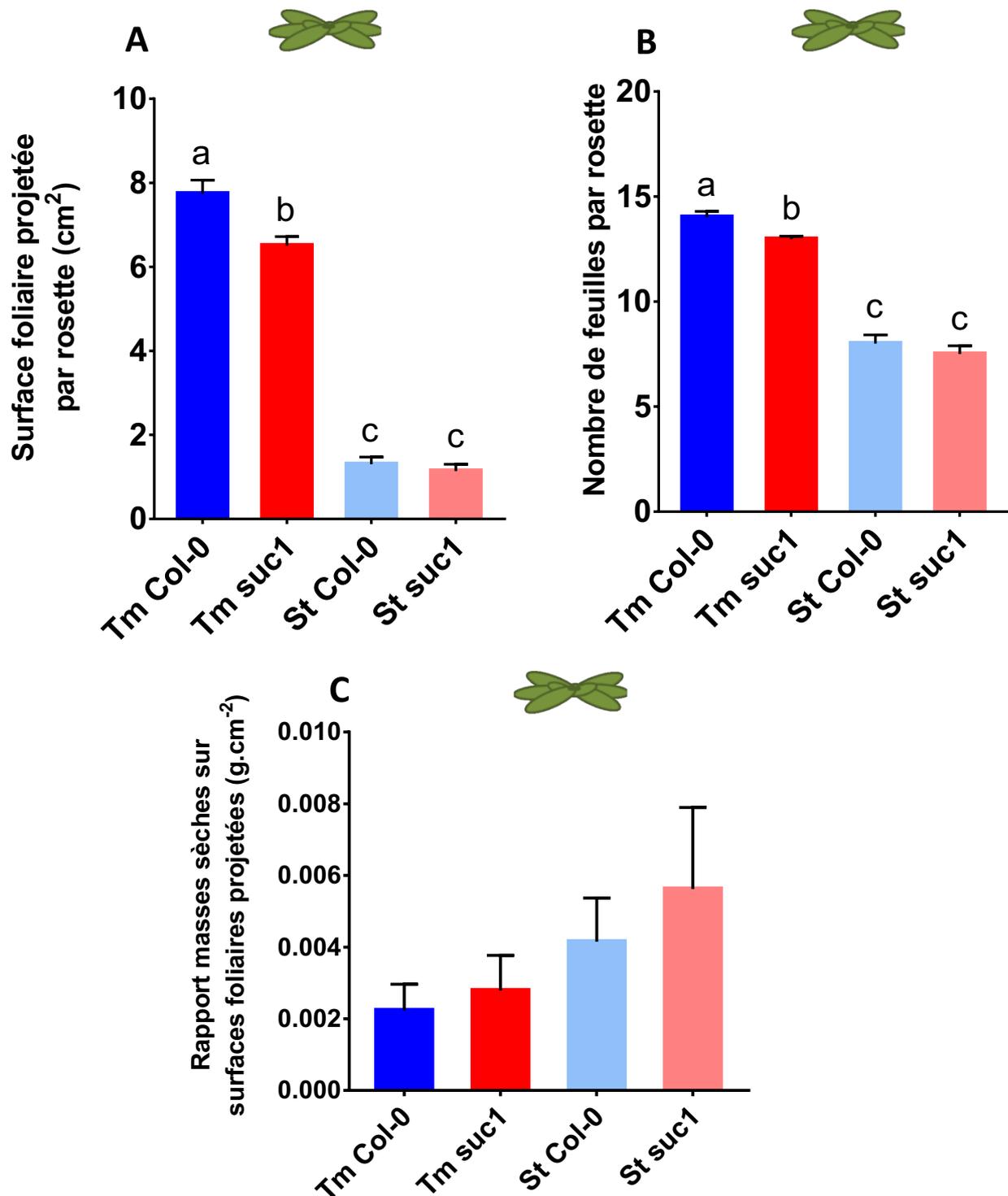


Figure 29. Surfaces foliaires projetées et nombre de feuilles par rosette de plantes de génotypes Col-0 et *suc1* cultivées en condition St et Tm et rapport entre la masse sèche foliaire et la surface foliaire projetée.

A. Surface foliaire projetée (cm²). **B.** Nombre de feuilles par rosette. **C.** Rapport entre les masses sèches des feuilles et la surface foliaire projetée (g.cm⁻²).

Les valeurs correspondent à la moyenne (+/- erreur standard) de plantes de 4 replicats (n=4) biologiques indépendants (7 à 10 plantes par replicat) pour A et B. Pour C les données utilisées sont celles présentées en Figure 3, A et Figure 4, A. Les lettres différentes sur les barres indiquent les différences significatives (P < 0,05) déterminées par un test de Kruskal-Wallis, l'absence de lettre indique une absence de significativité.

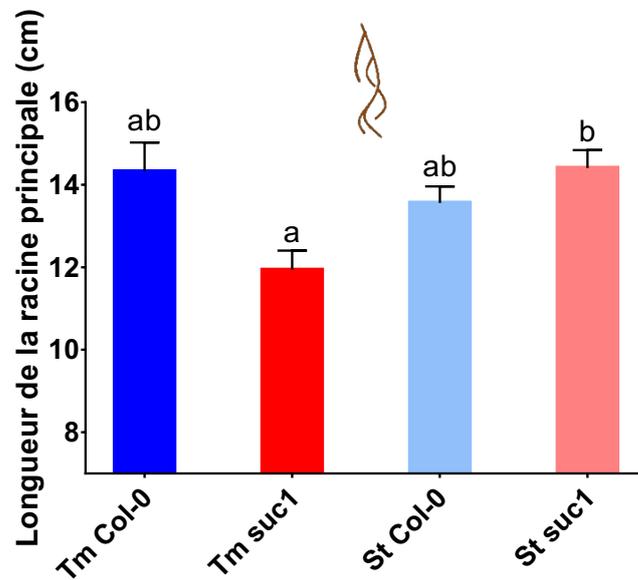


Figure 30. Mesure de la longueur des racines principales (cm) du système racinaire de plantes de génotypes Col-0 et *suc1* cultivées en conditions St et Tm.

Les valeurs correspondent à la moyenne (+/- erreur standard) de plantes de 4 replicats (n=4) biologiques indépendants (4 à 18 plantes par replicat). Les lettres différentes sur les barres indiquent les différences significatives ($P < 0,05$) déterminées par un test de Kruskal-Wallis.

condition Tm, avec en moyenne 7,5 feuilles par rosette *suc1* et 8 feuilles de rosettes Col-0. La différence de nombre de feuilles par rosette entre les plantes cultivées en conditions St et Tm est de 42 % environ pour les plantes des deux génotypes. Dans l'étude présentée dans l'article de Durand *et al.* (2016) les nombres de feuilles par rosette sont légèrement supérieurs comparés aux plantes présentées dans cette étude, pour les plantes Col-0 cultivées en condition Tm (16,6 feuilles pour Durand *et al.*, 2016 et 14 feuilles pour cette étude) et St (11,7 feuilles pour Durand *et al.*, 2016 et 8 feuilles pour cette étude). Néanmoins, la diminution du nombre de feuilles par rosette des plantes cultivées en condition St comparée aux plantes cultivées en condition Tm est similaire entre les deux études (environ 32 %), signifiant que la carence hydrique affecte le nombre de feuilles par rosette de façon comparable dans les deux études.

Le rapport entre les masses sèches des feuilles et la surface foliaire projetée (**Figure 29, C**) donne une indication sur la masse des feuilles par cm² de feuille, ce qui reflète l'épaisseur ou la densité des tissus foliaires ou des parois cellulaires. Le rapport est supérieur pour les plantes cultivées en condition St par rapport à la condition Tm. De plus, ce rapport est proche entre les génotypes pour chaque condition hydrique : en condition Tm, le rapport est de 2,2 mg.cm⁻² pour les plantes Col-0 et de 2,8 mg.cm⁻² pour les plantes *suc1* et en condition St, le rapport est de 4,2 g.cm⁻² pour les plantes Col-0 et de 5,6 g.cm⁻² pour les plantes *suc1*. Ces résultats indiquent donc que pour un cm², les feuilles de plantes cultivées en condition St sont plus denses ou épaisses que les feuilles des plantes cultivées en condition Tm. La réalisation de coupes de feuilles de plantes Col-0 et *suc1* serait nécessaire pour vérifier si l'épaisseur des feuilles diffère entre les deux génotypes.

Enfin, au niveau de la longueur de la racine principale (**Figure 30**), la réponse à la contrainte hydrique est différente en fonction du génotype des plantes. En effet, pour les plantes de génotype Col-0, la longueur de la racine principale est inférieure pour les plantes cultivées en condition St (13,5 cm) comparées aux plantes cultivées en condition Tm (14,3 cm). Ces résultats rejoignent ceux observés dans l'étude menée par Durand *et al.* (2016). Au contraire, pour les plantes de génotype *suc1*, la longueur de la racine principale est supérieure pour les plantes cultivées en condition St (14,4 cm) comparées à celle des plantes cultivées en condition Tm (11,9 cm). En condition Tm, les plantes de génotype Col-0 ont une longueur de racine principale supérieure (14,3 cm) à celle des plantes de génotype *suc1* (11,9 cm). Inversement, en condition St, les plantes de génotype Col-0 ont une longueur de racine principale inférieure (13,6 cm) à celle des plantes de génotype *suc1* (14,4 cm). La carence hydrique a donc un effet négatif sur la longueur de la racine principale pour les plantes de génotype Col-0, alors qu'elle a un effet positif pour les plantes de génotypes *suc1*. De plus, la mutation d'*AtSUC1* dans la plante a un effet négatif sur la longueur de la racine principale en condition Tm et pas en condition St.

Feuilles

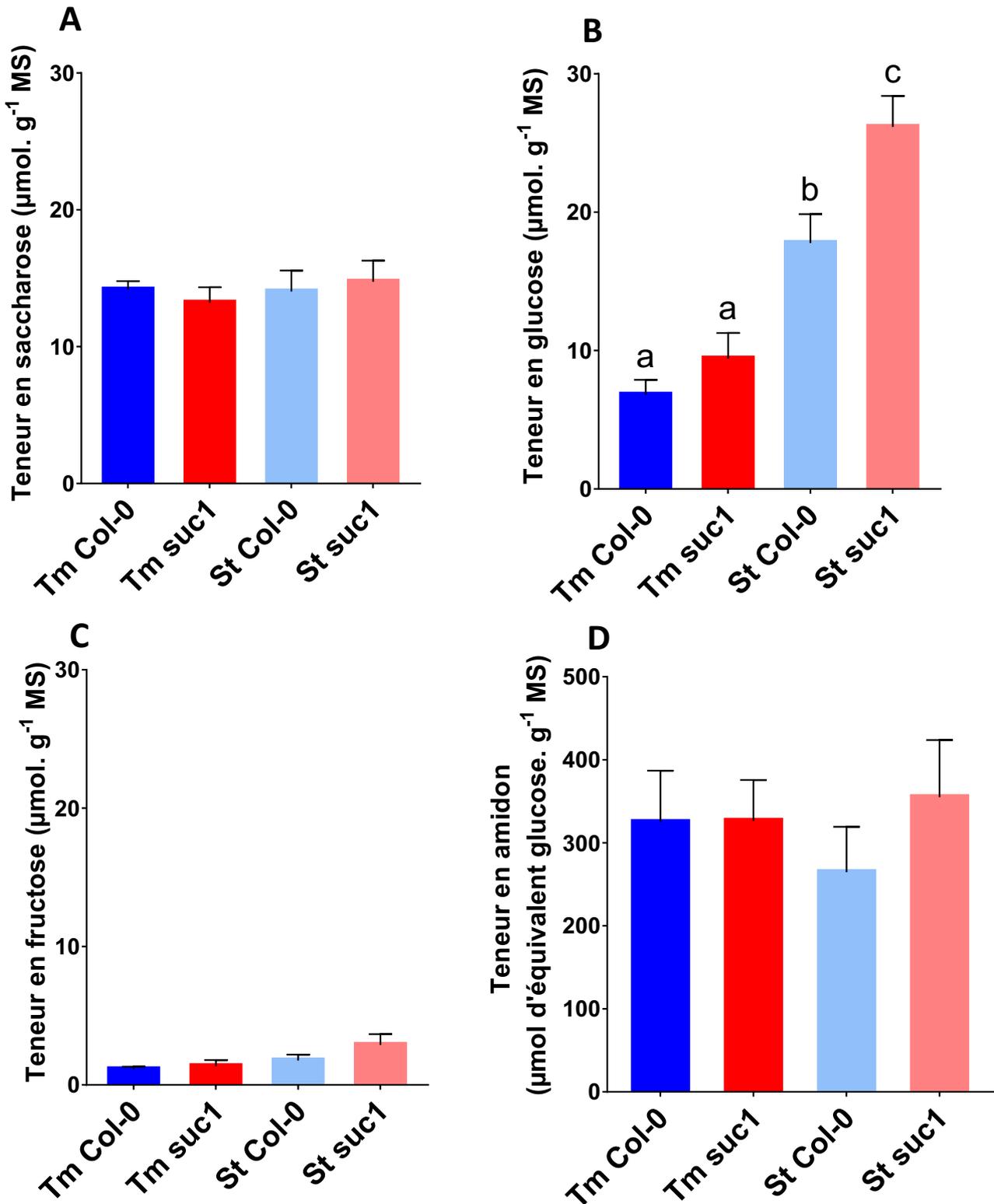


Figure 31. Teneurs en sucres solubles et amidon dans les feuilles de plantes de génotypes Col-0 et *suc1* cultivées en conditions St et Tm.

A. Teneur en saccharose des feuilles (µmol.g⁻¹ MS). **B.** Teneur en glucose des feuilles (µmol.g⁻¹ MS). **C.** Teneur en fructose des feuilles (µmol.g⁻¹ MS). **D.** Teneur en amidon des feuilles (µmol d'équivalent glucose.g⁻¹ MS).

Les valeurs correspondent à la moyenne (+/- erreur standard) de pools de plantes de 4 réplicats (n=4) biologiques indépendants (3 à 12 plantes par pool, 1 pool par réplicat). Les lettres différentes sur les barres indiquent les différences significatives (P < 0,05) déterminées par un test de Kruskal-Wallis, l'absence de lettre indique une absence de significativité.

1.1.4 Contenu en sucres

Afin de voir l'influence sur les plantes de la mutation du gène *AtSUC1* associé à la carence hydrique, des mesures de teneur en sucres ont été effectuées. Les quantités de saccharose, de glucose et de fructose ainsi que les teneurs en amidon ont été mesurées, dans les feuilles et dans les racines.

1.1.4.1 Teneurs en sucres dans les feuilles

Les teneurs en saccharose dans les feuilles (**Figure 31, A**) sont similaires pour les plantes cultivées dans les conditions hydriques Tm et St et pour les deux génotypes de plantes étudiés. Ces teneurs sont comprises entre $13,21 \mu\text{mol.g}^{-1}$ et $14,74 \mu\text{mol.g}^{-1}$.

Par contre, la teneur en glucose des feuilles (**Figure 31, B**) varie en fonction de la contrainte hydrique. En effet, celle-ci est supérieure en condition St comparée à la condition Tm pour les plantes des deux génotypes étudiés. Pour les plantes sauvages Col-0, la teneur en glucose foliaire est de $6,80 \mu\text{mol.g}^{-1}$ en condition Tm et de $17,77 \mu\text{mol.g}^{-1}$ en condition St, soit une différence de $10,9 \mu\text{mol.g}^{-1}$. Pour les plantes de génotype *suc1*, la teneur en glucose est de $9,41 \mu\text{mol.g}^{-1}$ en condition Tm et de $26,16 \mu\text{mol.g}^{-1}$ en condition St, la différence est ici de $16,7 \mu\text{mol.g}^{-1}$. La différence de teneur en glucose foliaire observée entre les conditions Tm et St est donc supérieure pour les plantes de génotype *suc1*. De plus, les teneurs en glucose pour les plantes de génotypes *suc1* sont supérieures à celles des plantes Col-0 en condition Tm ($9,41 \mu\text{mol.g}^{-1}$ et $6,80 \mu\text{mol.g}^{-1}$, respectivement) et en condition St ($26,16 \mu\text{mol.g}^{-1}$ et $17,77 \mu\text{mol.g}^{-1}$, respectivement).

Au niveau des teneurs en fructose foliaire (**Figure 31, C**), les teneurs sont faibles pour les deux génotypes, dans les deux conditions hydriques. Les teneurs en fructose sont comprises entre $1,12 \mu\text{mol.g}^{-1}$ et $2,89 \mu\text{mol.g}^{-1}$.

Enfin, les teneurs en amidon dans les feuilles (**Figure 31, D**) présentent de faibles différences entre les conditions hydriques Tm et St. Les valeurs présentées sont exprimées en $\mu\text{mol.g}^{-1}$ d'équivalent glucose, lorsque toutes les molécules d'amidon sont dégradées en glucose. Les teneurs en amidon sont inférieures dans les feuilles des plantes cultivées en condition St comparées à celles cultivées en condition Tm pour les plantes de génotype Col-0 (respectivement, $264,5 \mu\text{mol.g}^{-1}$ et $324,9 \mu\text{mol.g}^{-1}$, soit une différence de 18 %). En revanche, pour les plantes *suc1*, les teneurs sont très légèrement supérieures dans les feuilles des plantes cultivées en condition St comparées à celles Tm (respectivement, $354,9 \mu\text{mol.g}^{-1}$ et $326,5 \mu\text{mol.g}^{-1}$, soit une différence de 8,6 %). En condition Tm, il n'y a pas de différence remarquable de teneur en amidon entre les plantes des deux génotypes. En revanche, en condition St, les teneurs en amidon dans les feuilles des plantes de génotype *suc1* sont supérieures ($354,9 \mu\text{mol.g}^{-1}$) à celles de Col-0 ($264,5 \mu\text{mol.g}^{-1}$). Cette différence de teneur en amidon dans les feuilles entre les plantes *suc1* et les plantes Col-0 cultivées en condition St est de 34,1 %.

Racines

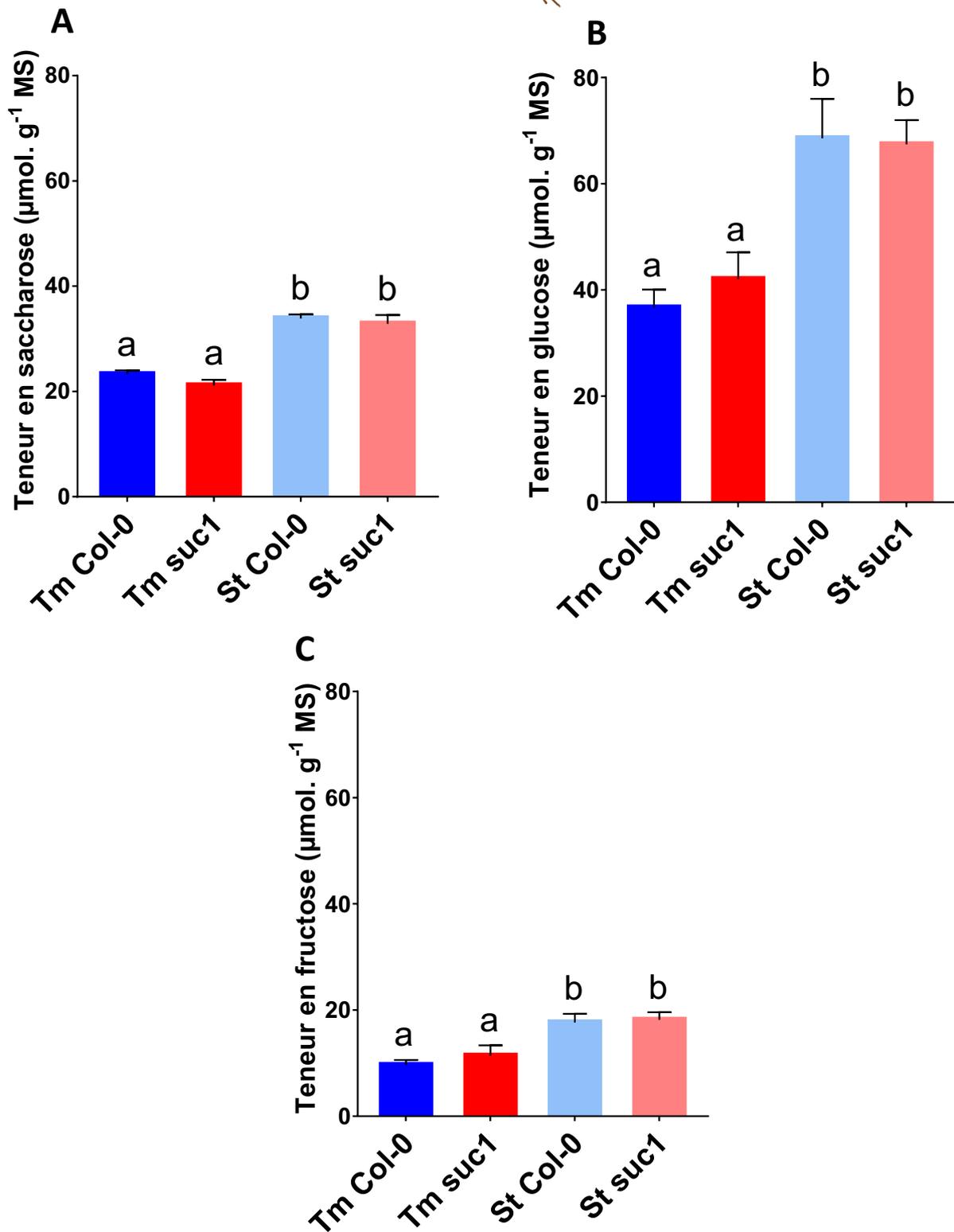


Figure 32. Teneurs en sucres solubles dans les racines de plantes de géotypes Col-0 et *suc1* cultivées en conditions St et Tm.

A. Teneur en saccharose des racines ($\mu\text{mol. g}^{-1}$ MS). **B.** Teneur en glucose des racines ($\mu\text{mol. g}^{-1}$ MS). **C.** Teneur en fructose des racines ($\mu\text{mol. g}^{-1}$ MS).

Les valeurs correspondent à la moyenne (+/- erreur standard) de pools de plantes de 4 réplicats ($n=4$) biologiques indépendants (3 à 12 plantes par pool, 1 pool par réplicat). Les lettres différentes sur les barres indiquent les différences significatives ($P < 0,05$) déterminées par un test de Kruskal-Wallis.

1.1.4.2 Teneurs en sucres dans les racines

Dans les racines (**Figure 32**), les teneurs en saccharose (**Figure 32, A**) pour les plantes cultivées en condition St sont supérieures à celles des plantes cultivées en condition Tm pour les génotypes Col-0 et *suc1*. La différence de teneur en saccharose entre les plantes cultivées en condition Tm et St est de $10,6 \mu\text{mol.g}^{-1}$ (31 %) pour les plantes Col-0 et de $11,7 \mu\text{mol.g}^{-1}$ (35 %) pour les plantes de génotype *suc1*. Dans les deux conditions hydriques, les plantes Col-0 et les plantes *suc1* ont une teneur en saccharose racinaire très proche (entre 1 et $2 \mu\text{mol.g}^{-1}$ de différence dans les deux cas).

La teneur en glucose des racines (**Figure 32, B**) est supérieure en condition St comparée à la condition Tm pour les plantes des deux génotypes étudiés. Pour les plantes sauvages Col-0, la teneur en glucose racinaire est de $36,66 \mu\text{mol.g}^{-1}$ en condition Tm et de $68,54 \mu\text{mol.g}^{-1}$ en condition St, soit une différence de $31,8 \mu\text{mol.g}^{-1}$ (46,5 %). Pour les plantes de génotype *suc1*, la teneur en glucose est de $42,02 \mu\text{mol.g}^{-1}$ en condition Tm et de $67,43 \mu\text{mol.g}^{-1}$ en condition St, la différence est ici de $25,4 \mu\text{mol.g}^{-1}$ (37,6 %). La différence de teneur en glucose racinaire observée entre les conditions Tm et St est donc supérieure pour les plantes de génotype Col-0 comparées aux plantes *suc1*. De plus, les teneurs en glucose sont légèrement supérieures dans les plantes de génotype *suc1* comparées aux plantes Col-0 en condition Tm ($42,02 \mu\text{mol.g}^{-1}$ et $36,66 \mu\text{mol.g}^{-1}$, respectivement) et quasiment similaires entre les plantes de génotypes *suc1* et les plantes Col-0 en condition St ($67,43 \mu\text{mol.g}^{-1}$ et $68,54 \mu\text{mol.g}^{-1}$, respectivement).

Enfin, la teneur en fructose dans les racines (**Figure 32, C**), est encore une fois supérieure dans les plantes cultivées en condition St comparée aux plantes cultivées en condition Tm. Dans les plantes de génotype Col-0, la différence entre les deux conditions est de $8,01 \mu\text{mol.g}^{-1}$ (45,3 %). Pour les plantes de génotype *suc1*, cette différence est de $6,76 \mu\text{mol.g}^{-1}$ (37,2 %). Les teneurs en fructose sont légèrement plus importantes dans les racines des plantes de génotype *suc1* comparées aux plantes Col-0 en condition Tm (respectivement, $11,38 \mu\text{mol.g}^{-1}$ et $9,63 \mu\text{mol.g}^{-1}$, soit une différence de 18,1 %) et quasiment identiques en condition St (respectivement, $18,15 \mu\text{mol.g}^{-1}$ et $17,64 \mu\text{mol.g}^{-1}$, soit une différence de 2,8 %).

Les teneurs en glucose (environ $35 \mu\text{mol.g}^{-1}$ à $70 \mu\text{mol.g}^{-1}$) sont supérieures aux teneurs en saccharose (environ $20 \mu\text{mol.g}^{-1}$ à $35 \mu\text{mol.g}^{-1}$) et les teneurs en fructose sont les plus faibles (environ $10 \mu\text{mol.g}^{-1}$ à $20 \mu\text{mol.g}^{-1}$).

Les teneurs en amidon ont été mesurées dans les racines, mais les quantités sont trop faibles pour être quantifiées précisément par la méthode utilisée.

En résumé, les teneurs en sucres solubles dans les racines sont plus importantes dans les plantes cultivées en condition St comparées aux plantes cultivées en condition Tm. De plus, les teneurs

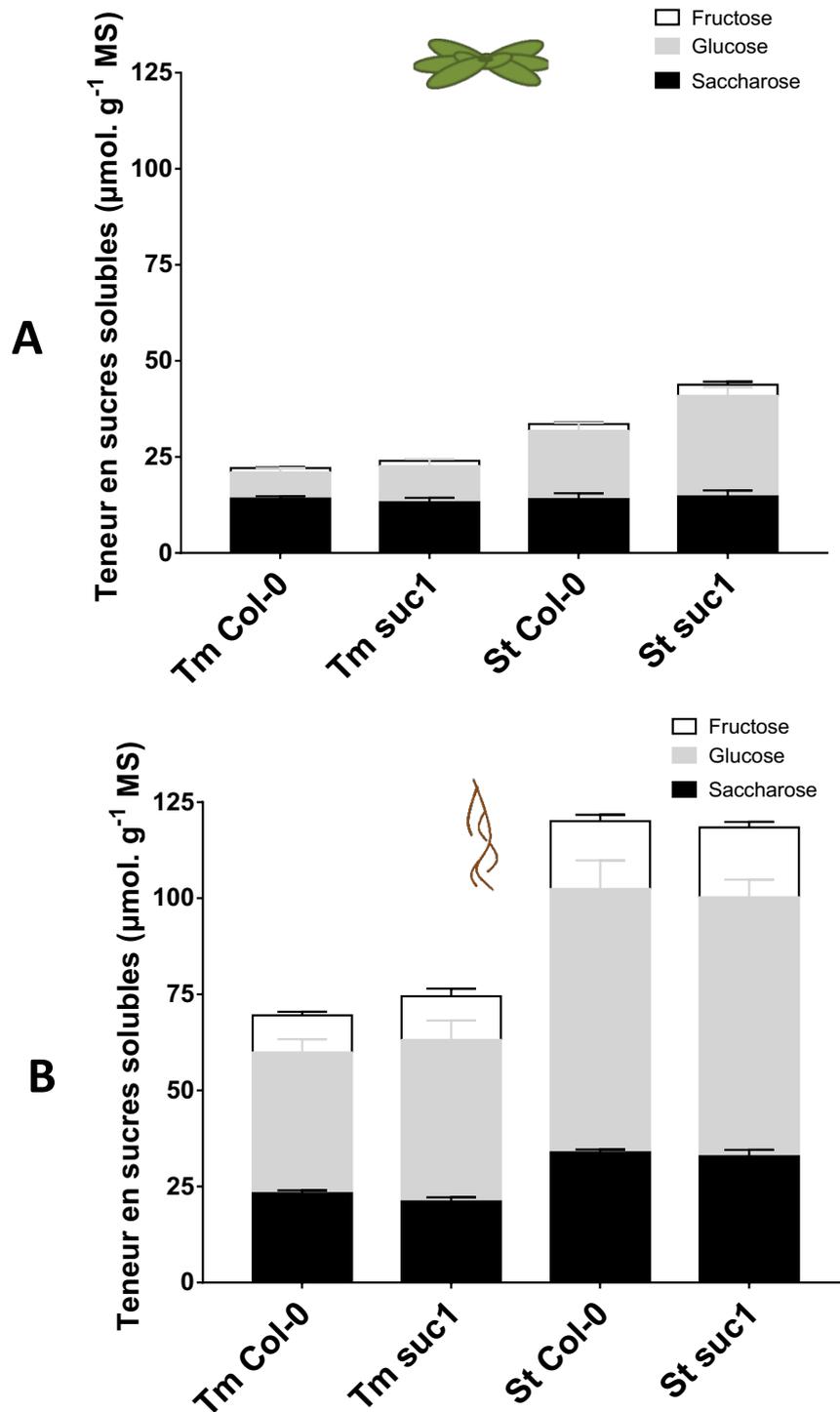


Figure 33. Teneurs en sucres solubles dans les feuilles et les racines de plantes de génotypes Col-0 et *suc1* cultivées en conditions St et Tm.

A. Teneur en sucres solubles dans les feuilles ($\mu\text{mol.g}^{-1}$ MS). **B.** Teneur en sucres solubles dans les racines ($\mu\text{mol.g}^{-1}$ MS).

Les valeurs correspondent à la moyenne (+/- erreur standard) de pools de plantes de 4 replicats ($n=4$) biologiques indépendants (3 à 12 plantes par pool, 1 pool par replicat).

en sucres dans cet organe sont très comparables entre les plantes des deux génotypes, dans les deux conditions hydriques étudiées.

1.1.4.3 Comparaison des teneurs en sucres dans les feuilles et les racines

Les proportions des trois sucres solubles sont différentes entre les feuilles (**Figure 31**) et les racines (**Figure 32**) pour les plantes cultivées en condition Tm. Dans les feuilles, les teneurs en saccharose sont supérieures à celles en glucose, alors que dans les racines les teneurs en glucose sont supérieures à celles du saccharose. Les teneurs en fructose sont dans tous les cas les plus faibles. Les teneurs en sucres solubles totaux sont plus importantes dans les racines (**Figure 33, B**) que dans les feuilles (**Figure 33, A**) lorsque celles-ci sont rapportées par gramme de matière sèche de l'organe. Néanmoins, les masses des feuilles étant bien supérieures aux masses des racines, les sucres dans les racines ne représentent qu'une faible part des sucres solubles de la plante entière. De plus, la valeur de ces teneurs est différente entre les feuilles et les racines. Dans les feuilles, les teneurs en saccharose sont environ de $15 \mu\text{mol.g}^{-1}$ quelle que soit la condition hydrique ou le génotype des plantes. En revanche, dans les racines, les teneurs fluctuent entre $20 \mu\text{mol.g}^{-1}$ et $35 \mu\text{mol.g}^{-1}$. Pour les teneurs en glucose, celles-ci varient d'environ $7 \mu\text{mol.g}^{-1}$ à $25 \mu\text{mol.g}^{-1}$ dans les feuilles et de $36 \mu\text{mol.g}^{-1}$ à $68 \mu\text{mol.g}^{-1}$ environ dans les racines. Dans les feuilles, les teneurs en fructose varient environ de $1 \mu\text{mol.g}^{-1}$ à $3 \mu\text{mol.g}^{-1}$, alors que dans les racines ces teneurs varient entre $9 \mu\text{mol.g}^{-1}$ et $18 \mu\text{mol.g}^{-1}$ environ. La teneur en chaque sucre soluble dans les racines est donc supérieure à celles des feuilles. Cependant, les teneurs en amidon dans les feuilles sont très largement supérieures à celles des racines. Pour le saccharose, une augmentation des teneurs dans les plantes cultivées en condition St comparées aux plantes cultivées en condition Tm est significative dans les racines mais pas dans les feuilles. Pour le glucose, cette augmentation est supérieure dans les feuilles (plus de 160 %) comparée à celle dans les racines (entre 60 % et 87 %). Pour le fructose, l'augmentation est comparable entre feuilles et racines, même si les teneurs en fructose sont beaucoup plus faibles dans les feuilles. Dans les feuilles comme dans les racines, les teneurs en glucose pour les plantes de génotype *suc1* sont légèrement supérieures à celles des plantes Col-0, en condition Tm. En condition St dans les feuilles, les teneurs en sucres solubles dans les plantes de génotype *suc1* sont supérieures à celles des plantes de génotype Col-0. En revanche, dans les mêmes conditions hydriques (St) dans les racines, il y a très peu de différences entre les deux génotypes.

1.1.4.4 Comparaison avec les travaux présentés par Durand *et al.* (2016)

Pour faciliter la comparaison entre l'étude présentée dans cette thèse et l'étude présentée dans l'article de Durand *et al.* (2016), celles-ci seront nommées par leur année de publication des

		Tm		St	
		étude 2016	étude 2018	étude 2016	étude 2018
Feuilles	Saccharose	12.5	14.1	21.5	14
	Glucose	9	6.8	35	17.8
	Fructose	2	1.12	6	1.76
	Amidon	325	324.9	233	264.6
Racines	Saccharose	17.5	23.2	41	33.9
	Glucose	18.5	36.6	35.5	68.6
	Fructose	5	9.6	11	17.65

Tableau 7. Comparaison entre l'étude 2018 et l'étude 2016 des teneurs en sucres dans les feuilles et les racines de plantes de génotype Col-0 cultivées en conditions St et Tm.

L'étude 2018 correspond aux résultats présentés dans cette thèse, l'étude 2016 correspond aux résultats de l'article de Durand *et al.* (2016).

Les teneurs sont exprimées en $\mu\text{mol.g}^{-1}$ MS.

résultats, c'est-à-dire que l'étude présentée dans cette thèse sera nommée « étude 2018 » et l'étude présentée dans l'article de Durand *et al.* (2016) sera nommée « étude 2016 ». L'étude 2016 ne portant pas sur les plantes de génotype *suc1*, seules les plantes de génotype Col-0 dans les deux conditions hydriques seront comparées.

Tout d'abord, les teneurs en sucres solubles des plantes (feuilles et racines) augmentent en condition de carence hydrique comparées aux conditions Tm dans les deux études. Néanmoins, il y a des différences entre l'étude 2018 et l'étude 2016, notamment au niveau des teneurs en sucres dans les plantes cultivées en condition de carence hydrique.

Au niveau du saccharose dans les feuilles des plantes cultivées en condition Tm, la quantité retrouvée dans les plantes est comparable entre l'étude 2018 et l'étude 2016. En revanche, dans l'étude 2018, les teneurs en saccharose observées entre les plantes cultivées en condition St et Tm sont identiques alors qu'une augmentation d'environ $10 \mu\text{mol.g}^{-1}$ est observée (**Tableau 7**) entre les plantes cultivées en condition St et Tm dans l'étude 2016. Dans les racines des plantes cultivées en condition Tm, les teneurs en saccharose sont supérieures dans les plantes de l'étude 2016 par rapport à celles des plantes de l'étude 2018. De plus, l'augmentation de la teneur en saccharose racinaire dans les plantes cultivées en condition St comparée aux plantes cultivées en condition Tm est plus importante dans l'étude 2016 que dans celle de 2018 (respectivement environ, $25 \mu\text{mol.g}^{-1}$ et $10 \mu\text{mol.g}^{-1}$).

Les teneurs foliaires en glucose sont comparables entre les deux études en condition Tm (entre $7 \mu\text{mol.g}^{-1}$ et $9 \mu\text{mol.g}^{-1}$). En revanche, l'augmentation de la teneur en glucose foliaire entre les plantes cultivées en condition St comparées à celle des plantes cultivées en condition Tm est plus importante dans les plantes présentées dans l'étude 2016 ($26 \mu\text{mol.g}^{-1}$) que dans celles de l'étude 2018 ($11 \mu\text{mol.g}^{-1}$). Dans les racines, la teneur en glucose retrouvée dans les plantes Col-0 cultivées en condition Tm est supérieure dans l'étude 2018 (environ $37 \mu\text{mol.g}^{-1}$) comparée à l'étude 2016 (environ $18.5 \mu\text{mol.g}^{-1}$), d'environ un facteur deux. Par contre, le pourcentage d'augmentation de la teneur en glucose dans les racines des plantes cultivées en condition St est similaire à celui des aux plantes cultivées en condition Tm (environ 100 %).

Les teneurs en fructose foliaire mesurées dans les plantes Col-0 sont inférieures dans l'étude 2018 comparée à l'étude 2016 en condition Tm (respectivement environ, $1,1 \mu\text{mol.g}^{-1}$ et $2 \mu\text{mol.g}^{-1}$) comme en condition St (respectivement environ, $1,8 \mu\text{mol.g}^{-1}$ et $6 \mu\text{mol.g}^{-1}$). L'augmentation des teneurs en fructose observée entre les plantes cultivées en condition St comparée à celle des plantes cultivées en condition Tm est donc supérieure dans l'étude 2016 comparée à l'étude 2018 (respectivement environ, 200 % et 50 %). Dans les racines en revanche, les teneurs en fructose sont supérieures dans les plantes de l'étude 2018 ($9,6 \mu\text{mol.g}^{-1}$ en Tm et $17,65 \mu\text{mol.g}^{-1}$ en St) à celles dans les plantes de l'étude 2016 ($5 \mu\text{mol.g}^{-1}$ en Tm et $11 \mu\text{mol.g}^{-1}$ en St).

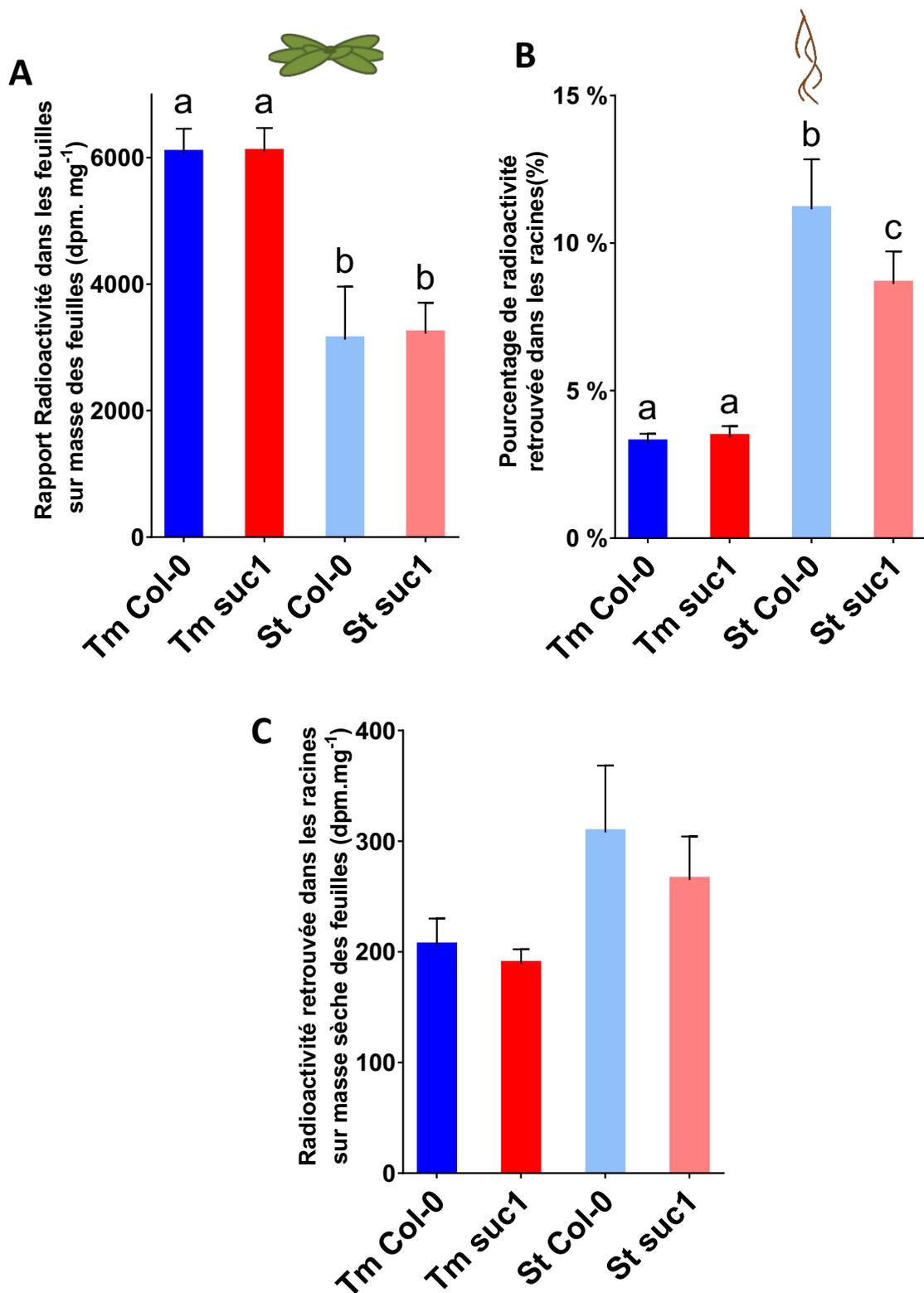


Figure 34. Rapport entre la radioactivité retrouvée dans les feuilles et la masse sèche des feuilles, pourcentage de radioactivité retrouvée dans les racines et rapport entre la radioactivité retrouvée dans les racines et la masse sèche des feuilles sur des plantes de génotypes Col-0 et *suc1* cultivées en conditions St et Tm.

A. Rapport entre la radioactivité retrouvée dans les feuilles et la masse des feuilles (DPM.mg⁻¹ MS). **B.** pourcentage de radioactivité retrouvée dans les racines (%). **C.** Rapport entre la radioactivité retrouvée dans les racines et la masse des feuilles (DPM.mg⁻¹ MS).

Les valeurs correspondent à la moyenne (+/- erreur standard) de plantes de 3 replicats (n=3) biologiques indépendants (3 à 10 plantes par replicat). Les lettres différentes sur les barres indiquent les différences significatives (P < 0,05) déterminées par un test de Kruskal-Wallis, l'absence de lettre indique une absence de significativité.

Enfin, la teneur en amidon dans les feuilles de plantes Col-0 cultivées en condition Tm est comparable entre les deux études (environ $325 \mu\text{mol.g}^{-1}$ équivalent glucose) et très légèrement supérieure pour les plantes cultivées en condition St de l'étude 2018 (environ $265 \mu\text{mol.g}^{-1}$ équivalent glucose) comparée à l'étude 2016 (environ $233 \mu\text{mol.g}^{-1}$ équivalent glucose). La diminution de la teneur en amidon foliaire est relativement proche entre les deux études puisqu'elle est de 18 % dans les plantes de l'étude 2018 et de 28 % dans celles de l'étude 2016. Dans les racines des plantes présentées dans les deux études, la teneur en amidon est très faible quelle que soit la condition hydrique.

Les deux études sont donc relativement comparables entre elles sur certains points, bien que des différences apparaissent. La principale différence est l'augmentation plus importante des teneurs en sucres solubles en condition St comparée à la condition Tm dans les plantes de l'étude 2016 que dans les plantes de l'étude 2018, mais des différences sont aussi visibles en condition Tm.

1.1.5 Transport à longue distance du saccharose

Une analyse de transport à longue distance a été réalisée grâce à une expérimentation d'assimilation de CO_2 radiomarqué par les plantes. Ceci permet de déterminer le flux de carbone *via* le phloème dans les différentes conditions. Le CO_2 radiomarqué est assimilé par les feuilles sources et transformé en sucre grâce à la photosynthèse. Le sucre formé (saccharose) est ensuite transporté *via* le phloème vers les organes puits. Ainsi, après 45 min de chasse, la radioactivité dans les feuilles et celle transportée vers les racines ont été mesurées et le rapport entre la radioactivité dans les feuilles et la masse des feuilles ainsi que le rapport entre la radioactivité retrouvée dans les racines et la masse des feuilles ont été calculés (**Figure 34**).

Le rapport entre la radioactivité retrouvée dans les feuilles et la masse des feuilles (**Figure 34, A**), permet de comparer l'assimilation de CO_2 par les feuilles dans les différentes conditions. Ce résultat permet aussi d'inférer sur la capacité photosynthétique des plantes en ayant l'assimilation des feuilles (dpm) par unité de masse sèche de rosette (mg). Les résultats montrent que l'assimilation de CO_2 par les feuilles est supérieure dans les plantes cultivées en condition Tm comparées aux plantes cultivées en condition St. De plus, il y a peu de différence d'assimilation du CO_2 par les feuilles entre les plantes des deux génotypes. En effet, en condition Tm, l'assimilation des feuilles pour les plantes de génotype sauvage Col-0 est de $6074,8 \text{ dpm.mg}^{-1}$ et de $6088,8 \text{ dpm.mg}^{-1}$ pour les plantes de génotype *suc1*. De même, en condition St, l'assimilation du CO_2 par les feuilles est de $3123,6 \text{ dpm.mg}^{-1}$ pour les plantes de génotypes Col-0 et de $3217,5 \text{ dpm.mg}^{-1}$ pour les plantes *suc1*.

Le pourcentage de radioactivité retrouvé dans les racines (**Figure 34, B**), correspond à la radioactivité mesurée dans les racines par rapport à la radioactivité totale mesurée dans toute la

plante. La radioactivité retrouvée dans les racines correspond à la radioactivité qui a été transportée des feuilles sources vers les racines puisque les racines n'assimilent pas le CO₂ (ceci a été montré lors d'expériences préliminaires). Ce résultat révèle donc le pourcentage de radioactivité transportée vers les racines. Un pourcentage plus important de radioactivité retrouvée dans les racines est observé pour les plantes cultivées en conditions St comparées aux plantes cultivées en condition Tm. En condition Tm, les plantes de génotypes Col-0 et *suc1* ont des valeurs comparables (respectivement, 3,23 % et 3,42 %). En revanche, en condition St, les plantes de génotype Col-0 ont un pourcentage de radioactivité exportée supérieur (11,14 %) à celui de plantes de génotype *suc1* (8,61 %). Par conséquent, l'augmentation de radioactivité retrouvée dans les racines entre les conditions Tm et St est plus importante pour les plantes de génotype Col-0 (244 %) que pour les plantes de génotype *suc1* (151%). De plus nous avons montré que plus de 96 % de la radioactivité totale assimilée se trouve dans les feuilles pour les plantes cultivées en condition Tm et entre 88 % et 91 % pour les plantes cultivées en condition St. Ces résultats diffèrent peu des résultats présentés dans l'article de Durand *et al.* (2016). En effet, environ 2 % de radioactivité transportée dans les racines ont été retrouvés dans les plantes Col-0 cultivées en condition Tm présentées dans cet article et 3,23 % ont été retrouvés dans les plantes Col-0 cultivées en condition Tm de l'étude présentée dans ce chapitre. Toutefois, pour les plantes Col-0 en condition St, un pourcentage plus important est retrouvé dans les plantes présentées dans l'étude analysée dans ce chapitre comparée aux plantes présentées dans les résultats de Durand *et al.* (2016) (respectivement, 11,14 % et environ 6 %).

Le rapport entre la radioactivité retrouvée dans les racines et la masse sèche des feuilles (**Figure 34, C**) permet d'avoir des valeurs de radioactivité transportée dans les racines par unité de masse sèche de rosette (dpm.mg⁻¹). Ce rapport montre que pour les plantes cultivées en condition St, il y a une augmentation de la radioactivité transportée vers les racines par mg de rosette comparée aux plantes cultivées en condition Tm. En condition Tm, la valeur de radioactivité transportée dans les racines par mg de rosette est légèrement supérieure pour les plantes de génotype Col-0 comparées aux plantes *suc1* (respectivement, 205,5 dpm.mg⁻¹ et 188,8 dpm.mg⁻¹). De même, en condition St, cette valeur est supérieure pour les plantes de génotype Col-0 comparée à celle des plantes *suc1* (respectivement, 307,9 dpm.mg⁻¹ et 264,9 dpm.mg⁻¹). L'augmentation de radioactivité transportée par mg de rosette observée entre les conditions Tm et St pour les plantes des deux génotypes est proche (40 % pour Col-0 et 49 % pour *suc1*). Ici aussi, la tendance est identique à celle observée dans les résultats de l'article de Durand *et al.* (2016). Cependant, les valeurs sont inférieures dans l'étude présentée dans ce chapitre comparée à l'étude de Durand *et al.* (2016) (respectivement, en condition Tm : 205 dpm.mg⁻¹ et 325 dpm.mg⁻¹ ; en condition St : 307 dpm.mg⁻¹ et 600 dpm.mg⁻¹)

En résumé, bien que la majorité du carbone assimilé reste dans les rosettes, plus de carbone est exporté vers les racines dans les plantes cultivées en condition St comparées aux plantes cultivées

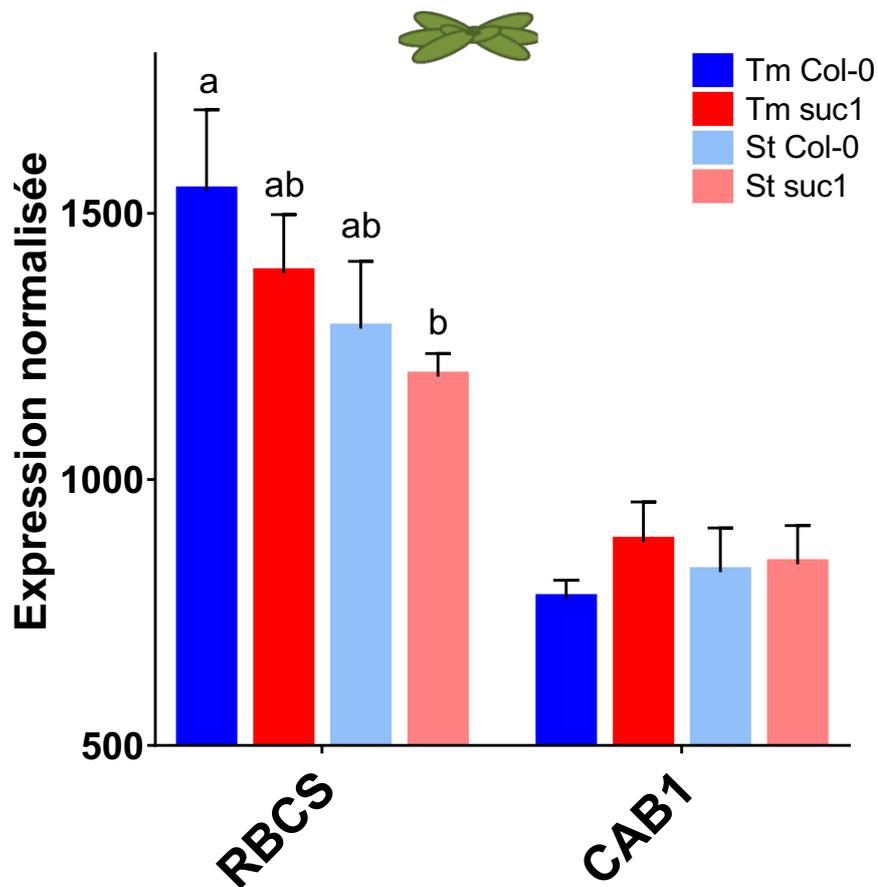


Figure 35. Expression de gènes marqueurs de la photosynthèse (*AtRBCS* et *AtCAB1*) dans les plantes de génotypes Col-0 et *suc1* cultivées en conditions St et Tm.

Les données sont normalisées (pas d'unité) par la moyenne de 3 gènes de référence *At5g12240*, *At4g26410* et *At3g18780* (Czechowski *et al.*, 2005). Les valeurs correspondent à la moyenne (+/- erreur standard) de pools de plantes de 3 réplicats (n=3) biologiques indépendants (3 à 12 plantes par pool, 1 pool par réplicat). Les lettres différentes sur les barres indiquent les différences significatives ($P < 0,05$) déterminées par un test de Kruskal-Wallis, réalisé gène par gène. L'absence de lettre indique une absence de significativité.

en condition Tm pour les deux géotypes. La quantité de radioactivité retrouvée dans les feuilles est moins importante dans les plantes cultivées en condition St comparées aux plantes cultivées en condition Tm. Ceci est révélateur d'une plus faible capacité d'assimilation du carbone en condition St. En revanche, en condition St, les plantes exportent relativement plus de carbone vers les racines comparées aux plantes cultivées en condition Tm. Enfin, lorsque la quantité de radioactivité exportée vers les racines est exprimée par gramme de masse sèche de rosette, des différences entre les géotypes Col-0 et *suc1* sont observables pour les plantes cultivées en condition Tm et St. En effet, dans les deux conditions hydriques, les racines des plantes *suc1* reçoivent moins de carbone par mg de rosette que les racines des plantes Col-0.

1.1.6 Expression des gènes

Afin d'étudier l'impact de la mutation d'*AtSUC1* au niveau moléculaire, l'expression de différents gènes a été analysée pour les plantes des deux géotypes cultivées dans les conditions Tm et St. L'expression foliaire des gènes *AtRBCS* (Ribulose Bisphosphate Carboxylase Small chain1a) et *AtCAB1* (Chlorophyll A/B-Binding protein1) liés à la photosynthèse a été étudiée pour vérifier qu'il n'y avait pas de perturbation importante de la photosynthèse entre les plantes Col-0 et *suc1* dans les différentes conditions hydriques (Tm et St). De plus, l'expression des transporteurs de saccharose de type SUC et SWEET a été analysée dans les feuilles et les racines.

1.1.6.1 Gènes codant des protéines liées à l'activité photosynthétique

L'expression du gène *AtRBCS* (**Figure 35**) est plus faible dans les plantes cultivées en condition St comparées aux plantes cultivées en condition Tm. Cette différence d'expression est d'environ 15 %. De plus, l'expression de ce gène dans les plantes de géotype *suc1* est très légèrement plus faible que dans les plantes de géotype Col-0 (environ 8 %) dans les deux conditions de culture. Dans l'article de Durand *et al.* (2016), la diminution de l'expression du gène *AtRBCS* dans les plantes Col-0 cultivées en condition St comparées aux plantes cultivées en condition Tm est comparable à celle observée ici pour les plantes Col-0 (respectivement, environ 16 % et 15 %).

L'expression du gène *AtCAB1* (**Figure 35**) est légèrement supérieure dans les plantes cultivées en condition St comparées à celles cultivées en condition Tm pour les plantes de géotype Col-0. La différence d'expression entre les deux conditions est de 6,5 %. En revanche, pour les plantes de géotype *suc1*, une expression légèrement inférieure du gène *AtCAB1* est observée pour les plantes cultivées en condition St comparées aux plantes cultivées en condition Tm. La différence d'expression entre les deux conditions pour les plantes *suc1* est de 4,7 %. En condition Tm, les plantes de géotype Col-0 expriment moins le gène *AtCAB1* (775) que les plantes de géotype *suc1* (882,6). En revanche,

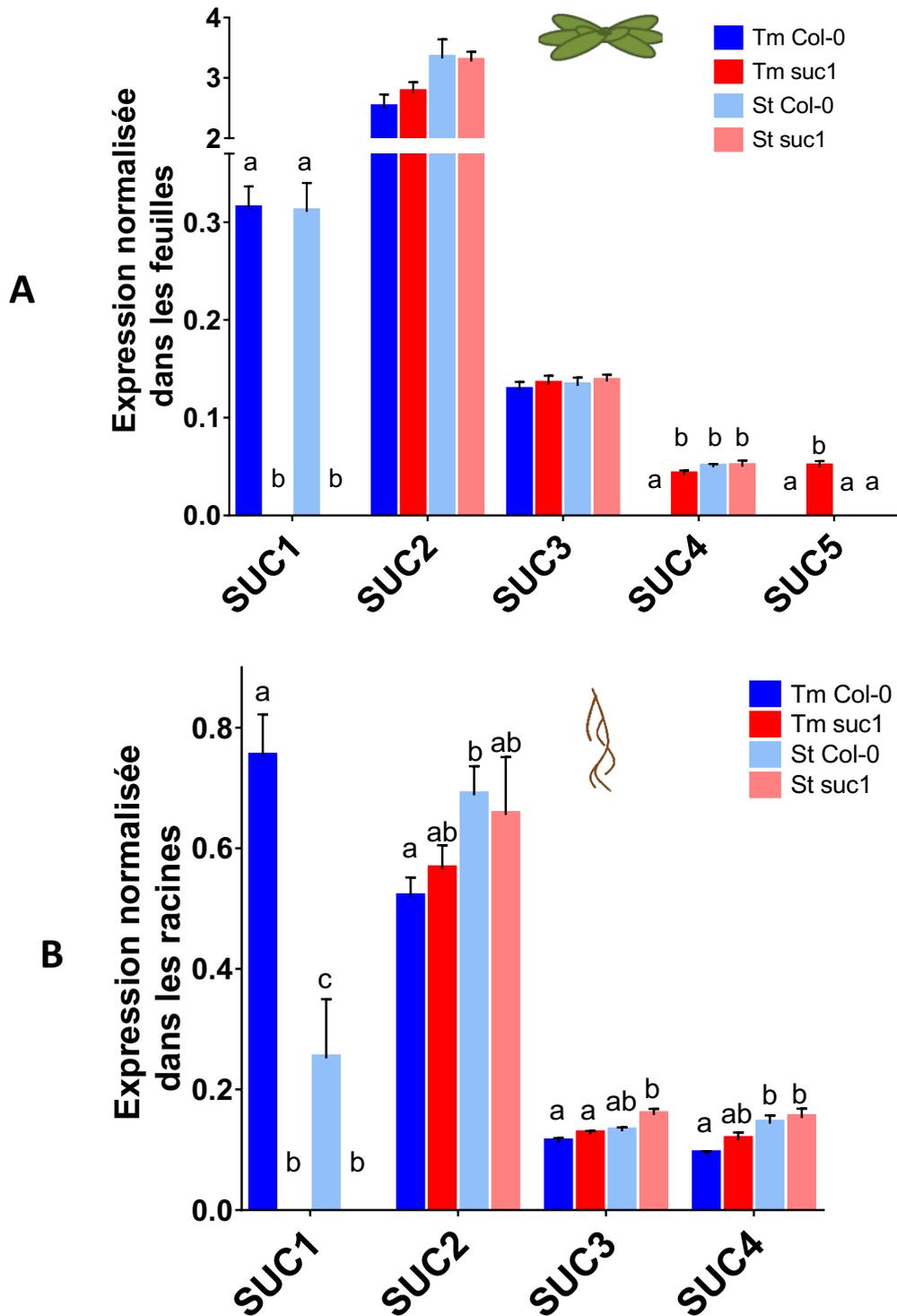


Figure 36. Expression de gènes codant des transporteurs de saccharose de type SUC dans les feuilles et dans les racines des plantes de génotypes Col-0 et *suc1* cultivées en conditions St et Tm.

A. Expression dans les feuilles. **B.** Expression dans les racines.

Les données sont normalisées (pas d'unité) par la moyenne de 3 gènes de référence *At5g12240*, *At4g26410* et *At3g18780* (Czechowski *et al.*, 2005). Les valeurs correspondent à la moyenne (+/- erreur standard) de pools de plantes de 3 replicats (n=3) biologiques indépendants (3 à 12 plantes par pool, 1 pool par replicat). Les lettres différentes sur les barres indiquent les différences significatives (P < 0,05) déterminées par un test de Kruskal-Wallis, réalisé gène par gène. L'absence de lettre indique une absence de significativité.

en condition St, l'expression du gène est comparable dans les plantes des deux génotypes (825,8 et 840,7). Dans l'article de Durand *et al.* (2016), l'expression du gène *AtCAB1* était comparable entre les plantes Col-0 cultivées en condition St et les plantes cultivées en condition Tm.

1.1.6.2 Gènes codant des transporteurs de type SUC

Dans les feuilles, les gènes codant des transporteurs de type SUC retrouvés sont *AtSUC1* à 5 (**Figure 36, A**). *AtSUC2* est le plus exprimé dans ce compartiment, suivi d'*AtSUC1* et 3 ; *AtSUC4* et 5 n'y sont exprimés que dans certaines conditions de culture.

L'expression foliaire d'*AtSUC1* est forte dans les plantes de génotype Col-0 et les valeurs sont comparables entre les deux conditions de culture Tm et St (0,313 et 0,310). De plus, l'expression d'*AtSUC1* est absente dans les feuilles des plantes de génotype mutant *suc1*, ce qui est attendu pour un mutant KO. L'expression d'*AtSUC2* dans les feuilles des plantes cultivées en condition St (valeurs d'expression d'environ 3,3 pour les deux génotypes) est très légèrement supérieure à celles des plantes cultivées en condition Tm (environ 2,6 pour les deux génotypes). De plus, peu de différences d'expression de ce gène sont observées entre les plantes de génotype Col-0 (2,50 en condition Tm et 3,32 en condition St) et *suc1* (2,75 en condition Tm et 3,27 en condition St). Dans les feuilles, l'expression du gène *AtSUC3* est comparable dans les plantes de toutes les conditions. L'expression d'*AtSUC4* n'est pas retrouvée dans les plantes de génotype Col-0 cultivées en condition Tm. En revanche, en condition St, l'expression est retrouvée dans les plantes de génotype Col-0 (0,049). De plus, l'expression d'*AtSUC4* est présente dans les feuilles des plantes de génotype *suc1* cultivées en condition Tm (0,041). En condition St, le gène est exprimé avec la même intensité dans les plantes de génotype Col-0 (0,0492) et *suc1* (0,0498). Enfin, pour le gène *AtSUC5*, l'expression est absente dans les feuilles des plantes de toutes les conditions, sauf pour les plantes de génotype *suc1* cultivées en condition Tm (0,0493).

Dans l'étude de Durand *et al.* (2016), les résultats concernant l'expression des gènes codant des transporteurs de saccharose de type SUC dans les feuilles de plantes Col-0 sont comparables à ceux présentés dans le paragraphe précédent : les mêmes gènes ont été retrouvés dans les feuilles, le classement des gènes de type SUC les plus exprimés, ainsi que les tendances pour l'expression des différents gènes, sont identiques entre les deux études. De même, l'augmentation d'expression du gène *AtSUC2* dans les plantes Col-0 cultivées en condition St par rapport à celles cultivées en condition Tm est comparable dans l'étude Durand *et al.* (2016) (environ 39 %) et l'étude présentée dans ce chapitre (32,8 %). En revanche, Durand *et al.* (2016) retrouvent une faible expression d'*AtSUC4* pour les plantes Col-0 cultivées en condition Tm et une expression d'*AtSUC5* dans les plantes Col-0 cultivées dans les deux conditions, ce qui n'est pas le cas dans les plantes de l'étude présentée ici.

Les gènes codant des transporteurs de saccharose de type SUC retrouvés dans les racines sont *AtSUC1* à 4 (**Figure 36, B**). Dans les racines des plantes de génotype Col-0 cultivées en condition Tm, *AtSUC1* est le plus exprimé. *AtSUC2* y est le second transporteur de type SUC le plus exprimé et *AtSUC3* et 4 sont les suivants.

L'expression d'*AtSUC1* dans les racines des plantes Col-0 cultivées en condition St diminue fortement comparée à celle des plantes cultivées en condition Tm (67 %). L'expression d'*AtSUC1* est absente dans les racines des plantes de génotype mutant *suc1*, ce qui est attendu pour un mutant KO. L'expression d'*AtSUC2* est plus importante dans les racines des plantes cultivées en condition St par rapport à celles des plantes cultivées en condition Tm pour les plantes de génotype Col-0 (32 %) et *suc1* (15 %). Pour *AtSUC3*, les différences d'expression entre les plantes cultivées en condition Tm et St sont faibles. Le niveau d'expression du gène *AtSUC3* est de 0,116 dans les plantes Col-0 et de 0,125 dans les plantes *suc1* en condition Tm et de 0,143 pour les plantes Col-0 et de 0,152 pour les plantes *suc1* cultivées en condition St. Le niveau d'expression racinaire d'*AtSUC4* est légèrement plus important pour les plantes cultivées en condition St par rapport à celles cultivées en condition Tm pour les deux génotypes. Cette différence d'expression est de 54,4 % dans les plantes Col-0 et de 31,2 % dans les plantes *suc1*.

Les résultats de cette étude concernant l'expression des gènes codant des transporteurs de saccharose de type SUC dans les racines sont cohérents avec ceux présentés dans l'article de Durand *et al.* (2016) : une augmentation du niveau d'expression des gènes *AtSUC2* (32 % dans notre étude et environ 100 % dans l'étude de Durand *et al.*, 2016), *AtSUC3* et *AtSUC4* est retrouvée dans les plantes Col-0 en réponse à la carence hydrique. De plus, une diminution de l'expression du gène *AtSUC1* (environ 67 % dans notre étude et 81 % dans l'étude de Durand *et al.*, 2016) dans les racines des plantes Col-0 est aussi observée en réponse à la contrainte hydrique. Cette diminution de l'expression d'*AtSUC1* en contrainte hydrique est aussi relevée par Xu *et al.* (2018). En revanche, ces différences sont plus importantes dans l'étude de Durand *et al.* (2016) que dans celles présentées dans le paragraphe précédent. Une autre différence est que Durand *et al.* (2016) retrouvent une expression d'*AtSUC5* dans les racines des plantes Col-0 cultivées dans les deux conditions, ce qui n'est pas le cas dans les plantes de l'étude présentée ici.

Dans notre étude, le niveau d'expression du gène *AtSUC1* dans les racines est supérieur à celui des feuilles dans les plantes Col-0 cultivées en condition Tm (respectivement, 0,75 et 0,31). En revanche, en condition St, les niveaux d'expressions sont proches entre les deux organes (respectivement, 0,25 et 0,31). Pour *AtSUC2*, le niveau d'expression retrouvé dans les feuilles (entre 2,5 et 3,3 suivant les conditions) est toujours supérieur à celui retrouvé dans les racines (entre 0,5 et

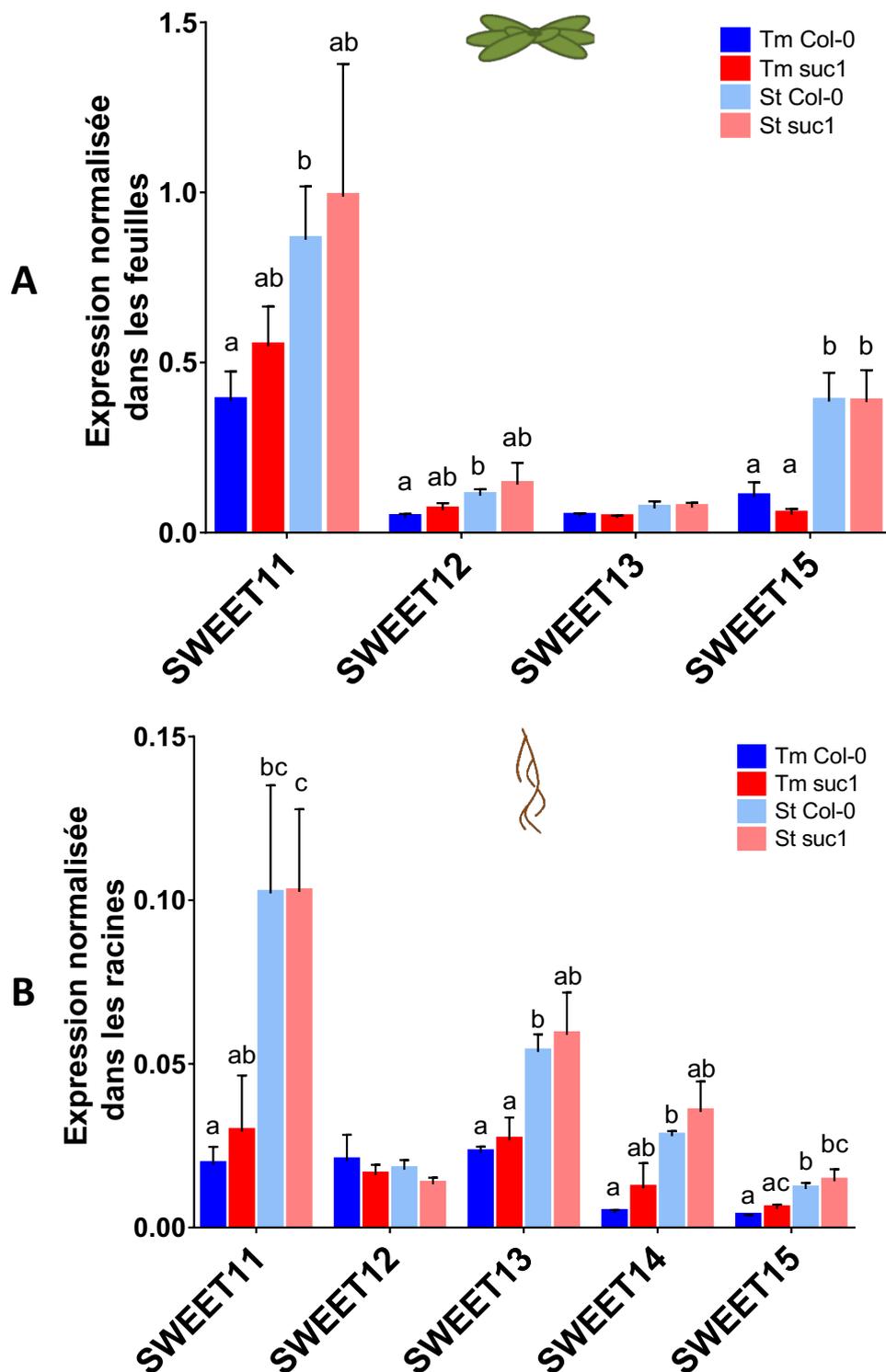


Figure 37. Expression de gènes codant des transporteurs de saccharose de type SWEET dans les feuilles et dans les racines des plantes de génotypes Col-0 et *suc1* cultivées en conditions St et Tm.

A. Expression dans les feuilles. **B.** Expression dans les racines.

Les données sont normalisées (pas d'unité) par la moyenne de 3 gènes de référence *At5g12240*, *At4g26410* et *At3g18780* (Czechowski *et al.*, 2005). Les valeurs correspondent à la moyenne (+/- erreur standard) de pools de plantes de 3 réplicats (n=3) biologiques indépendants (3 à 12 plantes par pool, 1 pool par réplicat). Les lettres différentes sur les barres indiquent les différences significatives ($P < 0,05$) déterminées par un test de Kruskal-Wallis, réalisé gène par gène. L'absence de lettre indique une absence de significativité.

0,7). L'expression d'*AtSUC3* est globalement comparable entre les feuilles (entre 0,12 et 0,14) et les racines (entre 0,11 et 0,15) quelles que soient les conditions étudiées. Le niveau d'expression d'*AtSUC4* est légèrement supérieur dans les racines (entre 0,09 et 0,15 suivant les conditions) comparées aux feuilles (entre 0 et 0,05 suivants les conditions). Enfin, l'expression d'*AtSUC5* est retrouvée dans une seule condition dans les feuilles (plantes de génotype *suc1* cultivées en condition Tm) et dans aucune des conditions étudiées dans les racines.

En résumé, dans les feuilles, la différence majeure observée au niveau de l'expression de transporteurs de saccharose de type SUC entre les plantes cultivées en condition St et Tm est une augmentation de l'expression d'*AtSUC2*. De plus, il y a très peu de différences d'expression de ces gènes entre les deux génotypes dans chaque condition hydrique. Dans les racines, une forte répression d'*AtSUC1* est observée dans les plantes cultivées en condition St comparées aux plantes cultivées en condition Tm. De plus, une induction du gène *AtSUC2* est visible en cas de carence hydrique. De même que dans les feuilles, il y a globalement peu de différences d'expression des gènes SUC dans les racines entre les plantes de génotype Col-0 et les plantes de génotype *suc1*.

1.1.6.3 Gènes codant des transporteurs de saccharose de type SWEET

L'expression de gènes codant des transporteurs de type SWEET transportant du saccharose (**Figure 37, A**), *AtSWEET11*, *12*, *13* et *15* a été retrouvée dans les feuilles. *AtSWEET11* y est le plus exprimé et les trois autres présentent des niveaux d'expression similaires dans les plantes de génotype Col-0 cultivées en condition Tm.

Une augmentation significative de l'expression d'*AtSWEET11* est observée dans les feuilles des plantes Col-0 cultivées en condition St comparées aux plantes cultivées en condition Tm (126 %). Une augmentation de l'expression de ce gène est aussi observée pour les plantes de génotype *suc1* cultivées en condition St par rapport aux plantes cultivées en condition Tm (80 %). L'expression d'*AtSWEET11* est plus importante dans les feuilles des plantes de génotype *suc1* que Col-0, cultivées en condition Tm (respectivement, 0,54 et 0,38) mais aussi en condition St (respectivement, 0,98 et 0,86) bien que les erreurs standard soient importantes. Des tendances similaires sont observables pour l'expression du gène *AtSWEET12* dans les feuilles mais avec une expression beaucoup plus faible que pour *AtSWEET11* (entre 0,38 et 0,98 pour *AtSWEET11* et entre 0,04 et 0,14 pour *AtSWEET12*). L'augmentation d'expression de ce gène dans les plantes cultivées en condition St comparée aux plantes Tm est de 147,3 % pour les plantes de génotype Col-0. Pour les plantes de génotype *suc1*, cette augmentation est de 113,9 %. L'expression foliaire du gène *AtSWEET12* est légèrement plus importante dans les plantes de génotype *suc1* que dans les plantes de génotype Col-0, aussi bien en

condition Tm (respectivement, 0,066 et 0,043) qu'en condition St (respectivement, 0,14 et 0,10). Le niveau d'expression d'*AtSWEET13* dans les feuilles présente peu de différences entre les diverses conditions. Néanmoins, l'expression de ce gène semble légèrement plus importante dans les plantes cultivées en condition St que dans celles cultivées en condition Tm. Cette augmentation d'expression est observable pour les plantes des deux génotypes (50 % pour Col-0 et 70 % pour *suc1*). De même, l'expression foliaire du gène *AtSWEET13* est très proche dans les plantes des deux génotypes, en condition Tm (0,047 pour Col-0 et 0,043 pour *suc1*) et St (0,071 pour Col-0 et 0,073 pour *suc1*). Enfin, l'expression d'*AtSWEET15* dans les feuilles des plantes cultivées en condition St est supérieure comparées à celles cultivées en condition Tm. Cette différence est de 267,9 % pour les plantes de génotype Col-0 et de 617,2 % pour les plantes de génotype *suc1*. Le fait que cette différence soit plus importante pour les plantes *suc1* que pour les plantes Col-0 est dû au fait qu'en condition Tm, les plantes de génotype *suc1* expriment deux fois moins le gène *AtSWEET15* dans les feuilles (0,053) que les plantes de génotype Col-0 (0,104), et qu'en condition St, les plantes des deux génotypes expriment ce gène avec la même intensité (0,385 pour Col-0 et 0,383 pour *suc1*).

Les résultats de cette étude concernant l'expression des gènes codant des transporteurs de saccharose de type SWEET dans les feuilles de Col-0 sont cohérents avec ceux présentées dans l'article de Durand *et al.* (2016). En effet, l'expression des mêmes *AtSWEETs* est retrouvée (*AtSWEET11*, *12*, *13* et *15*) dans les deux études. De plus, cette expression pour les plantes cultivées en condition St est toujours supérieure à celui des plantes cultivées en condition Tm, dans les deux études. Enfin, des différences sont observées au niveau des pourcentages d'augmentation de l'expression des gènes pour les plantes cultivées en condition St comparées à celles cultivées en condition Tm. En effet, l'augmentation de l'expression des gènes dans les plantes Col-0 cultivées en condition St comparées à celles cultivées en condition Tm est pour *AtSWEET11* de 126 %, pour *AtSWEET12* de 147 %, pour *AtSWEET13* de 50 %, et pour *AtSWEET15* de 268 %, dans l'étude présentée dans ce chapitre, et pour *AtSWEET11* de 33 %, pour *AtSWEET12* de 108 %, pour *AtSWEET13* de 80 %, et pour *AtSWEET15* de 1000 % dans l'étude de Durand *et al.* (2016).

Dans les racines, les gènes codant des transporteurs de saccharose de type SWEET exprimés (**Figure 37, B**) sont les mêmes que dans les feuilles (*AtSWEET11*, *12*, *13* et *15*) avec en plus, *AtSWEET14*. Néanmoins, l'expression de ces gènes dans les racines est beaucoup plus faible que dans les feuilles. Pour les plantes Col-0 cultivées en condition Tm, *AtSWEET11*, *12* et *13* ont des niveaux d'expression comparables (entre 0,019 et 0,022) entre eux et supérieurs à *AtSWEET14* et *15* (respectivement, 0,004 et 0,003). En revanche, dans les racines des plantes Col-0 cultivées en condition St, *AtSWEET11* (0,1) est deux fois plus exprimé qu'*AtSWEET13* (0,05), qui est deux fois plus exprimé qu'*AtSWEET14* (0,027), qui est plus exprimé qu'*AtSWEET12* et *15* (respectivement, 0,017 et 0,011). Les mêmes ordres de

niveaux d'expression sont observables pour les plantes de génotype *suc1*. Les niveaux d'expression des transporteurs de type SWEET dans les racines sont très faibles et certaines variations d'expression n'ont peut-être pas d'impact réel sur la physiologie de la plante.

Le gène *AtSWEET11* est plus exprimé dans les racines des plantes cultivées en condition St comparées aux plantes cultivées en condition Tm. Cette augmentation est plus importante pour les plantes de génotype Col-0 (430,7 %) que pour les plantes de génotype *suc1* (249,6 %). L'augmentation plus forte de l'expression du gène *AtSWEET11* dans les plantes Col-0 comparées aux plantes *suc1* est due au fait qu'en condition St, les plantes de génotypes Col-0 et *suc1* ont une expression de ce gène comparable (environ 0,102) alors qu'en condition Tm, les plantes de génotype *suc1* ont un niveau d'expression supérieur (0,029) à celui des plantes de génotype Col-0 (0,019). L'expression d'*AtSWEET12* présente peu de différences dans les racines entre les différentes conditions. Néanmoins, cette expression est légèrement plus faible pour les plantes cultivées en condition St (0,020 pour Col-0 et 0,016 pour *suc1*) comparées aux plantes cultivées en condition Tm (0,017 pour Col-0 et 0,013 pour *suc1*). La différence d'expression d'*AtSWEET12* entre les plantes cultivées en condition Tm et St est de 13,2 % pour les plantes de génotype Col-0 et de 17,6 % pour les plantes de génotype *suc1*. Pour les deux conditions hydriques, les plantes de génotype Col-0 présentent un niveau d'expression pour le gène *AtSWEET12* très légèrement supérieur à celui mesuré dans les plantes de génotype *suc1*. *AtSWEET13*, *14* et *15* présentent des profils d'expression comparables entre eux dans les racines même si les niveaux d'expression sont différents. Une augmentation de l'expression de ces trois gènes est observée dans les plantes cultivées en condition St comparées à celles cultivées en condition Tm. De plus, le niveau d'expression des trois gènes est plus important dans les plantes de génotype *suc1* comparées aux plantes de génotype sauvage Col-0. L'augmentation d'expression entre les plantes cultivées en condition St comparée à celle des plantes cultivées en condition Tm est de 134,9 % chez les plantes Col-0 et 120,7 % chez les plantes *suc1* pour *AtSWEET13* ; de 510,1 % chez les plantes Col-0 et 194,6 % chez les plantes *suc1* pour *AtSWEET14* et de 244,9 % chez les plantes Col-0 et 147 % chez les plantes *suc1* pour *AtSWEET15*.

Dans l'étude de Durand *et al.* (2016), les résultats concernant l'expression des gènes codant des transporteurs de saccharose de type SWEET dans les racines de plantes Col-0 sont comparables à ceux présentés dans le paragraphe précédent : les mêmes gènes ont été retrouvés dans les racines. Dans les deux études, une augmentation du niveau d'expression de ces gènes a été retrouvée entre les plantes Col-0 cultivées en condition St comparées aux plantes cultivées en condition Tm pour les gènes *AtSWEET11*, *13*, *14* et *15*. En revanche, le niveau d'expression d'*AtSWEET12* dans les plantes Col-0 cultivées en condition St comparées aux plantes cultivées en condition Tm est plus faible dans l'étude présentée dans ce chapitre contrairement ce qui est présenté dans l'article de Durand *et al.* (2016). Ces différences de niveau d'expression entre les plantes cultivées en condition St comparées aux

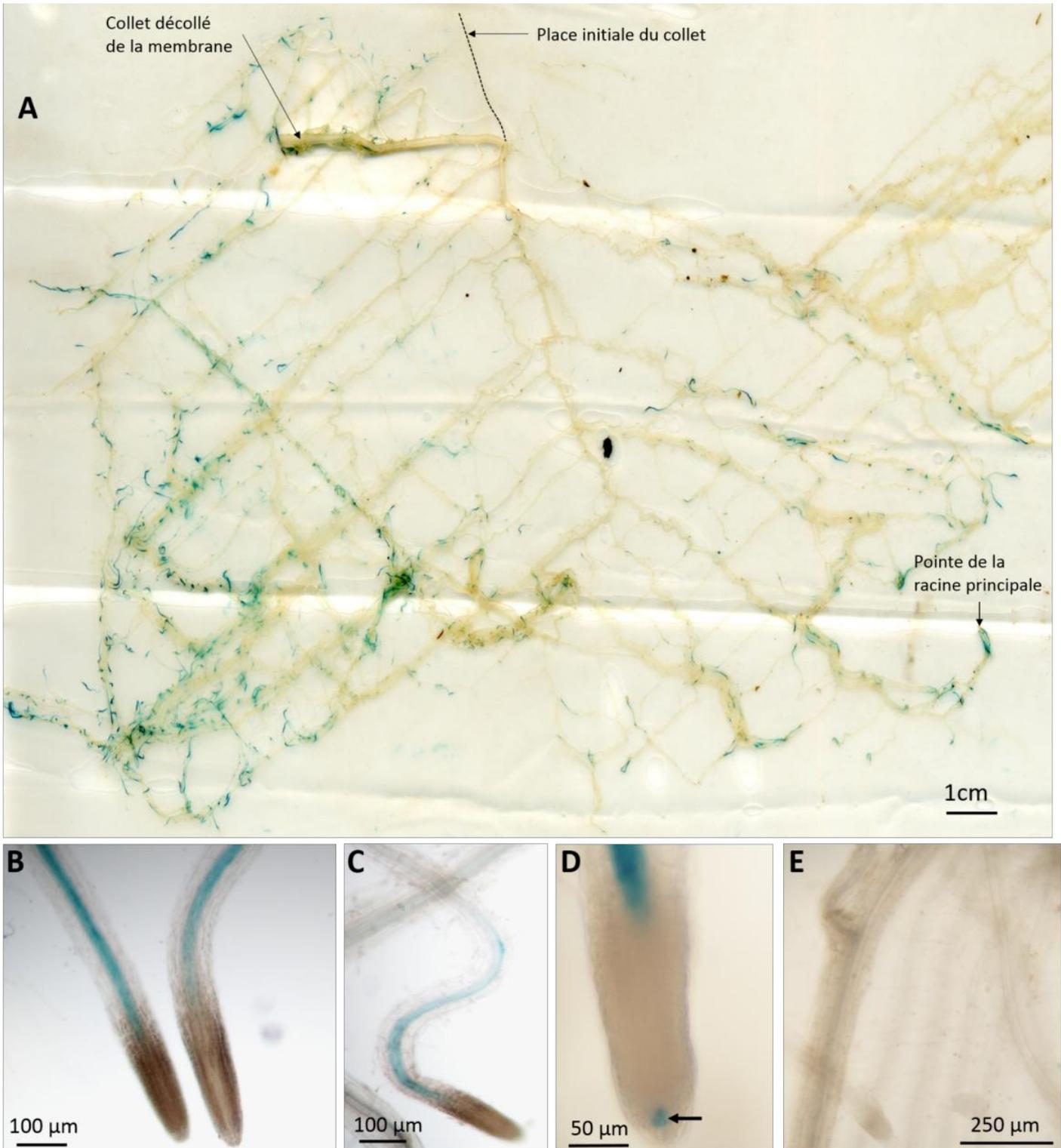


Figure 38. Localisation à l'échelle tissulaire de l'expression dans les racines du gène *AtSUC1* de la lignée SUC1-GUS #7 (*pAtSUC1 ::AtSUC1 ::GUS*).

Vue du système racinaire entier (A), de deux pointes racinaires (B), d'une pointe racinaire (C) et de l'extrémité de la pointe racinaire (D) de la lignée SUC1-GUS#7 après 3h (B, C et D) ou 12h (A) de réaction avec son substrat. E. Vue de racines témoins de lignée Col-0 après 24h de réaction avec le substrat du GUS.

plantes cultivées en condition Tm sont généralement plus importantes dans l'étude menée par Durand *et al.* (2016) que dans celle présentée ici : pour *AtSWEET11*, respectivement, 1400 % et 430,7 % ; pour *AtSWEET12*, respectivement, 75 % et -13,2 % ; pour *AtSWEET13*, respectivement, 283 % et 134,9 % et pour *AtSWEET15*, respectivement, 900 % et 244,9 %. La seule différence d'expression de gènes entre les plantes cultivées en condition St comparées aux plantes cultivées en condition Tm qui est inférieure dans l'étude de Durand *et al.* (2016) comparée à cette étude est pour *AtSWEET14*, dont les différences sont respectivement de 240 % et 510,1 %.

Les niveaux d'expression des gènes codant des transporteurs de saccharose de type SWEET sont toujours bien supérieurs dans les feuilles comparées aux racines. De plus, dans les feuilles comme dans les racines, une augmentation de l'expression des gènes *AtSWEETs* dans les plantes cultivées en conditions St comparées aux plantes cultivées en condition Tm est globalement observée pour tous les gènes (sauf *AtSWEET12* dans les racines). De plus, globalement, les niveaux d'expression des gènes *AtSWEETs* sont comparables entre les plantes de génotype *suc1* et les plantes Col-0.

1.2 Localisation de l'expression du gène et de la protéine

Afin de mieux comprendre le rôle d'*AtSUC1* dans le transport de saccharose dans les racines, la localisation de l'expression du gène et de la protéine a été étudiée dans les racines. En effet, dans les travaux antérieurs aux nôtres, la localisation racinaire de l'expression du gène *AtSUC1* n'a été réalisée que sur des plantules de 2 jours, cultivées *in vitro* (Sivitz *et al.*, 2008). De plus, la localisation racinaire de la protéine n'a jamais été réalisée. Dans notre étude, nous avons choisi d'étudier la localisation de l'expression du gène grâce à des lignées exprimant le gène de la β -glucuronidase (GUS), cultivées 30 jours en rhizobox. Pour préciser la localisation de la protéine, des études d'immunohistochimie ont été réalisées sur des plantes de génotype Col-0 et *suc1* cultivées 30 jours en rhizobox.

1.2.1 Localisation de l'expression du gène *AtSUC1* à l'aide de lignées exprimant le gène de la β -glucuronidase (GUS)

L'analyse des lignées *suc1*-GUS (**Figure 38**) permet d'observer la localisation de l'expression du gène *AtSUC1* par la formation d'un précipité bleu spécifiquement localisé à l'endroit où le gène est exprimé. Ce précipité se forme à l'issue d'une réaction avec son substrat (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-B-D-glucopyranoside). Deux lignées, issues de transformations indépendantes sont disponibles au laboratoire. Dans ces lignées est intégrée la construction composée du promoteur du gène *AtSUC1*, suivi de la séquence nucléotidique complète du gène *AtSUC1* et du gène rapporteur GUS

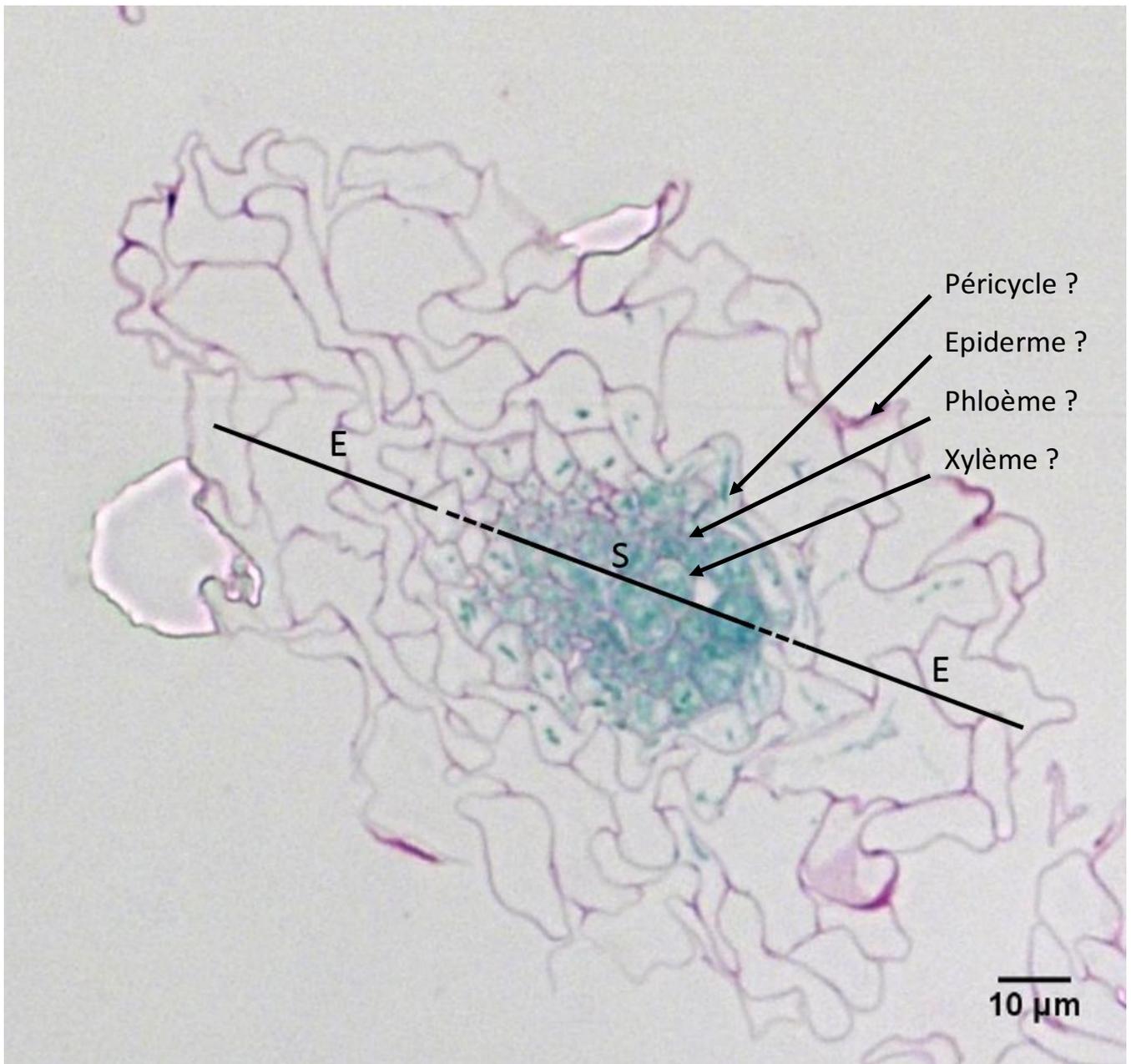


Figure 39. Localisation à l'échelle cellulaire de l'expression du gène *AtSUC1* dans une pointe racinaire de la lignée *SUC1-GUS#7* (*pAtSUC1::AtSUC1::GUS*).

Les racines de plantes de lignées *SUC1-GUS#7* ont été incluses dans une résine après la révélation de la coloration GUS. Ensuite, les coupes transversales des pointes racinaires (épaisseur de 1,5 µm à 1,75 µm) ont été réalisées au microtome et une coloration au réactif de Schiff a été effectuée.

E = Ecorce, S = Stèle (ou cylindre central)

(*pSUC1::SUC1::GUS*). Les deux lignées sont nommées *suc1#7* et *suc1#12*. La présence de la séquence nucléotidique entière du gène est nécessaire (particulièrement le premier intron) puisqu'il a été montré qu'avec le promoteur seul, des différences de localisation d'expression du gène étaient observées (Sivitz *et al.* 2007).

L'observation du système racinaire entier de la lignée *suc1#7* (**Figure 38, A**) montre l'expression d'*AtSUC1* au niveau de toutes les pointes racinaires, que ce soit la pointe de la racine principale, ou celles des racines secondaires ou tertiaires. Cependant, l'observation plus précise des pointes racinaires (**Figure 38, B**) montre que ce ne sont pas les extrémités des pointes racinaires qui sont marquées, mais une zone se terminant à 150 µm de l'extrémité de la pointe racinaire. Le marquage bleu débute à environ 600 à 700 µm de l'extrémité de la pointe de la racine (**Figure 38, C**). Cette zone correspond à une zone de forte activité d'élongation cellulaire (Mullen *et al.*, 1998). Dans certains cas, il est observé un précipité bleu dans une zone au bout de la pointe racinaire (**Figure 38, D**) qui correspondrait au centre quiescent de la pointe. Cette localisation de l'expression d'*AtSUC1* n'a jamais été recensée dans la bibliographie. L'analyse des racines de plantes de lignée *suc1#12* révèle des localisations d'expression du gène *AtSUC1* identiques à celles observées dans la lignée *suc1#7*. La seule différence est le fait que la coloration observée dans le centre quiescent dans les pointes racinaires de la lignée *suc1#7* n'est jamais retrouvée dans les pointes racinaires de la lignée *suc1#12*. Enfin, un contrôle de génotype Col-0 n'exprimant pas GUS a été réalisé et ne présente pas de marquage bleu même après 24h d'incubation (**Figure 38, E**).

L'expression d'*AtSUC1* serait donc localisée dans une zone de forte activité d'élongation cellulaire entre 150 µm et 600-700 µm de l'extrémité de toutes les pointes racinaires et dans certains cas dans le centre quiescent de pointes racinaires.

Pour aller plus loin dans la localisation de l'expression du gène *AtSUC1* grâce aux lignées GUS, des coupes transversales ont été réalisées sur les pointes de racines de lignée *suc1#7* (**Figure 39**). Les formes de la coupe de la racine et des cellules la constituant sont peu régulières. D'autres échantillons ayant subi les mêmes protocoles de révélation GUS et d'inclusion en résine ont des formes beaucoup plus régulières (racines et cellules arrondies). La différence entre ces échantillons est leur système de culture : les coupes aux formes irrégulières (ceux de cette étude) proviennent de plantes cultivées en rhizobox alors que les échantillons présentant des formes plus régulières sont issus de culture *in vitro*. La pression exercée par le système de culture en rhizobox sur les racines pourrait, peut-être, expliquer la différence de formes cellulaires. La coupe présentée (**Figure 39**) révèle une coloration localisée au centre de la racine, ce qui correspondrait au cylindre central, cependant le type cellulaire exact est difficile à définir à cause de la forme irrégulière des coupes.

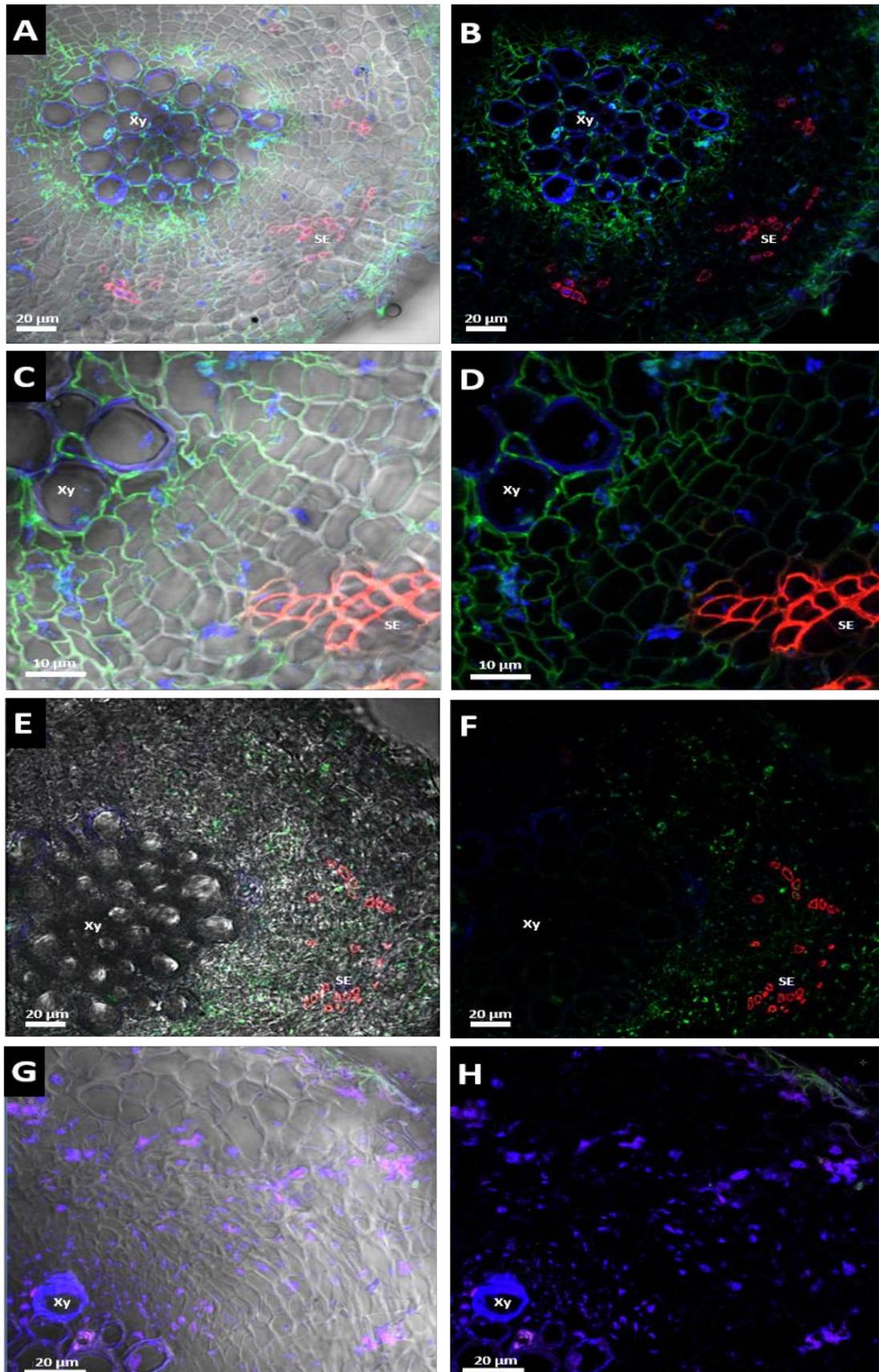


Figure 40. Localisation à l'échelle cellulaire de la protéine AtSUC1 dans les racines par immunohistochimie.

Coupes transversales de racines réalisées à quelques cm sous le collet de plantes Col-0 (**A, B, C, D, G et H**) ou du mutant *suc1* (**E et F**) observées au microscope confocal après immunomarquage. Les images **A, C, E et G** correspondent à la superposition des champs vert, rouge, bleu à l'image obtenue par transmission. Les images **B, D, F et H** correspondent à la même superposition d'image sans la transmission. Les couples d'anticorps utilisés sont : Anticorps anti-SUC1/Alexa 488 (apparaissant en vert) et Anti-RS6/Alexa 555 (apparaissant en rouge). Ce deuxième couple permet de localiser les cellules du tube criblé (SE). La couleur bleue correspond à l'autofluorescence dans le rouge lointain et permet de visualiser les cellules du xylème (Xy).

1.2.2 Localisation de la protéine AtSUC1 par immunohistochimie

Au laboratoire, quatre anticorps anti-SUC1 sont disponibles depuis peu de temps. Des western-blots ont été réalisés sur des fractions microsomales de racines et de feuilles de plantes de génotypes Col-0 et *suc1* pour tester la spécificité des anticorps mais aucune conclusion n'a pu être tirée des résultats, peut-être à cause du manque de quantité de la protéine ciblée dans nos échantillons (Stage Master 2 Esteban Trestard). La production de la protéine en levure est en cours pour obtenir de plus grandes quantités de protéines afin de valider la spécificité des anticorps. Etant en fin de thèse, nous avons profité du fait que des expérimentations d'immunohistochimie sur la protéine AtSUC2 étaient en cours pour faire des immunolocalisations sur AtSUC1 de manière exploratoire. Un anticorps a été choisi arbitrairement parmi les quatre pour réaliser des expérimentations d'immunohistochimie. Les résultats demandent donc à être confirmés.

Le principe de l'immunolocalisation par fluorescence est de permettre d'observer, par microscopie confocale, la localisation spécifique d'une protéine dans un tissu. Les anticorps primaires vont alors reconnaître les sites antigéniques de la protéine. Ils vont être ensuite reconnus par un anticorps secondaire conjugué à un fluorochrome qui, lorsqu'il sera excité, émettra un signal fluorescent qui indiquera la localisation de la protéine.

La localisation de la protéine AtSUC1 par immunohistochimie (**Figure 40**) est réalisée sur des coupes transversales de racines de génotype Col-0 et de mutant KO *suc1* d'*Arabidopsis thaliana* cultivées en rhizobox, âgées de 30 jours, à l'aide d'une co-localisation avec les éléments du tube criblé et observée au microscope confocal.

Un premier couple d'anticorps est composé de l'anticorps polyclonal de lapin primaire P2A1, il est reconnu par un anticorps secondaire GAR 488 (excitation à 488 nm / émission à 520 nm). Ainsi le signal correspondant à la protéine AtSUC1 apparaît en vert. Un second anticorps (monoclonal murin), ciblant les éléments du tube criblé (anti-RS6, Khan *et al.*, 2007) est utilisé comme marqueur des cellules du tube criblé. Cet anticorps est couplé à un anticorps secondaire GAM 555 (excitation à 543 nm /émission à 603 nm) dont le signal apparaîtra en rouge. Le signal bleu correspond à de l'autofluorescence dans le rouge lointain et permet de visualiser le contour de certaines cellules.

Au niveau des racines de plantes de génotype Col-0 (**Figure 40, A, B, C et D**), les résultats montrent bien la présence des tubes criblés (en rouge) et un signal vert (correspondant à l'anticorps anti-SUC1) est visible principalement autour des cellules du xylème et dans l'épiderme. Le marquage vert proche des vaisseaux du xylème délimite parfaitement le contour des cellules, comme attendu

d'une protéine décrite comme membranaire (Sauer et Stolz, 1994). En revanche, le signal vert au niveau de l'épiderme est plus diffus et semble être potentiellement un signal aspécifique.

Dans les coupes de racines de plantes mutantes *suc1* (**Figure 40, E et F**), le signal rouge marquant la présence des tubes criblés est bien visible mais le marquage vert est faible, diffus et complètement absent autour des cellules du xylème. De plus, ce signal ne semble pas marquer la membrane plasmique des cellules. Le signal vert visible serait alors un signal non spécifique.

Enfin, un témoin a été réalisé en omettant les anticorps primaires lors de la préparation des échantillons, afin de vérifier l'autofluorescence basale des coupes et la spécificité des anticorps secondaires (**Figure 40, G et H**). Aucune fluorescence verte ou rouge n'est retrouvée, indiquant que les anticorps secondaires sont bien spécifiques de l'anticorps primaire et ne se fixent pas naturellement sur les coupes.

En résumé, bien que ce ne soient que des expériences préliminaires, les résultats d'immunohistochimie tendent à montrer que la localisation d'AtSUC1 serait au niveau du cylindre central, proche des cellules du xylème. Ceci est soutenu par les résultats obtenus sur les coupes transversales des racines de lignées GUS, qui montrent une localisation de l'expression du gène dans le cylindre central.

2 Discussion

AtSUC1 étant le gène codant un transporteur de saccharose le plus exprimé dans les racines (Durand *et al.*, 2016) et sa fonction n'y étant pas encore élucidée, nous nous sommes attachés à étudier le rôle et la localisation du gène et de la protéine AtSUC1 dans cet organe. Une forte répression de l'expression du gène *AtSUC1* a été observée en condition de carence hydrique (Durand *et al.*, 2016). C'est pourquoi l'étude de plantes mutante KO *suc1* comparées à des plantes sauvages Col-0 a été réalisée dans deux conditions hydriques différentes : en condition hydrique témoin (Tm) dans laquelle la terre est à 100 % de la capacité au champ et en condition de carence hydrique (St) dans laquelle la terre est à 50 % de la capacité au champ. L'expression du gène a été localisée grâce à l'étude de lignées exprimant la β -glucuronidase sous le contrôle du promoteur du gène *AtSUC1*. De plus, la localisation de la protéine a été réalisée grâce à des expérimentations d'immunohistochimie avec des anticorps spécifiques, sur des plantes de génotype Col-0 et *suc1*. En effet, seule la localisation de l'expression du gène sur des racines de plantules ou sur des organes floraux avait été réalisée pour *AtSUC1* grâce au gène rapporteur *GUS* (Stadler *et al.*, 1999 ; Sivitz *et al.*, 2008). Les résultats précédemment présentés

vont être ici discutés et recoupés entre eux afin de faire ressortir les rôles potentiels de la protéine AtSUC1.

2.1 Impact de la carence hydrique sur Col-0 : comparaison 2018 vs 2016

Les conditions de culture de cette expérimentation (« étude 2018 ») ont notamment été choisies pour être proches de celles appliquées dans les travaux présentés par Durand *et al.* (2016 ; « étude 2016 ») afin d'avoir une référence à laquelle comparer nos résultats. Toutefois, des différences de résultats sont observées entre les deux études. Ces différences peuvent en partie s'expliquer par une carence hydrique légèrement supérieure dans notre étude en comparaison avec celle de Durand *et al.* (2016). En effet, des différences de teneur en eau (W.C.) ont été observées entre les plantes Col-0 cultivées en condition Tm et St, supérieures dans l'étude 2018 (**Figure 25**) par rapport à celles de l'étude 2016. Cette variation de teneur en eau dans les plantes reflétant une carence hydrique plus importante n'est pas retrouvée au niveau de la variation de l'expression du gène marqueur de la carence hydrique des feuilles *AtRD29a* (**Figure 26, A**). Cependant, l'expression du gène *AtTIP1.2*, marqueur de la carence hydrique des racines, présente une répression légèrement plus marquée en 2018 (**Figure 26, B**) qu'en 2016, indiquant une perception de la carence hydrique plus marquée dans cet organe. Il est à noter que lors de nos expérimentations les carences hydriques appliquées sont modérées (Durand *et al.*, 2016) et leur impact au niveau moléculaire sont similaires. Toutefois, les variations du contenu en eau mesuré au niveau des plantes de 2018 (comparées à celles de 2016) ont un impact plus marqué sur le phénotype des plantes. En effet, les plantes présentent une diminution plus importante des masses des feuilles et des racines par la carence hydrique dans l'étude 2018 (**Figure 28**) que dans l'étude 2016. De même, la réduction de la surface foliaire et du nombre de feuilles par rosette (**Figure 29**) en carence hydrique est plus importante dans l'étude 2018. Ces différences entre les deux études pourraient être dues au changement de terreau. En effet, lors des expérimentations sur AtSUC1 (étude 2018) un nouveau terreau a été utilisé (« 276-BP 4 Argile », Klasmann). Aux cours de l'expérience nous nous sommes rendu compte (visuellement) qu'une moins bonne répartition de l'eau dans la rhizobox s'effectuait avec ce terreau comparé à l'ancien (« LP502 », Peltracom). De plus, le nouveau terreau séchait plus rapidement en surface à cause d'une composition qui différente. Néanmoins, les résultats sur le phénotype des plantes sont ceux attendus suite à l'application d'une carence hydrique modérée.

Les carences hydriques de 2016 et 2018 ont eu un impact comparable sur l'expression des gènes marqueurs de la photosynthèse étudiés *AtRBCS* et *AtCAB1* (**Figure 35**), avec une faible réduction de l'expression d'*AtRBCS* en condition de carence hydrique alors que l'expression d'*AtCAB1* reste constante. La diminution de l'expression du gène *AtRBCS* en condition de carence hydrique a déjà été

observée dans *Nicotiana tabacum* (Kawaguchi *et al.*, 2003) et dans *Solanum lycopersicum* (Bartholomew *et al.*, 1991). Au niveau des teneurs en sucres solubles, une différence peut être notée au niveau des feuilles entre les 2 études. En 2018, il n'y a pas d'augmentation de saccharose en condition St (**Figure 31, A**) contrairement à 2016 et une plus faible augmentation des teneurs en glucose est aussi notée pour 2018 (**Figure 31, B**). En revanche, les teneurs en amidon ont diminué plus faiblement en condition St en 2018 (**Figure 31, D**) ce qui peut être cohérent avec des teneurs en sucres solubles plus faibles dans les feuilles. Au niveau des racines, les teneurs de chacun des sucres solubles ont augmenté en condition St pour les deux expérimentations (**Figure 32**, voir aussi Hummel *et al.*, 2010), avec une augmentation plus marquée en 2016, liée à des teneurs initiales plus faibles en condition Tm.

Au niveau de l'expression des gènes de transporteurs de saccharose dans les feuilles (**Figures 36, A et 37, A**), les deux études indiquent une augmentation de l'expression d'*AtSUC2* et de tous les *AtSWEETs* exprimés dans les feuilles (*AtSWEET11, 12, 13* et *15*) en réponse à la carence hydrique, avec cependant une différence plus marquée en 2016 qu'en 2018. De plus, l'expression d'*AtSUC5* n'est pas retrouvée dans notre étude mais son expression était faible dans l'étude de 2016. Dans les racines (**Figures 36, B et 37, B**), la carence hydrique entraîne une répression d'*AtSUC1* (Durand *et al.*, 2016 ; voir aussi Xu *et al.*, 2018) et une augmentation de l'expression d'*AtSUC2* et *AtSUC4* (Durand *et al.*, 2016) dans les deux études avec une différence plus marquée en 2016 qu'en 2018. Concernant les gènes *AtSWEETs*, contrairement à 2016 où les 5 *AtSWEETs* retrouvés exprimés dans la racine (*AtSWEET11* à *15*) voyaient leur expression augmenter, seuls 4 d'entre eux (*AtSWEET11, 13, 14* et *15*) présentent une augmentation de leur expression (2018).

Bien que l'expression des gènes codant des transporteurs de saccharose de type *AtSWEETs* ne soit pas très élevée dans les racines, et qu'il n'y ait pas de différence notable d'expression de ces gènes entre les plantes de génotypes Col-0 et *suc1*, le gène *AtSWEET11* est particulièrement surexprimé en carence hydrique dans les feuilles (**Figure 37, A**) et dans les racines (**Figure 37, B**). L'expression d'*AtSWEET11* a été localisée au niveau du xylème, dans les hampes florales avec un rôle potentiel dans la redistribution des sucres entre les cellules (Le Hir *et al.*, 2015, Durand *et al.*, 2018). Si ce gène a le même rôle dans les racines que dans les hampes, alors il y a peut-être un lien avec le rôle potentiel d'*AtSUC1* dans la redistribution du carbone entre les cellules. Ce lien peut être une complémentarité de fonction, les deux protéines redistribuant les sucres de manière passive pour l'une et active pour la seconde, comme dans les feuilles lors du chargement du phloème (Chen *et al.*, 2012). La protéine *AtSWEET11* permettrait l'export du saccharose vers l'apoplasme et la protéine *AtSUC1* transporterait le saccharose de l'apoplasme vers des cellules du parenchyme.

Bien que l'ensemble des résultats obtenus sur les paramètres mesurés lors des deux campagnes d'expérimentation (2016, 2018) sont proches et reflètent la perception d'une carence hydrique modérée par les plantes, les différences notées sont probablement liées à l'application du stress hydrique ainsi qu'à la différence de développement des plantes entre les deux études. En effet, l'utilisation du nouveau terreau en 2018 a montré une moins bonne répartition de l'eau ainsi qu'un assèchement plus rapide par rapport aux expérimentations de Durand *et al.* (2016). La composition légèrement différente des deux terreaux semble en être la raison et laisse penser qu'en 2018, le déficit hydrique subi par les plantes s'est établi plus rapidement (WC plus faibles mesurés dans ces plantes). De plus, en conditions Tm comme en conditions St, les plantes de 2018 ont des tailles inférieures à celles de 2016 (masses des feuilles et des racines, surfaces foliaires, nombre de feuilles par rosette et longueur de la racine principale). Ces plantes plus petites pourraient donc avoir été plus sensibles à la carence hydrique ce qui aurait engendré une réponse légèrement différente. Cette comparaison met en évidence l'importance du support de culture. Pour les expérimentations suivantes (chapitre suivant), nous sommes revenus au terreau utilisé précédemment.

2.2 Etude du mutant *suc1* en condition hydrique témoin

2.2.1 Suivi de la germination des plantes KO *suc1*

Les tests de germination *in vitro* sur des graines de plantes mutante KO *suc1* ont montré un taux de germination plus faible à 3 et 8 JAS pour les graines issues de plantes *suc1* que pour les graines issues de plantes Col-0 (**Figure 27**), confirmant les résultats de Sivitz *et al.* (2008). Ce taux de germination plus faible peut être lié à une mauvaise imbibition de la graine ou un manque de réserves de la graine, entraînant un retard de son développement. La mutation d'*AtSUC1* pourrait être donc liée à une ou à ces deux évènements. En effet, pour que les graines germent, la radicule doit croître suffisamment pour percer l'albumen et le tégument qui l'entourent (Müller *et al.*, 2006). Une accumulation de saccharose, ensuite clivé en hexoses permettrait un influx d'eau dans les cellules de la radicule, augmentant la pression de turgescence nécessaire à l'expansion cellulaire (Kutschera et Niklas, 2013) et donc à la croissance de la radicule, ce qui entrainerait la percée de l'albumen par la radicule. *AtSUC1* pourrait avoir un rôle à ce niveau en participant au chargement en saccharose des zones de croissance de la radicule. Inversement, la mutation d'*AtSUC1* entrainerait une limitation du chargement en saccharose de ces zones de croissance et limiterait l'influx d'eau et donc la capacité de la radicule à percer l'albumen, réduisant par conséquent la capacité germinative des graines issues de plantes de génotype mutant KO *suc1*. Cette hypothèse est soutenue par le fait qu'*AtSUC1* a déjà été montré comme impliqué dans la croissance du tube pollinique (Stadler *et al.*, 1999).

La diminution de la capacité germinative des graines peut aussi provenir de réserves moins importantes que les graines issues de plantes Col-0. AtSUC1 pourrait donc avoir un rôle dans le chargement en sucres des graines lors de leur maturation, puisque que le gène *AtSUC1* est fortement exprimé dans les siliques à différents stades (Durand *et al.*, 2018). Pour vérifier l'implication d'AtSUC1 dans la germination des graines il serait intéressant de comparer le poids des graines Col-0 aux poids des graines *suc1*, voire de comparer leurs teneurs en réserves (lipides, protéines, sucres). La mesure du nombre de graines par siliques serait aussi intéressante à réaliser sur des plantes Col-0 et *suc1*, afin de déterminer s'il n'y a pas des problèmes de formation des graines chez le mutant *suc1*. En effet, la mutation d'*AtSUC1* entraîne une diminution de la capacité germinative du grain de pollen, ce qui a pour impact de réduire la fécondation et probablement le nombre de graines dans les siliques (Sivitz *et al.*, 2008).

Toutefois, des expérimentations préliminaires, non présentées ici, (réalisées sur 10 plantes par condition) tendent à montrer que les différences de surface foliaire, du nombre de feuilles par rosette et de longueur de la racine principale entre les plantes Col-0 et les plantes *suc1* sont plus faibles à 30 JAS qu'à 10 ou 12 JAS. Ces résultats semblent indiquer une reprise rapide de la croissance 12 jours après la germination, et donc que le retard de croissance dû au retard de germination des graines de lignée *suc1* s'estompe avec le temps. Il serait intéressant de reprendre l'étude d'AtSUC1 en réalisant une cinétique et des observations à différents stades de développement des plantes notamment dans les 15 premiers jours de développement.

Néanmoins, le protocole expérimental de culture de plantes en rhizobox permet de réduire l'impact des différences de germination entre Col-0 et *suc1*. En effet, plusieurs graines sont semées en même temps pour chaque emplacement de semis et 4 JAS, la plantule la plus grande est conservée pour toute l'expérimentation. Pour chaque rhizobox les plantules conservées ont une taille comparable pour chaque emplacement.

2.2.2 Suivi du développement du mutant *suc1*

L'étude du phénotype du mutant *suc1* indique que les valeurs de masses sèches dans les feuilles et les racines sont proches de celles mesurées dans les plantes Col-0, et par conséquent les valeurs du ratio R/S sont similaires (**Figure 28**). En revanche, les mesures des surfaces foliaires et du nombre de feuilles par rosette montrent que ces deux paramètres sont inférieurs pour le mutant *suc1* (**Figure 29, A et B**). De plus, les résultats indiquent que la longueur de la racine principale est inférieure pour le mutant *suc1* (**Figure 30**). Ces résultats semblent donc indiquer que les plantes qui portent la mutation *suc1* sont plus petites que les plantes Col-0. Cependant, le calcul du rapport des masses

sèches des feuilles sur la surface foliaire projetée (**Figure 29, C**) montre qu'il est légèrement plus important dans les feuilles du mutant *suc1* comparé à Col-0, indiquant que pour une même unité de surface, les feuilles du mutant *suc1* sont plus lourdes que celles des plantes Col-0. Ceci pourrait expliquer pourquoi les plantes *suc1*, de plus petite taille que celles Col-0, ont une masse équivalente à celle des plantes Col-0 et présenteraient donc une épaisseur ou une densité des tissus foliaires ou des parois cellulaires plus importantes. La réalisation de coupes des feuilles des deux lignées pourrait être envisagée afin de vérifier cette hypothèse. Des coupes ont été réalisées au cours de cette thèse mais l'absence de précision de l'orientation des zones coupées n'a pas permis leur exploitation. Il est nécessaire en effet, d'observer des coupes réalisées dans la même zone de la feuille pour l'étude de ses tissus. De plus, il serait intéressant d'étudier l'intégralité du système racinaire afin de connaître le nombre de racines latérales ou la surface de sol occupée par la racine, ce qui permettrait éventuellement de relever des différences entre les deux génotypes.

En parallèle du phénotype des plantes, le dosage des sucres solubles et de l'amidon, impliqués dans le développement des plantes a été réalisé. Les résultats indiquent que dans les feuilles (**Figure 31**), les teneurs en chacun des sucres sont équivalentes dans les plantes des deux génotypes. De plus, dans les racines (**Figure 32**), aucune différence n'a été relevée dans les teneurs en sucre pour les deux génotypes. De même, aucune différence n'a été notée dans le transport du carbone des feuilles sources vers les racines (**Figure 34**) ainsi que dans l'expression des principaux transporteurs de saccharose identifiés dans les feuilles et les racines (**Figures 36 et 37**) entre les deux génotypes. Par conséquent, la différence de taille de plantes entre *suc1* et Co-0 ne semble liée ni à un manque de ressources carbonées pour son développement ni à une mauvaise répartition des assimilats.

Ces résultats semblent indiquer qu'en condition témoin la mutation *suc1* a un impact sur le développement global de la plante, un moins bon développement des racines observé ici pouvant impacter le développement de la rosette et son nombre de feuilles. En effet, les mutants *suc1* présentant un moins bon développement du système racinaire pourraient avoir une moins bonne efficacité dans l'absorption de l'eau et des sels minéraux entraînant un développement réduit de la partie foliaire (Cosgrove, 2005). Il n'est pas à exclure que cette différence de taille soit liée au retard de développement engendré par une moins bonne efficacité de germination des graines *suc1*. Même si les semis sont homogénéisés dans chacune des rhizobox, une différence peut subsister entre les plantes des rhizobox qui ont servi à mesurer les paramètres.

2.2.3 Localisation de l'expression d'*AtSUC1* et de la protéine AtSUC1

Nos travaux ont mis en évidence que le gène codant AtSUC1 est le plus exprimé dans la racine (**Figure 36** et Durand *et al.* (2016)). L'étude de sa localisation est alors une étape importante dans la compréhension de son rôle dans la racine d'*Arabidopsis thaliana*. Nos résultats mettent en évidence une expression d'*AtSUC1* localisée dans des régions à forte croissance cellulaire au-dessus de la zone méristématique des pointes racinaires (**Figure 38, B et C**), identifiée comme étant la zone d'élongation des racines (Mullen *et al.*, 1998). Cette localisation est cohérente avec celle observées dans les racines par Sivitz *et al.* (2008) sur des plantules de 2 jours, cultivées *in vitro*. De plus, AtSUC1 a déjà été montré comme impliqué dans la régulation de la croissance dans un autre organe à forte croissance cellulaire, le tube pollinique (Stadler *et al.*, 1999).

Par ailleurs, nos travaux ont permis de mettre en évidence une nouvelle localisation de l'expression d'*AtSUC1* qui a été retrouvée dans le centre quiescent (**Figure 38, D**). Cette nouvelle localisation peut être expliquée par le fait que c'est la première fois que ce genre d'analyse GUS sur *AtSUC1* est réalisée sur des plantes de 30 jours cultivées en terre. En effet, les précédentes expérimentations de localisation de l'expression d'*AtSUC1* grâce au gène rapporteur GUS ont été réalisés sur des plantules cultivées *in vitro* (Sivitz *et al.*, 2008). Toutefois, le fait d'avoir observé cette localisation sur une seule des deux lignées GUS peut signifier que cette localisation est dépendante de l'endroit où le T-DNA s'est inséré et peut ne pas être liée à l'expression du promoteur d'*AtSUC1*. Le centre quiescent est une zone sans division cellulaire, située entre la coiffe et le méristème dont les cellules peuvent devenir méristématiques (Clowes, 1958). La forte présence d'un transporteur de saccharose y est peu logique, car ces cellules ne nécessitent pas ou peu de sucres, sauf s'il a un rôle dans la signalisation glucidique sur les cellules du méristème adjacent, qui elles ont une forte activité mitotique. En effet, il a été montré dans des embryons de *Vicia faba* que la signalisation glucidique était impliquée dans l'activité mitotique (Rolland *et al.*, 2002). La localisation de l'expression d'*AtSUC1* dans le centre quiescent pourrait donc être aussi en faveur de l'hypothèse du rôle d'AtSUC1 dans la signalisation glucidique (Sivitz *et al.*, 2008). En effet, la protéine pourrait faire varier les flux de saccharose qui régulent l'activité mitotique du méristème adjacent au centre quiescent. Néanmoins, il paraît nécessaire de réitérer ces analyses sur un plus grand nombre de plantes ou sur d'autres lignées SUC1-GUS afin de vérifier que cette localisation dans le centre quiescent n'est pas dépendante de la zone d'insertion du T-DNA ou un artefact de coloration.

A partir de ces lignées SUC1-GUS, des coupes transversales ont été réalisées afin d'affiner la localisation d'AtSUC1 au niveau cellulaire. Ces observations (**Figure 39**) montrent que l'expression du gène est localisée au niveau du cylindre central. Le type cellulaire exact est difficile à définir pour deux raisons. La première est la forme particulière des cellules dans cette coupe, qui empêche d'identifier

certain types cellulaires. La seconde raison est la diffusion possible de la coloration bleue aux cellules adjacentes à celles présentant la coloration originale. En effet, lors de la division cellulaire, la β -glucuronidase qui est une protéine stable (Jefferson *et al.*, 1987) peut se retrouver dans les deux cellules filles. Or, ici, la coloration se trouve dans des zones de forte division cellulaire.

C'est pourquoi par la suite, nous avons étudié la localisation de la protéine en réalisant une immunohistochimie avec des anticorps spécifiques. Chez *Col-0*, la protéine semble localisée autour des cellules du xylème, au niveau des membranes plasmiques (**Figure 40, A, B, C et D**) donc dans le cylindre central, ce qui est en accord avec la localisation de l'expression d'*AtSUC1* (**Figure 39**). En revanche, ce marquage n'est pas observé dans le mutant *suc1* (**Figure 40, E et F**) ce qui est cohérent avec le fait que la protéine AtSUC1 n'est pas présente dans un mutant KO, et tend à valider la spécificité de nos anticorps. Afin de véritablement conclure sur la localisation de la protéine AtSUC1, la vérification par western blot de la spécificité des anticorps vis-à-vis de SUC1 est nécessaire. Celle-ci peut s'avérer difficile car il a été remarqué dans la littérature qu'aucun anticorps anti-transporteur de saccharose de type SUC n'avait été vérifié par western blot sur des fractions protéiques d'*Arabidopsis*. Ceci peut, par exemple, venir de la rareté de la protéine dans les fractions. La solution utilisée dans ces cas-là pour vérifier la spécificité des anticorps est de produire la protéine cible dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Sauer et Stolz, 1994 ; Stadler et Sauer, 1996). Ceci est en cours de réalisation. D'autres transporteurs de saccharose ont déjà été localisés au niveau du xylème : AtSWEET11 et 12, dont l'expression est retrouvée autour des cellules du xylème dans les hampes florales d'*Arabidopsis thaliana* (Le Hir *et al.*, 2015). Ces transporteurs assurent un transport passif (Chen *et al.*, 2012), alors qu'AtSUC1 est connu pour réaliser un transport actif (Sauer et Stolz, 1994). Il a été proposé que les transporteurs AtSWEETs localisés dans les hampes florales pouvaient servir à nourrir les cellules autour (Le Hir *et al.*, 2015). Il est possible de supposer qu'AtSUC1 ait un rôle similaire ou un rôle synergique dans la répartition des sucres entre cellules adjacentes.

2.3 Etude du mutant *suc1* lors de la carence hydrique

Comme pour *Col-0*, l'évaluation de la perception de la carence hydrique chez le mutant *suc1* a été réalisée par la mesure des WC dans les feuilles et les racines ainsi qu'en suivant l'expression des deux gènes marqueurs *AtRD29a* et *AtTIP1.2*. Les résultats de teneur en eau dans les feuilles et dans les racines (**Figure 25**) ainsi que les résultats de l'expression du gène de la carence hydrique dans les feuilles *AtRD29a* (**Figure 26, A**) ont permis de montrer que les plantes percevaient bien la carence hydrique, et ce de manière comparable entre les plantes des deux génotypes (*Col-0* et *suc1*). Seule l'expression du gène marqueur de la carence hydrique dans les racines, *AtTIP1.2*, présente des

variations en fonction du génotype (**Figure 26, B**). En effet, ce gène est moins exprimé pour *suc1* en condition Tm (par rapport à Col-0) ce qui semblerait indiquer que les plantes *suc1* cultivées en condition Tm perçoivent une légère carence hydrique. Cependant, ceci ne se reflète pas dans les teneurs en eau des racines, qui ne montrent pas de différence entre les plantes Col-0 et *suc1* cultivées en condition Tm (**Figure 25, B**). La mesure de la teneur en eau est directement révélatrice du statut hydrique de la plante. Cette contradiction dans les résultats peut être liée à un biais expérimental et une nouvelle RT-qPCR serait à réitérer sur plusieurs plantes *suc1*. Elle peut être aussi liée au fait que la mutation du gène *AtSUC1* soit associée à une plus faible expression du gène *AtTIP1.2*, mais la nature de ce lien reste encore à démontrer : soit *AtSUC1* a un impact sur la régulation de l'expression du gène *AtTIP1.2* en réprimant son expression ; soit *AtSUC1* est impliqué dans la signalisation de la réponse à la carence hydrique et la mutation du gène *AtSUC1* pourrait entraîner un signal de carence hydrique perçu au niveau moléculaire qui impacterait négativement l'expression du gène *AtTIP1.2*. Il est à noter qu'*AtTIP1.2* est un marqueur de la carence hydrique et n'a pas forcément une action dans réponse à la carence hydrique. En effet, il a été montré que la mutation du gène n'entraînait pas de phénotype particulier au niveau du statut hydrique ou au niveau de la sénescence (Schüssler *et al.*, 2008).

Au niveau phénotypique, l'impact de la carence hydrique sur le mutant *suc1* est proche de celui observé sur le phénotype sauvage Col-0. En effet, il a été observé une diminution de la taille des rosettes (**Figure 24**) en carence hydrique qui est associée à la diminution de la masse sèche des rosettes (Chaves *et al.*, 2003) pour les deux génotypes (**Figure 28, A**). De même, une diminution de la masse sèche des racines a été observée (**Figure 28, B**), reflétant une diminution de la taille globale des plantes en condition de carence hydrique. L'augmentation du ratio R/S en condition St (**Figure 28, C**) indique que pour les deux génotypes la carence hydrique entraîne une diminution plus importante de la masse des feuilles par rapport à celle des racines (Chaves *et al.*, 2003 ; Durand *et al.*, 2016). Ce résultat est corroboré par une diminution de la surface foliaire et du nombre de feuilles par rosette pour les deux génotypes en condition St (**Figure 29, A et B**). Comme pour Col-0, le calcul du rapport des masses sèches des feuilles et de la surface foliaire projetée pour *suc1* indique que ce dernier est plus important en condition St qu'en condition Tm (**Figure 29, C**). Ceci pourrait indiquer que l'épaisseur ou la densité des tissus foliaires ou des parois cellulaires sont plus importantes en condition St pour les deux génotypes. Cependant, le mutant *suc1* présente des valeurs plus élevées pour cette mesure que Col-0 et ce, dans les deux états hydriques. Les tentatives de comparaison de la structure des feuilles dans les différentes conditions n'a pas donné de résultat pour le moment. De plus, contrairement à Col-0 pour lequel aucune différence dans la longueur de la racine principale n'a été observée entre les deux conditions hydrique étudiées (**Figure 30**), pour *suc1*, une augmentation de cette longueur est à noter en condition de carence hydrique.

L'ensemble de ces résultats indique que l'impact de la carence hydrique sur le phénotype des plantes *suc1* est similaire à celui observé sur les plantes Col-0. De plus, contrairement à la condition Tm, l'absence d'*AtSUC1* en condition St impacte moins le phénotype des plantes mutantes *suc1* (rapport masse sèche sur surface foliaire plus élevée pour *suc1* que pour Col-0 pour les deux conditions). En effet, les différences phénotypiques observées au niveau de la surface foliaire, du nombre de feuilles et la longueur de la racine principale entre Col-0 et *suc1* en condition Tm ne sont plus observées en carence hydrique. Il semblerait donc que l'adaptation des plantes à la carence hydrique ait atténué les différences phénotypiques observées entre les deux génotypes en condition Tm. De plus, des résultats préliminaires, non présentés ici ont montré que les différences phénotypiques les plus marquées avaient été observées dans les 15 premiers jours du développement des plantes (Thomas Roulé, Master 2).

Au-delà de l'aspect phénotypique et en amont de l'activité de transport d'*AtSUC1*, la diminution d'expression d'*AtSUC1* observée dans les plantes Col-0 cultivées en condition St pourrait être mise en relation avec un signal ABA. En effet, en cas de carence hydrique, un fort signal ABA est généré dans les racines (Zhang et Davies, 1989). Ce signal induit l'expression du facteur de transcription ABI5, qui régule négativement l'expression d'*AtSUC1* et dont l'expression co-localise avec celle d'*AtSUC1* (Hoth *et al.*, 2010). D'autre part, il a été montré qu'ABI5 régule négativement la croissance des méristèmes (Yuan *et al.*, 2014 ; Harris, 2015). De plus, l'expression du gène *AtSUC1* a été localisée dans deux régions proches de la zone méristématique : la zone d'élongation des racines (**Figure 38, B**) et le centre quiescent (**Figure 38, D**). Si la protéine est bien présente dans ces zones (à vérifier) alors elle pourrait jouer un rôle sur la croissance des cellules en chargeant le saccharose nécessaire à leur développement et/ou en modulant le signal glucidique par l'action de l'ABA. Le rôle d'*AtSUC1* comme élément important de la signalisation glucidique a déjà été évoqué par Sivitz *et al.* (2008). Ce rôle est possible puisqu'il a été montré auparavant qu'un signal glucidique (augmentation des concentrations locales d'hexoses produits par la dégradation du saccharose) était lié à la croissance racinaire et l'initiation de départ de racines latérales (Freixes *et al.*, 2002). *AtSUC1* pourrait donc participer à l'influx de sucres qui initie le départ de racines latérales, mais aussi dans l'import cellulaire de sucres qui permet l'influx d'eau et la croissance cellulaire, comme dans le tube pollinique.

Le dosage des sucres a été réalisé dans les feuilles et les racines des deux génotypes dans les deux conditions hydriques appliquées. Dans les feuilles, les teneurs en saccharose et en fructose ne varient ni en fonction de la carence hydrique ni en fonction du génotype (**Figure 31, A et C**). En revanche, les teneurs en glucose, dont les valeurs sont proches entre Col-0 et *suc1* en condition Tm (**Figure 31, B**), augmentent en condition St (par rapport à la condition Tm) de manière plus importante dans les plantes *suc1* par rapport à Col-0. Les teneurs en amidon sont équivalentes entre les plantes

Col-0 et *suc1* en condition Tm (**Figure 31, D**) et diminuent en condition St par rapport à la condition Tm pour Col-0 mais ce résultat n'est pas observé pour *suc1*. Pour les plantes *suc1* la carence hydrique ne modifie pas la teneur en amidon. L'augmentation du glucose en réponse à la carence hydrique est une réponse déjà connue dans les plantes (Hummel *et al.*, 2010 ; Medici *et al.*, 2014 ; Durand *et al.*, 2016). En effet, l'accumulation de glucose observée en réponse à la carence hydrique peut être utile pour maintenir la croissance foliaire et l'ajustement osmotique (Hummel *et al.*, 2010 ; Durand *et al.*, 2016). De plus, l'accumulation de glucose dans les feuilles régule négativement l'activité photosynthétique qui est corrélée avec la réduction de l'expression du gène marqueur de la photosynthèse *AtRBCS* (**Figure 35**) et du rapport entre la radioactivité dans les feuilles et la masse foliaire (**Figure 34, A**), révélateur de l'assimilation du carbone par les feuilles. La réduction de l'expression d'*AtRBCS* en condition de carence hydrique est connue (Kawaguchi *et al.*, 2003 ; Bartholomew *et al.*, 1991). De plus, cette diminution est similaire entre les plantes des deux génotypes. L'expression du gène marqueur de la photosynthèse *AtCAB1* n'est pas impactée par la carence hydrique (**Figure 35**), comme observé dans l'étude de Durand *et al.* (2016), ni dans les plantes Col-0 ni dans les plantes *suc1*. La diminution potentielle de l'activité photosynthétique peut être liée à la diminution de la taille des plantes (masses des feuilles et des racines) en condition St (Muller *et al.*, 2011). D'autre part, pour les plantes Col-0, l'augmentation de glucose (**Figure 31, B**) est liée à une diminution de la teneur en amidon dans les feuilles (**Figure 31, D**) comme observé ailleurs (Chaves *et al.*, 2003 ; Durand *et al.*, 2016). En revanche, pour le mutant *suc1*, l'accumulation de glucose dans les feuilles plus importante que celle des plantes Col-0 n'est pas liée à une diminution de la teneur en amidon, qui est proche de celle observée en condition Tm. Ceci indique que les réserves en amidon sont comparables à celles des témoins. Ceci peut être expliqué par deux phénomènes. La mutation d'*AtSUC1* pourrait favoriser la synthèse d'amidon et son accumulation dans les feuilles. Une autre hypothèse serait que le mutant *suc1* accumule de l'amidon dans les feuilles du fait d'une réduction du transport des assimilats des feuilles vers les racines. En effet, l'expérience de transport à longue distance de CO₂ radiomarqué indique que, bien que ce transport soit connu pour être augmenté en carence hydrique (Durand *et al.*, 2016), que pour le mutant *suc1*, ce transport est moins augmenté que celui observé chez Col-0 (**Figure 34, C**). De plus, ce résultat est soutenu par l'étude de l'expression des transporteurs de saccharose de la famille des *AtSUCs* et *AtSWEETs* identifiés dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* (Durand *et al.*, 2016 ; Durand *et al.*, 2018). En effet, nos résultats indiquent une augmentation de l'expression des gènes *AtSUC2*, *AtSWEET11* et *AtSWEET12* dans les deux génotypes en réponse à la carence hydrique (**Figures 36, A et 37, A**). L'augmentation de l'expression de ces trois gènes impliqués dans le chargement du phloème a déjà été mise en évidence dans des travaux antérieurs, suggérant leur rôle dans l'augmentation du flux de carbone en réponse à la carence hydrique (Dasgupta *et al.*, 2014 ; Durand *et al.*, 2016) mais l'augmentation de *SUC2* (principal

transporteur impliqué dans le chargement phloémien du saccharose) est moins importante dans le mutant *suc1*, en accord avec notre hypothèse. De plus, dans les deux génotypes il est observé une augmentation de l'expression du gène *AtSWEET15* dans les feuilles en condition de carence hydrique (**Figure 37, A**). Ceci est à mettre en parallèle avec des travaux suggérant le rôle d'*AtSWEET15* en réponse à une carence hydrique modérée, ayant un rôle potentiel de redistribution des sucres dans la plante. Par ailleurs, des travaux précédents ont suggéré son rôle au cours de la sénescence (Seo *et al.*, 2011). Il ne peut être exclu que l'application de la carence hydrique ait entraîné une accélération de la sénescence qui s'accompagne de l'augmentation des sucres dans les feuilles (**Figure 31**) observée dans notre étude (Quirino *et al.*, 2001 ; Pourtau *et al.*, 2006). La mutation d'*AtSUC1* n'a pas entraîné de modification de l'expression d'autres transporteurs de saccharose identifiés dans les feuilles chez *Arabidopsis thaliana* (*AtSUC3*, *AtSUC4*, *AtSWEET13*), ni d'induction d'autres transporteurs de saccharose (*SUC* ou *SWEET*).

Dans les racines, les teneurs en saccharose, glucose et fructose sont proches entre les plantes Col-0 et *suc1* (**Figure 31**). De plus, une augmentation similaire de ces teneurs est observée en condition de carence hydrique (par rapport à la condition Tm) pour les plantes Col-0 et les plantes *suc1*. Cette augmentation de sucres solubles dans les racines est probablement liée à l'augmentation du transport du carbone des feuilles vers les racines (**Figure 34, C**) assurant des teneurs en ressources carbonées nécessaires au métabolisme de la racine (Lambers *et al.*, 1996). Ces données sont à rapprocher de résultats d'études précédentes (Hummel *et al.*, 2010 ; Durand *et al.*, 2016). Cette augmentation du flux de carbone des feuilles vers les racines en réponse à la carence hydrique s'accompagne de l'augmentation de l'expression d'*AtSUC2* dans les racines (**Figure 36, B**) dont le rôle dans le déchargement du phloème dans les organes puits a été déjà évoqué (Truernit et Sauer, 1995 ; Carpaneto *et al.*, 2005). L'augmentation de l'expression d'*AtSUC2* s'accompagne d'une augmentation de l'expression d'*AtSWEET11*, et dans une moindre mesure d'*AtSWEET13*, *14* et *15* (**Figure 37, B**). Ceci laisse penser qu'il existe une co-régulation entre *AtSUC2* et ces quatre *AtSWEETs*, même si l'expression de ces derniers reste faible dans la racine. En effet, en réponse à une carence hydrique modérée, ces gènes sont induits (Durand *et al.*, 2016) mais lors d'un stress osmotique sévère au PEG, les *AtSWEETs* sont réprimés au même titre qu'*AtSUC2* (Durand *et al.*, 2018).

L'apport soutenu en sucres dans les racines peut expliquer le maintien de la croissance de la racine principale pour les deux génotypes en condition hydrique (**Figure 30**). Il a déjà été montré que la carence hydrique impactait peu la croissance de la racine principale chez *Arabidopsis thaliana* (Van der Weele *et al.*, 2000, Durand *et al.*, 2016), ceci peut être interprété comme une stratégie pour favoriser l'exploration du sol par les racines et atteindre des zones plus humides du sol. De plus, il n'est pas à exclure que l'accumulation de sucres dans les racines en carence hydrique soit impliquée dans le

maintien de la pression osmotique afin d'assurer le flux d'eau dans la plante (Nicolas *et al.*, 1985). Les résultats indiquent aussi que le pourcentage de radioactivité retrouvé dans les racines du mutant *suc1* est inférieur à celui retrouvée dans les racines de Col-0 (**Figure 34, B**) et s'accompagne d'une expression légèrement plus faible d'*AtSUC2* dans les racines du mutant *suc1* par rapport à Col-0 (**Figure 36, B**). Une autre hypothèse serait que cette différence soit liée à l'absence de l'expression d'*AtSUC1* dans les racines entraînant une moins bonne accumulation de carbone dans les tissus racinaires (**Figure 34, B**). Cependant, une différence d'accumulation de radioactivité aurait dû aussi être observée dans les racines *suc1* cultivées en condition Tm, or les deux génotypes présentent la même accumulation du carbone radiomarqué en condition Tm. De plus, en condition de carence hydrique, *AtSUC1* est réprimée dans les racines de Col-0 (Durand *et al.*, 2016 ; Durand *et al.*, 2018 ; Xu *et al.*, 2018) et on devrait retrouver un pourcentage de radioactivité proche de celui mesuré dans les racines les mutant *suc1*, ce qui n'est pas observé (**Figure 34, B**). Afin de statuer sur le rôle d'*AtSUC1* dans la plante il pourrait être intéressant de réaliser des greffes entre Col-0 et *suc1*, de manière à vérifier si l'impact de l'absence de ce gène dans la plantes est lié à son expression dans les feuilles ou les racines. Ceci pourrait être réalisé aussi avec des mutants de développement racinaire affectés dans la signalisation glucidique (voir perspectives).

2.4 Une complémentation fonctionnelle d'*AtSUC1* ?

Le fait que la mutation d'*AtSUC1* chez le mutant *suc1* n'entraîne pas de différences importantes au niveau du phénotype peut venir du fait que des mécanismes pour limiter les effets de la mutation se mettent en place ou qu'*AtSUC1* n'a pas d'influence directe sur le développement des plantes. Dans les feuilles comme dans les racines, l'expression des transporteurs de saccharose de type SUC dans les plantes de génotype *suc1* est toujours proche de celle des plantes Col-0 cultivées en condition Tm (**Figure 36**). Néanmoins, des différences sont visibles pour *AtSUC4* et 5 dont l'expression n'est pas retrouvée dans les plantes sauvages mais qui sont exprimés dans les plantes *suc1*. Cette corrélation entre l'absence d'*AtSUC1* et l'augmentation d'expression de ces deux gènes nous amène à penser à une complémentation fonctionnelle d'*AtSUC1* chez le mutant *suc1* par *AtSUC4* et 5. Cette hypothèse semble peu probable pour *AtSUC4* puisque la protéine est localisée sur la membrane vacuolaire (Schulz *et al.*, 2011) alors que la localisation d'*AtSUC1* est sur la membrane plasmique (Sauer et Stolz, 1994). Il est néanmoins possible que la régulation des concentrations intracellulaires en saccharose joue aussi un rôle dans la répartition des sucres entre les cellules. Bien que l'expression du gène *AtSUC5* soit relativement faible il est possible que la protéine correspondante soit impliquée dans une complémentation fonctionnelle d'*AtSUC1* chez le mutant *suc1*. Tout d'abord,

AtSUC1 et AtSUC5 sont tous deux des transporteurs de saccharose de type I (Reinders *et al.*, 2012) et présentent des spécificités de substrats et des propriétés cinétiques similaires (Sauer et Stolz, 1994 ; Sauer *et al.*, 2004). De plus, ces deux gènes, situés l'un à côté de l'autre sur le chromosome 1 (At1g71880 (*AtSUC1*) et At1g71890 (*AtSUC5*)), possèdent une homologie de séquence nucléotidique de 86,3 % (Sauer *et al.*, 2004). Enfin, durant les travaux de thèse de Durand (2015), cette augmentation d'expression d'*AtSUC5* dans le mutant *suc1* a été retrouvée dans des plantules cultivées 16 jours *in vitro* tout comme dans des plantes cultivées 30 jours en rhizobox. Dans tous les cas, le niveau d'expression d'*AtSUC5* dans les plantes de génotype mutant *suc1* n'atteint jamais celui d'*AtSUC1* dans les plantes Col-0, ce qui expliquerait l'absence de phénotype marqué du mutant *suc1*.

Dans l'optique de vérifier cette potentielle complémentation fonctionnelle, l'obtention d'un double mutant *suc1/suc5* par la méthode CRISPR-Cas9 est détaillée dans l'**Annexe II**.

D'autre part, comme évoqué précédemment, AtSWEET11 pourrait avoir un rôle complémentaire à celui d'AtSUC1. Une étude de l'expression du gène *AtSUC1* dans le mutant *sweet11* permettrait de voir un lien potentiel entre les fonctions des deux protéines. L'obtention d'un double mutant *suc1-sweet11* peut aussi être envisagé pour déterminer leur rôle à ce niveau.

3 Bilan

Bien que les résultats ne permettent pas de préciser un rôle définitif pour AtSUC1, ceux-ci permettent de soulever quelques hypothèses. AtSUC1 pourrait éventuellement avoir un rôle dans les feuilles. Bien que ce ne soit pas mon sujet d'étude, il serait intéressant de localiser la protéine dans les feuilles afin de pouvoir vérifier cette hypothèse et d'avoir recours à des micro-greffes. AtSUC1 pourrait aussi avoir un rôle dans l'approvisionnement en saccharose des cellules en croissance dans les pointes racinaires ou au niveau de la racine. Enfin, il pourrait jouer un rôle important dans la signalisation glucidique, en lien avec l'ABA. Ces rôles ne sont d'ailleurs pas incompatibles entre eux. La mutation du gène *AtSUC1* n'entraîne pas de changement important dans la plante sur les paramètres étudiés et nos conditions ne sont peut-être pas les plus adaptées pour étudier ce mutant. En effet il semble que la légère différence phénotypique observée en condition Tm s'atténue avec la carence hydrique. De plus, il est possible qu'à 15 jours les différences soient plus marquées. Par ailleurs, les paramètres observés ne sont peut-être pas ceux que la mutation du gène va modifier. Il serait alors intéressant d'étudier d'autres paramètres tels que l'architecture racinaire, compte tenu de l'expression d'*AtSUC1* dans les pointes racinaires. Il est aussi possible que des différences soient plus visibles dans d'autres conditions telles que la culture en jours longs. De plus, afin de pouvoir vérifier une possible complémentation

fonctionnelle chez le mutant *suc1* par d'autres transporteurs de saccharose, l'utilisation de la technique CRISPR/Cas9 (Doudna et Charpentier, 2014) permettrait de pouvoir créer des mutants multiples (**voir Annexe II**) de manière relativement simple.

Chapitre V : AtSUC2

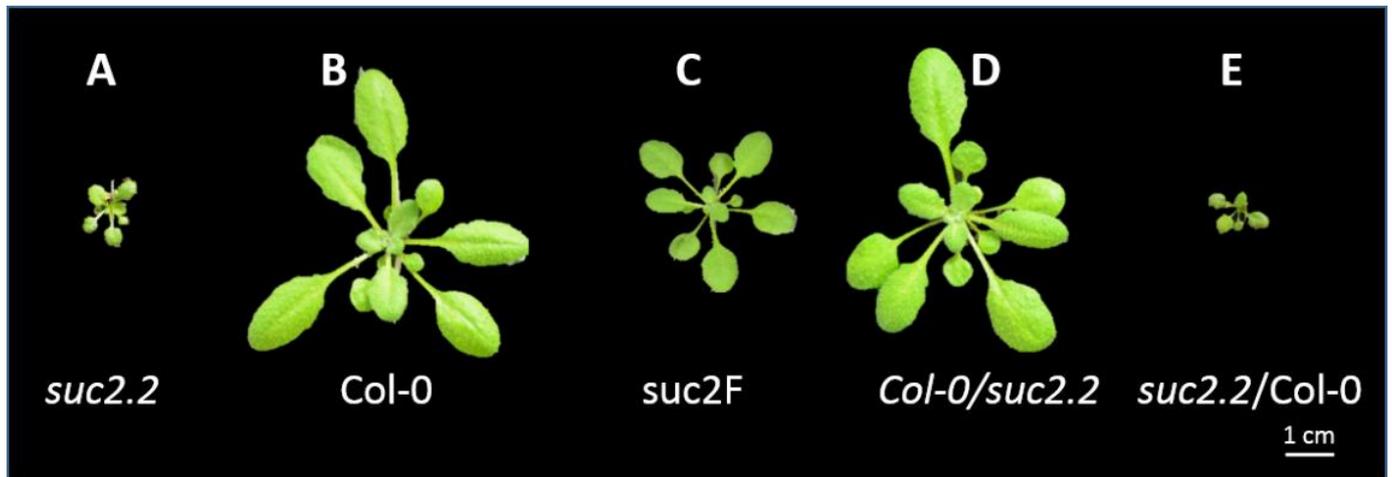


Figure 41. Phénotype des rosettes de différentes lignées d'*Arabidopsis thaliana* et de plantes greffées.

A. Lignée mutante KO *suc2.2*. **B.** Lignée sauvage Col-0. **C.** Lignée *suc2F*, mutant *suc2.2* complétement par *AtSUC2* sous le contrôle du promoteur de la galactinol synthase du melon. **D.** Greffe de la lignée Col-0 (rosette) sur *suc2.2* (racines). **E.** Greffe de la lignée *suc2.2* (rosette) sur Col-0 (racines).

Toutes les plantes ont été cultivées 10 jours *in vitro* et 21 jours en rhizobox.

Le rôle de la protéine AtSUC2 est connu dans les feuilles, elle est impliquée dans le chargement du saccharose dans les cellules compagnes (Stadler et Sauer, 1996 ; Gottwald *et al.*, 2000) et le long du phloème de transport dans le rechargement du saccharose s'échappant du phloème (Srivastava *et al.*, 2008 ; Gould *et al.*, 2012). Les plantes mutantes de lignée KO *suc2* (**Figure 41, A**) présentent un retard de développement important par rapport aux plantes sauvages (**Figure 41, B**) et une forte accumulation de sucres (saccharose, glucose, fructose et amidon) dans les feuilles (Gottwald *et al.*, 2000 ; Srivastava *et al.*, 2008). La mutation KO du gène *AtSUC2* dans les feuilles provoque une très forte diminution du chargement en saccharose du phloème, entraînant une limitation en carbone dans les racines, ce qui restreint fortement leur développement. Les racines se développent donc peu et limitent en retour le développement de la rosette par la diminution de l'alimentation en eau et en sels minéraux. Cette perturbation du développement et les difficultés de germination des graines de cette lignée mutante *suc2* ont longtemps laissé penser que la mutation du gène *AtSUC2* était létale ou tout au moins, que les lignées mutantes *suc2* ne génèrent que des graines stériles. Toutefois, cette lignée peut être cultivée en condition de jours courts et se développe (lentement) et produit des graines viables en faible quantité (Srivastava *et al.*, 2009). L'important retard de développement des plantes de lignées mutantes *suc2* souligne le rôle primordial d'AtSUC2 dans la plante, notamment dans le chargement du phloème dans les feuilles (Stadler et Sauer, 1996 ; Gottwald *et al.*, 2000). *AtSUC2* est le gène codant le transporteur de saccharose le plus exprimé dans les feuilles et aussi le deuxième plus exprimé dans les racines après *AtSUC1* (Durand *et al.*, 2016). En revanche, son rôle exact dans les racines n'est pas connu. Dans ce chapitre, seront détaillés les résultats obtenus lors d'expérimentations effectuées afin d'élucider le rôle d'AtSUC2 dans les racines.

1 Résultats

Comme pour l'étude d'AtSUC1, deux stratégies d'étude ont été adoptées : travailler sur le mutant KO *suc2* et sur la localisation de l'expression du gène et de la protéine.

1.1 Etude de la mutation du gène *AtSUC2* dans les racines

1.1.1 Description de l'expérimentation

Afin d'étudier le rôle d'AtSUC2 dans les racines, il faut séparer l'action de cette protéine dans les feuilles de celle dans les racines. Ceci est important, étant donné que le rôle prépondérant dans les feuilles risque de masquer un rôle potentiel d'AtSUC2 dans les racines. L'objectif est donc d'étudier des plantes présentant une mutation tissu-spécifique pour le gène *AtSUC2*. Julius *et al.* (2017) ont aussi

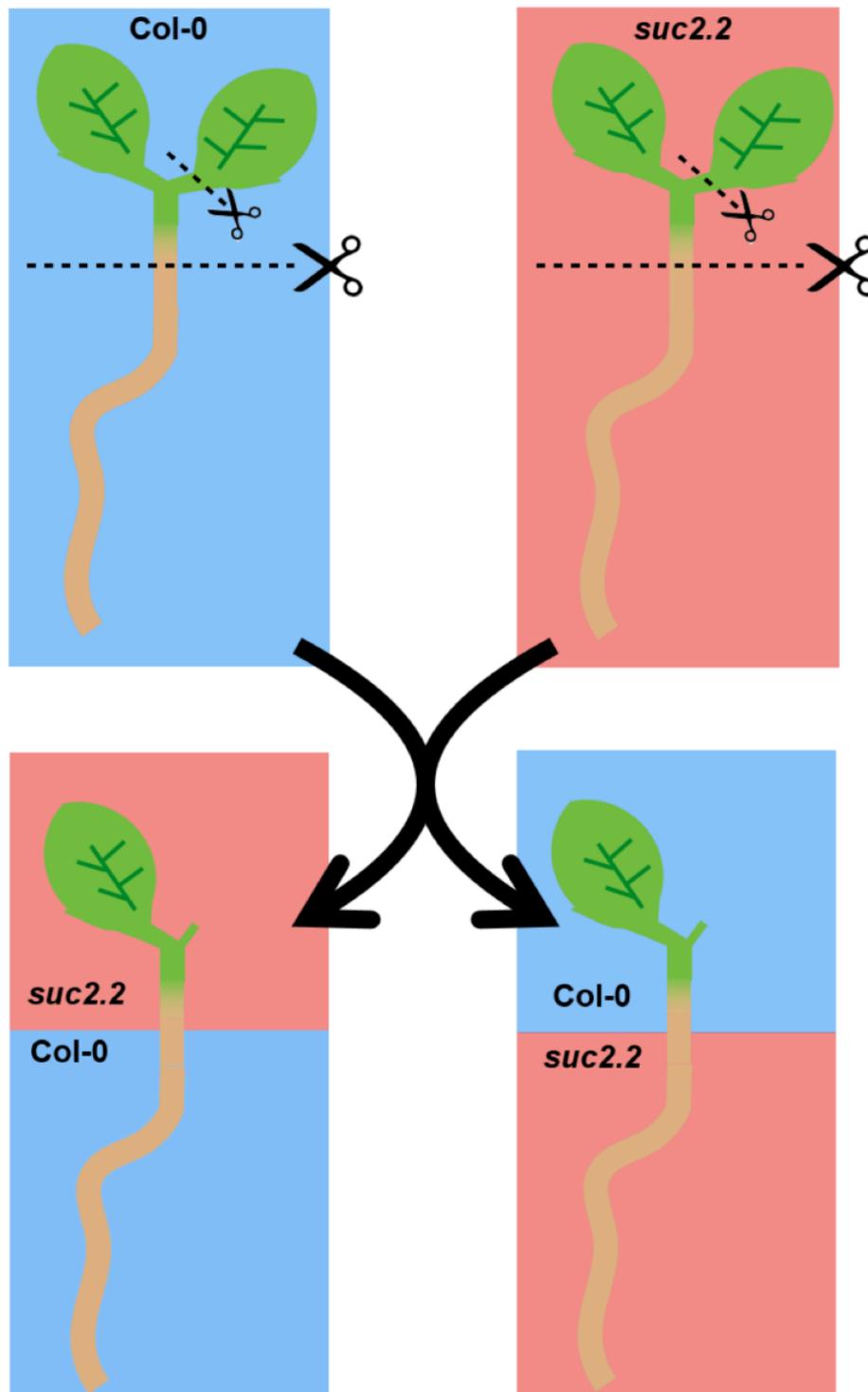


Figure 42 : Schéma explicatif du protocole de micro-greffe (Nils Hennion, rapport M2, 2015).

Un des cotylédons est sectionné sur chaque plantule (facilitant le positionnement des plantules sur le support) et une section nette est effectuée au niveau de l'hypocotyle des plantes Col-0 et *suc2.2*. La rosette de la plante Col-0 est ensuite placée contre la racine de la plante *suc2.2* de manière à ce que les deux sections coïncident parfaitement. L'inverse peut être réalisé en plaçant la rosette de la plante *suc2.2* sur la racine de la plante Col-0.

évoqué cette nécessité de travailler sur des plantes présentant une mutation tissu-spécifique pour étudier le rôle de ZmSUT1 (homologue d'AtSUC2 chez le maïs) dans les organes puits, car les plantes mutantes KO pour ce gène présentent un retard de développement trop important pour être étudiées, dû à la diminution du chargement du phloème dans les feuilles. Une première approche a été d'étudier les plantes de lignées *suc2F* (**Voir chapitre II, Tableau 2**). Cette lignée est une lignée mutante KO *suc2* complémentée par le gène *AtSUC2* sous le contrôle du promoteur de la galactinol synthase du melon (*pCmGAS1*), ne s'exprimant théoriquement que dans les fines nervures des feuilles matures (Srivastava *et al.*, 2008). Cette lignée (**Figure 41, C**) permet donc d'avoir des plantes exprimant seulement *AtSUC2* dans les feuilles matures, permettant ainsi le chargement du phloème et rétablissant partiellement les phénotypes des plantes sauvages (**Figure 41, B**). L'analyse des résultats d'une expérimentation préliminaire sur la lignée *suc2F* a montré que, dans nos conditions, une faible expression d'*AtSUC2* était retrouvée dans les racines après 30 jours de culture. Ayant des difficultés à quantifier précisément le niveau de cette expression, le choix a été fait de ne pas utiliser cette lignée. En effet, une expression résiduelle du gène *AtSUC2* dans les racines des plantes de lignée *suc2F* pourrait remettre en cause nos résultats quant au rôle d'*AtSUC2* dans les racines.

Pour étudier le rôle d'*AtSUC2* dans les racines sans être influencé par son rôle dans les feuilles, une nouvelle technique a donc été utilisée au laboratoire : les micro-greffes. Le but de cette expérimentation est de greffer des feuilles de plantes sauvages Col-0 sur des racines de plantes de lignée mutante KO *suc2* (lignée *suc2.2*, Srivastava *et al.*, 2008, **voir chapitre II, Tableau 2**). Cette greffe permet donc d'avoir des plantes exprimant *AtSUC2* dans les feuilles mais pas dans les racines (**Figure 42**). Ceci permet de pouvoir étudier l'impact de la mutation dans la racine uniquement, sans effet parasite dans les feuilles. Pour la suite, les types de greffes sont annotées en indiquant le génotype de la rosette en numérateur et le génotype des racines en dénominateur (exemple : une plantes constituée de feuilles Col-0 greffées sur des racines de mutant *suc2.2* sera annotée « Col-0/*suc2.2* »).

Trois types de plantes ont été étudiés lors de cette expérimentation : **i)** des plantes présentant une rosette de plante Col-0 greffée sur des racines de plante *suc2.2* (Col-0/*suc2.2*) afin de pouvoir étudier l'effet de la mutation d'*AtSUC2* dans la racine (**Figure 41, D**) ; **ii)** des plantes présentant une rosette de plante Col-0 greffée sur des racines de plantes Col-0 (Col-0/Col-0) afin d'avoir un témoin ayant subi les mêmes étapes expérimentales que les plantes précédentes ; **iii)** des plantes sauvages Col-0 non greffées (Col-0 NG) servant de témoin non greffé mais cultivé dans les mêmes conditions que les plantes greffées. Les plantes *suc2.2* non greffées et les plantes greffées possédant la mutation *suc2.2* au niveau de la rosette (*suc2.2*/Col-0, **Figure 41, E**) n'ont pas été étudiées en détail car la mutation d'*AtSUC2* dans les feuilles provoque un fort retard de développement comparé aux autres types de plantes et rend donc très difficile la récolte de matériel suffisant pour les mesures. Les plantes

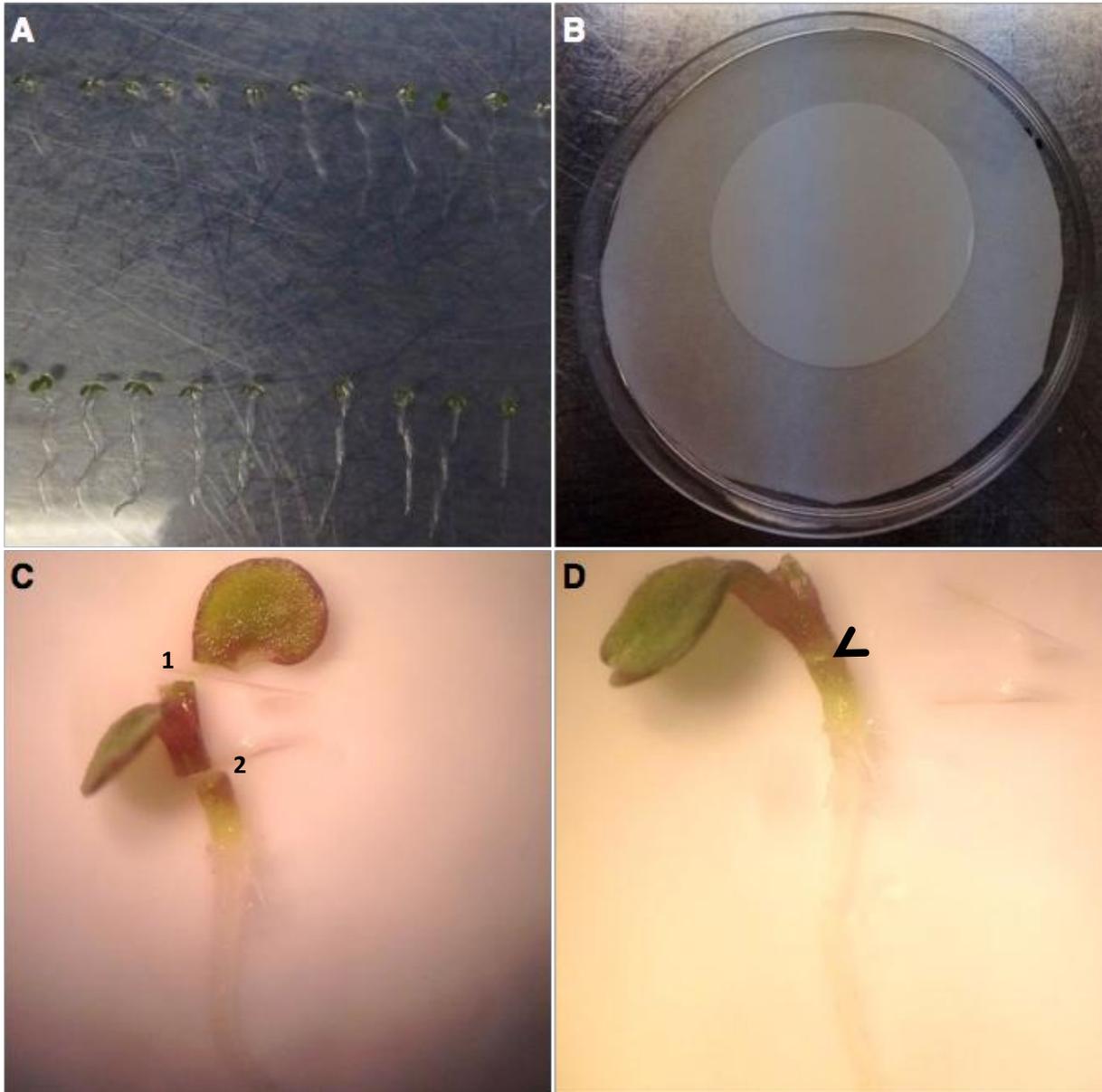


Figure 43 : Différentes étapes de la réalisation de greffes (Nils Hennion, rapport M2, 2015).

A : plantules de 5 jours, servant à la réalisation des greffes. **B** : boîtes de Pétri, papier Whatmann et membrane de nitrocellulose utilisés lors des greffes. **C** : plantule coupée au niveau de l'hypocotyle et d'un cotylédon. **D** : plantule après rapprochement des parties coupées, la flèche correspond à l'interface entre les deux parties.

des trois types (Col-0/suc2.2, Col-0/Col-0 et Col-0 NG) ont toutes été cultivées comme décrit dans le **chapitre II, partie 2.3**. C'est-à-dire que les plantes de génotypes Col-0 et *suc2.2* servant à réaliser les greffes ainsi que le témoin non greffé (Col-0 NG) ont été cultivées 5 jours *in vitro* (MS ½, **Figure 43, A**). Ensuite, toutes les plantules ont été sectionnées au niveau d'un cotylédon (**Figure 43, C n°1**) afin de faciliter la future étape de greffe. Puis, les greffes ont été réalisées en coupant les plantules au niveau de l'hypocotyle (**Figure 43, C, n°2**), juste sous la rosette, et en rapprochant le plus possible les sections des rosettes Col-0 des sections des racines Col-0 d'autres plantes (**Figure 43, D**) pour former les plantes greffées Col-0/Col-0, et en rapprochant les sections des rosettes Col-0 des sections des racines *suc2.2* pour former les plantes greffées Col-0/*suc2.2*. Les plantes Col-0 NG sont coupées au niveau d'un cotylédon comme les autres plantes mais pas au niveau de l'hypocotyle afin que la seule différence d'expérimentation avec les plantes Col-0/Col-0 soit cette coupure de l'hypocotyle. Toutes les plantes (Col-0/*suc2.2*, Col-0/Col-0 et Col-0 NG) ont ensuite été cultivées pendant 5 à 6 jours sur un papier humide, dans une boîte de Pétri (**Figure 43, B**). Enfin, les plantes Col-0 NG et les plantes greffées (Col-0/Col-0 et Col-0/*suc2.2*) dont les feuilles étaient solidaires des racines ont été repiquées en rhizobox (**voir chapitre II, partie 2.1**). Les plantes ont été cultivées en rhizobox pendant 21 jours après le repiquage (soit 31 à 32 jours après le semis) afin d'avoir une biomasse suffisamment importante pour pouvoir effectuer toutes les mesures, mais aussi pour que le système racinaire ne soit pas trop développé au point de gêner la récolte. Le choix a été fait d'utiliser pour cette étude le même terreau (« LP502 », Peltracom) que dans l'étude de Durand *et al.* (2016).

L'expérimentation a été réalisée 3 fois indépendamment (3 réplicats biologiques différents). Chaque réplicat biologique est composé de plusieurs plantes par condition, afin de réaliser des moyennes de résultats et des études statistiques. La faible quantité de matériel disponible à la récolte nous a obligés à rassembler des plantes de même type (« pooler ») afin d'obtenir des valeurs fiables. Par exemple, pour l'obtention des masses sèches de racines, 8 à 12 plantes ont été rassemblées et pesées afin d'avoir des masses suffisantes, en accord avec la précision des balances disponibles au laboratoire. Le fait de rassembler ainsi les plantes entraîne un moins grand nombre de valeurs par paramètre et donc une plus faible significativité lors des tests statistiques. Toutefois, les données sont robustes puisque ces valeurs sont finalement la moyenne des nombreuses plantes. C'est pourquoi les différences non significatives statistiquement seront quand même décrites et discutées en termes de teneurs. Un test de kruskal-walis a été réalisé sur les différents paramètres. En effet, l'utilisation d'un test non paramétrique était nécessaire dans notre cas puisque nous disposions d'un faible nombre d'échantillons.

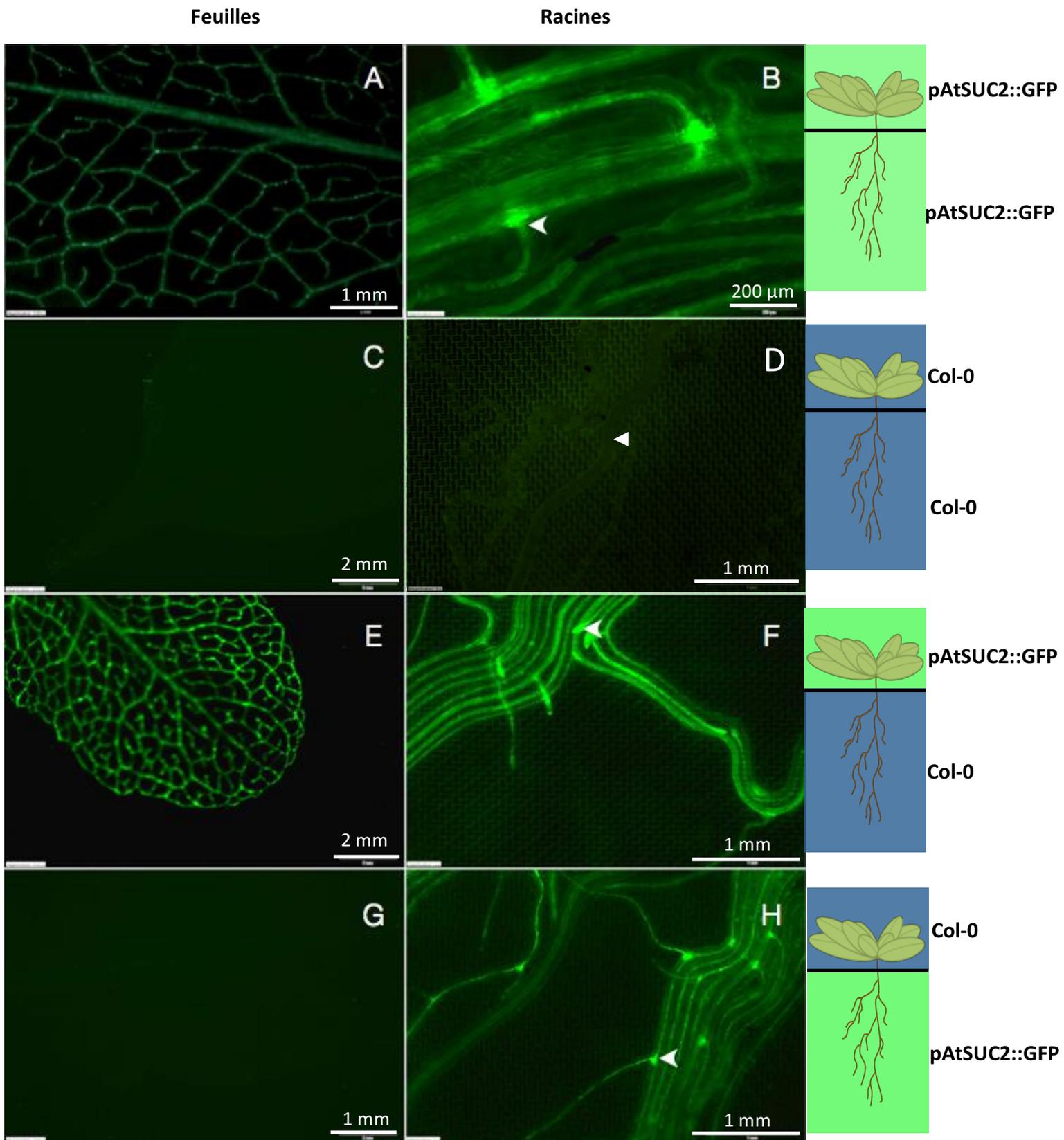


Figure 44 : Observation au macroscopie de micro-greffes pour vérifier la continuité des connexions phloémiennes (Nils Hennion, rapport M2, 2015).

A et B : observation de greffes de lignées transformées exprimant la *GFP* soluble sous le contrôle du promoteur du gène *AtSUC2* (*pAtSUC2::GFP*), au niveau de la rosette (**A**) et de la racine (**B**). **C et D :** observation de feuille (**C**) et racines (**D**) de greffes ayant une rosette et des racines sauvages (*Col-0*). **E et F :** Observation de greffes de rosette (**E**) *pAtSUC2::GFP* et de racines (**F**) *Col-0*. **G et H :** observation de feuille (**G**) et de racines (**H**) de greffes ayant une rosette *Col-0* et des racines *pAtSUC2::GFP*.

1.1.2 Vérification du système de greffes

Une expérience préliminaire a été réalisée dans le but de vérifier le succès des greffes. En effet, il était important de vérifier que l'association des deux organes était bien réussie afin que les échanges phloémiens puissent s'effectuer entre les deux compartiments greffés. Pour cela, la lignée transformée exprimant la GFP soluble sous le contrôle du promoteur du gène *AtSUC2* (*pAtSUC2::GFP*) a été greffée avec des plantes Col-0. La lignée *pAtSUC2::GFP* va produire une GFP soluble qui sera transportée par le phloème uniquement.

La **figure 44** présente l'observation au microscope de plantes greffées : le témoin Col-0/Col-0 (**Figure 44, C et D**), et les greffes *pAtSUC2::GFP/pAtSUC2::GFP* (**Figure 44, A et B**), *pAtSUC2::GFP/Col-0* (**Figure 44, E et F**) et Col-0/*pAtSUC2::GFP* (**Figure 44, G et H**), 21 jours après leur repiquage en rhizobox. Les lignées transformées exprimant la GFP soluble sous le contrôle du promoteur du gène *AtSUC2* (*pAtSUC2::GFP*) au niveau de la rosette et au niveau des racines (*pAtSUC2::GFP/pAtSUC2::GFP*), présentent une fluorescence au niveau des feuilles (**Figure 44, A**) et des racines (**Figure 44, B**). La fluorescence est observée au niveau des nervures des feuilles, de manière uniforme. Au niveau des racines, la fluorescence est localisée sous l'aspect de deux lignes au centre de celles-ci. Cette localisation semble correspondre à la position du phloème dans la racine. Il est cependant intéressant de noter une augmentation de l'intensité aux points de ramification des racines latérales (**Figure 44, B flèche**). La greffe témoin, Col-0/Col-0, ne présente de fluorescence ni au niveau des feuilles (**Figure 44, C**), ni au niveau des racines (**Figure 44, D, flèche**). Nous observons que de manière générale, la membrane de nylon sur laquelle est posée la plantule présente une certaine auto-fluorescence derrière les racines (**Figure 44, D**). L'observation de la greffe *pAtSUC2::GFP/Col-0* révèle une fluorescence au niveau des nervures des feuilles (**Figure 44, E**) et des racines (**Figure 44, F**), comme pour la greffe *pAtSUC2::GFP/pAtSUC2::GFP* (**Figure 44, A**). Ceci montre que la GFP provenant de la rosette passe dans les racines. De plus, la fluorescence semble plus intense au niveau des pointes racinaires (**Figure 44, F, flèche**), ce qui est différent de ce qui est observé pour la greffe *pAtSUC2::GFP/pAtSUC2::GFP*. Enfin, la plante Col-0/*pAtSUC2::GFP* ne présente pas de fluorescence au niveau des feuilles (**Figure 2, G**) mais cette dernière est bien observable au niveau racinaire (**Figure 44, H**), notamment au niveau des faisceaux conducteurs situés au milieu de la racine. Cette greffe montre que la GFP ne remonte pas dans la rosette après une greffe, ce qui est attendu puisque cette GFP est transportée par la sève phloémienne et que le flux ne remonte pas des racines vers les feuilles (en condition normale). De plus, une augmentation de l'intensité de fluorescence est notée au niveau des zones de ramification des racines latérales (**Figure 44, H, flèche**), comme pour la greffe *pAtSUC2::GFP/pAtSUC2::GFP* (**Figure 44, B**).

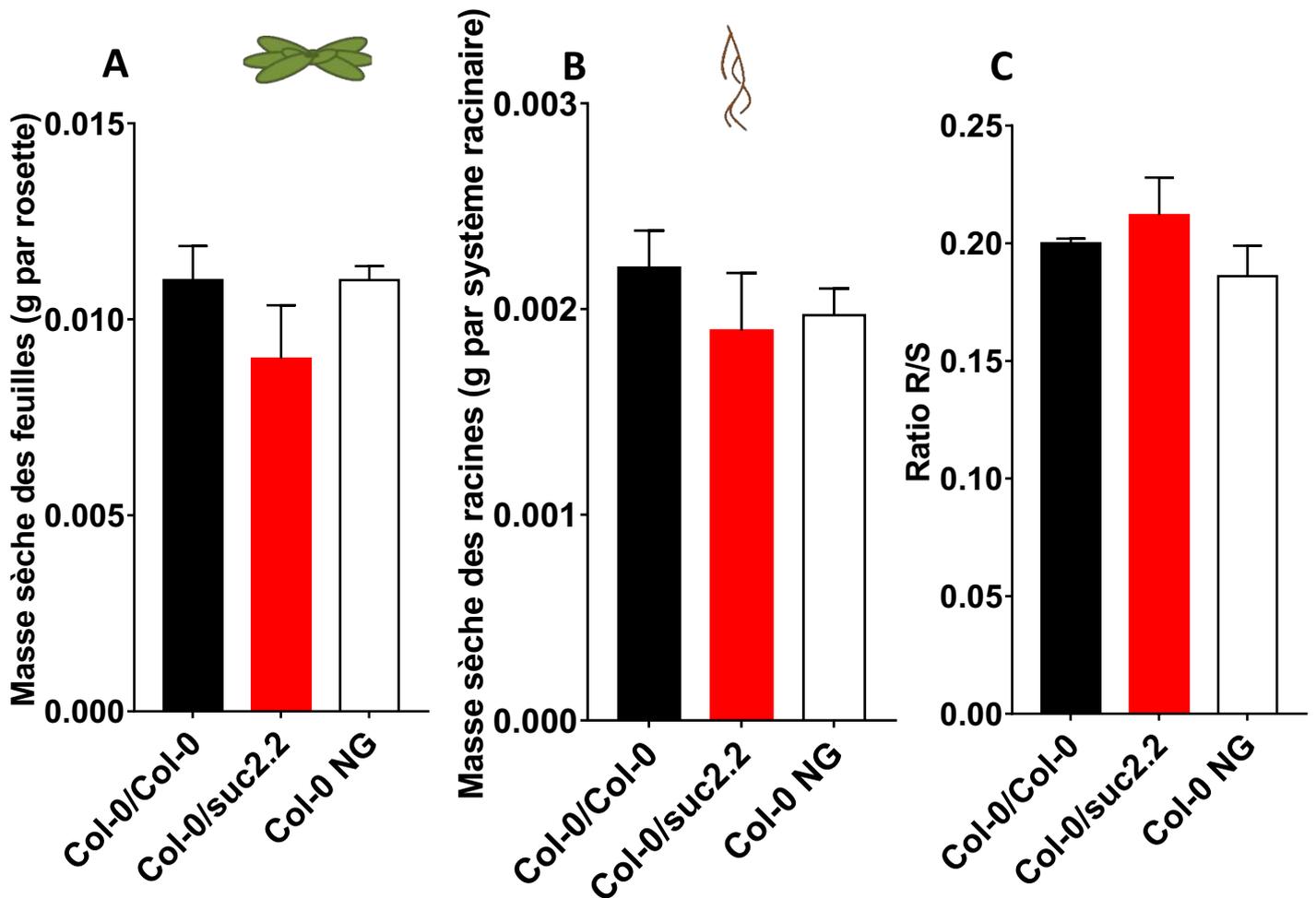


Figure 45. Masses sèches des feuilles et racines des plantes Col-0/Col-0, Col-0/*suc2.2* et Col-0 NG et ratio R/S correspondant.

A. Masse sèche des feuilles (g par rosette). **B.** Masse sèche des racines (g par système racinaire). **C.** Rapport entre les masses sèches des racines et des feuilles ou Root/Shoot ratio (R/S).

Les valeurs correspondent à la moyenne (+/- erreur standard) de pools de plantes de 3 réplicats (n=3) biologiques indépendants (8 à 12 plantes par réplicat). L'absence de lettres sur les barres indique une absence de significativité ($P < 0,05$) déterminée par un test de Kruskal-Wallis.

Ces résultats montrent qu'après une greffe, les échanges entre les feuilles et les racines sont rétablis, les flux phloémiens des feuilles vers les racines sont fonctionnels. De plus, nos résultats montrent que les pointes racinaires sont fortement marquées. Ceci est dû au fait que le déchargement du phloème s'y déroule de manière symplasmique (Oparka *et al.*, 1994).

1.1.3 Suivi phénotypique des plantes

Pour comparer les trois types de plantes (Col-0/Col-0, Col-0/*suc2.2* et Col-0 NG), des analyses phénotypiques ont été réalisées. Pour cela, les masses sèches des feuilles et des racines, les surfaces projetées des rosettes, les nombres de feuilles par rosette et la longueur des racines principales ont été mesurés lors de la récolte. De plus, le rapport entre la masse sèche des racines et la masse sèche des feuilles (Ratio R/S) a été calculé.

Les résultats de masses sèches sont présentés en **figure 45**. Comme expliqué dans le chapitre précédent, ce sont les masses sèches et non les masses fraîches qui ont été étudiées afin de s'affranchir de différences potentielles de teneur en eau dans les plantes. Dans les feuilles, les valeurs de masses sèches (**Figure 45, A**) pour les plantes Col-0/*suc2.2* (0,09 g par rosettes) sont inférieures à celle des deux autres types de plantes étudiées. De plus, ces masses sèches foliaires sont très similaires entre les plantes Col-0/Col-0 et Col-0 NG (0,11 g par rosette pour les deux). Dans les racines, les masses sèches (**Figure 45, B**) sont plus faibles pour les plantes Col-0/*suc2.2* (0,0019 g par système racinaire) par rapport aux deux autres types de plantes. Les masses sèches racinaires sont très légèrement supérieures pour les plantes Col-0/Col-0 (0,0022 g par système racinaire) comparées aux plantes Col-0 NG (0,0020 g par système racinaire). De plus, les masses sèches sont inférieures dans les feuilles et les racines des trois types de plantes étudiées ici comparées aux plantes Col-0 cultivées en conditions hydriques témoin de l'expérimentation sur le mutant *suc1* (0,18 g par rosette et 0,003 g par système racinaire).

Le ratio R/S permet de comparer les proportions des racines par rapport à la masse totale des plantes. Les résultats de ratio R/S présentés dans la **figure 45, C** montrent un ratio plus important pour les plantes Col-0/*suc2.2* (0,212) que pour les deux autres types de plantes. Ces résultats proviennent d'une diminution plus importante de la masse foliaire que de la masse racinaire (**Figure 45, A et B**) dans les plantes Col-0/*suc2.2* par rapport aux plantes Col-0/Col-0. De plus, le ratio est supérieur pour les plantes Col-0/Col-0 (0,200) que pour les plantes Col-0 NG (0,186). Cette différence vient d'une augmentation de la masse des racines dans les plantes Col-0/Col-0 comparées aux plantes Col-0 NG. Enfin, le ratio R/S des plantes Col-0 NG (0,186) est proche de celui des plantes Col-0 cultivées en

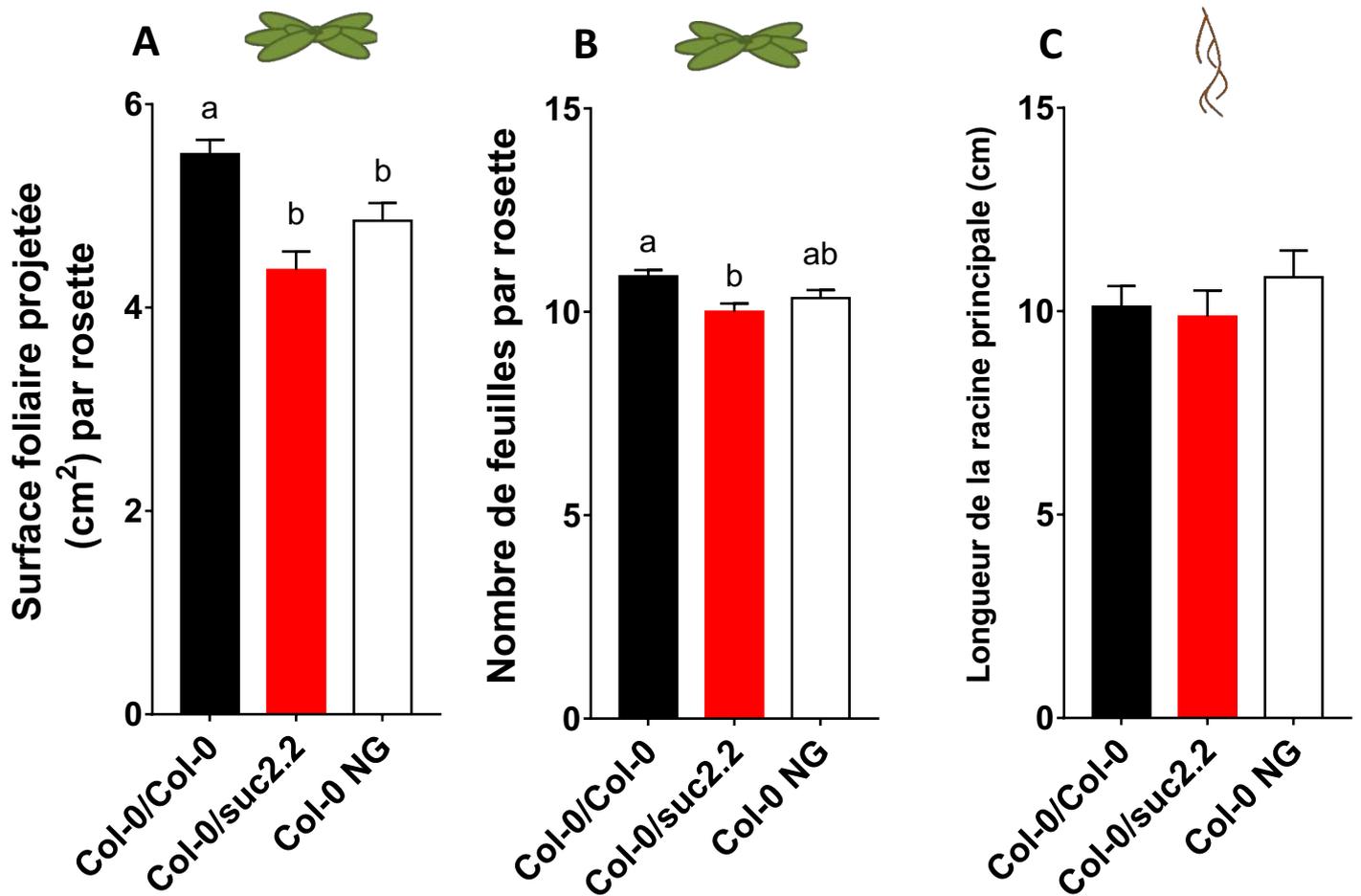


Figure 46. Surfaces foliaires projetées, nombres de feuilles par rosette et longueur des racines principales des plantes Col-0/Col-0, Col-0/suc2.2 et Col-0 NG.

A. Surface foliaire projetée (cm²). **B.** Nombre de feuilles par rosette. **C.** Longueur de la racine principale (cm). Les valeurs correspondent à la moyenne (+/- erreur standard) de plantes de 3 replicats (n=3) biologiques indépendants (21 à 42 plantes par replicat pour A et B et 21 à 22 plantes par replicat pour C). L'absence de lettres sur les barres indique une absence de significativité (P < 0,05) déterminée par un test de Kruskal-Wallis.

conditions hydriques témoin de l'expérimentation sur le mutant *suc1* (0,17). Ceci indique que les plantes témoins des deux études ont une proportion identique de masse de racines par rapport à la masse totale des plantes.

Les surfaces foliaires projetées (**Figure 46, A**) sont inférieures pour les plantes Col-0/*suc2.2* (4,3 cm²) comparées aux plantes Col-0/Col-0 (5,5 cm²). Les surfaces foliaires projetées des plantes Col-0 NG (4,8 cm²) sont comprises entre celles des plantes Col-0/*suc2.2* et des plantes Col-0/Col-0. Les plantes Col-0/*suc2.2* (10 feuilles par rosette) ont un nombre de feuilles par rosette (**Figure 46, B**) inférieures aux plantes Col-0/Col-0 (10,8 feuilles par rosette). Les plantes Col-0 NG (10,3 feuilles par rosette) ont un nombre de feuilles par rosette compris entre celui des plantes Col-0/Col-0 et celui des plantes Col-0/*suc2.2*.

La longueur de la racine principale (**Figure 46, C**) est proche pour les trois types de plantes étudiées, même si de légères différences sont visibles. Les plantes Col-0/*suc2.2* (9,86 cm) ont des longueurs de racine principale très légèrement inférieures aux plantes Col-0/Col-0 (10,10 cm) mais aussi inférieures à celles des plantes Col-0 NG (10,83 cm).

Les valeurs de surface foliaire projetée, de nombre de feuilles par rosette et de longueur de la racine principale sont toujours inférieures dans les plantes Col-0 NG de cette étude que dans les plantes Col-0 cultivées en conditions hydrique témoin de l'expérimentation sur le mutant *suc1* (respectivement, 4,8 cm² et 7,7 cm² pour la surface foliaire projetée, 10,3 feuilles et 14 feuilles pour le nombre de feuilles par rosette et 10,8 cm et 14,3 cm pour la longueur de la racine principale).

En résumé, la mutation d'*AtSUC2* dans les racines semble influencer négativement les masses foliaires et racinaires (**Figure 45, A et B**) et plus particulièrement les masses foliaires (**Figure 45, C**) ainsi que les surfaces foliaires et le nombre de feuilles par rosette (**Figure 46, A et B**). En revanche, la proportion des racines par rapport à la masse totale des plantes (**Figure 45, C**) est légèrement supérieure dans les plantes Col-0/*suc2.2* comparées aux plantes Col-0/Col-0. D'autre part, en comparant les plantes Col-0 /Col-0 aux plantes Col-0 NG il est possible de voir un effet de la greffe. De manière inattendue, la réalisation de greffe semble en soi, avoir un léger impact positif sur les masses sèches des racines ainsi que sur la surface foliaire et le nombre de feuilles par rosette. En revanche, le processus de germination *in vitro* a un effet très net sur la croissance des feuilles et des racines par rapport aux plantes témoin de l'expérience précédente.

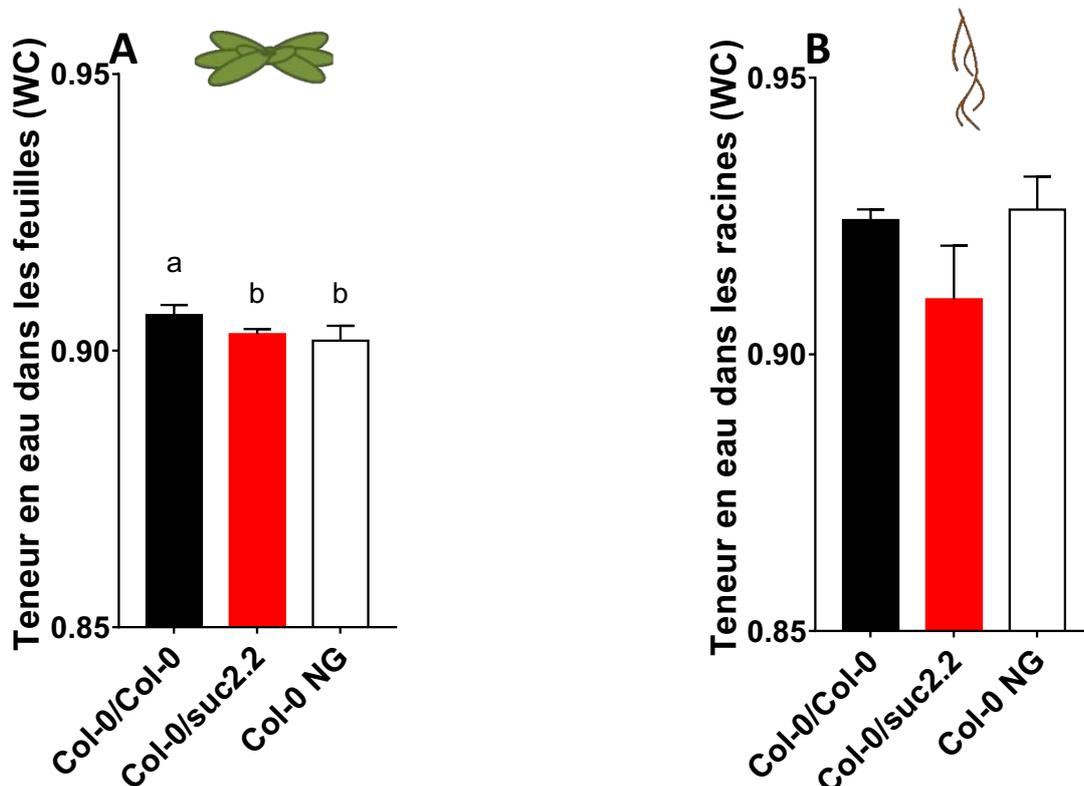


Figure 47. Teneur en eau (WC : Water Content) dans les feuilles et les racines des plantes Col-0/Col-0, Col-0/suc2.2 et Col-0 NG.

A. Teneur en eau dans les feuilles. **B.** Teneur en eau dans les racines.

Les valeurs correspondent à la moyenne (+/- erreur standard) de pools de plantes de 3 réplicats (n=3) biologiques indépendants (8 à 12 plantes par réplicat). Les lettres différentes sur les barres indiquent les différences significatives ($P < 0,05$) déterminée par un test de Kruskal-Wallis. L'absence de lettre indique une absence de significativité.

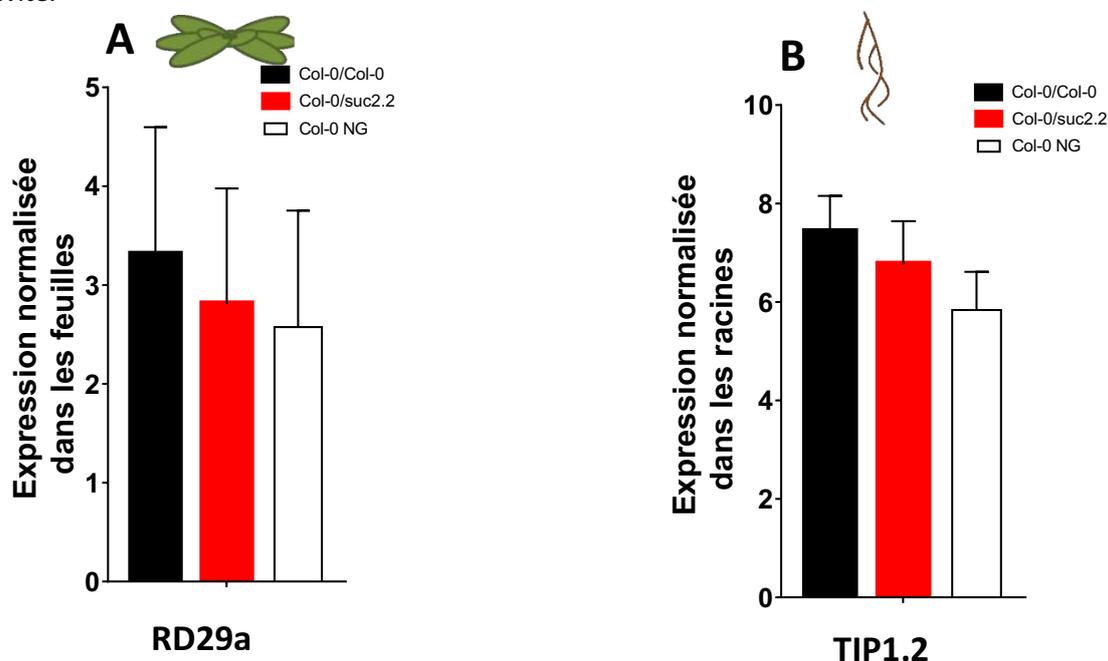


Figure 48. Expression de gènes marqueurs de stress hydrique dans les feuilles et les racines des plantes Col-0/Col-0, Col-0/suc2.2 et Col-0 NG.

A. Expression du gène *AtRD29a* dans les feuilles. **B.** Expression du gène *AtTIP1.2* dans les racines. Les données sont normalisées (pas d'unité) par la moyenne de 3 gènes de référence *At5g12240*, *At4g26410* et *At3g18780* (Czechowski *et al.*, 2005). Les valeurs correspondent à la moyenne (+/- erreur standard) de pools de plantes de 3 réplicats (n=3) biologiques indépendants (3 à 6 plantes par pool, 1 pool par réplicat). L'absence de lettres sur les barres indique une absence de significativité ($P < 0,05$) déterminée par un test de Kruskal-Wallis.

1.1.4 Etat physiologique des plantes

Afin d'estimer l'état physiologique des trois types de plantes étudiées (Col-0/Col-0, Col-0/*suc2.2* et Col-0 NG), des mesures de la teneur en eau des plantes (WC) et l'analyse de l'expression de gènes marqueurs du statut hydrique des plantes et de la photosynthèse ont été réalisées.

Comme pour l'étude du mutant *suc1*, c'est la teneur en eau (WC) qui est étudiée ici et non la teneur relative en eau (RWC) puisque l'obtention de la masse turgide des racines, nécessaire au calcul du RWC, est peu précise. Les résultats de WC dans les feuilles (**Figure 47, A**) montrent que pour les plantes Col-0/*suc2.2*, la valeur de WC (0,903) est comprise entre celle obtenue pour les plantes Col-0/Col-0 (0,906) et celle obtenue pour les plantes Col-0 NG (0,901). De plus, des valeurs de WC légèrement supérieures sont trouvées pour les plantes Col-0/Col-0 (0,906) comparées à celles trouvées pour les plantes Col-0 NG (0,901). Toutefois, ces différences de WC sont faibles entre les trois types de plantes. Dans les racines (**Figure 47, B**), les valeurs de WC sont inférieures dans les plantes Col-0/*suc2.2* (0,909) comparées à celles mesurées dans les deux autres types de plantes. Les WC mesurées dans les racines des plantes Col-0/Col-0 et les plantes Col-0 NG sont proches (respectivement 0,924 et 0,926). Globalement, les valeurs de WC sont supérieures dans les racines par rapport à celles obtenues dans les feuilles. De plus, les valeurs de WC des plantes Col-0 NG (0,901 pour les feuilles et 0,926 pour les racines) sont proches mais légèrement inférieures à celles trouvées dans les plantes Col-0 cultivées en condition hydrique témoin (0,918 pour les feuilles et 0,934 pour les racines) de l'expérimentation sur le mutant *suc1* (**chapitre IV**). Ceci indique que les plantes de cette étude sont dans une condition hydrique proche de celle des témoins de l'expérimentation sur *suc1* et ne sont pas en carence hydrique : leur développement n'est donc pas limité par la quantité d'eau.

L'état hydrique des plantes a aussi été évalué au niveau moléculaire grâce à l'analyse des gènes *AtRD29a* dans les feuilles et *AtTIP1.2* dans les racines (**Figure 48**). L'expression du gène *AtRD29a* est connue pour être positivement régulée par la carence hydrique dans les feuilles (Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki, 1994). Les résultats (**Figure 48, A**) montrent un niveau d'expression du gène *AtRD29a* dans les plantes Col-0/*suc2.2* (2,8) qui est compris entre les niveaux d'expression dans les plantes des deux autres types. De plus, le niveau d'expression de ce gène est supérieur dans les plantes Col-0/Col-0 (3,3) comparées aux plantes Col-0 NG (2,5). Cependant, les erreurs standards sont importantes et les différences peuvent ne pas représenter de différences physiologiques. En outre, les niveaux d'expression du gène *AtRD29a* dans ces plantes sont bien plus faibles que ceux trouvés dans les plantes cultivées en condition de carence hydrique (14,5) de l'expérimentation sur *suc1*, et même inférieurs à ceux trouvés dans les plantes cultivées en condition hydrique témoin (8,5). Ceci montre que les plantes ne se trouvent pas en carence hydrique au niveau des feuilles et que l'eau n'est pas un facteur limitant pour les plantes. L'expression du gène *AtTIP1.2* est régulée négativement en cas de fort stress hydrique

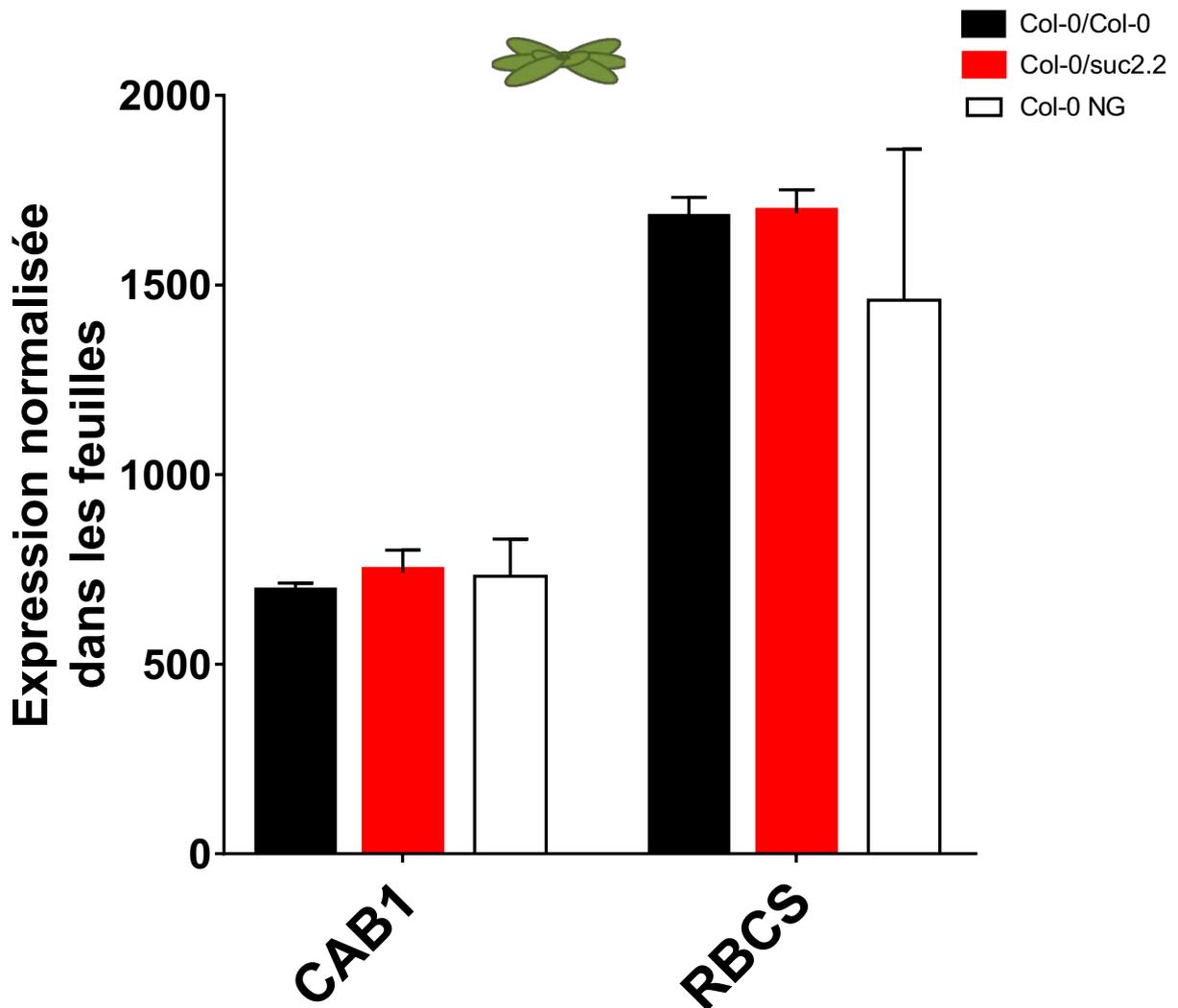


Figure 49. Expression de gènes marqueurs de la photosynthèse (*AtRBCS* et *AtCAB1*) des plantes Col-0/Col-0, Col-0/*suc2.2* et Col-0 NG.

Les données sont normalisées (pas d'unité) par la moyenne de 3 gènes de référence *At5g12240*, *At4g26410* et *At3g18780* (Czechowski *et al.*, 2005). Les valeurs correspondent à la moyenne (+/- erreur standard) de pools de plantes de 3 réplicats (n=3) biologiques indépendants (3 à 6 plantes par pool, 1 pool par réplicat). L'absence de lettres sur les barres indique une absence de significativité ($P < 0,05$) déterminée par un test de Kruskal-Wallis.

(Alexandersson *et al.*, 2005). Les résultats pour ce gène (**Figure 48, B**) montrent que la tendance est comparable à celle observée pour le gène *AtRD29a*, c'est-à-dire un niveau d'expression dans les plantes Col-0/*suc2.2* (6,7) inférieur à celui trouvé dans les plantes Col-0/Col-0 (7,4) et supérieur à celui retrouvé dans les plantes Col-0 NG (5,8). Toutefois, les niveaux d'expression observés ici pour ce gène (entre 5,8 et 7,4) sont plus proches de ceux observés pour les plantes cultivées en condition de carence hydrique (6) qu'en condition hydrique témoin (11) dans l'expérimentation sur *suc1*.

Globalement, les résultats de WC et d'expression du gène *AtRD29a* montrent que dans les feuilles le statut hydrique est comparable entre les trois types de plantes (Col-0/*suc2.2*, Col-0/Col-0 et Col-0 NG) et que celui-ci est proche de celui des plantes cultivées en condition témoin dans l'expérimentation sur le mutant *suc1*. En revanche, dans les racines, les résultats de WC et d'expression du gène *AtTIP1.2* montrent qu'il y a des disparités au niveau du statut hydrique entre les trois types de plantes, bien que les deux approches ne révèlent pas les mêmes disparités. Les différences de résultats entre les deux approches seront discutées plus loin dans ce chapitre.

L'analyse de l'expression des gènes marqueurs de la photosynthèse *AtCAB1* et *AtRBCS* (**Figure 49**) qui sont des gènes codant des protéines importantes pour la photosynthèse (chlorophylle et RuBisCO) montre qu'il y a peu de différences entre les trois types des plantes étudiées. Le niveau d'expression du gène *AtCAB1* est comparable entre les plantes Col-0/Col-0, Col-0/*suc2.2* et Col-0 NG, les variations étant inférieures à 8 % (respectivement, 687,6 ; 742,4 et 731,7). Le niveau d'expression d'*AtRBCS* est comparable entre les plantes Col-0/*suc2.2* et les plantes Col-0/Col-0 (respectivement 1689 et 1673, soit une différence inférieure à 1 %). En revanche, le niveau d'expression de ce gène est inférieur dans les plantes Col-0 NG (1460) bien que cette différence soit atténuée par l'importante erreur standard pour cette valeur. Les niveaux d'expression de ces deux gènes sont proches de ceux observés pour les plantes Col-0 cultivées en condition hydrique témoin (775 pour *AtCAB1* et 1541,5 pour *AtRBCS*) dans l'expérimentation sur le mutant *suc1*.

En résumé, il est possible de dire qu'il y a peu de différence au niveau des gènes marqueurs de la photosynthèse entre les trois types de plantes et donc que ni la greffe (après 26 jours de culture) ni la mutation du gène *AtSUC2* dans les racines n'ont d'effet majeur.

1.1.5 Contenu en sucres

Afin de voir l'effet de la mutation d'*AtSUC2* dans les racines sur le contenu en sucres des plantes, des mesures de teneur en sucres ont été effectuées sur les trois types de plantes. Les quantités

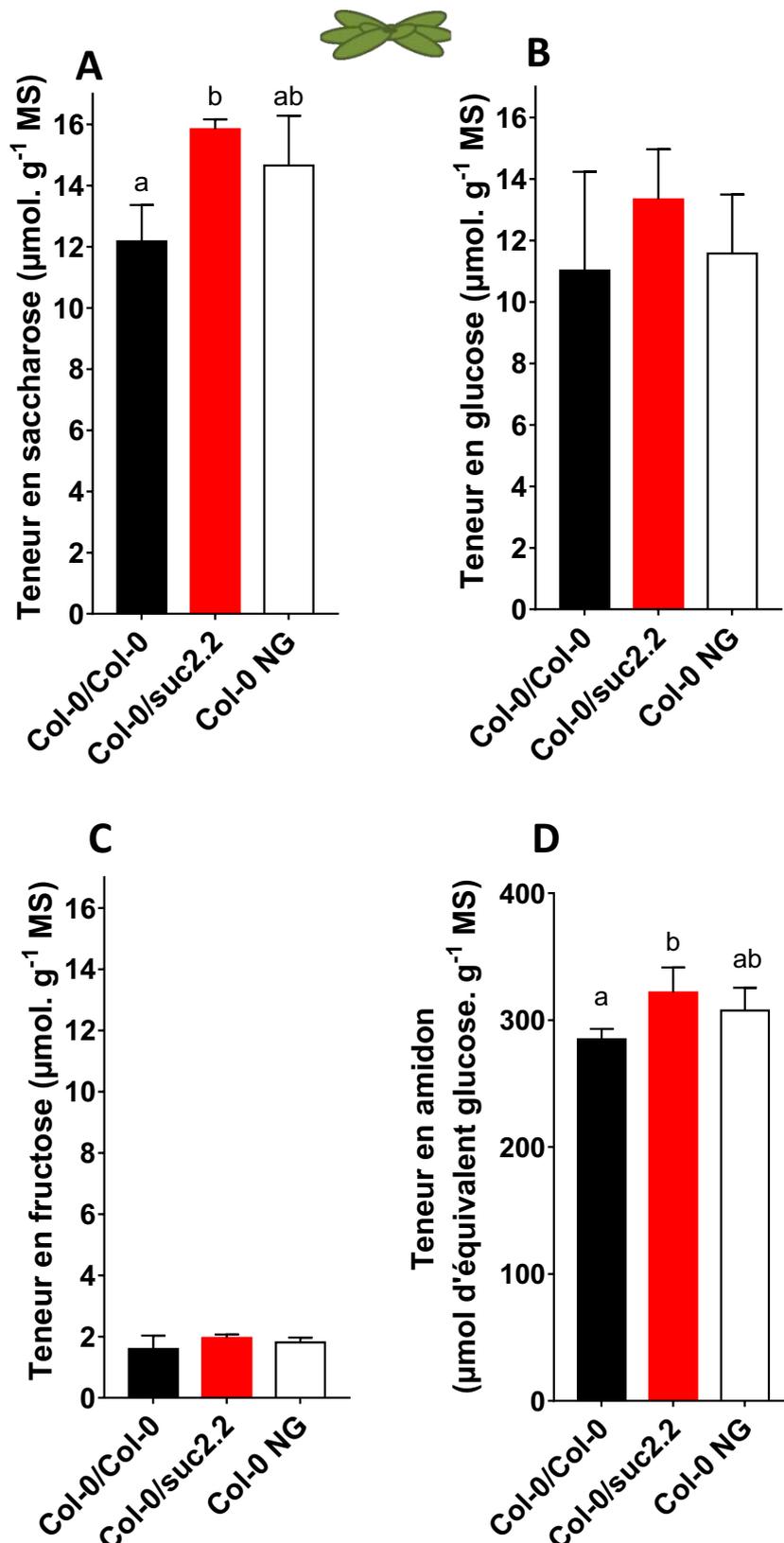


Figure 50. Teneurs en sucres solubles et en amidon dans les feuilles des plantes Col-0/Col-0, Col-0/*suc2.2* et Col-0 NG.

A. Teneur en saccharose des feuilles (µmol.g⁻¹ MS). **B.** Teneur en glucose des feuilles (µmol.g⁻¹ MS). **C.** Teneur en fructose des feuilles (µmol.g⁻¹ MS). **D.** Teneur en amidon des feuilles (µmol d'équivalent glucose.g⁻¹ MS). Les valeurs correspondent à la moyenne (+/- erreur standard) de pools de plantes de 3 réplicats (n=3) biologiques indépendants (8 à 12 plantes par pool, 1 pool par réplicat). Les lettres différentes sur les barres indiquent les différences significatives (P < 0,05) déterminée par un test de Kruskal-Wallis, une absence de lettre indique une absence de significativité.

de saccharose, de glucose et de fructose ainsi que les teneurs en amidon ont été mesurées dans les feuilles et dans les racines.

1.1.5.1 Teneur en sucres dans les feuilles

Globalement dans les feuilles (**Figure 50**), les teneurs en saccharose des trois types de plantes étudiées sont comparables aux teneurs en glucose pour ces mêmes plantes (environ entre $12 \mu\text{mol.g}^{-1}$ et $16 \mu\text{mol.g}^{-1}$ pour le saccharose ; et entre $11 \mu\text{mol.g}^{-1}$ et $13,5 \mu\text{mol.g}^{-1}$ pour le glucose). En revanche, les teneurs en fructose présentent un niveau largement inférieur (environ entre $1,5 \mu\text{mol.g}^{-1}$ et $2 \mu\text{mol.g}^{-1}$) à celui des deux autres sucres solubles, dans toutes les plantes étudiées.

Les teneurs en saccharose foliaire (**Figure 50, A**) sont plus élevées dans les plantes Col-0/*suc2.2* ($15,84 \mu\text{mol.g}^{-1}$) que dans les deux autres types de plantes. Les teneurs en saccharose dans les plantes Col-0/Col-0 ($12,17 \mu\text{mol.g}^{-1}$) sont inférieures à celles des plantes Col-0 NG ($14,65 \mu\text{mol.g}^{-1}$). De même, les teneurs en glucose (**Figure 50, B**) sont aussi les plus élevées dans les feuilles des plantes Col-0/*suc2.2* ($13,3 \mu\text{mol.g}^{-1}$) par rapport aux deux autres types de plantes. Les teneurs en glucose dans les plantes Col-0/Col-0 ($11,02 \mu\text{mol.g}^{-1}$) sont inférieures à celles des plantes non greffées ($11,57 \mu\text{mol.g}^{-1}$). De plus, les teneurs en fructose (**Figure 50, C**) sont les plus élevées dans les plantes Col-0/*suc2.2* ($1,81 \mu\text{mol.g}^{-1}$). Les teneurs en fructose sont elles aussi inférieures dans les plantes Col-0/Col-0 ($1,59 \mu\text{mol.g}^{-1}$) comparées à celles des plantes Col-0 NG ($1,95 \mu\text{mol.g}^{-1}$). Enfin, les teneurs en amidon (**Figure 50, D**) sont plus élevées dans les plantes Col-0/*suc2.2* ($321,86 \mu\text{mol d'équivalent glucose .g}^{-1}$). Les teneurs en amidon foliaire sont inférieures dans les plantes Col-0/Col-0 ($284,91 \mu\text{mol d'équivalent glucose .g}^{-1}$) comparées aux plantes non greffées ($307,57 \mu\text{mol d'équivalent glucose .g}^{-1}$).

Les mesures de teneurs en sucres dans les feuilles montrent un profil comparable pour tous les sucres étudiés, c'est-à-dire que des teneurs supérieures sont retrouvées dans les feuilles des plantes Col-0/*suc2.2* par rapport aux feuilles des plantes Col-0/Col-0 et les plantes Col-0 NG ont toujours des teneurs intermédiaires entre les deux types de greffe.

1.1.5.2 Teneur en sucres dans les racines

Dans les racines (**Figure 51**), les teneurs en glucose des trois types de plantes (entre $32 \mu\text{mol.g}^{-1}$ et $40 \mu\text{mol.g}^{-1}$ environ) sont supérieures aux teneurs en saccharose (entre $22 \mu\text{mol.g}^{-1}$ et $28 \mu\text{mol.g}^{-1}$ environ) mesurées dans ces plantes et très supérieures aux teneurs en fructose (entre $9 \mu\text{mol.g}^{-1}$ et $13 \mu\text{mol.g}^{-1}$ environ).

Les teneurs en saccharose (**Figure 51, A**) des plantes Col-0/*suc2.2* ($24,14 \mu\text{mol.g}^{-1}$) sont comprises entre celles des plantes Col-0 NG ($27,13 \mu\text{mol.g}^{-1}$) et celles des plantes Col-0/Col-0 ($22,04 \mu\text{mol.g}^{-1}$). Les teneurs en glucose (**Figure 51, B**) des plantes Col-0/*suc2.2* ($32,46 \mu\text{mol.g}^{-1}$) sont

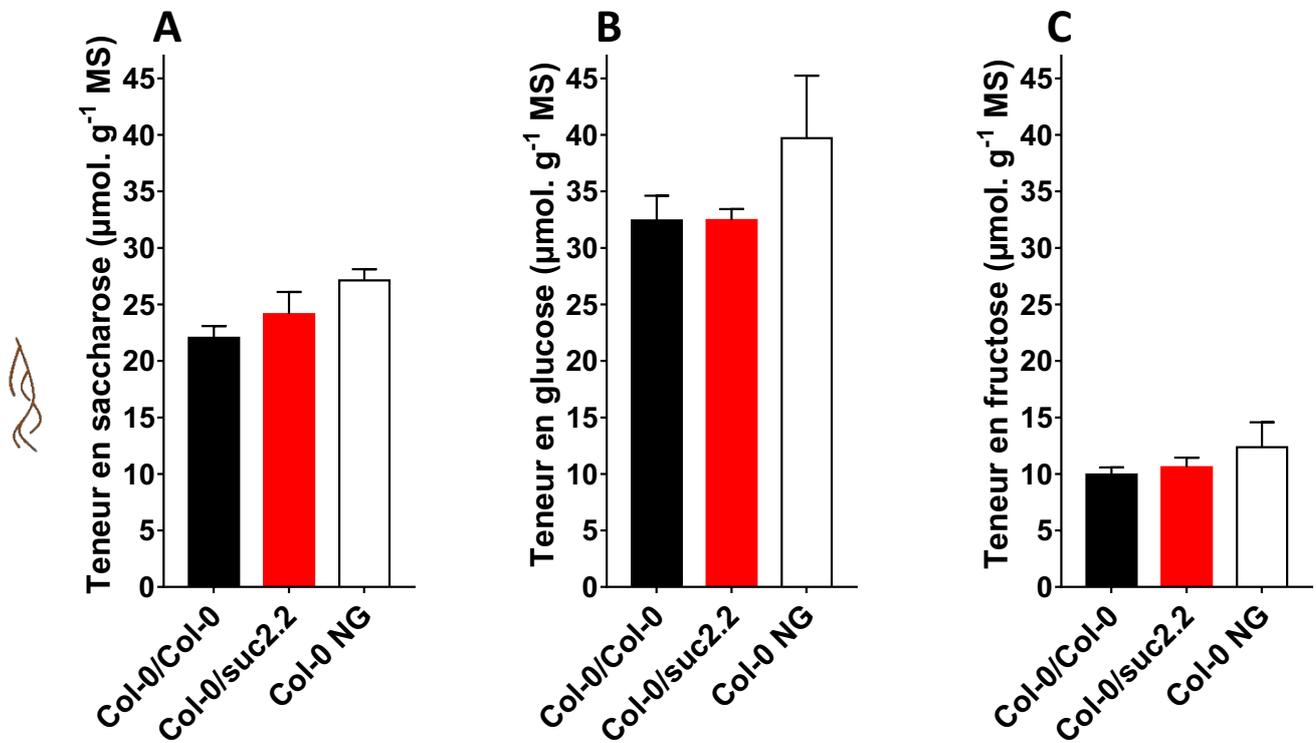


Figure 51. Teneurs en sucres solubles dans les racines des plantes Col-0/Col-0, Col-0/*suc2.2* et Col-0 NG.

A. Teneur en saccharose des racines (µmol.g⁻¹ MS). B. Teneur en glucose des racines (µmol.g⁻¹ MS). C. Teneur en fructose des racines (µmol.g⁻¹ MS). Les valeurs correspondent à la moyenne (+/- erreur standard) de pools de plantes de 3 réplicats biologiques indépendants (8 à 12 plantes par pool, 1 pool par réplicat). L'absence de lettres sur les barres indique une absence de significativité (P < 0,05) déterminée par un test de Kruskal-Wallis.

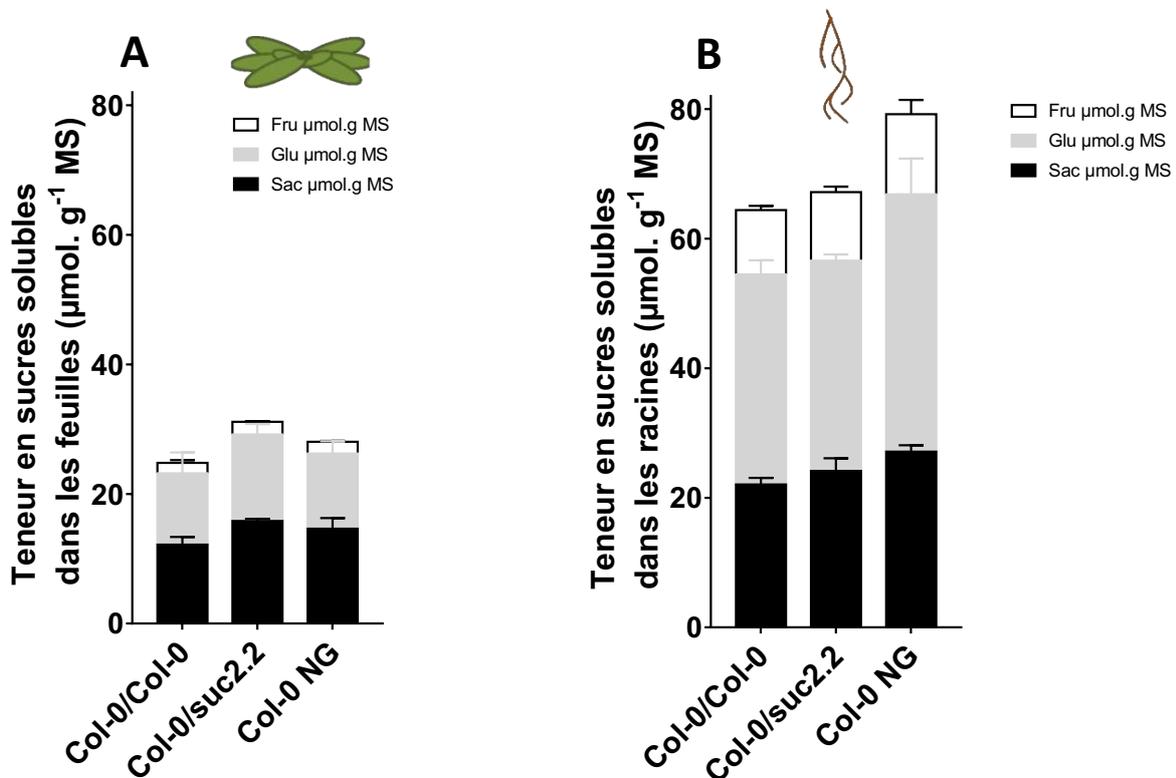


Figure 52. Teneurs cumulées en sucres solubles dans les feuilles et les racines des plantes Col-0/Col-0, Col-0/*suc2.2* et Col-0 NG.

A. Teneur cumulée en sucres solubles dans les feuilles (µmol.g⁻¹ MS). B. Teneur cumulée en sucres solubles dans les racines (µmol.g⁻¹ MS). Les valeurs correspondent à la moyenne (+/- erreur standard) de pools de plantes de 3 réplicats (n=3) biologiques indépendants (8 à 12 plantes par pool, 1 pool par réplicat).

équivalentes aux teneurs des plantes Col-0/Col-0 ($32,42 \mu\text{mol.g}^{-1}$). Les teneurs en glucose dans les plantes Col-0 NG ($39,7 \mu\text{mol.g}^{-1}$) sont supérieures à celles des deux types de plantes greffées. De plus, les teneurs en fructose dans les racines (**Figure 51, C**) des plantes Col-0/*suc2.2* ($10,59 \mu\text{mol.g}^{-1}$) sont inférieures à celles des plantes Col-0 NG ($12,37 \mu\text{mol.g}^{-1}$) et légèrement supérieures à celles des plantes Col-0/Col-0 ($9,94 \mu\text{mol.g}^{-1}$). Enfin, les teneurs en amidon (données non présentées) ont été mesurées dans les racines, mais les quantités sont trop faibles pour être quantifiées précisément par la méthode utilisée.

En résumé, les teneurs en sucres dans les racines des plantes Col-0/Col-0 sont soit équivalentes soit légèrement inférieures aux teneurs en sucres retrouvées dans les racines des plantes Col-0/*suc2.2* et ce pour les trois sucres quantifiés. De plus, les teneurs en sucres racinaires sont supérieures dans les plantes Col-0 NG pour les trois sucres quantifiés comparées aux plantes des deux types de greffes étudiées.

1.1.5.3 Comparaison des teneurs en sucres dans les feuilles et dans les racines

Les proportions des trois sucres solubles sont différentes entre les feuilles et les racines. Dans les feuilles, les teneurs en saccharose et en glucose sont du même ordre de grandeur, alors que dans les racines, les teneurs en glucose sont supérieures à celle du saccharose. Les teneurs en fructose sont, dans tous les cas, les plus faibles. De plus, le niveau de ces teneurs est différent entre les feuilles et les racines (**Figures 50 et 51**). Les teneurs en chaque sucre soluble dans les racines sont supérieures à celles des feuilles. Cependant, les teneurs en amidon sont très largement supérieures dans les feuilles comparées aux racines. De plus, rapportés à la masse totale de la plante, les sucres racinaires ne représentent qu'une faible partie des sucres totaux de toute la plante. Lorsque sont additionnées les teneurs en chaque sucre soluble (saccharose, glucose et fructose), il apparaît que dans les feuilles (**Figure 52, A**), les plantes Col-0/*suc2.2* contiennent plus de sucres solubles cumulés que les feuilles des deux autres types de plantes. En revanche dans les racines (**Figure 52, B**), ce sont les plantes Col-0 NG qui ont le plus de sucres solubles cumulés. Dans les feuilles comme dans les racines, les plantes Col-0/Col-0 ont moins de sucres solubles cumulés que les deux autres types de plantes. La mutation d'*AtSUC2* dans les racines semble donc induire une augmentation des sucres dans les feuilles et très légèrement, dans les racines. De plus, la greffe entraîne une faible diminution de la teneur en sucres dans les feuilles et de manière plus importante dans les racines.

Les teneurs en sucres retrouvées dans cette étude pour les plantes sauvages non greffées sont à des niveaux comparables à celles retrouvées dans les plantes Col-0 cultivées en condition hydrique témoin de l'étude du mutant *suc1* (**chapitre IV**) pour tous les sucres solubles et l'amidon. En additionnant les valeurs des trois sucres solubles, il est retrouvé dans cette étude pour les plantes Col-

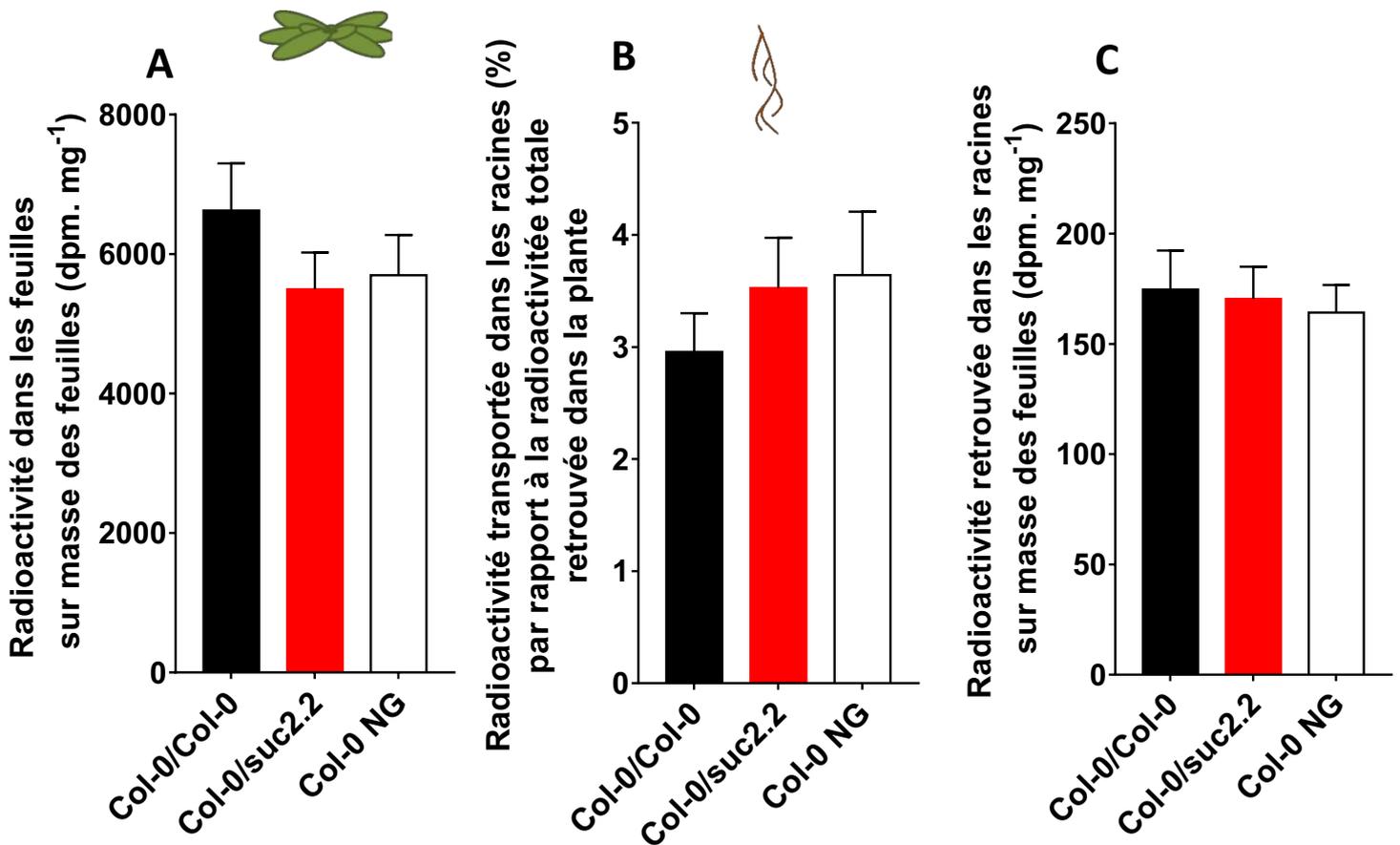


Figure 53. Etude de l'assimilation du ¹⁴CO₂ et du transport à longue distance dans les plantes Col-0/Col-0, Col-0/suc2.2 et Col-0 NG.

A. Rapport entre la radioactivité retrouvée dans les feuilles et la masse des feuilles (DPM.mg⁻¹ MS). B. pourcentage de radioactivité transportée dans les racines par rapport à la radioactivité totale retrouvée dans toute la plante (%). C. Rapport entre la radioactivité retrouvée dans les racines et la masse des feuilles (DPM.mg⁻¹ MS).

Les valeurs correspondent à la moyenne (+/- erreur standard) de plantes de 3 réplicats (n=3) biologiques indépendants (6 à 8 plantes par réplicat). L'absence de lettres sur les barres indique une absence de significativité (P < 0,05) déterminée par un test de Kruskal-Wallis.

0 NG 27,9 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ de sucres solubles et 22,8 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ de sucres solubles pour les plantes Col-0 Tm de l'étude sur *suc1*.

1.1.6 Transport à longue distance du saccharose

Afin de déterminer le flux de carbone *via* le phloème des différents types de plantes étudiées, des expérimentations d'assimilation de CO_2 radiomarqué ont été réalisées comme décrit dans le **chapitre IV**. La radioactivité des feuilles et des racines est mesurée après 45 min de chasse. Ceci nous permet donc d'obtenir le rapport entre la radioactivité retrouvée dans les feuilles et la masse des feuilles, révélateur de la capacité d'assimilation du carbone par les feuilles. Le pourcentage de la radioactivité retrouvée dans les racines par rapport à la radioactivité totale de la plante peut aussi être obtenu, correspondant au pourcentage de radioactivité transportée des feuilles sources vers les racines. De plus, le rapport entre la radioactivité retrouvée dans les racines et la masse des feuilles a été calculé, permettant d'avoir une estimation des flux de carbone vers les racines par mg de rosette.

Le rapport entre la radioactivité retrouvée dans les feuilles et la masse des feuilles (**Figure 53, A**) est plus faible pour les plantes Col-0/*suc2.2* (5494,9 dpm.mg^{-1}) que pour les deux autres types de plantes. Ce rapport est supérieur dans les plantes Col-0/Col-0 (6624,1 dpm.mg^{-1}) comparées aux plantes Col-0 NG (5696,4 dpm.mg^{-1}). On peut donc en déduire que l'assimilation est plus faible pour les plantes Col-0/*suc2.2* que pour les plantes Col-0/Col-0 et légèrement plus faible que pour les plantes Col-0 NG. Le pourcentage de radioactivité retrouvée dans les racines par rapport à la radioactivité totale retrouvée dans la plante (**Figure 53, B**) des plantes Col-0/*suc2.2* (3,52 %) est supérieur à celui des plantes Col-0/Col-0 (2,95 %) et inférieur à celui des plantes Col-0 NG (3,64). De plus, ces résultats montrent qu'une très grande partie de la radioactivité est localisée dans les rosettes (96 % à 97 %), indiquant que la plupart des molécules carbonées sont conservées dans les feuilles et qu'une très faible proportion seulement est transportée dans les racines après 45 min de chasse. Enfin, le rapport entre la radioactivité transportée vers les racines et la masse des feuilles (**Figure 53, C**) révèle que les plantes Col-0/*suc2.2* (170,39 dpm.mg^{-1}) présentent des valeurs comprises entre celles des plantes Col-0/Col-0 (174,63 dpm.mg^{-1}) et celles des plantes Col-0 NG (164,20 dpm.mg^{-1}). Néanmoins, ces valeurs sont proches pour les trois types de plantes avec des différences inférieures à 6 % entre elles.

Globalement, l'assimilation par mg de rosette varie légèrement entre les plantes des différents types et semble plus important dans les plantes Col-0/Col-0 que dans les autres types de plantes. En revanche, la quantité de radioactivité exportée vers les racines par mg de rosette est similaire entre les différentes plantes (Col-0/Col-0, Col-0/*suc2.2* et Col-0 NG). De plus, les valeurs pour les plantes Col-0 NG sont proches de celles retrouvées pour les plantes Col-0 cultivées en condition hydrique témoin de l'étude du mutant *suc1* (**chapitre IV**) pour le rapport entre la radioactivité retrouvée dans les feuilles

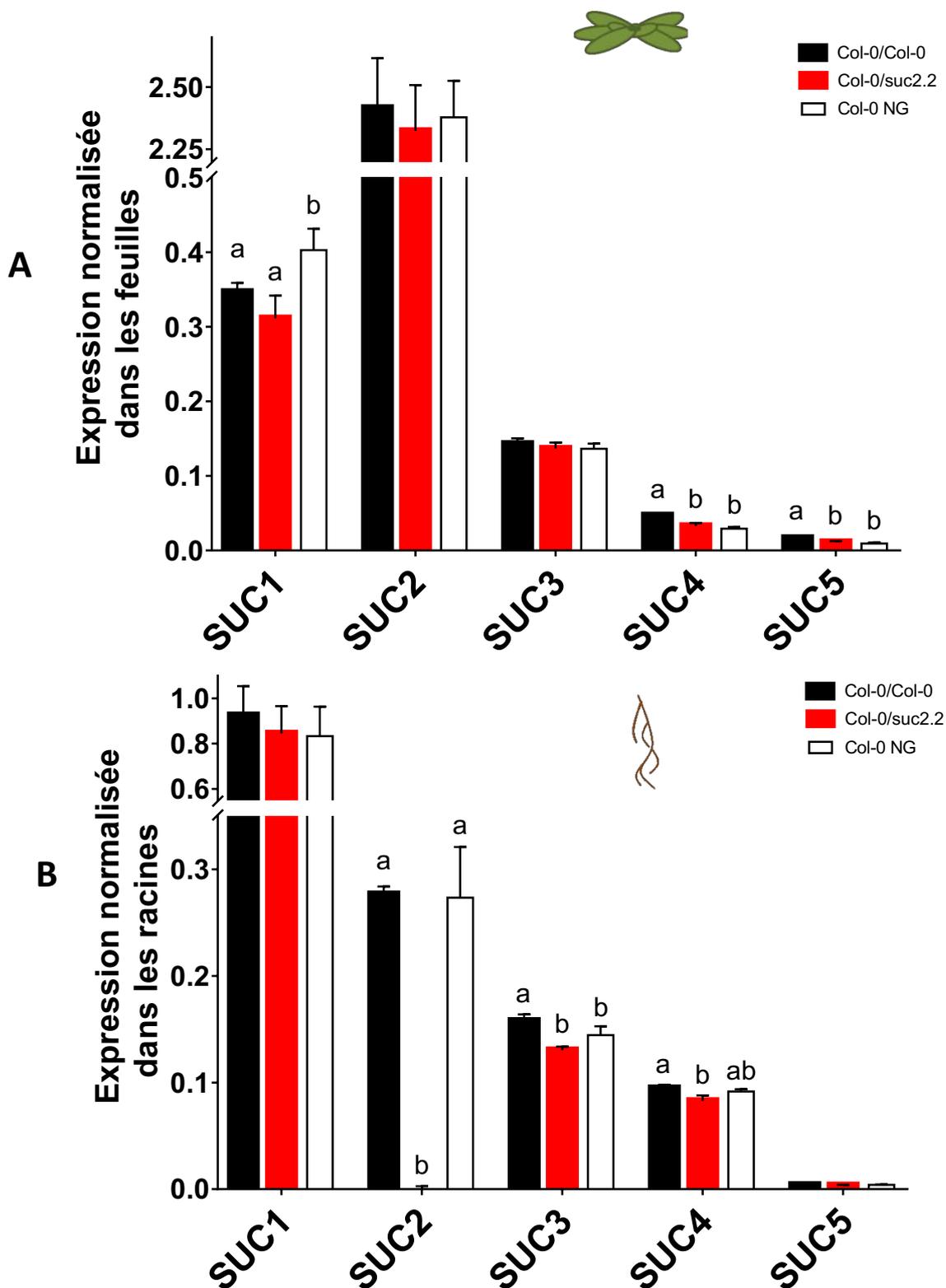


Figure 54. Expression de gènes codant des transporteurs de saccharose de type SUC dans les feuilles et dans les racines des plantes Col-0/Col-0, Col-0/suc2.2 et Col-0 NG.

A. Expression dans les feuilles. B. Expression dans les racines.

Les données sont normalisées (pas d'unité) par la moyenne de 3 gènes de référence *At5g12240*, *At4g26410* et *At3g18780* (Czechowski *et al.*, 2005). Les valeurs correspondent à la moyenne (+/- erreur standard) de pools de plantes de 3 réplicats (n=3) biologiques indépendants (3 à 6 plantes par pool, 1 pool par réplicat). Les lettres différentes sur les barres indiquent les différences significatives (P < 0,05) déterminée par un test de Kruskal-Wallis, réalisé gène par gène. L'absence de lettre indique une absence de significativité.

et la masse des feuilles (respectivement, 5696,4 dpm.mg⁻¹ et 6074,8 dpm.mg⁻¹), les pourcentages de radioactivité transportée vers les racines par rapport à la radioactivité totale des plantes (respectivement, 3,64 % et 3,23 %) et les valeurs de radioactivité retrouvée dans les racines par mg de feuille (respectivement, 164,20 dpm.mg⁻¹ et 205,5 dpm.mg⁻¹).

1.1.7 Expression des gènes codant des transporteurs de saccharose et des invertases

L'expression de différents gènes codant des transporteurs de saccharose et des invertases a été quantifiée par RT-qPCR afin d'étudier l'effet de la mutation d'*AtSUC2* dans les racines au niveau moléculaire. Ainsi, l'expression de gènes codant des transporteurs de saccharose de types SUC et SWEET et de gènes codant des invertases a été analysée dans les feuilles et les racines des deux types de greffe et dans le témoin non greffé (Col-0/Col-0, Col-0/*suc2.2* et Col-0 NG).

1.1.7.1 Gènes codant des transporteurs de type SUC

Dans les feuilles, les gènes codant des transporteurs de type SUC exprimés sont *AtSUC1* à 5 (**Figure 54, A**), conformément à ce qui a déjà été trouvé au laboratoire (**Chapitre IV** ; Durand *et al.*, 2016 ; Durand *et al.*, 2018). Le plus exprimé dans ce compartiment est *AtSUC2* puis *AtSUC1* suivi d'*AtSUC3*, 4 et 5.

L'expression foliaire d'*AtSUC1* retrouvée dans les plantes Col-0/*suc2.2* (0,311) est plus faible que celle dans les plantes Col-0/Col-0 (0,346). Le niveau d'expression foliaire de ce gène est plus important dans les plantes Col-0 NG (0,402). Dans les feuilles, l'expression du gène *AtSUC2* est légèrement plus faible dans les plantes Col-0/*suc2.2* (2,32) que dans les plantes des deux autres types. Cette expression est supérieure dans les plantes Col-0/Col-0 (2,41) comparées à celles des plantes Col-0 NG (2,37). Ces différences sont néanmoins très faibles (moins de 4 %). Très peu de variations d'expression sont observées pour le gène *AtSUC3* : les niveaux d'expression de ce gène sont de 0,142 pour les plantes Col-0/Col-0, de 0,137 pour les plantes Col-0/*suc2.2* et de 0,136 pour les plantes Col-0 NG. Le niveau d'expression du gène *AtSUC4* dans les plantes Col-0/*suc2.2* (0,032) est compris entre ceux des deux autres types de plantes étudiées. Ce gène est plus exprimé dans les plantes Col-0/Col-0 (0,047) que dans les plantes Col-0 NG (0,029). Enfin, les niveaux d'expression du gène *AtSUC5* des trois types de plantes sont très faibles (entre 0,009 et 0,016).

Dans les racines, les mêmes transporteurs de type SUC sont retrouvés (**Figure 54, B**) que dans les feuilles (**Figure 54, A**), c'est-à-dire *AtSUC1* à 5. En revanche l'ordre des niveaux d'expression n'est

pas le même : dans le compartiment racinaire (**Figure 54, B**), *AtSUC1* est le transporteur de type SUC le plus exprimé puis *AtSUC2* suivi d'*AtSUC3*, 4 puis 5.

Le niveau d'expression racinaire d'*AtSUC1* est proche entre les plantes des deux types de greffe et le témoin Col-0 NG. Toutefois, le niveau d'expression de ce gène dans les plantes Col-0/*suc2.2* (0,845) est légèrement inférieur à celui des plantes Col-0/Col-0 (0,925) et légèrement supérieur à celui des plantes Col-0 NG (0,833). L'expression d'*AtSUC2* est absente dans les racines des plantes Col-0/*suc2.2*, ce qui est attendu dans les plantes greffées mutées pour le gène *AtSUC2* uniquement dans les racines. Le niveau d'expression d'*AtSUC2* est comparable entre les plantes Col-0/Col-0 (0,276) et les plantes Col-0 NG (0,273). Le niveau d'expression du gène *AtSUC3* pour les trois types de plantes suit les mêmes tendances que pour le gène *AtSUC4* : le niveau d'expression des gènes est plus faible dans les plantes Col-0/*suc2.2* (0,130 pour *AtSUC3* et 0,082 pour *AtSUC4*) par rapport aux deux autres types de plantes. Les niveaux d'expression des gènes *AtSUC3* et *AtSUC4* sont très légèrement supérieurs dans les plantes Col-0/Col-0 (0,157 pour *AtSUC3* et 0,094 pour *AtSUC4*) comparées aux plantes Col-0 NG (0,144 pour *AtSUC3* et 0,091 pour *AtSUC4*). Enfin, l'expression du gène *AtSUC5* est très faible et peu de variations d'expression entre les trois types de plantes sont observables : 0,00365 pour les plantes Col-0/*suc2.2*, 0,00403 pour les plantes Col-0/Col-0 et 0,00407 pour les plantes Col-0 NG.

En résumé, les niveaux d'expression dans les feuilles et les racines sont différents pour *AtSUC1* qui est deux à trois fois plus exprimé dans les racines que dans les feuilles et *AtSUC2* qui est dix fois moins exprimé dans les racines que dans les feuilles. Les niveaux d'expression sont comparables entre les feuilles et les racines pour *AtSUC3*, 4 et 5. Les différences d'expression de ces gènes sont celles habituellement retrouvées (**Chapitre IV** ; Durand *et al.*, 2016). De plus, les variations d'expression des gènes entre les différents types de plantes étudiées sont faibles, que ce soit dans les feuilles ou dans les racines. Les principales variations sont observées dans les feuilles pour le gène *AtSUC1*. L'expression d'*AtSUC2* est bien éteinte dans les racines des plantes Col-0/*suc2.2* mais bien présente dans les feuilles de cette même greffe.

Globalement, les niveaux d'expression dans les plantes Col-0 non greffées sont cohérents avec ceux observés dans les plantes Col-0 cultivées en condition hydrique témoin de l'expérimentation sur le mutant *suc1*. En effet, les niveaux d'expression des gènes peuvent être comparés entre les deux études puisque la technique d'extraction des ARN et les gènes de référence utilisés sont identiques entre les deux études. Néanmoins, quelques différences sont remarquables. Le niveau d'expression d'*AtSUC2* dans les racines est deux fois plus important dans les plantes de l'étude du mutant *suc1* (0,519) que dans les plantes de l'étude sur *AtSUC2* (0,273). De plus, l'expression du gène *AtSUC5* n'était

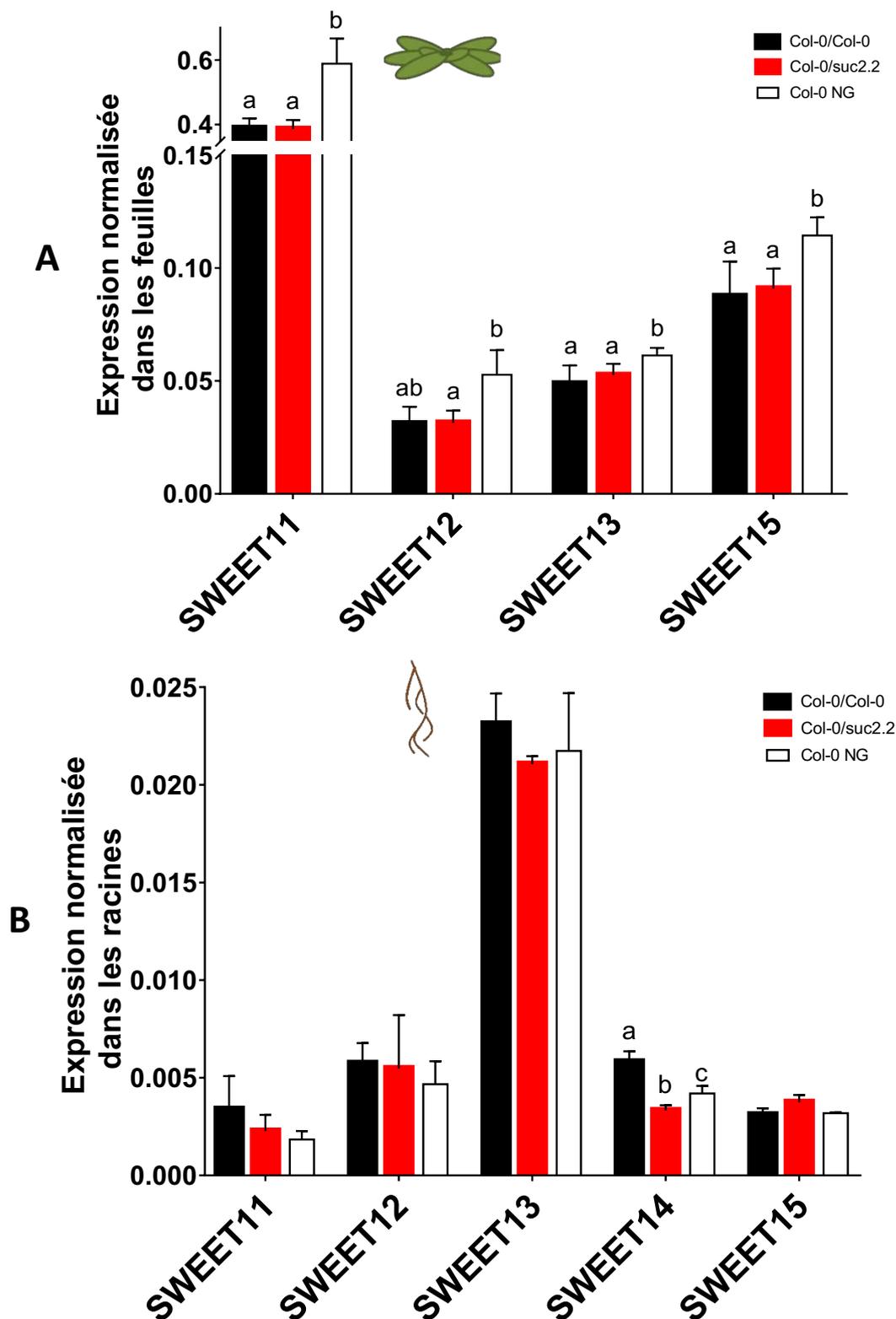


Figure 55. Expression de gènes codant des transporteurs de saccharose de type SWEET dans les feuilles et dans les racines des plantes Col-0/Col-0, Col-0/suc2.2 et Col-0 NG.

A. Expression dans les feuilles. **B.** Expression dans les racines.

Les données sont normalisées (pas d'unité) par la moyenne de 3 gènes de référence *At5g12240*, *At4g26410* et *At3g18780* (Czechowski *et al.*, 2005). Les valeurs correspondent à la moyenne (+/- erreur standard) de pools de plantes de 3 réplicats (n=3) biologiques indépendants (3 à 6 plantes par pool, 1 pool par réplicat). Les lettres différentes sur les barres indiquent les différences significatives ($P < 0,05$) déterminée par un test de Kruskal-Wallis, réalisé gène par gène. L'absence de lettre indique une absence de significativité.

pas retrouvée dans les feuilles ni dans les racines des plantes Col-0 de l'étude sur le mutant *suc1* alors que dans l'étude présentée dans ce chapitre, une expression de ce gène est retrouvée dans les deux compartiments, bien que les niveaux d'expression soient très faibles.

1.1.7.2 Gènes codant des transporteurs de saccharose de type SWEET

Dans les feuilles (**Figure 55, A**), l'expression des gènes *AtSWEET11*, *12*, *13* et *15* a été détectée, ce qui est en accord avec les résultats du **chapitre IV**. *AtSWEET11* est le plus exprimé dans ce compartiment. Les trois autres gènes ont des niveaux d'expression proches, mais *AtSWEET15* est légèrement plus exprimé qu'*AtSWEET13* et ces deux gènes sont légèrement plus exprimés qu'*AtSWEET12*.

Globalement, peu de différences d'expression foliaire des *AtSWEETs* sont observables entre les différents types de plantes étudiées. Le niveau d'expression du gène *AtSWEET11* est similaire entre les plantes Col-0/*suc2.2* (0,386) et les plantes Col-0/Col-0 (0,389). L'expression foliaire d'*AtSWEET11* est supérieure dans les plantes Col-0 NG (0,588) par rapport aux plantes greffées. Les mêmes tendances sont observées pour le gène *AtSWEET12* : le niveau d'expression de ce gène comparable entre les plantes Col-0/*suc2.2* (0,0314) et les plantes Col-0/Col-0 (0,0311), et l'expression de ce gène est plus importante dans les plantes Col-0 NG (0,0527). Le niveau d'expression du gène *AtSWEET13* dans les plantes Col-0/*suc2.2* (0,0525) est proche de celui retrouvé dans les plantes Col-0/Col-0 (0,0487) et inférieur à celui retrouvé dans les plantes Col-0 NG (0,0613). Enfin, l'expression d'*AtSWEET15* dans les plantes Col-0/*suc2.2* (0,0909) est encore une fois proche de celle des plantes Col-0/Col-0 (0,0875) et inférieure à celle des plantes Col-0 NG (0,1143).

Dans les racines (**Figure 55, B**), les gènes *AtSWEET11* à *15* sont exprimés. Dans ce compartiment, l'expression d'*AtSWEET13* y est la plus forte et les expressions des quatre autres gènes retrouvés sont comparables entre elles et ont un niveau d'expression très faible. De plus, l'expression de ces gènes est bien plus élevée dans les feuilles que dans les racines.

L'expression racinaire d'*AtSWEET11* dans les plantes Col-0/*suc2.2* (0,00227) est comprise entre celles des plantes Col-0/Col-0 (0,00339) et Col-0 NG (0,00183). L'expression du gène *AtSWEET12* dans les plantes Col-0/*suc2.2* (0,00547) est légèrement inférieure à celle des plantes Col-0/Col-0 (0,00574) et supérieure à celle des plantes Col-0 NG (0,00467). L'expression racinaire du gène *AtSWEET13* est inférieure dans les plantes Col-0/*suc2.2* (0,0210) comparées aux plantes Col-0/Col-0 (0,0231). Le niveau d'expression de ce gène dans les plantes Col-0 NG (0,0217) est compris entre celui des plantes Col-0/Col-0 et celui des plantes Col-0/*suc2.2*. Les mêmes tendances sont observables pour *AtSWEET14* que pour *AtSWEET13*. Cependant la différence est plus marquée entre les plantes Col-0/*suc2.2*

(0,00332) et les plantes Col-0 NG (0,00419). De plus, les plantes Col-0/Col-0 (0,00581) ont encore une expression plus importante comparée à celle des deux autres types de plantes. Enfin, l'expression du gène *AtSWEET15* dans les plantes Col-0/*suc2.2* (0,00375) est supérieure à celle des deux autres types de plantes étudiées, qui ont un niveau d'expression comparable entre elles (0,00311 pour Col-0/Col-0 et 0,00318 pour Col-0 NG).

En résumé, les niveaux d'expression des gènes *AtSWEETs* sont très proches dans les feuilles des plantes Col-0/Col-0 et Col-0/*suc2.2*. En revanche, dans les plantes Col-0 NG les niveaux d'expression foliaires de ces gènes sont légèrement plus élevés par rapport aux deux types de plantes greffées. Dans les racines, l'expression des gènes *AtSWEETs* dans les plantes Col-0/Col-0 est pratiquement toujours supérieure à celle des deux autres types de plantes, bien que les différences d'expression soient faibles. L'expression des gènes codant des transporteurs de saccharose de type SWEET est très supérieure dans les feuilles par rapport aux racines. D'autre part, les niveaux d'expression des gènes étudiés dans les racines sont comparables pour les plantes Col-0/Col-0 et Col-0/*suc2.2* sauf pour *AtSWEET14* pour lequel les différences d'expression sont supérieures à 20 %.

Globalement, les gènes retrouvés exprimés dans chaque compartiment sont identiques à ceux observés dans les plantes qui font l'objet du **chapitre IV** ainsi que dans l'article de Durand *et al.*, (2016). De plus, les niveaux d'expression des gènes *AtSWEETs* dans les feuilles des plantes Col-0 non greffées de ce chapitre sont relativement proches de ceux observés dans les feuilles des plantes Col-0 cultivées en condition hydrique témoin de l'étude du mutant *suc1*. Dans les racines, en revanche, les gènes *AtSWEET11* et *AtSWEET12* sont retrouvés 4 à 10 fois plus exprimés dans les plantes Col-0 cultivées en condition Tm (0,019 pour *AtSWEET11* et 0,020 pour *AtSWEET12*) de l'étude du mutant *suc1* par rapport aux plantes Col-0 non greffées de ce chapitre (0,0018 pour *AtSWEET11* et 0,005 pour *AtSWEET12*). Toutefois, les gènes *AtSWEET 13, 14* et *15* sont exprimés de manière comparable dans les racines des plantes Col-0 (NG ou Tm de l'étude sur *AtSUC1*) des deux études (*AtSWEET13* : 0,021 pour Col-0 NG et 0,022 pour Col-0 Tm ; *AtSWEET14* : 0,0042 pour Col-0 NG et 0,0046 pour Col-0 Tm ; *AtSWEET15* : 0,0032 pour Col-0 NG et 0,0034 pour Col-0 Tm).

1.1.7.3 Gènes codant des invertases

Afin d'aller plus loin dans l'analyse des gènes en lien avec le métabolisme des sucres, l'expression de gènes codant des invertases a été quantifiée dans les trois types de plantes (Col-0/Col-0, Col-0/*suc2.2* et Col-0 NG). Cette étude a été réalisée afin de détecter une hydrolyse potentielle du saccharose sous forme d'hexoses après son déchargement du phloème. Le saccharose peut être en effet clivé en hexoses (glucose et fructose) par les invertases. Les gènes *AtCWIN1* et 5 (codant des

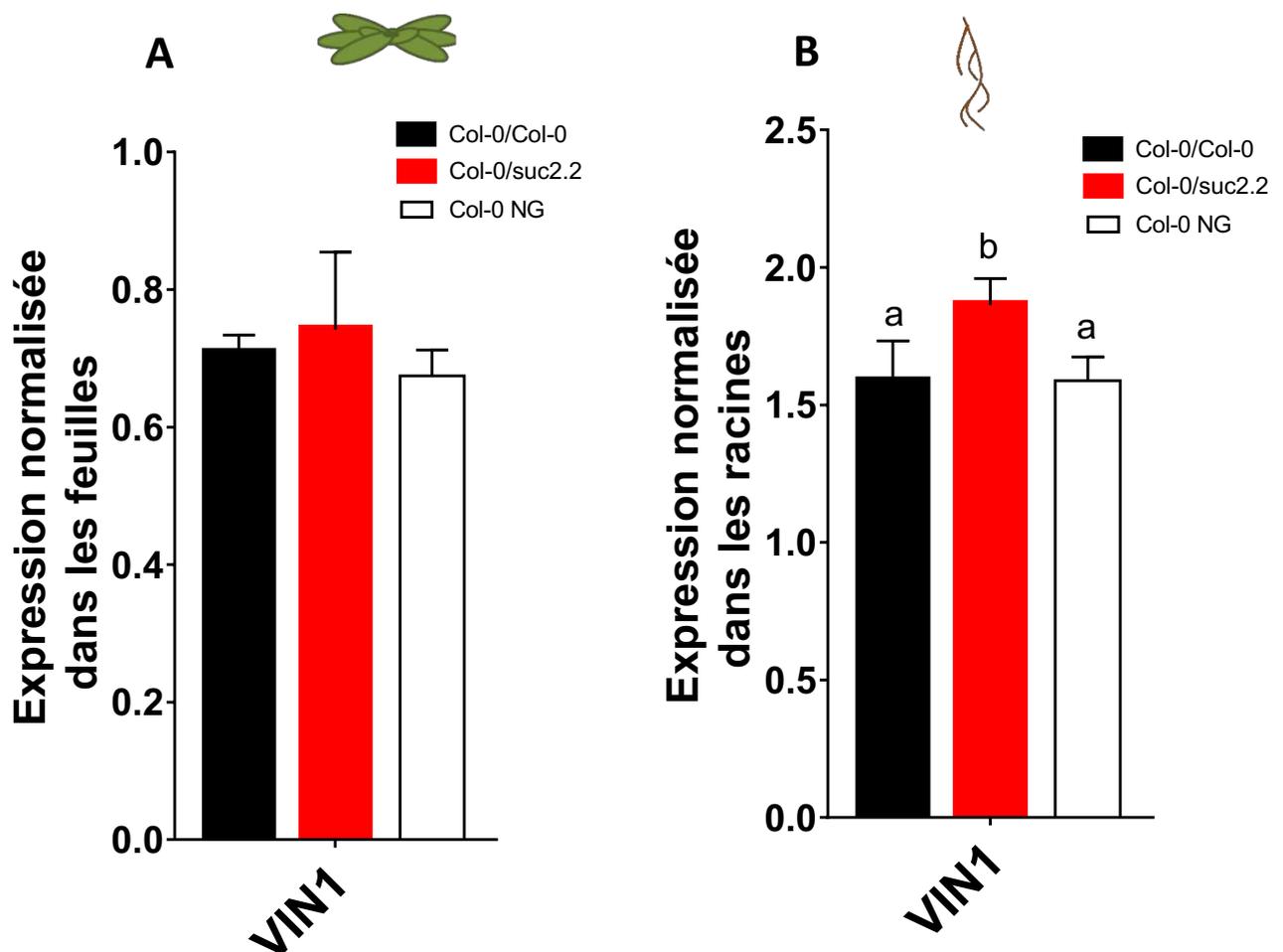


Figure 56. Expression d'un gène codant une invertase vacuolaire (VIN1) dans les feuilles et dans les racines des plantes Col-0/Col-0, Col-0/suc2.2 et Col-0 NG.

A. Expression dans les feuilles. **B.** Expression dans les racines.

Les données sont normalisées (pas d'unité) par la moyenne de 3 gènes de référence *At5g12240*, *At4g26410* et *At3g18780* (Czechowski *et al.*, 2005). Les valeurs correspondent à la moyenne (+/- erreur standard) de pools de plantes de 3 réplicats (n=3) biologiques indépendants (3 à 6 plantes par pool, 1 pool par réplicat). Les lettres différentes sur les barres indiquent les différences significatives ($P < 0,05$) déterminée par un test de Kruskal-Wallis, réalisé gène par gène. L'absence de lettre indique une absence de significativité.

invertases pariétales), les gènes *AtCIN1* et 2 (codant des invertases cytosoliques) et les gènes *AtVIN1* et 2 (codant des invertases vacuolaires) sont exprimés dans les feuilles et les racines. Aucune différence importante de l'expression de ces gènes n'a été observée entre les différents types de plantes, sauf pour le gène *AtVIN1* dont le profil d'expression est présenté dans la **figure 56**.

Dans les feuilles (**Figure 56, A**), le niveau d'expression d'*AtVIN1* dans les plantes Col-0/*suc2.2* (0,742) est légèrement supérieur à celui retrouvé dans les deux autres types de plantes. L'expression de ce gène est supérieure dans les plantes Col-0/Col-0 (0,708) par rapport aux plantes Col-0 NG (0,674). Les différences d'expression d'*AtVIN1* dans les feuilles entre les différents types de plantes sont faibles (inférieures à 10 %).

Dans les racines (**Figure 56, B**), le profil d'expression du gène *AtVIN1* pour les trois types de plantes étudiées est proche de celui observé dans les feuilles mais le niveau d'expression du gène est environ deux fois plus élevé. L'expression du gène *AtVIN1* est supérieure dans les plantes Col-0/*suc2.2* (1,862) par rapport à celle retrouvée dans les deux autres types de plantes, qui ont des niveaux d'expression très similaires (1,585 dans les plantes Col-0/Col-0 et 1,587 dans les plante Col-0 NG).

Ces résultats montrent donc que ni la greffe, ni la mutation d'*AtSUC2* dans les racines n'influencent l'expression des invertases. La seule variation observée est une légère augmentation de l'expression d'une invertase vacuolaire dans les feuilles et les racines en cas de mutation du gène *AtSUC2* dans les racines.

1.2 Localisation de l'expression du gène et de la protéine AtSUC2

Afin de compléter l'étude dans le but d'élucider le rôle de la protéine AtSUC2 dans les racines, la localisation de l'expression du gène ainsi que la localisation de la protéine dans ce compartiment ont été étudiés. En effet, la localisation de l'expression racinaire du gène n'a été réalisée que sur des racines de plantules (Truernit et Sauer, 1995). De plus, même si la localisation cellulaire de la protéine au niveau des feuilles est connue (dans les cellules compagnes, Stadler et Sauer, 1996), la localisation cellulaire de la protéine dans les racines n'a jamais été réalisée. L'analyse de la localisation de l'expression du gène *AtSUC2* a été réalisée grâce à différents gènes rapporteurs exprimés sous le contrôle du promoteur *pAtSUC2*. Pour la localisation de la protéine AtSUC2, des expérimentations d'immunohistochimie avec des anticorps spécifiques ont été réalisées sur des plantes de génotype Col-0, *suc2.2* et *suc2F*.

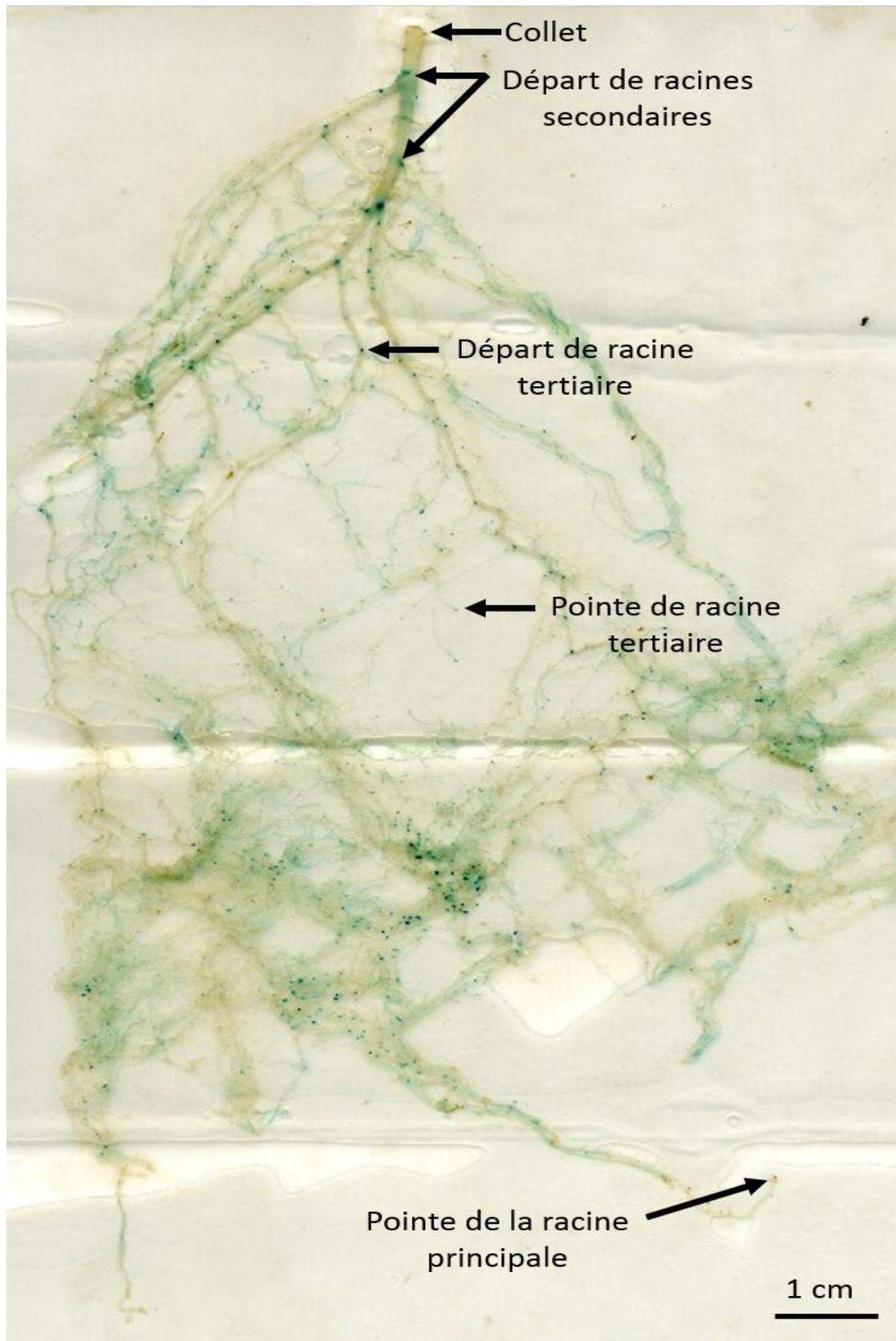


Figure 57. Localisation de l'expression du gène *AtSUC2* dans le système racinaire entier de la lignée SUC2-GUS 4-2 (*pAtSUC2::GUS*).

Photographie du système racinaire entier de la lignée SUC2-GUS 4-2 après 12h de réaction avec son substrat (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-B-D-glucopyranoside).

1.2.1 Localisation de l'expression du gène *AtSUC2* à l'aide de lignées exprimant un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur *pAtSUC2*

Plusieurs types de lignées avec un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur du gène *AtSUC2* (*pAtSUC2*) ont été utilisés. Ce promoteur s'exprime dans les cellules compagnes dans les feuilles (Stadler et Sauer, 1996) et celui-ci est largement utilisé comme promoteur spécifique des cellules compagnes pour localiser les cellules compagnes elles-mêmes ou bien pour suivre l'expression d'une molécule fluorescente qui sera chargée dans le phloème, permettant ainsi de visualiser les tubes criblés (Yin *et al.*, 2012 ; Marquès-Bueno *et al.*, 2016 ; Ross-Elliott *et al.*, 2017 et de nombreux autres articles). Des lignées SUC2-GUS exprimant le gène de la β -glucuronidase (GUS) sous le contrôle du promoteur *pAtSUC2* (*pAtSUC2::GUS*) ont été utilisées pour définir la localisation tissulaire de l'expression du gène *AtSUC2*. Ces lignées ont été généreusement fournies par Sylvie Dinant (INRA de Versailles). Ce type de lignée a déjà été utilisé pour prouver la localisation foliaire de l'expression du gène *AtSUC2* (Truernit et Sauer, 1995) ou pour montrer l'induction du promoteur par des nématodes (Juergensen *et al.*, 2003 ; Zhao *et al.*, 2018). Une lignée SUC2-RED TIDE a aussi été utilisée, exprimant deux copies de la mCherry (fluorochrome) sous le contrôle du promoteur *pAtSUC2* et adressé au noyau des cellules grâce au gène *H2B* (*pAtSUC2::H2B-2xmCherry*). Cette lignée, décrite par Marquès-Bueno *et al.* (2016) a été généreusement fournie par Grégory Vert (CNRS/CEA Paris-Sud). Enfin une lignée SUC2-GFP qui exprime une GFP soluble sous le contrôle du promoteur *pAtSUC2* a été utilisée afin de situer les tubes criblés dans les plantes lors de co-localisations. Cette lignée a aussi été fournie par Sylvie Dinant (INRA Versailles).

1.2.1.1 Localisation de l'expression du gène *AtSUC2* à l'aide des lignées exprimant le gène de la β -glucuronidase (GUS)

Pour rappel, l'analyse des lignées SUC2-GUS (**Figure 57, 58 et 59**) permet d'observer la localisation de l'expression du gène *AtSUC2* par la formation d'un précipité bleu spécifiquement localisé à l'endroit où le gène est exprimé. Ce précipité se forme à l'issue d'une réaction avec son substrat (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-B-D-glucopyranoside). Deux lignées issues de transformations indépendantes sont disponibles au laboratoire : SUC2-GUS 4-2 et SUC2-GUS 8-2. Les observations ont été réalisées sur un minimum de 5 plantes différentes de chaque lignée et les manipulations sur ces 5 plantes ont été réalisées de manières complètement indépendantes. De plus, les expérimentations ont été réalisées sur des systèmes racinaires entiers et sur des morceaux de pointes racinaires afin d'exclure des problèmes potentiels de pénétration du substrat.

L'étude du système racinaire entier de la lignée SUC2-GUS 4-2 (**Figure 57**) permet d'observer l'expression du gène *AtSUC2* à différents niveaux. Une forte coloration bleue est visible au niveau du départ des racines secondaires, le long de la racine principale et au niveau du départ des racines

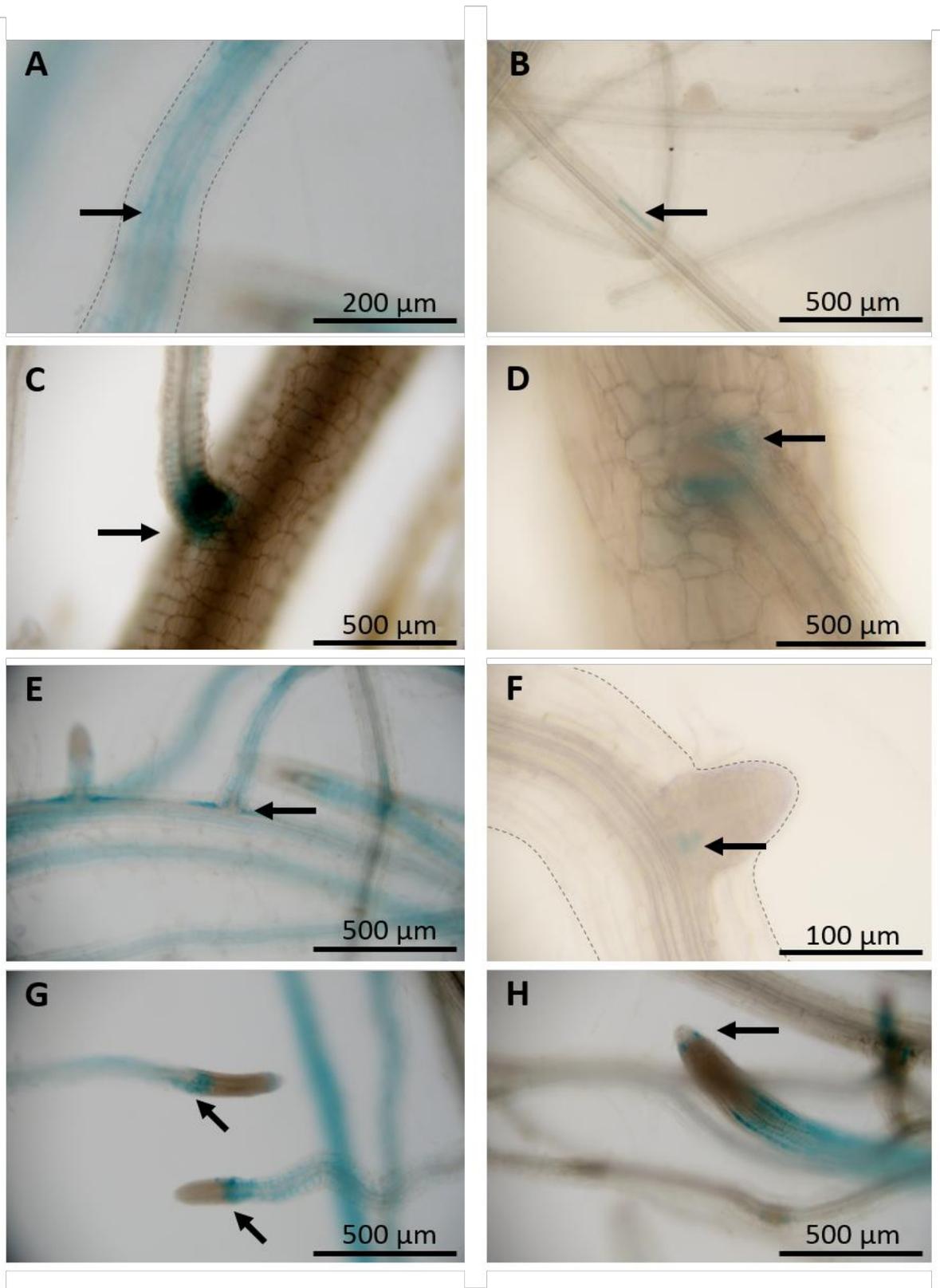


Figure 58. Localisation à l'échelle tissulaire de l'expression du gène *AtSUC2*, au niveau de différents types racinaire, dans la lignée *SUC2-GUS 4-2* (*pAtSUC2::GUS*).

Observation de la coloration bleue dans des racines (**A et B**). Observation de départs de racines secondaires au niveau de la racine principale vue sur le côté (**C**) ou de face (**D**). Observations de départs de racines tertiaires au niveau d'une racine secondaire (**E**). Observation d'un primordia racinaire (émergence d'une racine latérale) (**F**). Observation de pointes racinaires (**G et H**). Les racines sont des racines de la lignée *SUC2-GUS 4-2* après 3h de réaction avec son substrat (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-B-D-glucopyranoside). Les lignes en pointillés sur les images **A** et **D** correspondent aux contours de la racine.

tertiaires à partir des racines secondaires. Ceci montre donc une localisation de l'expression du gène *AtSUC2* au niveau de la majorité des départs de racines latérales. La coloration bleue est aussi retrouvée le long des fines racines (racines tertiaires et parties plus fines des autres racines) et dans les pointes racinaires y indiquant donc la localisation de l'expression du gène *AtSUC2*. L'observation au microscope à un plus fort grossissement de ces zones (**Figure 58**) permet de voir que la localisation de l'expression d'*AtSUC2* est visible pratiquement au centre de la racine (**Figure 58, A**), au niveau du phloème, ce qui est attendu de par la localisation de la protéine dans les cellules compagnes. Dans certaines racines fines, du marquage bleu n'est pas visible sur toute la longueur (**Figure 58, B**), mais certaines cellules compagnes sont colorées sous forme de « traits » bleus au centre de la racine. Au niveau des départs de racines secondaires à partir de la racine principale (**Figure 58, C et D**), la coloration bleue est visible sur une zone peu étendue mais le marquage est relativement fort (bien qu'il ne soit pas possible de réellement quantifier l'expression ici). De plus, il est possible d'observer l'expression du gène *AtSUC2* au niveau du départ des racines tertiaires à partir de racines secondaires (**Figure 58, E**). L'expression d'*AtSUC2* au niveau du départ de racines latérales est visible très tôt dans le développement des racines, dès l'apparition des primordia (émergence des racines latérales) (**Figure 58, F**). De plus, la coloration des fines racines est encore plus visible juste avant la pointe racinaire (**Figure 58, G**), à environ 150 à 300 μm de l'extrémité de la pointe de la racine. Cette zone pourrait correspondre à la zone d'élongation des cellules issues du méristème apical racinaire (Mullen *et al.*, 1998). De plus, cette observation au microscope permet d'observer que dans certaines pointes racinaires, l'expression du gène *AtSUC2* est retrouvée de manière très localisée, pratiquement au bout de la pointe, sur les côtés de la coiffe (**Figure 58, H**). Les localisations d'expression sont identiques dans les deux lignées GUS (*SUC2-GUS 4-2* et *8-2*), mais l'intensité de la coloration bleue est toujours supérieure dans les plantes de la lignée *SUC2-GUS 4-2* que dans les plantes de la lignée *SUC2-GUS 8-2* (non présentées).

En résumé, l'expression du gène *AtSUC2* est donc localisée dans le phloème des racines (certainement dans les cellules compagnes), comme attendu, mais aussi au niveau de tous les départs de racines latérales et le long des fines racines. De plus, il est exprimé juste au-dessus des pointes racinaires, probablement au niveau de la zone d'élongation des racines et de chaque côté de la coiffe des pointes racinaires. Enfin, le gène *AtSU2* est exprimé au niveau des primordia racinaires.

Pour préciser la localisation de l'expression d'*AtSUC2* au niveau cellulaire, des coupes transversales ont été réalisées sur les racines de la lignée *SUC2-GUS 4-2* (**Figure 59**). Au niveau du départ d'une racine latérale (**Figure 59, A**), l'expression d'*AtSUC2* est localisée dans de grandes cellules sous l'épiderme qui correspond certainement aux cellules du parenchyme cortical. Au niveau des pointes racinaires (**Figure 59, B et C**), l'expression est localisée juste autour du cylindre central, à la

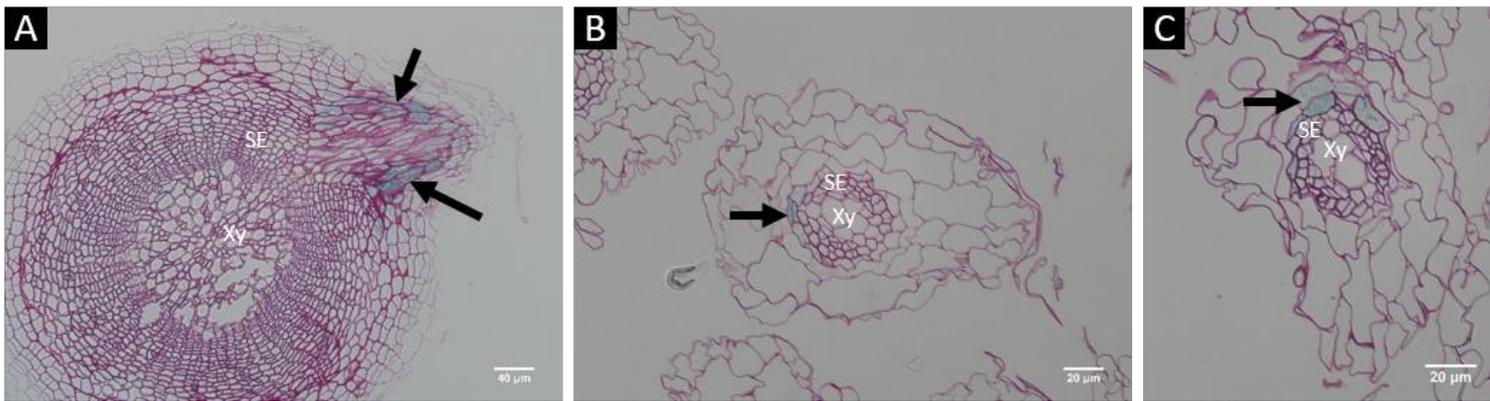


Figure 59. Localisation à l'échelle cellulaire de l'expression du gène *AtSUC2* sur des coupes transversales de racines, sur la lignée *SUC2-GUS 4-2* (*pAtSUC2::GUS*).

A. Observation d'un départ de racine latérale. **B et C.** Observation de pointes racinaires. Les racines de plantes de lignées *SUC2-GUS 4-2* ont été incluses dans une résine après la révélation de la coloration GUS. Ensuite, les coupes transversales des pointes racinaires (épaisseur de 1,5 μm à 1,75 μm) ont été réalisées au microtome et une coloration au réactif de Schiff a été effectuée. Xy = cellules du xylème, SE = Phloème.

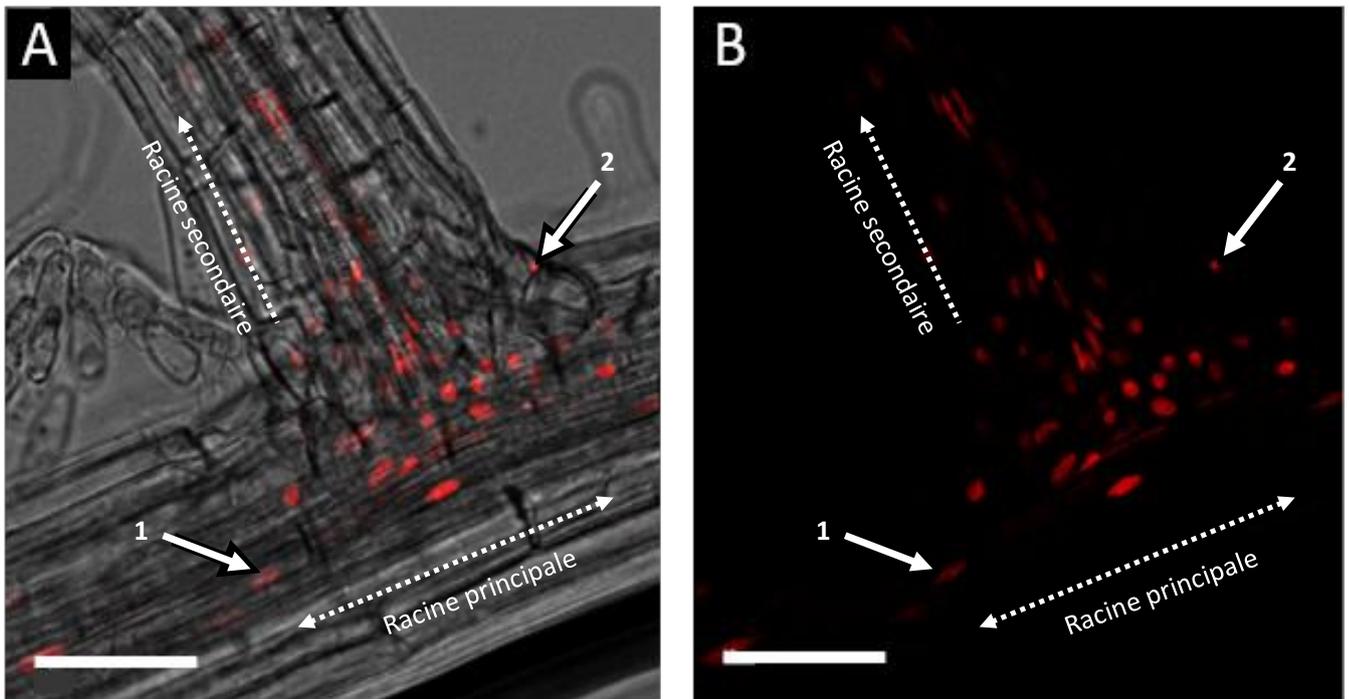


Figure 60. Localisation à l'échelle cellulaire de l'expression du gène *AtSUC2* dans un départ de racine secondaire dans la lignée *SUC2-RED TIDE* (*pAtSUC2::H2B-2xCherry*).

Observation au microscope confocal d'un départ de racine secondaire au niveau de la racine principale avec la lumière transmise (**A**) et sans lumière transmise (**B**).

Les barres blanches en bas à gauche des images représentent 50 μm.

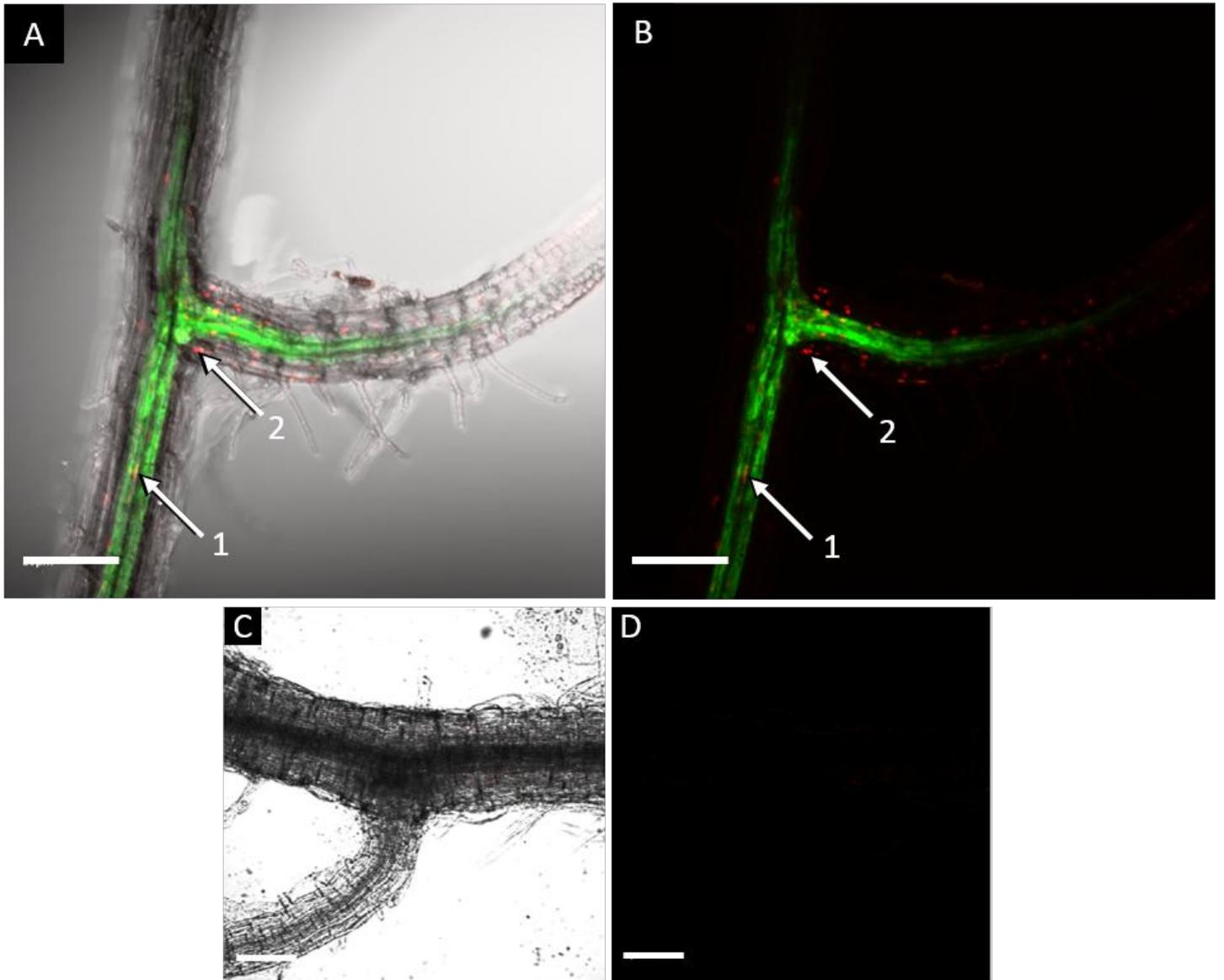


Figure 61. Localisation à l'échelle cellulaire de l'expression du gène *AtSUC2* dans les racines d'un plante greffée *SUC2-GFP* (*pAtSUC2::GFP soluble*)/ *SUC2-RED TIDE* (*pAtSUC2::H2B-2xCherry*).

Observation au microscope confocal d'un départ de racine secondaire au niveau de la racine principale de plantes greffées *SUC2-GFP/SUC2-RED TIDE* avec la lumière transmise (**A**) et sans lumière transmise (**B**) et de plantes greffées *Col-0/Col-0* avec la lumière transmise (**C**) et sans lumière transmise (**D**). Les barres blanches en bas à gauche des images représentent 100 μm .

périphérie des éléments du tube criblé : dans le péricycle, dans l'endoderme ou dans des cellules du parenchyme cortical. Ces cellules ne sont pas des cellules compagnes. Comme lors de l'observation de coupes de lignées SUC1-GUS, les formes des coupes des pointes racinaires et des cellules la constituant sont peu régulières. D'autres coupes réalisées au laboratoire ayant subi les mêmes protocoles de révélation GUS et d'inclusion en résine ont des formes beaucoup plus régulières (racines et cellules arrondies), mais ces échantillons sont issus de culture *in vitro* alors que ceux présentés ici sont cultivés en rhizobox. La pression exercée par le système de culture sur les racines pourrait, peut-être, expliquer la différence de formes cellulaires.

1.2.1.2 Localisation de l'expression du gène *AtSUC2* à l'aide de lignées exprimant des molécules fluorescentes

Comme expliqué précédemment, la lignée SUC2-RED TIDE (*pAtSUC2::H2B-2xCherry*) exprime deux copies de la mCherry (fluorochrome, excitation à 587 nm) et le gène *H2B* (qui permet l'adressage au noyau des cellules) sous le contrôle du promoteur *pAtSUC2*. Les plantes de cette lignée vont donc permettre de visualiser (en rouge) les noyaux des cellules exprimant *AtSUC2*, *a priori* des cellules compagnes. L'observation de ces plantes va permettre de pouvoir localiser les cellules exprimant *AtSUC2*.

L'observation d'un départ de racine secondaire de lignée SUC2-RED TIDE (**Figure 60**) révèle de nombreux noyaux de cellules exprimant *AtSUC2*. Des noyaux de cellules exprimant *AtSUC2* sont retrouvés le long et proche (voire à l'intérieur) du cylindre central dans la racine principale (**Figure 60, flèche 1**) qui sont sûrement ceux des cellules compagnes. De plus, d'autres noyaux sont retrouvés éloignés du cylindre central au niveau même de la jonction entre les deux racines (**Figure 60, flèche 2**), probablement dans des cellules du parenchyme cortical.

La lignée SUC2-GFP exprime une GFP soluble sous le contrôle du promoteur *pAtSUC2*. Les plantes de cette lignée vont donc produire une GFP dans les cellules compagnes exprimant *AtSUC2* mais celle-ci étant soluble, elle sera chargée dans les éléments du tube criblé dans les feuilles et transportée dans toute la plante *via* le phloème. Cette lignée permet donc de pouvoir visualiser les éléments du tube criblé grâce aux molécules fluorescentes (GFP) circulant avec la sève phloémienne.

Une greffe a été réalisée entre la rosette de la lignée SUC2-GFP et la racine de la lignée SUC2-RED TIDE (**Figure 61, A et B**). Cette greffe permet donc de voir au microscope les éléments du tube criblé dans toute la plante grâce à la GFP (en vert) et de voir la localisation des noyaux des cellules exprimant *AtSUC2* dans les racines grâce à la mCherry (en rouge). Les éléments du tube criblé sont bien visibles au niveau du départ de la racine latérale. De plus, de nombreux noyaux de cellules exprimant *AtSUC2* sont visibles. Certains noyaux sont localisés le long des éléments du tube criblé

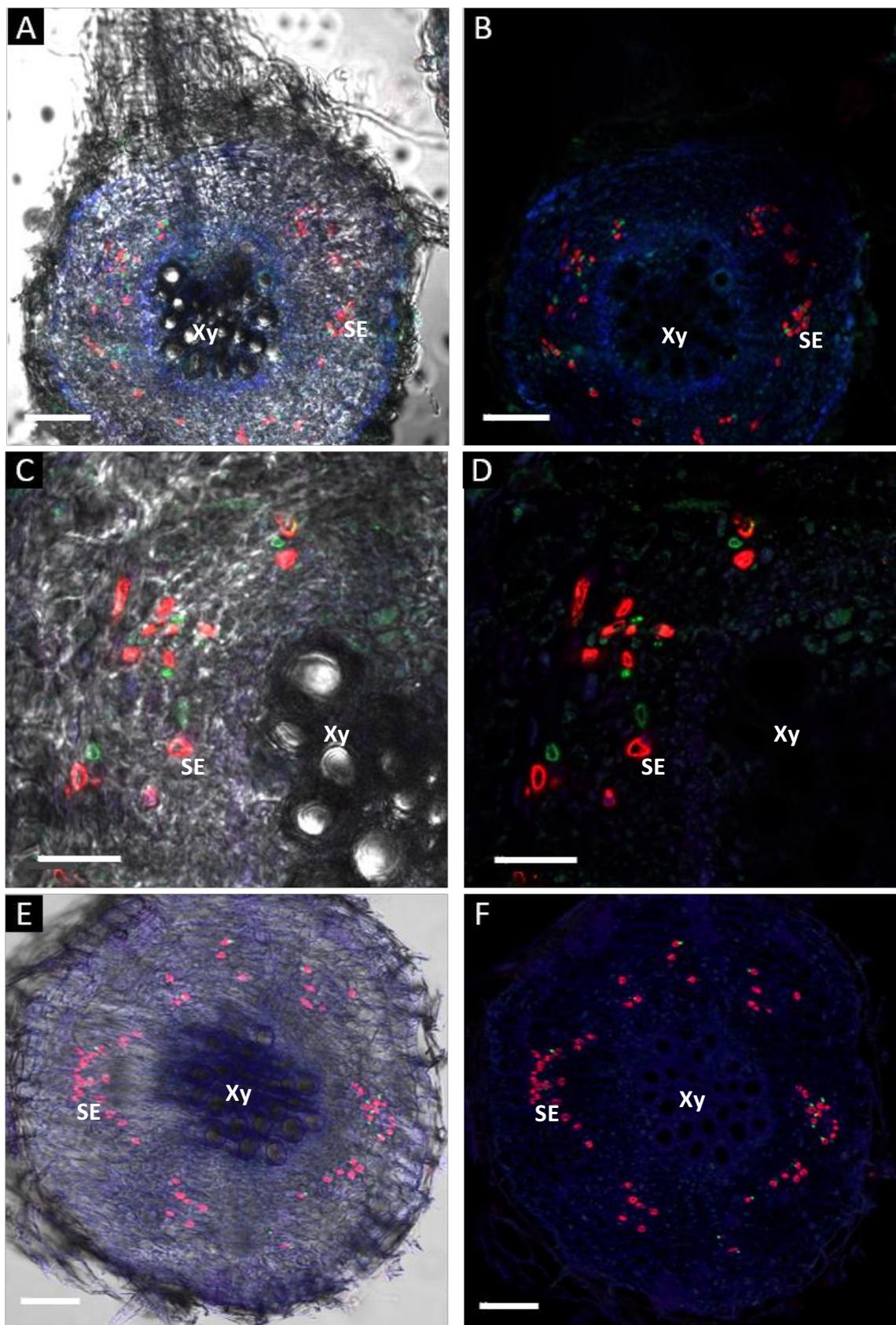


Figure 62. Localisation à l'échelle cellulaire de la protéine AtSUC2 dans les racines par immunohistochimie.

Coupes transversales de racines Col-0 observées au microscope confocal après immunomarquage. Les images **A**, **C** et **E** correspondent à la superposition des champs vert, rouge, bleu à l'image obtenue par transmission. Les images **B**, **D** et **F** correspondent à la même superposition d'image sans la transmission. Les couples d'anticorps utilisés sont : Anticorps anti-SUC2/Alexa 488 (apparaissant en **vert**) et Anti-RS6/Alexa 555 (apparaissant en **rouge**). Ce deuxième couple permet de localiser les cellules du tube criblé (SE). La couleur **bleue** correspond à l'autofluorescence dans le rouge lointain et permet de visualiser les cellules du xylème (Xy). La barre d'échelle correspond à 50 μm pour **A**, **B**, **E** et **F** ; et 20 μm pour **C** et **D**.

(**Figure 61, A et B, flèche 1**), probablement dans les cellules compagnes, tandis que d'autres (**Figure 61, A et B, flèche 2**) sont situés au niveau de la jonction entre les racines et sont parfois assez éloignés des tubes criblés. Des observations témoins ont été réalisées grâce à des plantes Col-0/Col-0 (**Figure 61, C et D**) afin de vérifier l'absence d'autofluorescence de composés dans les plantes aux longueurs d'ondes utilisées.

Pour conclure, l'expression du gène *AtSUC2* est localisée le long des éléments du tube criblé, probablement dans les cellules compagnes, mais également au niveau du départ de racines latérales. Dans ce dernier cas, il semble que le gène *AtSUC2* soit également exprimé dans les cellules du parenchyme cortical.

1.2.2 Localisation de la protéine AtSUC2 par immunohistochimie

La localisation de la protéine AtSUC2 par immunohistochimie a été réalisée sur des coupes transversales de racines de plantes de génotypes Col-0, *suc2.2* et *suc2F* âgées de 30 jours, cultivées en rhizobox. Une co-localisation des éléments du tube criblé et de la protéine AtSUC2 a été réalisée et observée au microscope confocal. Pour cela, deux couples d'anticorps ont été utilisés. L'anticorps primaire anti-RS6 (monoclonal, murin) ciblant les éléments du tube criblé (Khan *et al.*, 2007), est reconnu par un anticorps secondaire GAM 555 (excitation 543nm / émission à 603nm). Le second couple est composé de l'anticorps polyclonal de lapin primaire SD-22 ciblant la protéine AtSUC2, il est reconnu par un anticorps secondaire GAR 488 (excitation 488nm / émission 520nm). Par conséquent, le signal correspondant à la protéine AtSUC2 apparaît en vert et celui correspondant aux éléments du tube criblé apparaît en rouge. Le signal bleu correspond à l'autofluorescence de composés de la plante dans le rouge lointain et permet de visualiser les contours de certaines cellules.

Au niveau des racines de plantes de génotype Col-0 (**Figure 62**), le signal rouge (anti-RS6) sur le pourtour des cellules nous indique bien la localisation des éléments du tube criblé. De plus, un signal vert (correspondant à l'anticorps anti-SUC2) est visible, sur la périphérie de certaines cellules ce qui est cohérent avec la nature membranaire de la protéine AtSUC2 (Sauer et Stolz, 1994). La localisation de la protéine AtSUC2 est proche des éléments du tube criblé et n'est visible qu'à côté de ces cellules. Cette localisation correspond aux cellules compagnes, ce qui est déjà le cas dans les feuilles (Stadler et Sauer, 1996). Plusieurs contrôles témoins ont été effectués afin de valider cette expérimentation (**Figure 63**). Un témoin a été réalisé en omettant les anticorps primaires lors de la préparation des échantillons de plantes Col-0, afin de vérifier l'autofluorescence basale des composés de la plante dans les coupes et la spécificité des anticorps secondaires (**Figure 63, A et B**). Aucun signal vert ou rouge

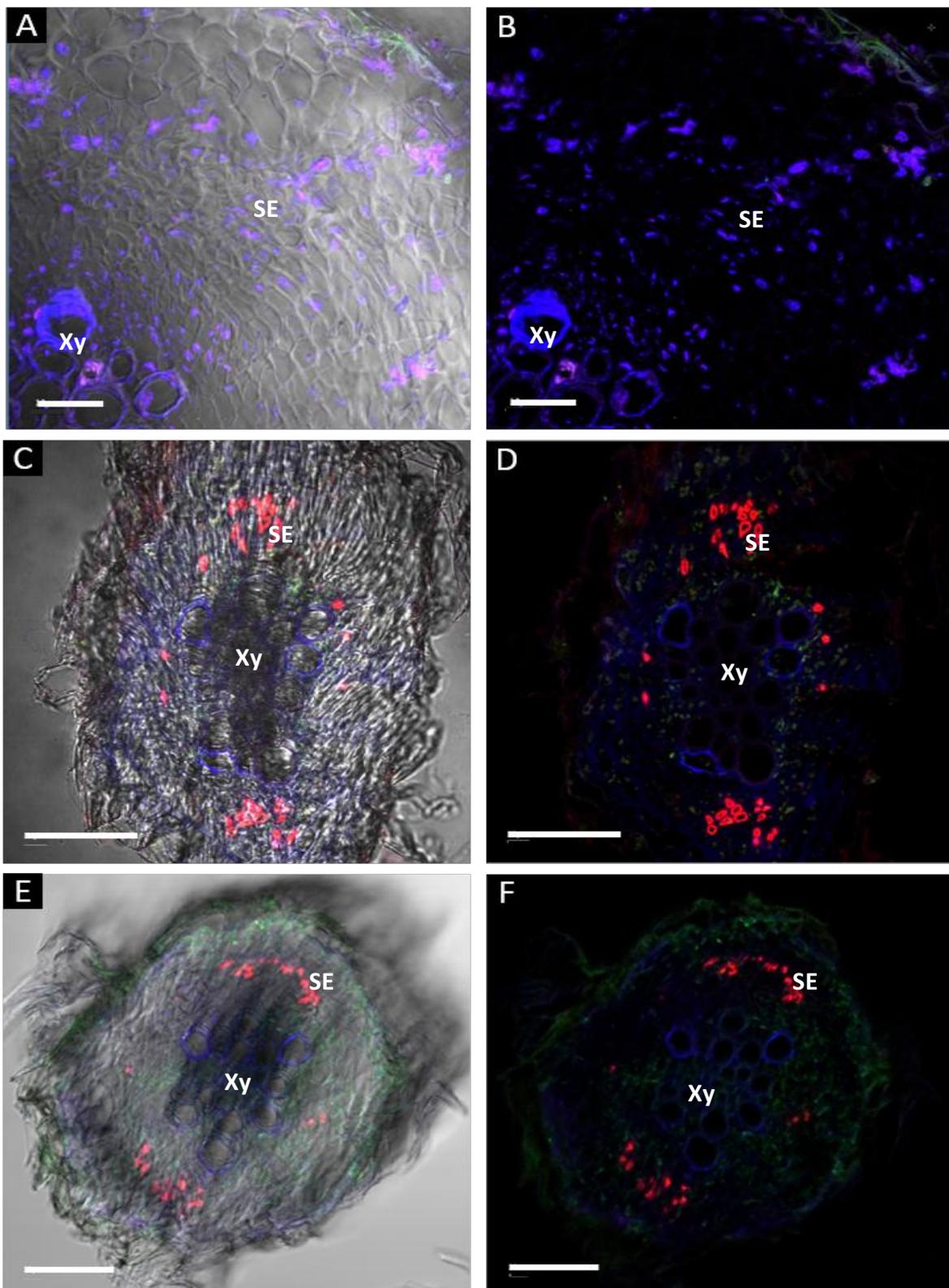


Figure 63. Localisation à l'échelle cellulaire de la protéine AtSUC2 dans les racines des mutants *suc2.2* et *suc2F* par immunohistochimie.

Coupes transversales de racines de plantes Col-0 (**A et B**), de plantes *suc2.2* (**C et D**) et de plantes *suc2F* (**E et F**) observées au microscope confocal après immunomarquage. Les images **A, C et E** correspondent à la superposition des champs vert, rouge, bleu à l'image obtenue par transmission. Les images **B, D et F** correspondent à la même superposition d'image sans la transmission. Les images **A et B** correspondent aux témoins omission des anticorps primaires. Les couples d'anticorps utilisés pour **C, D, E et F** sont : Anticorps anti-SUC2/Alexa 488 (apparaissant en **vert**) et Anti-RS6/Alexa 555 (apparaissant en **rouge**). Ce deuxième couple permet de localiser les cellules du tube criblé (SE). La couleur **bleue** correspond à l'autofluorescence dans le rouge lointain et permet de visualiser les cellules du xylème (Xy). La barre d'échelle correspond à 20 μm pour **A et B** ; et 50 μm pour **C, D, E et F**.

n'est retrouvé, validant que les anticorps secondaires sont bien spécifiques de l'anticorps primaire et ne se fixent pas naturellement sur les coupes. Les autres témoins sont des coupes réalisées sur des plantes *suc2.2* et *suc2F*. Ces deux lignées n'expriment théoriquement pas le gène *AtSUC2* dans les racines, aucun signal vert ne devrait être trouvé. Dans les coupes des plantes de lignées *suc2.2* (**Figure 63, C et D**) et *suc2F* (**Figure 63, E et F**) est observé un signal rouge (tubes criblés) identique à celui retrouvé dans les plantes Col-0, ce qui est attendu. Un signal vert est retrouvé quasiment sur l'ensemble de la coupe mais celui-ci est très faible et diffus et ne semble donc pas être spécifique. Ces observations montrent qu'il y a donc bien une spécificité de l'anticorps pour la protéine AtSUC2 et confirme l'absence de la protéine AtSUC2 dans les racines des plantes *suc2.2* et *suc2F*.

Le fait d'avoir observé précédemment la localisation de l'expression d'*AtSUC2* au niveau des départs des racines latérales (**Figure 57**) nous a mené à observer la localisation de la protéine AtSUC2 dans cette même zone (**Figure 64**). La présence des éléments du tube criblé est visible (grâce au signal rouge émis par l'anticorps) ainsi que la présence de la protéine AtSUC2 (grâce au signal vert émis par l'anticorps). Au niveau du départ de la racine latérale, une cellule allongée, très proche des éléments du tube criblé et contenant du signal vert est visible (**Figure 64, E et F, flèche 1**). Cette cellule est sûrement une cellule compagne orientée dans le sens de la longueur, suivant une cellule du tube criblé dans le même sens. En revanche, dans la même zone, sont observées des cellules qui semblent avoir une orientation différente (**Figure 64, E et F, flèche 2**), perpendiculaire à la cellule compagne précédemment observée. Ceci montre qu'au niveau des départs des racines latérales, des cellules parallèles à l'axe de la racine principale jouxtent des cellules parallèles à l'axe de la racine secondaire.

Ces résultats montrent pour la première fois que la protéine AtSUC2 est localisée dans les cellules compagnes dans les racines de plantes adultes, comme cela avait déjà été montré dans les feuilles (Stadler et Sauer, 1996). Ces résultats montrent aussi que la protéine est présente dans les cellules compagnes dans différentes zones de la racine principale. En revanche, au niveau des départs de racines latérales, la protéine a toujours été observée à proximité directe des éléments du tube criblé, et pas dans les cellules du cortex, comme les expériences précédentes (GUS et coloration des noyaux par la mCherry) le laissaient penser. Le point sera abordé dans la discussion.

2 Discussion

AtSUC2 est le gène codant le transporteur de saccharose le plus exprimé dans les feuilles et sa mutation KO dans la plante entraîne un phénotype sévère de retard de croissance (**Figure 41**) ainsi

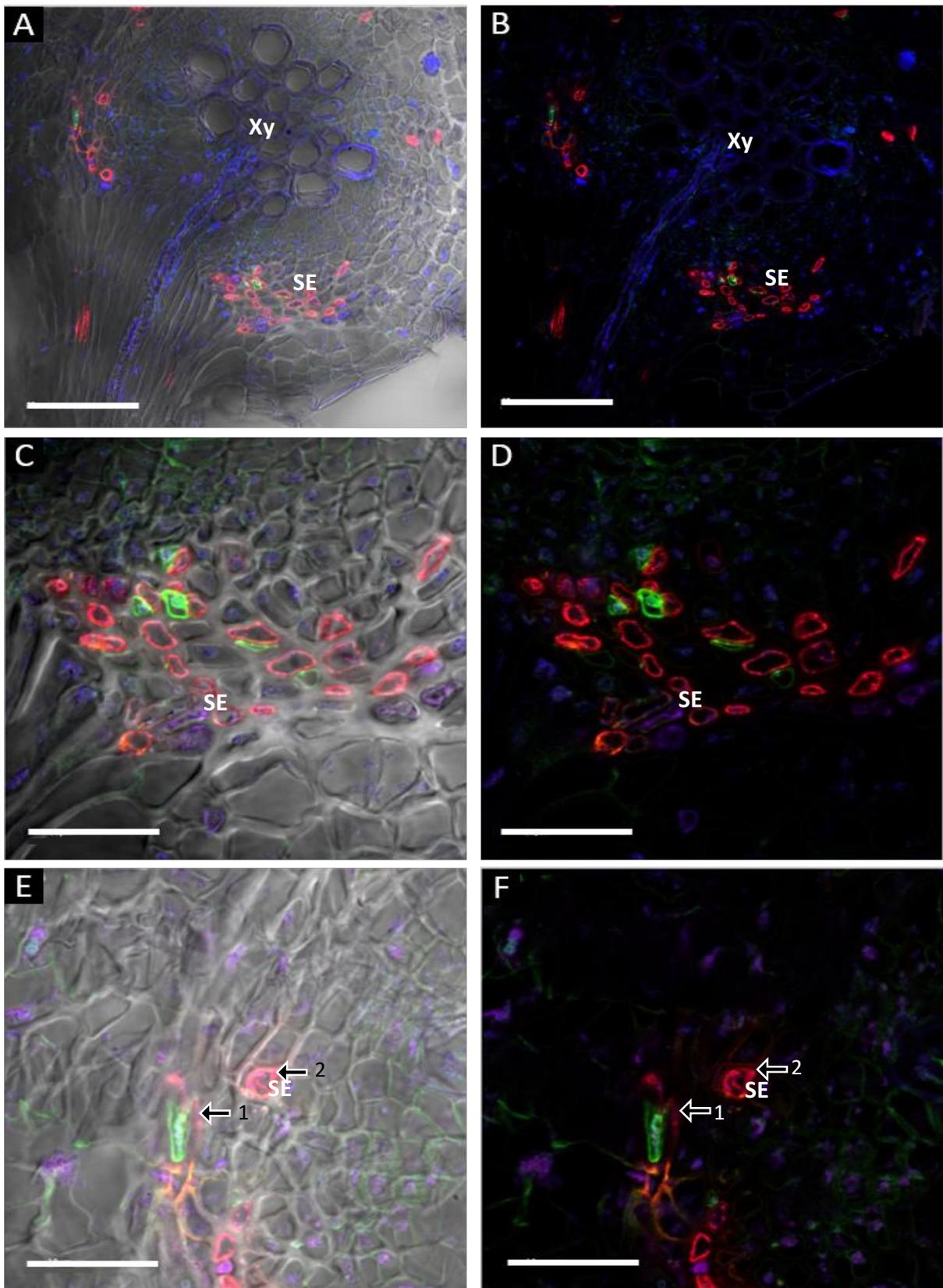


Figure 64. Localisation à l'échelle cellulaire de la protéine AtSUC2 dans les départs de racines secondaires par immunohistochimie.

Coupes transversales de racines Col-0 observées au microscope confocal après immunomarquage. Les images **A, C et E** correspondent à la superposition des champs vert, rouge, bleu à l'image obtenue par transmission. Les images **B, D et F** correspondent à la même superposition d'image sans la transmission. Les couples d'anticorps utilisés sont : Anticorps anti-SUC2/Alexa 488 (apparaissant en **vert**) et Anti-RS6/Alexa 555 (apparaissant en **rouge**). Ce deuxième couple permet de localiser les cellules du tube criblé (SE). La couleur **bleue** correspond à l'autofluorescence dans le rouge lointain et permet de visualiser les cellules du xylème (Xy). La barre d'échelle correspond à 50 μm pour **A et B** ; et 20 μm pour **C, D, E et F**.

qu'une accumulation de sucres (saccharose, glucose fructose et amidon) dans les feuilles (Gottwald *et al.*, 2000 ; Srivastava *et al.*, 2008). La protéine a été localisée dans les cellules compagnes (Stadler et Sauer, 1996) et elle est impliquée dans le chargement du phloème et la récupération du saccharose le long du phloème de transport (Srivastava *et al.*, 2008 ; Gould *et al.*, 2012). Dans les racines, *AtSUC2* est le deuxième gène codant un transporteur de saccharose le plus exprimé (**Chapitre IV** ; Durand *et al.*, 2016) mais ni sa localisation ni son rôle ne sont connus dans cet organe. Pour élucider ce rôle sans être influencé par l'effet de la mutation d'*AtSUC2* dans les feuilles, une expérimentation de greffe entre des rosettes Col-0 et des racines de mutant KO *suc2* (Col-0/*suc2.2*) a été réalisée et le phénotype des plantes analysé. De plus, la localisation du gène et de la protéine a été réalisée grâce à l'étude de lignées de plantes exprimant un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur du gène *AtSUC2* (*pAtSUC2*) et à des expériences d'immunohistochimie avec des anticorps spécifiques sur des plantes de lignée sauvage Col-0, sur des plantes de lignée mutante *suc2.2* et sur des plantes de lignée *suc2F*. Ces résultats vont permettre dans un premier temps de voir l'effet de la greffe sur les plantes, ce qui va ensuite permettre de pouvoir émettre des hypothèses quant au rôle d'*AtSUC2* dans les racines.

2.1 Effets de la greffe sur les plantes

Le premier résultat qu'il est possible d'observer est le bon développement des plantes après les greffes réalisées avec le mutant *suc2.2*. En effet, bien que le retard de croissance du mutant *suc2.2* soit important, les plantes greffées avec cette lignée au niveau des racines (Col-0/*suc2.2*) et même au niveau des feuilles (*suc2.2*/Col-0) ont poursuivi leur développement (**Figure 41**), indiquant donc que les deux parties se sont bien soudées. En revanche, le fort retard de croissance des plantes *suc2.2*/Col-0 (**Figure 41, E**) a empêché d'étudier ce type de plantes greffées à cause du manque de matériel disponible (masses très faibles) pour les différentes mesures.

Afin d'observer s'il y a un effet de la greffe sur les plantes 26 jours après celle-ci (5 jours en condition de culture de « reprise de greffe » puis 21 jours de culture en rhizobox), des plantes Col-0/Col-0 ont été comparées aux plantes Col-0 NG. La coupure de l'hypocotyle est la seule manipulation qui diffère entre ces deux types de plantes puisqu'elles ont été cultivées dans les mêmes conditions et qu'elles ont toutes subi l'ablation d'un cotylédon.

Vingt-six jours après la greffe, les plantes greffées (Col-0/Col-0) sont dans un état physiologique proche de celui des plantes non greffées (Col-0 NG) cultivées dans les mêmes conditions. En effet, les teneurs en eau des feuilles et des racines (**Figure 47**) et les niveaux d'expression des gènes liés à la photosynthèse (**Figure 49**) et des gènes marqueurs de la carence hydrique dans les feuilles (*AtRD29a*, **Figure 48, A**) sont comparables entre les deux types de plantes. Cependant, l'analyse de l'expression d'un gène marqueur de la carence hydrique dans les racines (*AtTIP1.2*, **Figure 48, B**)

présente de faibles valeurs d'expression qui pourraient indiquer une situation de carence hydrique pour les plantes non greffées mais pas pour les plantes greffées. Ce résultat est en désaccord avec l'observation des teneurs en eau dans les racines dont les valeurs sont très proches entre les plantes greffées Col-0/Col-0 et les plantes non greffées Col-0 NG. L'expression du gène *AtTIP1.2* réagit peut-être aux réponses de la plante suite à la greffe, ce qui rendrait son rôle de marqueur de carence hydrique inadapté dans ce cas. Par exemple, ce gène marqueur n'est pas utilisable en cas de carence en azote puisqu'il réagit aussi à cette carence (Liu *et al.*, 2003).

Les résultats indiquent aussi qu'à ce stade, les plantes greffées (Col-0/Col-0) ne présentent pas d'importantes différences phénotypiques ou biochimiques avec les plantes non greffées (Col-0 NG), au niveau des feuilles. Néanmoins, il est possible de distinguer un effet positif de la greffe sur la surface foliaire projetée (**Figure 46, A**) ainsi que sur la quantité de feuilles par rosette (**Figure 46, B**), qui n'est pas corrélé avec une augmentation de la masse sèche des feuilles (**Figure 45, A**). Cependant, lors d'expérimentations préliminaires, une augmentation similaire de la surface foliaire avait été retrouvée ainsi qu'une augmentation de la masse des feuilles dans les plantes greffées. Ce léger effet positif de la greffe sur les feuilles paraît surprenant et n'a, à notre connaissance, pas été recensé dans la littérature. Une autre différence observée entre les plantes greffées et non greffées au niveau des feuilles est une diminution de l'expression des gènes *AtSWEET11*, *12*, *13* et *15* (**Figure 55, A**) dans les plantes greffées. Les différences phénotypiques et moléculaires observées sont peut-être liées, mais des investigations plus poussées sont nécessaires pour le déterminer. Par exemple, une étude du transcriptome des plantes greffées et non greffées permettrait de détecter les gènes dont l'expression est modulée par la greffe 26 jours après celle-ci. De plus, des greffes réalisées sur des mutants pour les gènes *AtSWEETs* permettraient éventuellement de voir si ces gènes sont impliqués dans l'effet positif de la greffe sur le développement des plantes.

Au niveau des racines, peu de différences (phénotypiques, biochimiques ou expression des gènes étudiés, **Partie 1.1.6**) sont observées entre les plantes greffées et non greffées. La principale différence phénotypique est une très légère augmentation de la masse racinaire (**Figure 45, B**) en cas de greffe, ce qui influence positivement le rapport entre la masse des racines et la masse totale de la plante (ratio R/S, **Figure 45, C**). Une différence de teneur en sucres solubles est trouvée entre les plantes greffées et non greffées. En effet, il y a une diminution des teneurs en sucres solubles dans les racines des plantes greffées par rapport aux plantes témoins (**Figure 51**). Le fait que les teneurs en sucres solubles soient inférieures dans les racines des plantes greffées, mais que la masse y soit supérieure comparées aux plantes non greffées, peut éventuellement être expliqué par une augmentation de l'utilisation des sucres comme composants des parois (cellulose, hémicellulose, ...) (Verbančič *et al.*, 2018).

Les études concernant l'effet de la greffe au niveau génétique (Yin *et al.*, 2012 ; Cookson *et al.*, 2013 ; Cookson *et al.*, 2014 ; Melnyk *et al.*, 2018) ou au niveau phénotypique (Melnyk *et al.*, 2015), se sont principalement intéressées aux mécanismes de réunification des deux parties des plantes greffées, spécifiquement dans la zone autour du site de réunification, ou à l'effet de la greffe entre deux plantes de génotypes différents. La greffe entraîne de nombreuses modifications au niveau de l'expression des phytohormones, notamment l'auxine (Melnyk *et al.*, 2018), et l'expression de certains gènes est modifiée (par exemple *AtSWEET15* est fortement régulé positivement 24h après la greffe, Yin *et al.*, 2012). Dans notre étude, 26 jours après la greffe, les plantes semblent avoir retrouvé un état d'équilibre au niveau développemental ainsi qu'un équilibre au niveau de l'expression des gènes, du moins sur les gènes étudiés (**Figures 54 à 56**). Il est toutefois à noter qu'une expression légèrement inférieure des gènes *AtSWEETs* est retrouvée dans les feuilles de plantes greffées par rapport aux plantes non greffées.

L'effet positif de la greffe (précédemment discuté) peut provenir des changements au niveau des phytohormones consécutifs à la réalisation de la greffe. En effet, l'auxine dont les teneurs augmentent rapidement lors de la greffe (Melnyk *et al.*, 2018) ainsi que d'autres phytohormones impliquées dans la régulation du développement pourraient stimuler la croissance des plantes en cas de greffe et expliquer le léger effet positif de cette manipulation sur le développement des plantes greffées.

Au niveau phénotypique, les plantes Col-0 non greffées présentent des valeurs plus faibles de masses sèches (feuilles et racines), de surfaces foliaires projetées, de nombre de feuilles par rosette ainsi que de longueur de la racine principale par rapport aux plantes Col-0 cultivées en conditions hydrique témoin (Tm) de l'étude du mutant *suc1* (**Chapitre IV**). En revanche, la masse des racines par rapport à la masse totale des plantes (ratio R/S) ainsi que les quantités de sucres dans les feuilles et les racines ne varient pas entre les plantes des deux études. Les différences peuvent s'expliquer par un retard de développement des plantes de cette étude par rapport aux plantes Col-0 (Tm) de l'étude sur le mutant *suc1*. Ce retard de développement peut être expliqué par la différence de composition du terreau utilisé entre les deux expérimentations et surtout par le fait que les plantes de cette étude ont été cultivées 5 jours sur du papier humide (sans nutriment) après ablation d'un cotylédon, ce qui a dû vider les réserves carbonées des plantes, alors que les plantes de l'étude sur le mutant *suc1* ont été cultivées en rhizobox en continu, dès la germination.

Au niveau moléculaire, le niveau d'expression des gènes *AtSUC2*, *AtSWEET11* et *AtSWEET12* dans les racines des plantes Col-0 Tm de l'étude du mutant *suc1* supérieur par rapport à celles des plantes Col-0 NG de cette étude peut aussi s'expliquer par les différences de condition de culture des plantes précédemment évoquées. Une autre hypothèse est que ces différences d'expression proviennent du retard de développement provoqué par le changement de conditions de culture. En

effet, nous n'avons jamais réalisé de profil d'expression de gènes sur des plantes âgées de moins de 30 jours dans nos conditions. Il est donc possible que ces gènes soient différentiellement exprimés en fonction du stade de développement. Une analyse de l'expression des gènes au cours du développement des plantes en rhizobox serait donc nécessaire pour vérifier cette hypothèse.

A part ce retard de développement, il n'y a pas de biais important entre les plantes Col-0 non greffées de cette étude et les plantes Col-0 (Tm) de l'étude sur le mutant *suc1*. Ceci valide donc la technique de micro-greffe pour étudier des mutations sur des gènes spécifiquement dans un compartiment de la plante, notamment dans une optique d'étude du transport du carbone à longue distance.

2.2 Localisation de l'expression du gène *AtSUC2* et de la protéine AtSUC2

Grâce à la localisation de l'expression du gène *AtSUC2* et de la protéine AtSUC2, il est possible d'émettre plusieurs hypothèses quant au rôle d'AtSUC2 dans les racines.

L'expression du gène *AtSUC2* a été localisée dans les racines au niveau du phloème (**Figure 58, A**), ce qui est cohérent avec la localisation de la protéine dans les cellules compagnes dans les feuilles (Stadler et Sauer, 1996) et dans les racines (**Figures 62 et 64**).

La localisation ponctuelle de l'expression du gène *AtSUC2* dans certaines cellules, visible par une coloration sous forme de « traits » bleus observée lors des expérimentations GUS (**Figure 58, B**) peut être due à un artefact de coloration. En effet il n'est pas à exclure que le substrat de la protéine GUS ne pénètre pas de manière homogène dans les racines. Ceci peut créer des régions de la racine non marquées alors que le promoteur s'y exprime et des régions partiellement marquées, limitées par la propagation du substrat dans la racine. Une seconde hypothèse est que ces cellules particulièrement colorées présentent une expression très forte du promoteur dans une cellule compagne en particulier. Cette cellule pourrait alors marquer l'emplacement de l'émergence d'une future racine latérale puisqu'il a été observé qu'*AtSUC2* s'exprime très tôt au cours du développement d'une racine latérale (**Figure 58, F**). AtSUC2 pourrait avoir un rôle dans l'import de saccharose vers les zones d'émergence des racines latérales. Ce saccharose serait ensuite clivé en hexoses. Ceci serait cohérent avec l'observation de Freixes *et al.* (2002) montrant que l'émergence des racines latérales est liée à une augmentation locale d'hexoses. Néanmoins, bien qu'ils soient liés à l'émergence des racines latérales, ce ne sont pas les sucres mais l'auxine qui est le facteur déterminant pour l'initiation de l'émergence des racines latérales (Moreno-Risueno *et al.*, 2010 ; De Rybel *et al.*, 2010 ; Marhavy *et al.*, 2013). La mutation du gène *AtSUC2* n'a donc probablement pas d'impact majeur sur l'émergence des racines latérales.

La présence de l'expression du gène *AtSUC2* dans les départs de racines latérales peut suggérer un rôle potentiel dans l'orientation de la récupération du saccharose. En effet, tout au long des tubes criblés, des « fuites » de saccharose vont avoir lieu, afin notamment de fournir des molécules carbonées aux cellules le long du phloème (Cabrita *et al.*, 2013). Ces fuites de saccharose s'effectuent principalement au niveau des jonctions entre deux éléments du tube criblé (De Schepper *et al.*, 2013). Il est donc possible d'imaginer qu'au niveau des départs de racines latérales, il y ait plus de jonctions entre les éléments du tube criblé dues à la connexion entre les éléments du tube criblé de la racine principale et les éléments du tube criblé de la racine latérale (**Figure 64**) et donc plus de « fuites » potentielles de saccharose. Le rôle d'*AtSUC2* dans la récupération du saccharose s'échappant du phloème est déjà connu le long du phloème de transport (Srivastava *et al.*, 2008 ; Gould *et al.*, 2012), il est possible que dans les départs de racines latérales, ce rôle soit aussi nécessaire et assuré par *AtSUC2*.

Les cellules de la coiffe racinaire servent principalement de protection des cellules méristématiques et de senseur des changements environnementaux (Arnaud *et al.*, 2010). De plus, les cellules de la coiffe produisent un mucilage polysaccharidique permettant de faciliter la progression de la racine dans le sol (Read *et al.*, 1999). Par la localisation de l'expression d'*AtSUC2* dans des cellules sur les côtés de la coiffe racinaire (**Figure 58**), la protéine *AtSUC2* pourrait être impliquée dans le transport du saccharose vers les cellules de la coiffe, ce saccharose servant à former le mucilage. Une étude plus poussée du système racinaire des plantes mutantes *suc2.2* serait importante pour vérifier cette hypothèse en analysant, par exemple, le mucilage produit par ces racines.

La localisation de l'expression d'*AtSUC2* par le gène rapporteur GUS est retrouvée le long des fines racines jusqu'au-dessus des pointes (**Figure 57 et 58**). Néanmoins, il est possible que la coloration bleue ne soit visible que dans les fines racines bien que celle-ci soit aussi présente dans d'autres racines, mais que l'épaisseur plus importante de celles-ci empêche de la voir ou empêche la bonne pénétration du substrat. Par exemple, la présence de la protéine est retrouvée dans la partie haute des racines principales, (quelques centimètres sous le collet, **Figure 62 et 64**), or la coloration GUS n'est pas visible dans cette partie de la racine. La coloration dans les fines racines est plus forte juste avant les pointes racinaires, à environ 150-300 μm du bout de la pointe. Cette localisation correspond au début de la zone d'élongation des racines (Mullen *et al.*, 1998), qui est connue pour demander beaucoup de sucres pour son développement (forte activité métabolique). *AtSUC2* pourrait donc avoir un rôle dans le déchargement du saccharose dans ces zones puits fortes. Toutefois, cette localisation d'expression est identique à celle du gène *AtSUC1* (**Chapitre IV**) et celui-ci est plus exprimé dans les racines qu'*AtSUC2* (**Figure 54, B**). Il est donc possible que ces deux gènes aient un rôle similaire dans ces zones.

La localisation cellulaire de l'expression du gène *AtSUC2* dans les pointes racinaires (**Figure 59, B et C**) semble être autour du cylindre central ou au niveau du péricycle. Sur des tissus plus développés, au niveau du départ d'une racine latérale, la localisation de l'expression est retrouvée proche du cylindre central (**Figure 60 et 61**), certainement dans les cellules compagnes, mais aussi peut être retrouvée assez éloignée du cylindre central et même proche de l'épiderme dans certains cas, probablement dans des cellules du parenchyme cortical (**Figure 59, A et figures 60 et 61**). Cette dernière localisation est en contradiction avec la localisation de la protéine par immunohistochimie (**Figure 61**) qui ne montre aucune protéine AtSUC2 en dehors des cellules compagnes. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette différence de localisation. La première est que les observations ne sont pas faites au même niveau des racines. En effet, pour les expériences de localisation de la protéine les coupes sont réalisées assez haut dans les racines principales, quelques centimètres sous le collet, alors que dans les plantes de lignées avec un gène rapporteur (GUS ou RED TIDE), les visualisations sont réalisées très bas sur la racine principale ou sur des racines secondaires afin de moins être gêné par l'épaisseur des tissus. Ceci impliquerait donc que la localisation de la protéine soit dépendante du stade de développement de la racine. La localisation de la protéine par immunohistochimie dans les fines racines, voire dans les pointes racinaires, serait une façon de vérifier cette hypothèse.

Une seconde hypothèse est que l'expression du gène soit localisée dans un type cellulaire (parenchyme cortical par exemple) et que l'ARN en résultant soit transporté dans un second type cellulaire (cellule compagne) où il serait traduit en protéine. Mais dans le cas d'une lignée avec un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur *pAtSUC2*, l'ARN du gène rapporteur resterait dans la cellule où s'exprime le promoteur. Ceci nécessiterait que les deux types cellulaires soient proches, or ici, l'expression est retrouvée dans le parenchyme cortical et les cellules compagnes (où est localisée la protéine) se trouvent dans le cylindre central, ce qui nécessite donc que la molécule traverse l'endoderme et le péricycle.

Une troisième hypothèse est que le gène est exprimé dans plusieurs types cellulaires mais qu'une régulation post-traductionnelle ou post-transcriptionnelle ait lieu dans les cellules d'un autre type que les cellules compagnes. Ceci nécessite que ce mécanisme soit spécifiquement dirigé contre la protéine AtSUC2 ou l'ARN issu du gène *AtSUC2*, puisque les protéines issues des gènes rapporteurs sont visibles et donc ne sont pas détruites. Ce phénomène est possible d'autant plus que les protéines GUS, GFP et mCherry sont très stables (Jefferson *et al.*, 1987 ; Ward, 2005). Un mécanisme similaire a été montré pour des transporteurs d'hexoses (*AtSTP4* et 9) dont l'expression des gènes est retrouvée dans différents tissus, mais les protéines ne sont retrouvées que dans les grains de pollen germés (Schneidereit *et al.*, 2003 ; Büttner, 2007).

Enfin une quatrième hypothèse, déjà posée dans le **chapitre IV**, est que comme les protéines GUS et mCherry sont très stables, elles peuvent se retrouver dans les deux cellules filles lors de la division cellulaire, bien que les deux cellules ne deviennent pas des cellules du même type par la suite. Ces différences d'expression du gène *AtSUC2* posent aussi la question des constructions utilisant le promoteur d'*AtSUC2* pour cibler les cellules compagnes (Ivashikina *et al.*, 2003 ; Marquès-Bueno *et al.*, 2016). Ceci est vraiment le cas dans les feuilles, mais dans les racines il est possible, d'après nos résultats, que l'expression du promoteur ne soit pas seulement limitée aux cellules compagnes.

La protéine est localisée dans les cellules compagnes au niveau des racines (**Figure 62 et 64**), comme cela a déjà été montré dans les feuilles (Stadler et Sauer, 1996). De plus, les résultats montrent que la protéine n'est pas présente dans les plantes de lignées *suc2.2* et *suc2F*. L'absence de la protéine *AtSUC2* dans les racines des plantes *suc2.2* était attendue, puisque l'expression du gène *AtSUC2* n'avait pas été détectée dans les racines de ces plantes (**partie 1.1.6.1 de ce chapitre**). En revanche, dans les plantes *suc2F*, des expérimentations préliminaires avaient montré une expression du gène *AtSUC2* dans les racines au stade de développement étudié (ce qui nous avait fait choisir une autre approche pour étudier le rôle d'*AtSUC2* dans les racines) bien que ce résultat soit peu reproductible. La contradiction entre la présence de l'expression du gène et l'absence de la protéine peut avoir plusieurs explications : les données de RT-qPCR peuvent être erronées puisque les résultats n'étaient pas fiables, l'immunohistochimie ne révèle peut-être pas la présence des protéines si celles-ci sont très peu nombreuses ou le promoteur utilisé pour exprimer le gène *AtSUC2* dans les fines nervures des feuilles (*pCmGAS1*) du mutant *suc2F*, n'est pas exprimé dans la racine principale (observée en immunohistochimie) mais seulement dans les racines latérales.

2.3 Rôle d'*AtSUC2* dans le déchargement du saccharose du phloème dans les racines

Après avoir validé notre système de greffe associé à la culture en rhizobox, il est possible d'étudier le rôle de la protéine *AtSUC2* dans les racines en comparant les plantes Col-0/*suc2.2* aux plantes Col-0/Col-0.

Une hypothèse depuis longtemps émise sur le rôle d'*AtSUC2* dans les organes puits est un rôle dans le déchargement du saccharose (Truernit et Sauer, 1995). Ce rôle est biochimiquement possible puisqu'il a été montré que la protéine ZmSUT1 (analogue d'*AtSUC2* chez le maïs, *Zea mays*) avait une fonction de chargement ou déchargement du saccharose, réversible en fonction des conditions (gradients de saccharose, de pH et différence de potentiel membranaire) (Carpaneto *et al.*, 2005).

Les résultats de mesures phénotypiques présentés précédemment soutiennent l'hypothèse qu'AtSUC2 est impliqué dans la force d'appel du puits, probablement en ayant un rôle dans le déchargement du saccharose dans les racines. Si AtSUC2 est bien impliqué dans le déchargement du phloème dans les racines, il va alors participer à diminuer la concentration en saccharose du phloème au niveau des racines. Cette diminution de concentration entraînera une diminution de la pression de turgescence des racines et donc un transfert plus important de carbone des feuilles vers les racines, permettant le développement de ces dernières. Suivant cette hypothèse, la mutation du gène *AtSUC2* dans les racines entraînerait donc un déchargement de saccharose du phloème moins important dans les racines, impliquant une augmentation de la concentration du phloème en saccharose. Ceci induirait un plus faible transport de carbone des feuilles vers les racines (Münch, 1930) et une accumulation de sucres dans les feuilles. Il a été effectivement montré qu'une diminution de la force d'appel du puits entraîne une diminution de la vitesse du phloème (Knox *et al.*, 2018). De plus, dans les plantes la réduction des forces de puits limite aussi la photosynthèse et le chargement du phloème dans les feuilles (« sink-limitation », Patrick, 2013). La limitation de la force d'appel du puits des racines va donc limiter la croissance des feuilles.

Malgré le fait qu'il n'y ait pas une plus faible accumulation de sucres observée dans les racines (**Figures 51 et 52**) en cas de mutation du gène *AtSUC2* ni une diminution claire (la diminution observée est très faible) du transport de carbone des feuilles vers les racines (**Figure 53, B et C**), plusieurs résultats de cette étude (détaillés ci-après) vont dans le sens de l'hypothèse selon laquelle *AtSUC2* serait impliqué dans le déchargement du saccharose dans les racines. La très faible diminution du transport observée dans les plantes mutées pour le gène *AtSUC2* dans les racines (par rapport aux plantes Col-0/Col-0), peut sur la durée de vie de la plante (31 à 32 jours), potentiellement générer des différences de phénotype. De plus, les données de transport du carbone des feuilles vers les racines peuvent ne pas refléter complètement la réalité puisque les mesures ont été réalisées après un temps de 45 min de chasse, ce qui est un temps court par rapport à la durée de la vie de la plante. D'autre part, ces mesures ne représentent que le transport du carbone au moment de l'expérimentation qui ne se comporte pas forcément de la même façon à d'autres moments de la journée. En effet, des résultats qui peuvent provenir d'une diminution du transport sont observés. Premièrement, l'accumulation de sucres solubles et d'amidon observée dans les feuilles des plantes Col-0/*suc2.2* (**Figures 50 et 52**) est cohérente avec l'hypothèse posée et peut provenir d'une diminution de l'export du saccharose vers les racines. De plus, la biomasse plus faible des racines (**Figure 45, B**) des plantes Col-0/*suc2.2* comparées à celle des plantes Col-0/Col-0 est aussi cohérente avec l'hypothèse du rôle d'AtSUC2 dans le déchargement du saccharose des racines. En effet, la limitation en carbone ou en pression de turgescence nécessaire à l'expansion cellulaire peut expliquer les masses plus faibles mesurées dans les plantes Col-0/*suc2.2*. Enfin, la limitation de la force d'appel du puits des racines

peut entraîner la diminution d'assimilation du carbone par les feuilles observée (**Figure 53, A**) et la diminution de la masse des feuilles (**Figure 45, A**) par « sink –limitation ». Donc, la majorité des résultats vont dans le sens de l'hypothèse selon laquelle AtSUC2 serait impliqué dans le déchargement du saccharose dans les racines. Par ailleurs, la diminution de la masse racinaire observée en cas de mutation du gène *AtSUC2* dans les racines peut être liée à une limitation en eau car une plus faible teneur en eau est observée dans ce cas (**Figure 47, B**). En effet, une limitation en eau va provoquer une diminution de la pression de turgescence nécessaire à la croissance racinaire et ainsi, limiter le développement des racines.

Néanmoins, le déchargement du saccharose et la croissance des racines s'effectuent tout de même en l'absence d'*AtSUC2* dans les racines. Ici aussi, plusieurs explications peuvent être avancées. Tout d'abord, bien que dans la majorité du système racinaire, le déchargement se fasse de manière apoplasmique, le déchargement se fait de manière symplasmique dans les pointes racinaires (Oparka *et al.*, 1994). Donc dans les pointes racinaires, le déchargement du saccharose peut s'effectuer même en cas de mutation du gène *AtSUC2*. De plus, il est possible que dans les zones d'élongation des racines, le rôle d'*AtSUC2* dans le déchargement du phloème soit également assuré par *AtSUC1* puisque les deux gènes y sont exprimés et qu'*AtSUC1* est le gène codant un transporteur de saccharose le plus exprimé dans les racines (**Chapitre IV**, Durand *et al.*, 2016). Ceci expliquerait le fait que la mutation d'*AtSUC2* n'a que peu d'effet. D'autre part, il n'y a pas de changement important dans l'expression des gènes codant des transporteurs de saccharose en cas de mutation du gène *AtSUC2* (**Figure 54 et 55**). Il n'y a donc pas d'autres gènes codant des transporteurs de saccharose dont l'expression augmente et qui pourraient prendre la place du gène *AtSUC2* en cas de mutation d'*AtSUC2* dans les racines. Néanmoins, *AtSUC1* ne semble pas localisé dans les cellules compagnes (**Chapitre IV**) mais avoir une localisation proche du xylème. Enfin, l'implication des transporteurs d'hexoses dans la récupération du saccharose dans les racines en cas de mutation d'*AtSUC2* n'est pas à exclure après clivage des molécules de saccharose par les invertases. En revanche, l'expression des invertases notamment pariétales varie peu, à part pour l'invertase vacuolaire *AtVIN1* (**Figure 56**). L'expression du gène ne révèle pas réellement l'activité des invertases qui sont connues pour être des protéines stables et avoir une forte régulation post-transcriptionnelle et post-translationnelle (Schwimmer *et al.*, 1961 ; Roitsch et Gonzalez, 2004 ; Huang *et al.*, 2007). L'étude moléculaire des transporteurs d'hexoses serait donc nécessaire pour vérifier leur implication.

3 Bilan

Les résultats montrent que 26 jours de culture après la greffe, très peu de différences de phénotype sont observées entre les plantes greffées et non greffées. De plus, les plantes Col-0 non greffées (ayant un cotylédon coupé et ayant été cultivées 5 jours sans nutriments puis 21 en rhizobox) ont un phénotype très proche des plantes Col-0 (Tm, de l'étude du mutant *suc1*) cultivées 30 jours en rhizobox, mis à part un léger retard de développement. Ceci valide donc notre système de plantes greffées cultivées en rhizobox et nous permet de pouvoir comparer les types de greffes Col-0/Col-0 e Col-0/*suc2.2*.

Au niveau du rôle d'AtSUC2 dans les racines, les résultats permettent d'avoir des arguments concrets en faveur de l'hypothèse selon laquelle AtSUC2 serait impliqué dans la force d'appel du puits *via* le déchargement du phloème dans les racines, au niveau des cellules compagnes. La mutation du gène *AtSUC2* provoque une diminution de la force d'appel du puits dans les racines et entraîne des répercussions sur la rosette par « sink-limitation ». Il serait pertinent de vérifier la localisation de la protéine dans les pointes racinaires où l'expression du gène *AtSUC2* a été trouvée, sa présence serait un argument en faveur de cette hypothèse. Cependant, d'autres hypothèses (qui n'empêchent pas la première d'être possible) sont envisageables au vu des résultats. Par exemple, la localisation de l'expression du gène dans les primordia des racines peut suggérer un potentiel rôle d'AtSUC2 dans l'augmentation locale d'hexoses liée à l'émergence des racines latérales (Freixes *et al.*, 2002). Néanmoins, la localisation de la protéine dans les primordia est une étape nécessaire pour confirmer les résultats d'expression du gène et pour vérifier cette hypothèse. L'étude plus poussée de l'architecture racinaire des plantes mutées pour le gène *AtSUC2* dans les racines serait aussi importante pour vérifier ce rôle. En effet, la mutation du gène peut, peut-être, influencer le nombre de racines latérales. D'autre part, la localisation de l'expression d'AtSUC2 dans les départs de racines latérales est peut-être liée au rôle de la protéine dans le rechargement du saccharose dans le phloème, comme cela a été montré le long du phloème de transport (Srivastava *et al.*, 2008 ; Gould *et al.*, 2012), et ici particulièrement dans une zone où les « fuites » de saccharose sont probables. Enfin, la contradiction entre la localisation de l'expression du gène *AtSUC2* dans le parenchyme cortical et la localisation de la protéine qui n'est pas retrouvée dans ces cellules nécessite des expérimentations supplémentaires afin de trouver une explication. Ces expérimentations peuvent être une localisation de la protéine au même niveau exactement que la localisation de l'expression du gène puisque les deux localisations n'ont pas été effectuées au même niveau de la racine. De plus, l'utilisation de lignées avec l'intégralité de la séquence du gène *AtSUC2* fusionnée avec le gène rapporteur (GUS ou mCherry) permettrait de vérifier d'éventuelles informations d'adressage contenue dans les séquences du gène.

Chapitre VI : Conclusion et Perspectives

Pour rappel, l'objectif de ma thèse était de comprendre le rôle des transporteurs de saccharose dans les racines chez *Arabidopsis thaliana*, et particulièrement les deux plus exprimés dans ce compartiment : AtSUC1 et AtSUC2.

1 Evaluation des techniques

L'intérêt de l'utilisation des rhizobox pour étudier les racines d'*Arabidopsis thaliana* a déjà été montré (Durand *et al.*, 2016). Ce système permet de pouvoir faire pousser des plantes jusqu'au stade adulte dans des conditions proches de la culture en pot et de pouvoir récolter des racines propres pour réaliser des analyses phénotypiques, biochimiques ou encore moléculaires.

1.1 Architecture racinaire

Ce système permet de pouvoir suivre l'architecture racinaire en deux dimensions. Lors des expérimentations en rhizobox sur AtSUC1 et sur AtSUC2, nous n'avons pas pu obtenir les architectures racinaires. En effet, les photographies du système racinaire réalisées lors de la récolte ont révélé que le système racinaire était trop complexe pour pouvoir l'analyser : il arrive fréquemment qu'il y ait des groupes de plus de 10 racines emmêlées, ce qui rend impossible le suivi de la longueur totale du système racinaire et du nombre de racines latérales. La longueur de la racine principale a pu néanmoins être mesurée. Une solution pour mesurer la longueur totale du système racinaire et le nombre de racines latérales serait d'avoir un système racinaire moins complexe en travaillant sur des plantes plus jeunes. Cette solution est facilement réalisable mais n'a pas été utilisée lors de nos expérimentations car nous voulions travailler sur des plantes adultes en nous plaçant au même stade de développement des plantes que dans l'étude de Durand *et al.* (2016). Une seconde solution serait que ce suivi soit fait informatiquement. En effet, un algorithme se basant sur la couleur de certains pixels et la continuité entre les pixels devrait pouvoir réussir à suivre toutes les racines. Ceci est un projet que nous avons amorcé avec la collaboration de Bruno Mercier (Université de Poitiers). Mais nous sommes actuellement limités par la résolution insuffisante des images. Il a aussi été envisagé d'utiliser des membranes de couleur dans les rhizobox, afin d'augmenter le contraste entre les racines et la membrane puisqu'actuellement, la couleur des membranes de nylon utilisées est proche de celle des racines. Ceci permettrait de discerner plus facilement chaque racine. Il faut néanmoins que le colorant utilisé sur les membranes ne vienne pas perturber le développement racinaire.

1.2 Rhizobiome

Comme évoqué précédemment, le système de culture en rhizobox est proche de celui en pot. Une étude à laquelle j'ai participé au début de ma thèse tend à le prouver (Mignerot *et al.*, en cours de rédaction, **Annexe I**). Cette étude est la comparaison de plantes cultivées en pot et en rhizobox au niveau de leur phénotype et de leur microbiome racinaire. Les principales conclusions sont que les plantes cultivées en rhizobox ont un léger retard de croissance par rapport aux plantes cultivées en pot mais que ces plantes ne présentent pas de carences minérales, prouvant une nouvelle fois l'intérêt de ce système de culture. L'analyse et la comparaison du rhizobiome bactérien de plantes cultivées en pots et en rhizobox ont montré qu'il n'y avait pas de différence de nature dans la composition du rhizobiome mais plutôt une répartition différente au niveau des genres représentés, le genre *Rhodococcus* étant surreprésenté dans les racines de plantes cultivées en rhizobox. Ce travail est pionnier en la matière et ce type d'analyse est appelé à se développer car les applications sont nombreuses. Ce retard de croissance pourrait être dû à la contrainte physique appliquée sur les racines en rhizobox (entre la paroi et la membrane) qui freinerait leur développement et par conséquent celui des rosettes. Ceci est soutenu par le fait qu'en culture en rhizobox, les cellules des pointes racinaires semblent avoir une forme modifiée par la contrainte physique (**Figure 39**). Cette contrainte pourrait être mesurée à l'aide de nanocapteurs de pression.

1.3 Micro-greffes

Nous avons aussi montré la bonne reprise de croissance des plantes après les micro-greffes et leur intérêt pour pouvoir étudier la mutation d'un gène dans un organe donné. Les plantes témoins greffées présentent peu de différences avec les plantes témoin non greffées. Les principales différences sont une légère augmentation de la surface foliaire, du nombre de feuilles par rosette (**Chapitre V**) et une diminution de l'expression des gènes *AtSWEET11*, *12*, *13* et *15* dans les feuilles des plantes greffées par rapport aux plantes non greffées. Ces différences ne peuvent être expliquées actuellement mais des expérimentations complémentaires telles que l'étude de mutants KO *sweets* greffés permettrait de voir le rôle potentiel des AtSWEETs en réponse à la greffe. Une analyse transcriptomique au cours du développement de plantes greffées permettrait d'avoir une vue d'ensemble des mécanismes de réponse à la greffe et notamment de l'implication des phytohormones lors du développement des plantes greffées.

Les rhizobox et les micro-greffes sont un très bon moyen de pouvoir étudier des mutations dans un organe spécifique. Le rôle d'autres transporteurs tels que les AtSWEETs serait intéressant à étudier. La difficulté de les étudier est que les cinq gènes codant des protéines AtSWEETs transportant du saccharose, sont tous exprimés dans les racines et des redondances fonctionnelles sont, *a priori*,

possibles. Le mutant *sweet11* ne présente pas de phénotype particulier par rapport aux plantes sauvages et le double mutant *sweet11-sweet12* présente de faibles différences de phénotype par rapport aux plantes sauvages. De plus, dans le double mutant, le gène *AtSWEET13* est surexprimé (Chen *et al.*, 2012). L'étude de simples mutants paraît dans ce cas être compliquée pour définir un rôle de ces transporteurs dans les racines. Il est donc nécessaire de réaliser des mutants multiples (double mutant, triple mutant, voire plus). Pour cela, la technique récemment développée CRISPR/Cas9 est particulièrement adaptée et différents mutants multiples sont en cours de réalisation (**Annexe II**).

1.4 Flux de carbone

Pour obtenir des informations sur les flux de carbone nous avons réalisé des expérimentations d'assimilation de carbone radiomarqué par la plante. Ces analyses permettent de connaître la proportion de carbone allouée aux différents compartiments et de comparer l'assimilation entre deux génotypes différents. Pour compléter ces résultats sur le transport à longue distance, afin de connaître la vitesse de la sève phloémienne dans les racines, une expérimentation est en cours de mise en place au laboratoire. Cette expérimentation reprend le principe de la technique de FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching, Oparka *et al.*, 1994, Froelich *et al.*, 2011). Le principe consiste à utiliser la carboxyfluorescéine, une molécule fluorescente qui va être séquestrée dans le phloème et de l'observer dans les racines au microscope confocal. Ensuite, un flash lumineux est appliqué sur la racine afin de supprimer la fluorescence et le temps mis par la fluorescence pour revenir à son niveau initial nous indiquera la vitesse de la sève. Mais l'adaptation de cette méthode nécessite l'utilisation de système de culture pouvant être utilisé en microscopie. Nous avons donc fait l'acquisition de micro-ROC (Microscopy Rhizosphere Chambers, Advanced Science Tools LLC). Ce système de culture très proche d'une rhizobox miniature, possède comme paroi sur la face où les racines sont observables, une lamelle de microscopie. Ceci permet donc d'observer nos plantes dans leurs conditions de culture. Des mises au point ont été réalisées au niveau de la façon de faire pénétrer la carboxyfluorescéine dans la plante. Toutefois, des études récentes mettent en avant une autre molécule fluorescente, l'esculine, qui se montre plus optimisée pour l'étude des transporteurs de saccharose puisque cette molécule est prise en charge par ces transporteurs (Knoblauch *et al.*, 2015 ; Rottmann *et al.*, 2018). De plus, cette molécule a été utilisée pour montrer (*in vitro*) que la vitesse du phloème était régulée pas des variations environnementales, des variations de concentration en saccharose et par l'expression du gène *AtSUC2* (Knox *et al.*, 2018). Ces expériences viendraient en complément des expériences d'assimilation du $^{14}\text{CO}_2$.

2 Rôle d'AtSUC1 chez *Arabidopsis thaliana*

Les résultats de nos expérimentations sur AtSUC1 (**Chapitre IV**) nous ont permis d'émettre plusieurs hypothèses quant au rôle d'AtSUC1 dans la plante. Des expérimentations avec des micro-greffes entre le mutant KO *suc1* et des plantes sauvages seraient pertinentes pour pouvoir différencier le rôle de la protéine dans les feuilles de son rôle dans les racines. Les localisations de l'expression du gène dans les zones d'élongation et de la protéine AtSUC1 autour du xylème dans les racines est cohérente avec un rôle potentiel dans la répartition du saccharose entre les cellules (**Figure 65**). De plus, il est possible que ce rôle soit complémentaire avec AtSWEET11, dont le gène est exprimé dans les racines et dont le rôle dans la redistribution du saccharose entre les cellules a déjà été suggéré dans les hampes florales (Le Hir *et al.*, 2015). D'autre part, le rôle d'AtSUC1 dans la répartition des sucres entre les cellules peut être lié à la signalisation glucidique. En effet, l'ABA peut réguler le gène *AtSUC1* par l'intermédiaire d'un facteur de transcription, ABI5. Le rôle d'AtSUC1 dans les zones de croissance de la plante pourrait donc être en lien avec la signalisation glucidique régulée par l'ABA. L'étude du mutant *ABI5* serait intéressante pour vérifier cette hypothèse. La répétition de l'expérimentation menée sur AtSUC1 est importante pour vérifier les résultats obtenus sur un plus grand nombre de plantes. Toutefois, une étude plus poussée du mutant *suc1* est nécessaire, probablement en analysant le phénotype des racines au cours du développement mais aussi en analysant des paramètres tels que le nombre de racines latérales, la longueur totale des racines ou encore la surface occupée par la racine. En effet, d'après la localisation présumée d'AtSUC1, il est possible de penser que la mutation du gène entraîne des changements au niveau de l'architecture racinaire. Pour étudier le rôle d'AtSUC1 dans l'architecture racinaire, il est aussi possible d'analyser l'expression d'*AtSUC1* (mais aussi d'autres gènes tel qu'*AtSUC2*) dans des mutants présentant des modifications de l'architecture racinaire, notamment ceux pour lesquels a été mis en évidence un lien avec les sucres (signalisation glucidique). Ces mutations peuvent, par exemple, concerner les gènes *AtBRI1* (Gupta *et al.*, 2015) ou *AtWOX7* (Kong *et al.*, 2016). Des mutants sont en cours de réalisation tel que le double mutant *suc1-suc5* afin de vérifier une potentielle complémentarité fonctionnelle entre les deux gènes et le double mutant *suc1-suc2* afin de voir l'effet de la mutation des deux gènes codant des transporteurs de saccharose les plus exprimés dans les racines.

3 Rôles hypothétiques d'AtSUC2 dans les racines

Comme évoqué précédemment, la greffe est un bon moyen pour étudier une mutation dans un compartiment donné. Bien que le rôle d'AtSUC2 dans les racines soit moins important que dans les feuilles (la mutation du gène dans les feuilles a beaucoup plus d'influence sur la croissance que la

mutation du gène dans les racines), la mutation du gène *AtSUC2* dans les racines entraîne des changements phénotypiques qui vont tous dans le sens d'une même hypothèse. L'étude des plantes greffées Col-0/*suc2.2* ainsi que la localisation de l'expression du gène *AtSUC2* et de la protéine AtSUC2 nous a donc permis d'avoir plusieurs résultats en accord avec l'hypothèse selon laquelle AtSUC2 serait impliqué dans la force d'appel du puits *via* le déchargement du saccharose dans les racines au niveau des cellules compagnes (**Figure 65**). Il serait intéressant de réaliser des expérimentations de mesures de vitesse du phloème dans les racines avec l'esculine (Knox *et al.*, 2018) sur des plantes greffées Col0/*suc2-2*. En effet, ceci permettrait aussi de confirmer nos hypothèses quant au rôle d'AtSUC2 dans les racines. Pour écarter des hypothèses sur d'autres voies de déchargement, il faudrait vérifier l'implication des transporteurs d'hexoses dans ce phénomène. Une approche similaire à celle utilisée pour AtSUC2 (étude des mutants greffés en rhizobox) peut être réalisée pour vérifier cette implication des transporteurs d'hexoses dans le déchargement du phloème dans les racines.

En condition de carence hydrique le gène *AtSUC1* est réprimé dans les racines et le gène *AtSUC2* est induit (**Chapitre IV** ; Durand *et al.*, 2016). De plus, il a été observé que dans ces mêmes conditions il y avait une augmentation du transport de carbone vers les racines. Il est possible que l'augmentation de l'expression d'*AtSUC2* soit liée à l'augmentation du flux de carbone vers les racines. Cela soulignerait encore le rôle d'AtSUC2 dans la force d'appel du puits dans les racines, et serait cohérent avec l'observation de Knox *et al.* (2018). Pour vérifier cela, il serait opportun de réaliser une expérimentation sur des plantes mutées pour *AtSUC2* (greffées) cultivées en condition témoin et en carence hydrique.

Lors de nos expérimentations de localisation une contradiction est apparue entre les résultats de localisation de l'expression du gène *AtSUC2* et de localisation de la protéine AtSUC2. L'expression du gène a été retrouvée dans les cellules du parenchyme cortical en plus des cellules compagnes alors que la protéine a été localisée seulement dans les cellules compagnes. Les hypothèses pour expliquer cette différence sont exposées dans le **chapitre V**. Pour pouvoir vérifier certaines de ces hypothèses il faudrait localiser la protéine dans les mêmes zones que celles où a été observée l'expression du gène. Par exemple, la localisation de la protéine dans les pointes racinaires pourrait être réalisée puisque l'expression du gène a été localisée dans le parenchyme cortical dans cette zone. Néanmoins, des tentatives ont été réalisées pour couper les pointes racinaires dans le but de réaliser l'immunolocalisation sur ces tissus, mais la finesse des racines dans cette zone rend difficile l'obtention de coupes exploitables (non déchirées et droites). Toutefois, il y a encore de nombreuses possibilités à tester pour y parvenir, telle que l'inclusion en résine pour faciliter la coupe des pointes. Pour vérifier une autre hypothèse sur cette contradiction, il faudrait aussi étudier la localisation de l'ARN transcrit d'*AtSUC2* (et non des protéines issues des gènes rapporteurs *GUS* ou *mCherry*), dans les différents types cellulaires par hybridation *in situ*. Les expérimentations de localisation de l'expression du gène

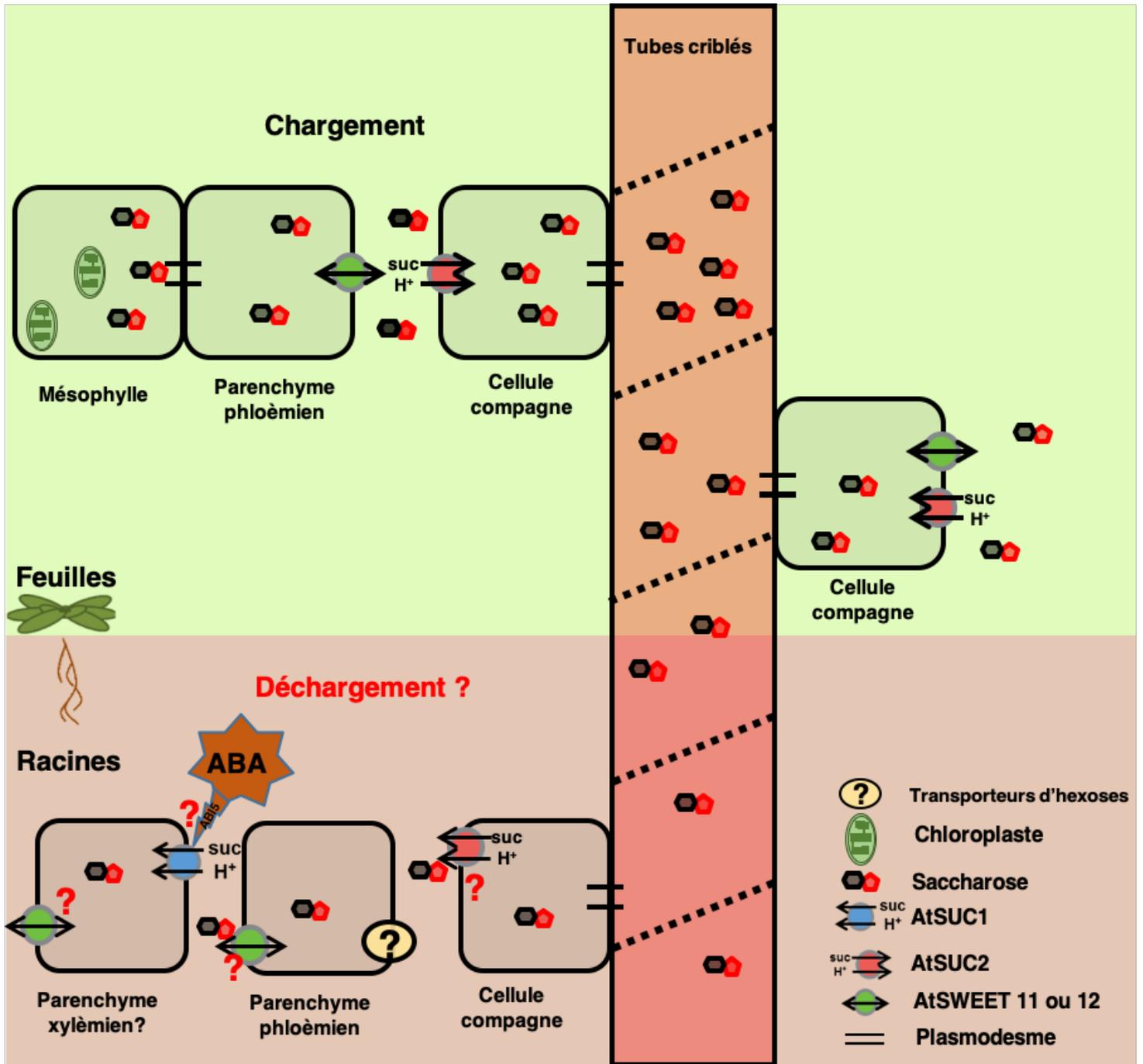


Figure 65. Schéma récapitulatif du chargement du saccharose dans les feuilles chez *Arabidopsis thaliana* et du déchargement apoplastique dans les racines d'après nos hypothèses.

AtSUC2 grâce à des gènes rapporteurs sont toutefois à compléter sur un plus grand nombre de plantes pour vérifier nos hypothèses.

4 Conclusion de la thèse

Nos résultats ont permis de répondre à la problématique de cette thèse en montrant les rôles probables d'*AtSUC1* et *AtSUC2*, les deux transporteurs de saccharose les plus exprimés dans les racines d'*Arabidopsis thaliana*. Néanmoins, les résultats sont plus clairs et faciles à interpréter pour *AtSUC2* que pour *AtSUC1* et des expérimentations complémentaires sont nécessaires pour valider nos hypothèses sur le rôle des hypothèses (surtout pour *AtSUC1*). *AtSUC1* aurait un rôle dans la redistribution du saccharose entre les cellules des zones en croissance dans les racines (**Figure 65**) et serait impliqué dans la signalisation glucidique. Enfin, *AtSUC2* serait impliqué dans la force d'appel du puits dans les racines *via* le déchargement en saccharose du phloème dans les cellules compagnes (**Figure 65**). La **figure 65** présente l'implication des transporteurs de saccharose déjà connue dans le chargement du phloème et les principales hypothèses sur leur rôle dans les racines. Néanmoins, les *AtSUCs* ne sont probablement pas les seuls responsables du transport des sucres dans les racines, puisque certains transporteurs d'hexose ainsi que des transporteurs de saccharose de type *AtSWEETs* sont retrouvés exprimés dans ce compartiment (nos résultats et Büttner, 2007 ; Le Hir *et al.*, 2015). L'élucidation du rôle précis de ces transporteurs dans les racines permettrait de compléter l'étude des mécanismes de répartition des sucres dans les racines et leur influence sur le développement racinaire.

Références bibliographique

- Alexandersson E, Fraysse L, Sjövall-Larsen S, Gustavsson S, Fellert M, Karlsson M, Johanson U, Kjellbom P** (2005) Whole Gene Family Expression and Drought Stress Regulation of Aquaporins. *Plant Molecular Biology* **59**: 469–484
- Aloni R, Aloni E, Langhans M, Ullrich CI** (2006) Role of Cytokinin and Auxin in Shaping Root Architecture: Regulating Vascular Differentiation, Lateral Root Initiation, Root Apical Dominance and Root Gravitropism. *Annals of Botany* **97**: 883–893
- Aluri S, Büttner M** (2007) Identification and functional expression of the *Arabidopsis thaliana* vacuolar glucose transporter 1 and its role in seed germination and flowering. *PNAS* **104**: 2537–2542
- Arnaud C, Bonnot C, Desnos T, Nussaume L** (2010) The root cap at the forefront. *Comptes Rendus Biologies* **333**: 335–343
- Atkinson JA, Rasmussen A, Traini R, Voss U, Sturrock C, Mooney SJ, Wells DM, Bennett MJ** (2014) Branching Out in Roots: Uncovering Form, Function, and Regulation. *Plant Physiology* **166**: 538–550
- Barratt DHP, Derbyshire P, Findlay K, Pike M, Wellner N, Lunn J, Feil R, Simpson C, Maule AJ, Smith AM** (2009) Normal growth of *Arabidopsis* requires cytosolic invertase but not sucrose synthase. *PNAS* **106**: 13124–13129
- Bartholomew DM, Bartley GE, Scolnik PA** (1991) Abscisic acid control of *rbcS* and *cab* transcription in tomato leaves. *Plant Physiology* **96**: 291–296
- Baud S, Wuillème S, Lemoine R, Kronenberger J, Caboche M, Lepiniec L, Rochat C** (2005) The *AtSUC5* sucrose transporter specifically expressed in the endosperm is involved in early seed development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **43**: 824–836
- van Bel AJ** (1996) Interaction between sieve element and companion cell and the consequences for photoassimilate distribution. Two structural hardware frames with associated physiological software packages in dicotyledons? *Journal of Experimental Botany* 1129–1140
- Bezruczyk M, Hartwig T, Horshman M, Char SN, Yang J, Yang B, Frommer WB, Sosso D** (2018) Impaired phloem loading in *zmsweet13a,b,c* sucrose transporter triple knock-out mutants in *Zea mays*. *New Phytologist*. doi: 10.1111/nph.15021
- Bhalerao RP, Eklöf J, Ljung K, Marchant A, Bennett M, Sandberg G** (2002) Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal* **29**: 325–332
- Bihmidine S, Hunter CT, Johns CE, Koch KE, Braun DM** (2013) Regulation of assimilate import into sink organs: update on molecular drivers of sink strength. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2013.00177
- Büttner M** (2010) The *Arabidopsis* sugar transporter (AtSTP) family: an update. *Plant Biology* **12**: 35–41
- Büttner M** (2007) The monosaccharide transporter(-like) gene family in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* **581**: 2318–2324
- Cabrera P, Thorpe M, Huber G** (2013) Hydrodynamics of steady state phloem transport with radial leakage of solute. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2013.00531
- Carpaneto A, Geiger D, Bamberg E, Sauer N, Fromm J, Hedrich R** (2005) Phloem-localized, proton-coupled sucrose carrier ZmSUT1 mediates sucrose efflux under the control of the sucrose gradient and the proton motive force. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 21437–21443

- Cayla T, Batailler B, Le Hir R, Revers F, Anstead JA, Thompson GA, Grandjean O, Dinant S** (2015) Live Imaging of Companion Cells and Sieve Elements in *Arabidopsis* Leaves. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0118122
- Chardon F, Bedu M, Calenge F, Klemens PAW, Spinner L, Clement G, Chietera G, Léran S, Ferrand M, Lacombe B, et al** (2013) Leaf Fructose Content Is Controlled by the Vacuolar Transporter SWEET17 in *Arabidopsis*. *Current Biology* **23**: 697–702
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS** (2003) Understanding plant responses to drought — from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* **30**: 239
- Chaves MM, Pereira JS, Maroco JP, Rodrigues ML, Ricardo CPP, Osorio ML, Carvalho I, Faria T, Pinheiro C** (2002) How Plants Cope with Water Stress in the Field? Photosynthesis and Growth. *Annals of Botany* **89**: 907–916
- Chen H-Y, Huh J-H, Yu Y-C, Ho L-H, Chen L-Q, Tholl D, Frommer WB, Guo W-J** (2015) The *Arabidopsis* vacuolar sugar transporter SWEET2 limits carbon sequestration from roots and restricts Pythium infection. *The Plant Journal* **83**: 1046–1058
- Chen L-Q** (2014) SWEET sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition. *New Phytologist* **201**: 1150–1155
- Chen L-Q, Hou B-H, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu X-Q, Guo W-J, Kim J-G, Underwood W, Chaudhuri B, et al** (2010) Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* **468**: 527–532
- Chen L-Q, Qu X-Q, Hou B-H, Sosso D, Osorio S, Fernie AR, Frommer WB** (2012) Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* **335**: 207–211
- Cho M-H, Lim H, Shin DH, Jeon J-S, Bhoo SH, Park Y-I, Hahn T-R** (2011) Role of the plastidic glucose translocator in the export of starch degradation products from the chloroplasts in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **190**: 101–112
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**: 735–743
- Clowes FAL** (1958) Development of quiescent centres in root meristems. *New Phytologist* **57**: 85–88
- Cookson SJ, Clemente Moreno MJ, Hevin C, Nyamba Mendome LZ, Delrot S, Magnin N, Trossat-Magnin C, Ollat N** (2014) Heterografting with nonself rootstocks induces genes involved in stress responses at the graft interface when compared with autografted controls. *Journal of Experimental Botany* **65**: 2473–2481
- Cookson SJ, Clemente Moreno MJ, Hevin C, Nyamba Mendome LZ, Delrot S, Trossat-Magnin C, Ollat N** (2013) Graft union formation in grapevine induces transcriptional changes related to cell wall modification, wounding, hormone signalling, and secondary metabolism. *Journal of Experimental Botany* **64**: 2997–3008
- Cosgrove DJ** (2005) Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**: 850–861
- Cruz de Carvalho MH** (2008) Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. *Plant Signaling & Behavior* **3**: 156–165

- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible W-R** (2005) Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **139**: 5–17
- Dasgupta K, Khadilkar AS, Sulpice R, Pant B, Scheible W-R, Fisahn J, Stitt M, Ayre BG** (2014) Expression of Sucrose Transporter cDNAs Specifically in Companion Cells Enhances Phloem Loading and Long-Distance Transport of Sucrose but Leads to an Inhibition of Growth and the Perception of a Phosphate Limitation. *Plant Physiology* **165**: 715–731
- Davies WJ, Zhang J** (1991) Root Signals and the Regulation of Growth and Development of Plants in Drying Soil. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**: 55–76
- De Rybel B, Vassileva V, Parizot B, Demeulenaere M, Grunewald W, Audenaert D, Van Campenhout J, Overvoorde P, Jansen L, Vanneste S, et al** (2010) A Novel Aux/IAA28 Signaling Cascade Activates GATA23-Dependent Specification of Lateral Root Founder Cell Identity. *Current Biology* **20**: 1697–1706
- De Schepper V, De Swaef T, Bauweraerts I, Steppe K** (2013) Phloem transport: a review of mechanisms and controls. *Journal of Experimental Botany* **64**: 4839–4850
- De Smet, S., Cuypers, A., Vangronsveld, J. and Remans, T.** (2015) Gene Networks Involved in Hormonal Control of Root Development in *Arabidopsis thaliana*: A Framework for Studying Its Disturbance by Metal Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, **16**, 19195–19224.
- Deak KI, Malamy J** (2005) Osmotic regulation of root system architecture. *The Plant Journal* **43**: 17–28
- Dickson RE** (1979) Analytical Procedures for the Sequential Extraction of ¹⁴C-Labeled Constituents from Leaves, Bark and Wood of Cottonwood Plants. *Physiologia Plantarum* **45**: 480–488
- Doudna JA, Charpentier E** (2014) The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* **346**: 1258096
- Durand M** (2015) Etude de l'allocation du carbone dans la plante en réponse à la contrainte hydrique : impact sur l'expression des transporteurs de saccharose dans les organes source et puits. Thèse de doctorat. Poitiers
- Durand M, Mainson D, Porcheron B, Maurousset L, Lemoine R, Pourtau N** (2018) Carbon source–sink relationship in *Arabidopsis thaliana*: the role of sucrose transporters. *Planta* **247**: 587–611
- Durand M, Porcheron B, Hennion N, Maurousset L, Lemoine R, Pourtau N** (2016) Water deficit enhances C export to the roots in *A. thaliana* plants with contribution of sucrose transporters in both shoot and roots. *Plant Physiology* pp.01926.2015
- Endler A, Meyer S, Schelbert S, Schneider T, Weschke W, Peters SW, Keller F, Baginsky S, Martinoia E, Schmidt UG** (2006) Identification of a Vacuolar Sucrose Transporter in Barley and *Arabidopsis* Mesophyll Cells by a Tonoplast Proteomic Approach. *Plant Physiology* **141**: 196–207
- Fausser F, Schiml S, Puchta H** (2014) Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **79**: 348–359
- Feng L, Frommer WB** (2015) Structure and function of SemiSWEET and SWEET sugar transporters. *Trends in Biochemical Sciences*. doi: 10.1016/j.tibs.2015.05.005
- Fischer K, Weber A** (2002) Transport of carbon in non-green plastids. *Trends in Plant Science* **7**: 345–351

- Freixes S, Thibaud M-C, Tardieu F, Muller B** (2002) Root elongation and branching is related to local hexose concentration in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant, Cell & Environment* **25**: 1357–1366
- Froelich DR, Mullendore DL, Jensen KH, Ross-Elliott TJ, Anstead JA, Thompson GA, Pélissier HC, Knoblauch M** (2011) Phloem Ultrastructure and Pressure Flow: Sieve-Element-Occlusion-Related Agglomerations Do Not Affect Translocation. *Plant Cell* **23**: 4428–4445
- Gottwald JR, Krysan PJ, Young JC, Evert RF, Sussman MR** (2000) Genetic evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *PNAS* **97**: 13979–13984
- Gould N, Thorpe MR, Pritchard J, Christeller JT, Williams LE, Roeb G, Schurr U, Minchin PEH** (2012) AtSUC2 has a role for sucrose retrieval along the phloem pathway: Evidence from carbon-11 tracer studies. *Plant Science* **188–189**: 97–101
- Gupta A, Singh M, Laxmi A** (2015) Interaction between Glucose and Brassinosteroid during regulation of lateral root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* pp.114.256313
- Hafke JB, Amerongen J-K van, Kelling F, Furch ACU, Gaupels F, Bel AJE van** (2005) Thermodynamic Battle for Photosynthate Acquisition between Sieve Tubes and Adjoining Parenchyma in Transport Phloem. *Plant Physiology* **138**: 1527–1537
- Hammond JP, White PJ** (2008) Sucrose transport in the phloem: integrating root responses to phosphorus starvation. *Journal of Experimental Botany* **59**: 93–109
- Hare PD, Cress WA, Van Staden J** (1998) Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, cell & environment* **21**: 535–553
- Harris J** (2015) Abscisic Acid: Hidden Architect of Root System Structure. *Plants* **4**: 548–572
- Haupt S, Duncan GH, Holzberg S, Oparka KJ** (2001) Evidence for symplastic phloem unloading in sink leaves of barley. *Plant Physiology* **125**: 209–218
- Hennion N, Durand M, Vriet C, Doidy J, Maurousset L, Lemoine R, Pourtau N** (2018) Sugars en route to the roots. Transport, metabolism and storage within plant roots and towards microorganisms of the rhizosphere. *Physiologia Plantarum*. doi: 10.1111/ppl.12751
- Heo J -o., Roszak P, Furuta KM, Helariutta Y** (2014) Phloem development: Current knowledge and future perspectives. *American Journal of Botany* **101**: 1393–1402
- Ho LC** (1988) Metabolism and Compartmentation of Imported Sugars in Sink Organs in Relation to Sink Strength. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **39**: 355–378
- Hoth S, Niedermeier M, Feuerstein A, Hornig J, Sauer N** (2010) An ABA-responsive element in the AtSUC1 promoter is involved in the regulation of AtSUC1 expression. *Planta* **232**: 911–923
- Hu Y-B, Sosso D, Qu X-Q, Chen L-Q, Ma L, Chermak D, Zhang D-C, Frommer WB** (2016) Phylogenetic evidence for a fusion of archaeal and bacterial SemiSWEETs to form eukaryotic SWEETs and identification of SWEET hexose transporters in the amphibian chytrid pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *The FASEB Journal* **30**: 3644–3654
- Huang L-F, Bocoock PN, Davis JM, Koch KE** (2007) Regulation of invertase: a “suite” of transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Functional Plant Biology* **34**: 499
- Hummel I, Pantin F, Sulpice R, Piques M, Rolland G, Dauzat M, Christophe A, Pervent M, Bouteillé M, Stitt M, Gibon Y et Muller B** (2010) *Arabidopsis* Plants Acclimate to Water Deficit at Low Cost through

Changes of Carbon Usage: An Integrated Perspective Using Growth, Metabolite, Enzyme, and Gene Expression Analysis. *Plant Physiology* **154**: 357–372

Imlau A, Truernit E, Sauer N (1999) Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *The Plant Cell* **11**: 309–322

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* **6**: 3901–3907

Jia W, Zhang L, Wu D, Liu S, Gong X, Zhenhai Cui, Na Cui, Huiying Cao, Longbing Rao, Che Wang (2015) Sucrose Transporter AtSUC9 Mediated by a Low Sucrose Level is Involved in *Arabidopsis* Abiotic Stress Resistance by Regulating Sucrose Distribution and ABA Accumulation. *Plant & Cell Physiology* **56**: 1574–1587

Jian H, Lu K, Yang B, Wang T, Zhang L, Zhang A, Wang J, Liu L, Qu C, Li J (2016) Genome-Wide Analysis and Expression Profiling of the SUC and SWEET Gene Families of Sucrose Transporters in Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2016.01464

Juergensen K, Scholz-Starke J, Sauer N, Hess P, Van Bel AJE, Grundler FMW (2003) The Companion Cell-Specific *Arabidopsis* Disaccharide Carrier AtSUC2 Is Expressed in Nematode-Induced Syncytia. *Plant Physiology* **131**: 61–69

Julius BT, Leach KA, Tran TM, Mertz RA, Braun DM (2017) Sugar Transporters in Plants: New Insights and Discoveries. *Plant Cell Physiology* **58**: 1442–1460

Kanno Y, Oikawa T, Chiba Y, Ishimaru Y, Shimizu T, Sano N, Koshiba T, Kamiya Y, Ueda M, Seo M (2016) AtSWEET13 and AtSWEET14 regulate gibberellin-mediated physiological processes. *Nature Communications* **7**: 13245

Kawaguchi R, Williams AJ, Bray EA, Bailey-Serres J (2003) Water-deficit-induced translational control in *Nicotiana tabacum*. *Plant, Cell & Environment* **26**: 221–229

Khan JA, Wang Q, Sjölund RD, Schulz A, Thompson GA (2007) An Early Nodulin-Like Protein Accumulates in the Sieve Element Plasma Membrane of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **143**: 1576–1589

Klemens PAW, Patzke K, Deitmer J, Spinner L, Le Hir R, Bellini C, Bedu M, Chardon F, Krapp A, Neuhaus HE (2013) Overexpression of the Vacuolar Sugar Carrier AtSWEET16 Modifies Germination, Growth, and Stress Tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **163**: 1338–1352

Klepek Y-S, Geiger D, Stadler R, Klebl F, Landouar-Arsivaud L, Lemoine R, Hedrich R, Sauer N (2005) *Arabidopsis* POLYOL TRANSPORTER5, a New Member of the Monosaccharide Transporter-Like Superfamily, Mediates H⁺-Symport of Numerous Substrates, Including myo-Inositol, Glycerol, and Ribose. *Plant Cell* **17**: 204–218

Klepek Y-S, Volke M, Konrad KR, Wippel K, Hoth S, Hedrich R, Sauer N (2010) *Arabidopsis thaliana* POLYOL/MONOSACCHARIDE TRANSPORTERS 1 and 2: fructose and xylitol/H⁺ symporters in pollen and young xylem cells. *Journal of Experimental Botany* **61**: 537–550

Knoblauch M, Vendrell M, Leau E de, Paterlini A, Knox K, Ross-Elliot T, Reinders A, Brockman SA, Ward J, Oparka K (2015) Multispectral Phloem-Mobile Probes: Properties and Applications. *Plant Physiology* **167**: 1211–1220

Knox K, Paterlini A, Thomson S, Oparka K (2018) The coumarin glucoside, esculin, reveals rapid changes in phloem-transport velocity in response to environmental cues. *Plant physiology* pp–00590

- Kong D, Hao Y, Cui H** (2016) The WUSCHEL Related Homeobox Protein WOX7 Regulates the Sugar Response of Lateral Root Development in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant* **9**: 261–270
- Krügel, U. et Kühn, C.** (2013) Post-translational regulation of sucrose transporters by direct protein–protein interactions. *Front Plant Sci*, **4**.
- Kuhn C, Franceschi VR, Schulz A, Lemoine R, Frommer WB** (1997) Macromolecular Trafficking Indicated by Localization and Turnover of Sucrose Transporters in Eucleate Sieve Elements. *Science* **275**: 1298–1300
- Kühn C, Grof CP** (2010) Sucrose transporters of higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 287–297
- Kutschera U, Niklas KJ** (2013) Cell division and turgor-driven stem elongation in juvenile plants: A synthesis. *Plant Science* **207**: 45–56
- Lambers H, Atkin O, Milenaar F** (1996) Respiratory Patterns in Roots in Relation to Their Functioning. *Plant roots: the hidden half*. Beekman.
- Le Hir R, Spinner L, Klemens PAW, Chakraborti D, de Marco F, Vilaine F, Wolff N, Lemoine R, Porcheron B, Géry C, et al** (2015) Disruption of the Sugar Transporters AtSWEET11 and AtSWEET12 Affects Vascular Development and Freezing Tolerance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* **8**: 1687–1690
- Lemoine R** (2000) Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1465**: 246–262
- Lemoine R, La Camera S, Atanassova R, Dédaldéchamp F, Allario T, Pourtau N, Bonnemain J-L, Laloï M, Coutos-Thévenot P, Maurousset L, et al** (2013) Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontier in Plant Science* **4**: 272
- Lemonnier P, Gaillard C, Veillet F, Verbeke J, Lemoine R, Coutos-Thévenot P, La Camera S** (2014) Expression of *Arabidopsis* sugar transport protein STP13 differentially affects glucose transport activity and basal resistance to *Botrytis cinerea*. *Plant Molecular Biology* **85**: 473–484
- Li Y, Li L-L, Fan R-C, Peng C-C, Sun H-L, Zhu S-Y, Wang X-F, Zhang L-Y, Zhang D-P** (2012) *Arabidopsis* Sucrose Transporter SUT4 Interacts with Cytochrome b5-2 to Regulate Seed Germination in Response to Sucrose and Glucose. *Molecular Plant* **5**: 1029–1041
- Liesche, J., Krügel, U., He, H., Chincinska, I., Hackel, A. and Kühn, C.** (2011) Sucrose transporter regulation at the transcriptional, post-transcriptional and post-translational level. *Journal of Plant Physiology*, **168**, 1426–1433.
- Lin IW, Sosso D, Chen L-Q, Gase K, Kim S-G, Kessler D, Klinkenberg PM, Gorder MK, Hou B-H, Qu X-Q, et al** (2014) Nectar secretion requires sucrose phosphate synthases and the sugar transporter SWEET9. *Nature* **508**: 546–549
- Liu L-H, Ludewig U, Gassert B, Frommer WB, Von Wirén N** (2003) Urea Transport by Nitrogen-Regulated Tonoplast Intrinsic Proteins in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **133**: 1220–1228
- Ludewig F, Flügge U-I** (2013) Role of metabolite transporters in source–sink carbon allocation. *Frontier in Plant Science* **4**: 231
- Mainson D** (2013) Etude du transport des sucres dans les racines d'*Arabidopsis thaliana* au cours de son cycle de développement et en réponse à un stress osmotique. Thèse de doctorat. Poitiers

- Marhavý P, Vanstraelen M, De Rybel B, Zhaojun D, Bennett MJ, Beeckman T, Benková E** (2013) Auxin reflux between the endodermis and pericycle promotes lateral root initiation. *The EMBO journal* **32**: 149–158
- Marquès-Bueno MM, Morao AK, Cayrel A, Platre MP, Barberon M, Caillieux E, Colot V, Jaillais Y, Roudier F, Vert G** (2016) A versatile Multisite Gateway-compatible promoter and transgenic line collection for cell type-specific functional genomics in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **85**: 320–333
- Marsch-Martínez N, Franken J, Gonzalez-Aguilera KL, Folter S de, Angenent G, Alvarez-Buylla ER** (2013) An efficient flat-surface collar-free grafting method for *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Methods* **9**: 14
- Medici A, Laloi M, Atanassova R** (2014) Profiling of sugar transporter genes in grapevine coping with water deficit. *FEBS Letters* **588**: 3989–3997
- Melnyk CW, Gabel A, Hardcastle TJ, Robinson S, Miyashima S, Grosse I, Meyerowitz EM** (2018) Transcriptome dynamics at *Arabidopsis* graft junctions reveal an intertissue recognition mechanism that activates vascular regeneration. PNAS 201718263
- Melnyk CW, Schuster C, Leyser O, Meyerowitz EM** (2015) A Developmental Framework for Graft Formation and Vascular Reconnection in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* **25**: 1306–1318
- Meyer S, Lauterbach C, Niedermeier M, Barth I, Sjolund RD, Sauer N** (2004) Wounding Enhances Expression of AtSUC3, a Sucrose Transporter from *Arabidopsis* Sieve Elements and Sink Tissues. *Plant Physiology* **134**: 684–693
- Meyer S, Melzer M, Truernit E, Hümmer C, Besenbeck R, Stadler R, Sauer N** (2000) AtSUC3, a gene encoding a new *Arabidopsis* sucrose transporter, is expressed in cells adjacent to the vascular tissue and in a carpel cell layer. *The Plant Journal* **24**: 869–882
- Milne RJ, Grof CP, Patrick JW** (2018) Mechanisms of phloem unloading: shaped by cellular pathways, their conductances and sink function. *Current Opinion in Plant Biology* **43**: 8–15
- Moreno-Risueno MA, Van Norman JM, Moreno A, Zhang J, Ahnert SE, Benfey PN** (2010) Oscillating gene expression determines competence for periodic *Arabidopsis* root branching. *Science* **329**: 1306–1311
- Morgan JM** (1984) Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual review of plant physiology* **35**: 299–319
- Mullen JL, Ishikawa H, Evans ML** (1998) Analysis of changes in relative elemental growth rate patterns in the elongation zone of *Arabidopsis* roots upon gravistimulation. *Planta* **206**: 598–603
- Muller B, Pantin F, Génard M, Turc O, Freixes S, Piques M, Gibon Y** (2011) Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. *Journal of Experimental Botany* **62**: 1715–1729
- Müller K, Tintelnot S, Leubner-Metzger G** (2006) Endosperm-limited Brassicaceae Seed Germination: Abscisic Acid Inhibits Embryo-induced Endosperm Weakening of *Lepidium sativum* (cress) and Endosperm Rupture of Cress and *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **47**: 864–877
- Münch E** (1930) *Die Stoffbewegungen in der Pflanze*. Fischer, Jena, Germany.
- Nicolas ME, Lambers H, Simpson RJ, Dalling MJ** (1985) Effect of drought on metabolism and partitioning of carbon in two wheat varieties differing in drought-tolerance. *Annals of Botany* **55**: 727–742

- Oparka K j., Duckett C m., Prior D a. m., Fisher D b.** (1994) Real-time imaging of phloem unloading in the root tip of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **6**: 759–766
- Oparka KJ, Santa Cruz S** (2000) The great escape: phloem transport and unloading of macromolecules. *Annual review of plant biology* **51**: 323–347
- Oparka KJ, Turgeon R** (1999) Sieve elements and companion cells—traffic control centers of the phloem. *The Plant Cell* **11**: 739–750
- Osakabe Y, Osakabe K, Shinozaki K, Tran L-SP** (2014) Response of plants to water stress. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2014.00086
- Patrick JW** (2013) Does Don Fisher’s high-pressure manifold model account for phloem transport and resource partitioning? *Frontier in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2013.00184
- Petricka JJ, Winter CM, Benfey PN** (2012) Control of *Arabidopsis* Root Development. *Annual Review of Plant Biology* **63**: 563–590
- Pommerrenig B, Popko J, Heilmann M, Schulmeister S, Dietel K, Schmitt B, Stadler R, Feussner I, Sauer N** (2013) SUCROSE TRANSPORTER 5 supplies *Arabidopsis* embryos with biotin and affects triacylglycerol accumulation. *Plant Journal* **73**: 392–404
- Pourtau N, Jennings R, Pelzer E, Pallas J, Wingler A** (2006) Effect of sugar-induced senescence on gene expression and implications for the regulation of senescence in *Arabidopsis*. *Planta* **224**: 556–568
- Quirino BF, Reiter W-D, Amasino RD** (2001) One of two tandem *Arabidopsis* genes homologous to monosaccharide transporters is senescence-associated. *Plant molecular biology* **46**: 447–457
- Read DB, Gregory PJ, Bell AE** (1999) Physical properties of axenic maize root mucilage. *Plant and Soil* **211**: 87–91
- Reinders A, Panshyshyn JA, Ward JM** (2005) Analysis of Transport Activity of *Arabidopsis* Sugar Alcohol Permease Homolog AtPLT5. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 1594–1602
- Rennie EA, Turgeon R** (2009) A comprehensive picture of phloem loading strategies. *PNAS* **106**: 14162–14167
- Roberts AG, Cruz SS, Roberts IM, Prior DA, Turgeon R, Oparka KJ** (1997) Phloem unloading in sink leaves of *Nicotiana benthamiana*: comparison of a fluorescent solute with a fluorescent virus. *The Plant Cell* **9**: 1381–1396
- Roitsch T, González M-C** (2004) Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in Plant Science* **9**: 606–613
- Rolland F, Moore B, Sheen J** (2002) Sugar Sensing and Signaling in Plants. *Plant Cell* **14**: S185–S205
- Ross-Elliott TJ, Jensen KH, Haaning KS, Wager BM, Knoblauch J, Howell AH, Mullendore DL, Monteith AG, Paultre D, Yan D, et al** (2017) Phloem unloading in *Arabidopsis* roots is convective and regulated by the phloem-pole pericycle. *eLife Sciences* **6**: e24125
- Rottmann TM, Fritz C, Lauter A, Schneider S, Fischer C, Danzberger N, Dietrich P, Sauer N, Stadler R** (2018) Protoplast-Esculin Assay as a New Method to Assay Plant Sucrose Transporters: Characterization of AtSUC6 and AtSUC7 Sucrose Uptake Activity in *Arabidopsis* Col-0 Ecotype. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2018.00430

- Roycewicz P, Malamy JE** (2012) Dissecting the effects of nitrate, sucrose and osmotic potential on *Arabidopsis* root and shoot system growth in laboratory assays. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **367**: 1489–1500
- Ruan Y-L** (2014) Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Annual Review of Plant Biology* **65**: 33–67
- Sauer N** (2007) Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Letters* **581**: 2309–2317
- Sauer N, Ludwig A, Knoblauch A, Rothe P, Gahrtz M, Klebl F** (2004) AtSUC8 and AtSUC9 encode functional sucrose transporters, but the closely related AtSUC6 and AtSUC7 genes encode aberrant proteins in different *Arabidopsis* ecotypes. *The Plant Journal* **40**: 120–130
- Sauer N, Stolz J** (1994) SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *The Plant Journal* **6**: 67–77
- Schimi S, Fauser F, Puchta H** (2016) CRISPR/Cas-Mediated Site-Specific Mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* Using Cas9 Nucleases and Paired Nickases. *In* M Murata, ed, *Chromosome and Genomic Engineering in Plants*. Springer New York, New York, NY, pp 111–122
- Schneider S, Hulpke S, Schulz A, Yaron I, Höll J, Imlau A, Schmitt B, Batz S, Wolf S, Hedrich R, et al** (2012) Vacuoles release sucrose via tonoplast-localised SUC4-type transporters. *Plant Biology* **14**: 325–336
- Schneider S, Schneidereit A, Udvardi P, Hammes U, Gramann M, Dietrich P, Sauer N** (2007) *Arabidopsis* INOSITOL TRANSPORTER2 Mediates H⁺ Symport of Different Inositol Epimers and Derivatives across the Plasma Membrane. *Plant physiology* **145**: 1395–1407
- Schneidereit A, Scholz-Starke J, Büttner M** (2003) Functional Characterization and Expression Analyses of the Glucose-Specific AtSTP9 Monosaccharide Transporter in Pollen of *Arabidopsis*. *Plant physiology* **133**: 182–190
- Schulz A, Beyhl D, Marten I, Wormit A, Neuhaus E, Poschet G, Büttner M, Schneider S, Sauer N, Hedrich R** (2011) Proton-driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2: AtSUC4- and AtTMT1/2-mediated vacuolar sucrose transport. *The Plant Journal* **68**: 129–136
- Schulze W, Weise A, Frommer WB, Ward JM** (2000) Function of the cytosolic N-terminus of sucrose transporter AtSUT2 in substrate affinity. *FEBS letters* **485**: 189–194
- Schüssler MD, Alexandersson E, Bienert GP, Kichey T, Laursen KH, Johanson U, Kjellbom P, Schjoerring JK, Jahn TP** (2008) The effects of the loss of TIP1;1 and TIP1;2 aquaporins in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **56**: 756–767
- Schwimmer S, Makower RU, Rorem ES** (1961) Invertase & invertase inhibitor in potato. *Plant physiology* **36**: 313
- Seo PJ, Park J-M, Kang SK, Kim S-G, Park C-M** (2011) An *Arabidopsis* senescence-associated protein SAG29 regulates cell viability under high salinity. *Planta* **233**: 189–200
- Sharp RE, Davies WJ** (1989) Regulation of growth and development of plants growing with a restricted supply of water. *In* HG Jones, TJ Flowers, MB Jones, eds, *Plants under Stress*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 71–94

- Sharp RE, Poroyko V, Hejlek LG, Spollen WG, Springer GK, Bohnert HJ, Nguyen HT** (2004) Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *Journal of Experimental Botany* **55**: 2343–2351
- Singh M, Gupta A, Laxmi A** (2014) Glucose control of root growth direction in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **65**: 2981–2993
- Sivitz AB, Reinders A, Johnson ME, Krentz AD, Grof CPL, Perroux JM, Ward JM** (2007) *Arabidopsis* Sucrose Transporter AtSUC9. High-Affinity Transport Activity, Intragenic Control of Expression, and Early Flowering Mutant Phenotype. *Plant Physiology* **143**: 188–198
- Sivitz AB, Reinders A, Ward JM** (2008) *Arabidopsis* Sucrose Transporter AtSUC1 Is Important for Pollen Germination and Sucrose-Induced Anthocyanin Accumulation. *Plant Physiology* **147**: 92–100
- Slewinski TL** (2011) Diverse Functional Roles of Monosaccharide Transporters and their Homologs in Vascular Plants: A Physiological Perspective. *Molecular Plant* **4**: 641–662
- Solfanelli C, Poggi A, Loreti E, Alpi A, Perata P** (2006) Sucrose-Specific Induction of the Anthocyanin Biosynthetic Pathway in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **140**: 637–646
- Sperdoui I, Moustakas M** (2012) Interaction of proline, sugars, and anthocyanins during photosynthetic acclimation of *Arabidopsis thaliana* to drought stress. *Journal of Plant Physiology* **169**: 577–585
- Srivastava AC, Dasgupta K, Ajieren E, Costilla G, McGarry RC, Ayre BG** (2009) *Arabidopsis* plants harbouring a mutation in AtSUC2, encoding the predominant sucrose/proton symporter necessary for efficient phloem transport, are able to complete their life cycle and produce viable seed. *Annals of Botany* **104**: 1121–1128
- Srivastava AC, Ganesan S, Ismail IO, Ayre BG** (2008) Functional Characterization of the *Arabidopsis* AtSUC2 Sucrose/H⁺ Symporter by Tissue-Specific Complementation Reveals an Essential Role in Phloem Loading But Not in Long-Distance Transport. *Plant Physiology* **148**: 200–211
- Stadler R, Lauterbach C, Sauer N** (2005) Cell-to-Cell Movement of Green Fluorescent Protein Reveals Post-Phloem Transport in the Outer Integument and Identifies Symplastic Domains in *Arabidopsis* Seeds and Embryos. *Plant Physiology* **139**: 701–712
- Stadler R, Sauer N** (1996) The *Arabidopsis thaliana* AtSUC2 Gene is Specifically Expressed in Companion Cells. *Botanica Acta* **109**: 299–306
- Stadler R, Truernit E, Gahrtz M, Sauer N** (1999) The AtSUC1 sucrose carrier may represent the osmotic driving force for anther dehiscence and pollen tube growth in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **19**: 269–278
- Taiz, Zeiger** (2010) *Plant physiology*, Sinauer. ISBN 978-0-87893-866-7
- Tardieu F** (2013) Plant response to environmental conditions: assessing potential production, water demand, and negative effects of water deficit. *Frontiers in Physiology*. doi: 10.3389/fphys.2013.00017
- Truernit E** (2001) Plant physiology: The importance of sucrose transporters. *Current Biology* **11**: R169–R171
- Truernit E, Sauer N** (1995) The promoter of the *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H⁺ symporter gene directs expression of β -glucuronidase to the phloem: Evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta* **196**: 564–570

- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F** (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* **3**: research0034–1
- Veillet F, Gaillard C, Lemonnier P, Coutos-Thévenot P, La Camera S** (2017) The molecular dialogue between *Arabidopsis thaliana* and the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* leads to major changes in host carbon metabolism. *Scientific Reports*. doi: 10.1038/s41598-017-17413-y
- Verbančič J, Lunn JE, Stitt M, Persson S** (2018) Carbon Supply and the Regulation of Cell Wall Synthesis. *Molecular Plant* **11**: 75–94
- Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu J-K** (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal* **45**: 523–539
- Viola R, Roberts AG, Haupt S, Gazzani S, Hancock RD, Marmioli N, Machray GC, Oparka KJ** (2001) Tuberization in potato involves a switch from apoplastic to symplastic phloem unloading. *The Plant Cell* **13**: 385–398
- Ward WW** (2005) *Biochemical and Physical Properties of Green Fluorescent Protein*. Green Fluorescent Protein. Wiley-Blackwell, pp 39–65
- Wardlaw I** (1990) The control of carbon partitioning in plants. *New Phytologist* **116**: 341–381
- Weber A, Servaites JC, Geiger DR, Kofler H, Hille D, Gröner F, Hebbeker U, Flügge U-I** (2000) Identification, purification, and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator. *The Plant Cell* **12**: 787–801
- van der Weele CM, Spollen WG, Sharp RE, Baskin TI** (2000) Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *Journal of Experimental Botany* **51**: 1555–1562
- Weise A, Barker L, Kühn C, Lalonde S, Buschmann H, Frommer WB, Ward JM** (2000) A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. *The Plant Cell* **12**: 1345–1355
- Wenzel WW, Wieshammer G, Fitz WJ, Puschenreiter M** (2001) Novel rhizobox design to assess rhizosphere characteristics at high spatial resolution. *Plant and Soil* **237**: 37–45
- Wingenter K, Schulz A, Wormit A, Wic S, Trentmann O, Hoermiller II, Heyer AG, Marten I, Hedrich R, Neuhaus HE** (2010) Increased Activity of the Vacuolar Monosaccharide Transporter TMT1 Alters Cellular Sugar Partitioning, Sugar Signaling, and Seed Yield in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **154**: 665–677
- Wippel K, Sauer N** (2012) *Arabidopsis* SUC1 loads the phloem in suc2 mutants when expressed from the SUC2 promoter. *Journal of Experimental Botany* **63**: 669–679
- Xiong L, Wang R-G, Mao G, Koczan JM** (2006) Identification of Drought Tolerance Determinants by Genetic Analysis of Root Response to Drought Stress and Abscisic Acid. *Plant Physiology* **142**: 1065–1074
- Xu Q, Chen S, Yunjuan R, Chen S, Liesche J** (2018) Regulation of Sucrose Transporters and Phloem Loading in Response to Environmental Cues. *Plant Physiology* **176**: 930–945
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (1994) A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell* **6**: 251–264

- Yin H, Yan B, Sun J, Jia P, Zhang Z, Yan X, Chai J, Ren Z, Zheng G, Liu H (2012)** Graft-union development: a delicate process that involves cell–cell communication between scion and stock for local auxin accumulation. *Journal of Experimental Botany* **ers109**
- Yuan T-T, Xu H-H, Zhang K-X, Guo T-T, Lu Y-T (2014)** Glucose inhibits root meristem growth via *ABA INSENSITIVE 5*, which represses PIN1 accumulation and auxin activity in *Arabidopsis*: Glucose causes root defects via *ABI5* and auxin signalling. *Plant, Cell & Environment* **37**: 1338–1350
- Zhang J, Davies WJ (1989)** Abscisic acid produced in dehydrating roots may enable the plant to measure the water status of the soil. *Plant, Cell & Environment* **12**: 73–81
- Zhao D, You Y, Fan H, Zhu X, Wang Y, Duan Y, Xuan Y, Chen L (2018)** The Role of Sugar Transporter Genes during Early Infection by Root-Knot Nematodes. *International Journal of Molecular Sciences* **19**: 302

Annexes

Annexe I : « Influence of the plant culture system, pot vs rhizobox, on *Arabidopsis thaliana* growth and root microbiome »

Cet article sera soumis au journal « Microbial biotechnology » au format « Letters » :

Influence of the plant culture system, pot vs rhizobox, on *Arabidopsis thaliana* growth and root microbiome

Running title: Influence of the culture system on *Arabidopsis thaliana*

Laure Mignerot^{1,5#}, Nils Hennion^{1#}, Kévin Gravouil², Benoît Porcheron¹, Mickaël Durand^{1,6}, Laurence Maurousset¹, Yann Héchard³, Joanne Bertaux⁴, Thierry Ferreira², Nathalie Pourtau¹, Anne Mercier^{2,3} and Rémi Lemoine^{1*}

^{1,2,3,4}Ecologie et Biologie des Interactions, UMR 7267, CNRS Université de Poitiers, 86073 Poitiers, France ¹Team Sugar and Exchanges Plant – Environment, ²Cooperative Laboratory Thanaplast^{SP}-Carbios, ³Team Water Microbiology, ⁴Team Ecology, Evolution, Symbiosis, ⁵Present address: Algal Genetics Group, UMR 8227 Integrative Biology of Marine Models, Station biologique de Roscoff, CS 90074, 29688, Roscoff, France, ⁶Present address: INRA-AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR1318, ERL CNRS 3559, Saclay Plant Sciences, Route de Saint-Cyr, 78026 Versailles, France

*Corresponding author: remi.lemoine@univ-poitiers.fr

#: the authors contributed equally to the work.

Summary

Plant culture systems such as rhizoboxes, allowing direct monitoring of root growth and architecture, are increasingly included in research programs for study and selection of efficient root systems. Here we report a comparison of the classic pot and rhizobox systems to evaluate the influence of culture systems on the plant growth and root microbiome. This study has revealed that the model plant *A. thaliana* plants grown in rhizobox displayed a growth pattern similar to those grown in pots, but with a delayed leaf initiation and slower rate of growth over the experiment. This led to smaller plants 40 days after *A. thaliana* planting. However, no nutrient deficiency symptoms were observed in the plants grown in rhizobox. Interestingly, plants in rhizobox displayed a root microbiome composition showing differences with plants grown in pot from the same substrate, including a reduction of the bacterial diversity in

rhizosphere, rhizoplan and endosphere compartments, although the same genus were present in both cases. Altogether, the results suggested that the physical partition between plant roots and substrate in rhizobox may delay the root bacterial colonization, and may shift signalling occurring in the rhizosphere. Results from this comprehensive study give some clues for future experiment with such optimized systems.

Introduction

While the beneficial effects of soil microorganisms on plant growth and plant resistance to stress have long been documented (1, 2), most studies on rhizobiome diversity, including those on the model plant *Arabidopsis thaliana*, have been conducted on plants in their natural soil environment (3). In contrast, our current understanding of the root microbiome of plants grown in controlled conditions (pots in green-houses or growth cabinets) are scarce, although most of plant physiology experiments are done on these culture systems. As the interactions of the rhizosphere inhabiting micro-organisms are in general considered as positive for the plant (4), knowledge of the rhizobiome diversity in artificial conditions would be important for comparisons with natural or field conditions. This might be even more important for the study of root development in specific system culture such as rhizotron designed for the study of the root system architecture. Technical difficulties in accessing roots non-destructively and dynamically within soil were overcome by the design of optimized devices such as rhizoboxes (Fig. 4), allowing the direct observations of plant root development and architecture due to the physical separation of the roots from the substrate. However little information is available on comparative growth parameters and rhizobiome diversity in such systems. Information on rhizobiome diversity in artificial culture systems may be essential for scaling from laboratory up to field conditions. As a first step in this knowledge, the model plant *Arabidopsis thaliana* was grown on two culture systems used in our laboratory : the “classical” pot (5) and the newly

developed rhizobox (6). An analysis of plant growth parameters was combined with a characterization of the compost and root-inhabiting bacterial communities, including examination of the rhizosphere, rhizoplan and endosphere compartments.

Results and discussion

Arabidopsis thaliana (L.) Heynth ecotype Col-0 plants were cultivated in organic compost (Peltracom Belgium, LP502). Seeds were sown in a drop of nutrient agar medium on the surface of either 9 cm diameter pot or rhizobox. The rhizobox were composed of two Plexiglas plates of 20 cm x 20 cm, spaced on both sides with 1 cm x 20 cm (width x length) bars, as previously described (6). The root system was separated from compost by a 7 μm -mesh width nylon membrane (Sefar Nitex[®] 03-7/2). This system allows direct and continuous 2D-observations of the root system architecture during development and determination of root traits involved in responses to stresses such as water deficit (6). Plants (in pots and rhizoboxes) were placed in a phytotron under controlled conditions as reported in Supporting Information (see “Detailed experimental procedure”).

Plant growth parameters were first monitored in the two culture systems. After an initial similar plant development during the first three-week, an obvious difference was detected in leaf number after day 26, with fewer leaves in plants grown in rhizobox compared to those in pot (Fig. 1a). The leaf number exponentially increased from day 12 to day 40 in the two culture systems, but the rate of leaf initiation was lower in rhizobox over the experiment. Consequently, a much lower leaf projected area discriminated rhizobox- from pot-grown plants (Fig. 1b). This difference became significant from day 22 on and increased steadily to day 40, certainly due to larger individual leaves in pot.

Both rosette and root dry weights were significantly reduced in rhizobox-grown plants (Fig. 1c), but the reduction was more important for roots as demonstrated by the decreased root/shoot

ratio. However, harvesting the whole root system from plants in pots was rather tedious as, even after thorough washing, some compost particles were still firmly attached to roots, artifactually increasing root weight. However, one cannot rule out that some fine roots were lost during collection. On the opposite, collecting root systems from rhizobox was fast and easy, as the roots were physically separated from compost by a nylon membrane. Because of the difficulty of measuring reliable root weight in pots, further analyses were only performed on rosettes, assuming that any changes in water and mineral content in leaves may be related to defect in root function. The rosette water content was quite similar in plants from the two culture systems (Fig. 1c). The analysis of the leaf nutritional status revealed a slight increase in C content for plants in rhizobox but the difference in C/N ratio was not significant. Moreover, the P and K content analysis did not reveal any important modifications between the two culture systems. Therefore no major change was observed for these main components of the dry matter. Concerning the other macro and micro-nutrients investigated, smaller contents were measured for plants grown in rhizobox with the most striking differences for Ca, Mn and B, while differences detected for Mg and S were smaller (Fig. 1c). An enrichment of both soluble (mainly glucose and fructose) and insoluble (starch) sugar contents was detected in rhizobox-grown plants (Fig.1c). This last trait is usually associated to mineral deficiency in plants (7), which was not detected through our analyses. Altogether, the measured parameters indicated that none of the plants grown in rhizobox exhibited nutrient deficiency, suggesting that the root system was fully functional in those plants. The differences observed between the two culture systems could be explained in part by a physical constraint applied on roots growing in rhizobox. In addition, these changes may be associated with modifications of the composition of the microbial community colonizing the rhizosphere and the inside of the roots, considering the pivotal role of microorganisms in plant growth, systemic resistance, and in carbon sequestration (8-10).

For the first time to our knowledge, the root microbiome was assessed in rhizobox-grown plants in comparison with classical pot culture using a meta-barcoded pyrosequencing approach. The sampling techniques and the different fractions collected from roots of pot-grown plants were as described (11). The different steps allowing the collection of fractions [A] (compost), [C] (rhizosphere), [D] (rhizoplane) and [E] (endosphere) are presented in Supporting Fig. S1 and correspond to those described by (11). The fractionation method is based on successive washing and shaking steps of the roots. In the case of roots of rhizobox-grown plants, an extra fraction [B] was collected, resulting from the washing of the nylon membrane.

The relative abundances of bacteria in the root-associated fractions from the two culture systems were estimated using a qPCR approach targeting the 16S rRNA genes, 40 days after *A. thaliana* planting (See “Detailed experimental procedure” and Fig. S2). The results demonstrate bacterial colonization of the rhizosphere and endosphere in rhizobox culture system despite the initial physical separation of the roots from the substrate. This may indicate that a significant part of compost bacterial cells was able to pass through the nylon membrane towards the roots by passive transport or in response to chemotactic gradients. The higher abundance recorded in fractions C and D of rhizobox-grown plants (Fig S2) may be due to a more efficient bacteria collection from roots devoid of compost in rhizobox. In order to check whether the culture system could drive bacterial community differentiation at the root surface, the V3-V5 region of the 16S rRNA genes was pyrosequenced from all five biological replicates of each fraction [A, (B), C, D, E] collected from pot- and rhizobox-grown plants. A total of 214 088 high-quality sequences were obtained and clustered using more than 95% sequence identity into bacterial genus operational taxonomic units (OTUs). An unconstrained principal coordinate analysis from Bray-Curtis distance matrix was performed to investigate the overall variations among root-associated fractions (Fig. 2a). Reproducible measurements revealed that the *A. thaliana* plant roots from each culture system supported a distinctive bacterial community

recruited from the same reservoir of microorganisms present in the compost. Moreover, the data nicely fit previous observations showing a progressive differentiation of the rhizosphere and inside root bacterial assemblages from the surrounding compost microbial community (3, 12), indicating that the proximity to the root is a source of variation in root microbiome in both culture systems.

The complexity of the bacterial communities in the different root-associated fractions was also investigated by measures of within-sample diversity (α -diversity). The median α -diversity was higher in the fractions [A] corresponding to compost than in the fractions [C, D, E] for both culture systems (Fig 2b). The α -diversity suggested an enrichment of a subset of bacterial genera in the rhizoplastic and endophytic fractions in rhizobox-grown plants, in agreement with the movement of a subset of bacterial genera to the plant roots. No diversity gradient, depending on the distance from the root (fractions [C] to [E]), was observed in the two culture systems. In rhizobox the membrane clearly delimitates the compost from the roots with the different index values for B closer to fraction A (compost) than to fractions associated to roots (C-E). Discrepancies in the Evenness index were observed in the fractions [C, D] from rhizobox. Interestingly, all the indices revealed a significant reduction of the bacterial richness and diversity in fractions [C, D, E] from plants grown in rhizoboxes compared to plants in pots. In the compost (fraction [A]), the median α -diversity was also lower in rhizoboxes than in pots. The compost microbial community in rhizoboxes may be affected differently than in pots because the roots tend to occupy a larger surface of soil in rhizobox. Root activity is known to influence the soil solution chemistry, and its pH in particular, that is recognized as a main driver of rhizosphere processes (10, 13, 14). This is supported by a reduced Ca uptake by roots in rhizoboxes (Fig 1c), which may be the consequence of lesser exchangeable calcium in the proximity of the roots.

Taxonomic assignation of the OTU revealed the dominance of two major phyla: *Proteobacteria*

and *Bacteroidetes* in all fractions from both culture systems, with both phyla representing at least 80% of the total sequences assigned (Figure S3 and Table S1). These two dominant phyla were also largely detected in the *A. thaliana* roots sampled in soil (3, 12). This suggests the recruitment of similar bacterial groups despite the different starting inoculums and culture systems between the studies. However, one major difference in the very low abundance of *Acidobacteria* (less than 1%) in all fractions of this study, compared to fractions collected from plants grown in soil (3, 12). This may be related to the fact that *Acidobacteria* are found in natural soils poor in organic compound (15), when plants in this study were grown on compost enriched with mineral nutrients. Interestingly, both rhizosphere and rhizoplane (fractions [C, D]) and, to a lesser extent, endosphere (E) displayed a higher abundance of *Actinobacteria* in rhizobox-grown plants compared to pot. However, there were only differences in the relative abundance and note the overall phylum composition of the fractions between the two culture systems.

Nevertheless, differences in the relative abundance of the bacterial genera detected were noted between the two plant culture systems (Fig. 3, Table S2). However, only the relative abundance of the genus *Rhodococcus* clearly discriminated the root microbiome from the two plant growth systems. Further work should investigate the potential role of these microorganisms in the rhizosphere and inside the roots of plants grown in rhizobox, as some *Rhodococcus* strain was shown to exhibit plant growth promoting activities (16). Whereas both rhizosphere and rhizoplane (fractions [C, D]) were dominated by the genera *Rhizobium*, *Flexibacter* and *Chitinophaga* in the pot-grown plants, *Rhodococcus*, *Rhizobium*, *Dyella*, *Chitinophaga*, *Asticcacaulis* and *Holospira* were the main genera in rhizobox-grown plants. Altogether, the results showed that these root surface-inhabiting bacterial communities define the composition of the microbiome inside the root (fraction [E]) in the two culture system, in addition to being significantly discriminated from the surrounding compost (i.e. fraction [A]), as previously

reported in the literature (3, 12). However, recent studies have pointed the difficulty of separating bacterial populations from rhizoplane and endosphere. Harsh treatments such as repeated sonication or sodium hypochlorite are necessary to separate both populations (17) with the drawback of altering tissue integrity. Those techniques were not used here and may explain the absence of large difference between fractions D and E in both systems.

Finally, the differences observed in plant growth and in root microbiome between the two culture systems may be mostly attributed to the physical separation between plant roots and substrate in rhizoboxes. The first consequence of this design may result in a delay in the bacterial recruitment and biofilm formation at the root surface and thereafter, in the root-inside bacterial colonization, compared to plants cultured in pots. A second consequence is to keep the rhizosphere-recruited microorganisms at a distance from the other compost microorganisms (Fig. S3). All these temporal- and spatial-scale variations may shift plant-microorganism and, microorganism-microorganism interactions that are mostly achieved via chemical communications, and thus slow down the root microbiome activities (18, 19). Nevertheless, when the root microbiome is established, and taking the physiological data into account (Fig 1a and 1b), it seems reasonable to assume that the rhizobox is a suitable dynamic system representing what it is obtained in pot culture during the period from 12 to 26 days after *A. thaliana* planting in our experimental conditions. In prolonged experiments, the system may be mainly limited by the membrane clogging (i.e. the saturation of the pores with microbial cells and compost particles) and by a damaging change in compost chemistry solution. In addition, a physical constraint on roots cannot be excluded due to the confined space. Nevertheless, plants in rhizobox were able to achieve their reproductive cycle with the production of viable seeds. Altogether, our work highlights the effect of the culture system on the root microbiome assemblage, structure and functioning. This strongly reinforces the requirement of further multi-disciplinary investigations, as similar devices (e.g. rhizotubes) were used in research

programs (20). Using membrane with different pore size or/and various type of soils and/or nutrient solutions, such plant culture devices will help to disentangle the factors shaping a plant beneficial root microbiome, including analysis of root exudates, and to develop strategies to improve agriculture and food production.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. Cécile Vriet for comprehensive review of the manuscript. The results presented here were obtained through the EBI program “AAP”.

The authors are sincerely thankful for the scientific support and helpful discussions provided by S. Terrat and the GenoSol platform (INRA Dijon, France ; www2.dijon.inra.fr/plateforme_genosol/) for the development of the pyrosequencing and data analysis.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest

References

1. Van Der Heijden MGA, Bardgett RD, Van Straalen NM. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* 11:296-310.
2. Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud M-L, Touraine B, Moïgne-Loccoz Y, Muller D, Legendre L, Wisniewski-Dyé F, Prigent-Combaret C. 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci* 4.
3. Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppi K, Ver Loren van Themaat E, Ahmadinejad N, Assenza F, Rauf P, Huettel B, Reinhardt R, Schmelzer E, Peplies J, Gloeckner FO, Amann R, Eickhorst T, Schulze-Lefert P. 2012. Revealing structure and assembly cues for Arabidopsis root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature* 488:91-95.
4. Pieterse CMJ, de Jonge R, Berendsen RL. 2016. The Soil-Borne Supremacy. *Trends in Plant Science* 21:171-173.
5. Lemonnier P, Gaillard C, Veillet F, Verbeke J, Lemoine R, Coutos-Thévenot P, La Camera S. 2014. Expression of Arabidopsis sugar transport protein STP13 differentially affects glucose transport activity and basal resistance to Botrytis cinerea. *Plant Mol Biol* 85:473-484.

6. Durand M, Porcheron B, Hennion N, Maurousset L, Lemoine R, Pourtau N. 2016. Water Deficit Enhances C Export to the Roots in *Arabidopsis thaliana* Plants with Contribution of Sucrose Transporters in Both Shoot and Roots. *Plant Physiology* 170:1460-1479.
7. Hermans C, Hammond JP, White PJ, Verbruggen N. 2006. How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends Plant Sci* 11:610-7.
8. Gaiero JR, McCall CA, Thompson KA, Day NJ, Best AS, Dunfield KE. 2013. Inside the root microbiome: Bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American Journal of Botany* 100:1738-1750.
9. Mendes R, Garbeva P, Raaijmakers JM. 2013. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews* 37:634-663.
10. Philippot L, M Raaijmakers J, Lemanceau P, H van der Putten W. 2013. Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere, vol 11.
11. Barillot CC, Sarde C-O, Bert V, Tarnaud E, Cochet N. 2012. A standardized method for the sampling of rhizosphere and rhizoplan soil bacteria associated to a herbaceous root system. *Annals of Microbiology* 63:471-476.
12. Lundberg DS, Lebeis SL, Paredes SH, Yourstone S, Gehring J, Malfatti S, Tremblay J, Engelbrektsen A, Kunin V, Rio TGD, Edgar RC, Eickhorst T, Ley RE, Hugenholtz P, Tringe SG, Dangl JL. 2012. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature* 488:86-90.
13. Hinsinger P, Plassard C, Tang C, Jaillard B. 2003. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant and Soil* 248:43-59.
14. Blossfeld S, Schreiber CM, Liebsch G, Kuhn AJ, Hinsinger P. 2013. Quantitative imaging of rhizosphere pH and CO₂ dynamics with planar optodes. *Annals of Botany* 112:267-276.
15. Fierer N, Bradford MA, Jackson RB. 2007. TOWARD AN ECOLOGICAL CLASSIFICATION OF SOIL BACTERIA. *Ecology* 88:1354-1364.
16. Toussaint J-P, Pham TTM, Barriault D, Sylvestre M. 2012. Plant exudates promote PCB degradation by a rhodococcal rhizobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 95:1589-1603.
17. Richter-Heitmann T, Eickhorst T, Knauth S, Friedrich MW, Schmidt H. 2016. Evaluation of Strategies to Separate Root-Associated Microbial Communities: A Crucial Choice in Rhizobiome Research. *Frontiers in Microbiology* 7.
18. Bakker PAHM, Berendsen RL, Doornbos RF, Wintermans PCA, Pieterse CMJ. 2013. The rhizosphere revisited: root microbiomics. *Front Plant Sci* 4.
19. Venturi V, Keel C. Signaling in the Rhizosphere. *Trends in Plant Science* 21:187-198.
20. Jeudy C, Adrian M, Baussard C, Bernard C, Bernaud E, Bourion V, Busset H, Cabrera-Bosquet L, Cointault F, Han S, Lamboeuf M, Moreau D, Pivato B, Prudent M, Trouvelot S, Truong HN, Vernoud V, Voisin A-S, Wipf D, Salon C. 2016. RhizoTubes as a new tool for high throughput imaging of plant root development and architecture: test, comparison with pot grown plants and validation. *Plant Methods* 12:31.

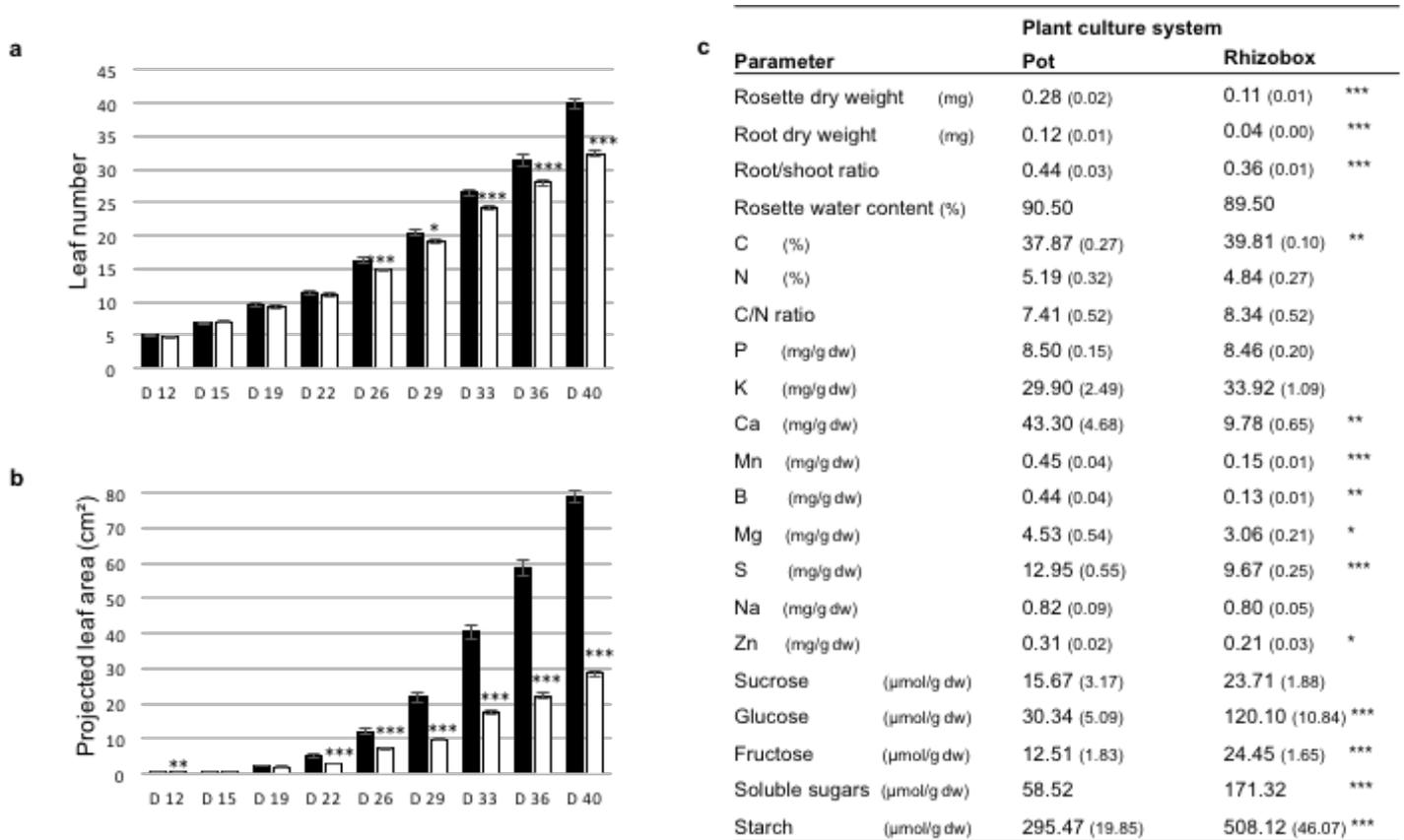


Figure 1. Arabidopsis plants display some distinctive growth parameters in the two culture systems.

Measurement of leaf number (a) and projected leaf area (b) were performed on plants cultivated in pot (black bars) and rhizobox (white bars), 18 plants for each condition, from 12 to 40 days, from photographs. In c, plant nutritional status. All measurements were performed at day 40. Rosette dry weight (n=9 plants), all elements (n=5 plants), soluble sugars (n=8 to 9 plants), starch (n=8 to 9 plants), protein (n=8 to 9 plants) and total chlorophyll (n=8 to 9 plants) were measured on whole rosette. Root dry weight (n=9 plants) and root/shoot ratio (n=11 plants) were measured on whole root systems. Water content was calculated as $([\text{fresh weight} - \text{dry weight}] / \text{fresh weight}) \times 100$. dw: dry weight. Data are mean and standard error of the mean (SEM). Asterisks represent significant differences from plants cultivated in pot as determined by two/t sample permutation test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$).

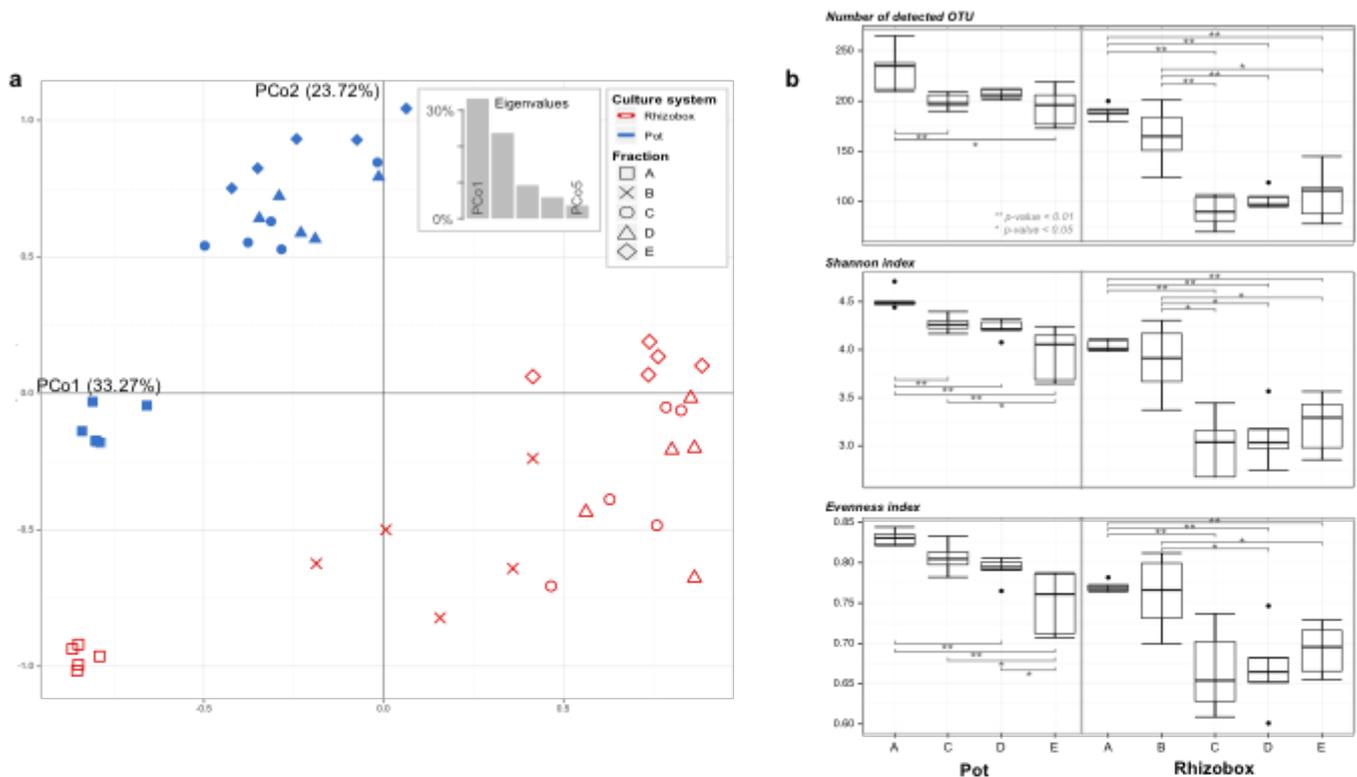


Figure 2. Arabidopsis plants display distinctive root microbiome in the two plant culture systems (40 days after planting).

a, Bacterial communities associated with the different fractions ($n=5$ plants) according to the distance from the root of *A. thaliana* grown in pot (full plots) and in rhizobox (empty plots) by principal coordinate analysis (PCoA), based on the Bray-Curtis distance matrix. Percentage of the diversity distribution explained by each axis is indicated on the figure. Bar plots are inserted in the figure. Each of the five replicates for each fraction, randomly collected from plants grown in pot or in rhizobox, clustered closely underscoring the reproducibility of the bacterial community structures and the robustness of the molecular characterization of each microbiome. The fractions [C, D, E] from rhizobox-grown plants were clearly separated from the corresponding fractions of plant grown in pot across the first two principal coordinates which explained 56.99% of the total variability, whereas the bacterial community structures from the two fractions [A] were more closely related. The root-associated microbiomes [C, D, E] were clearly separated from the compost fraction [A] for both culture systems. In plant grown in rhizobox, fraction [B] displayed an intermediate bacterial community structure between the fractions [A] and [C, D, E]. In **b**, Bacterial genus-OTU richness and diversity indices from the different fractions according to the culture system. The Tukey box was obtained from 5 biological replicates. Asterisks indicate a statistically significant difference ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; Kruskal-Wallis (not shown) and *post hoc* Wilcoxon tests).

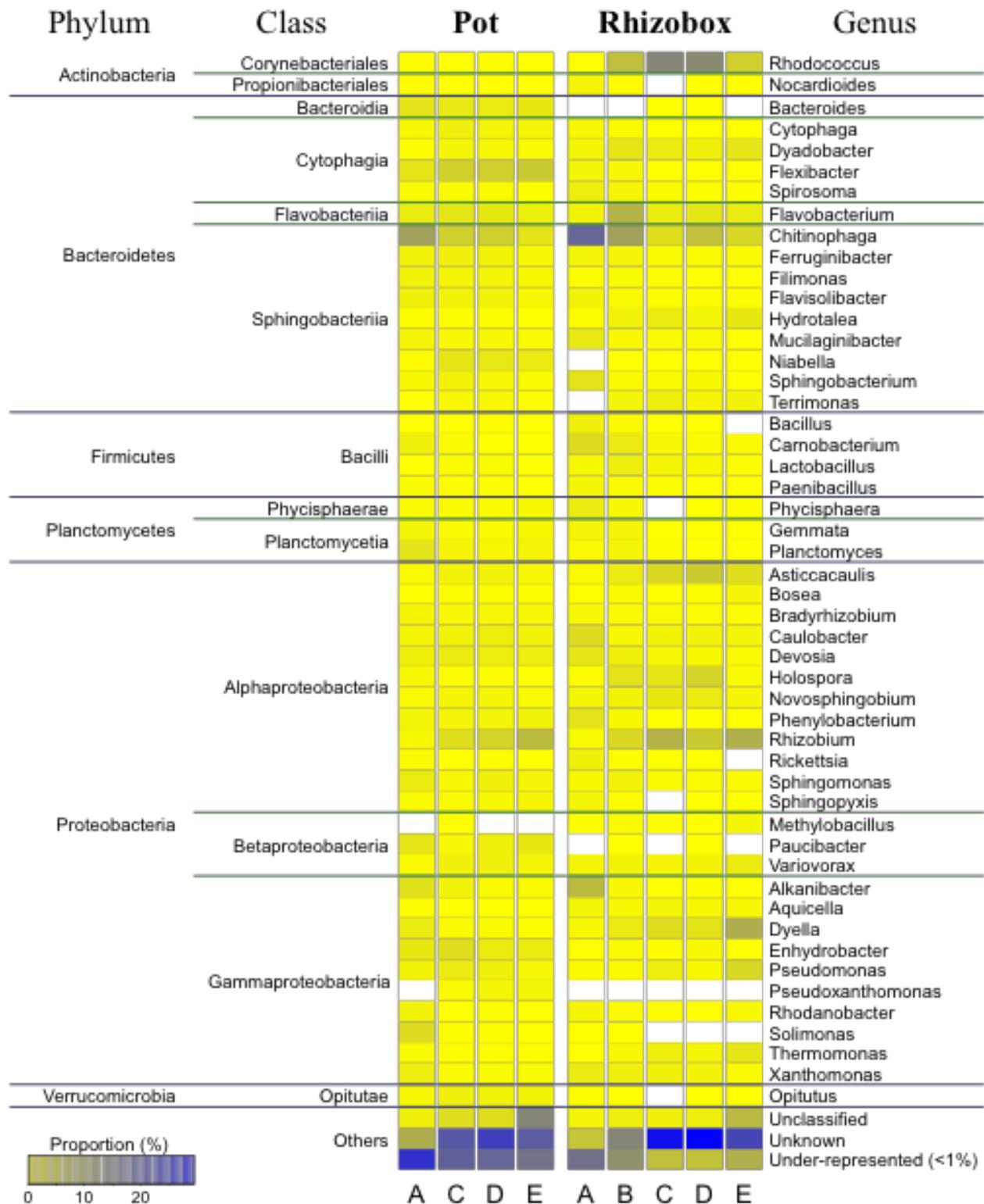


Figure 3. Heatmap comparison of bacterial genera according to the distance from the roots and the culture system. Only genera representing more than 1% of relative abundance from the total sequences list in at least one fraction were represented. When relative abundance of a genus was null, the corresponding space in the heatmap was left empty. For each fraction, the average relative abundance was obtained from the biological replicates (n=5 plants).

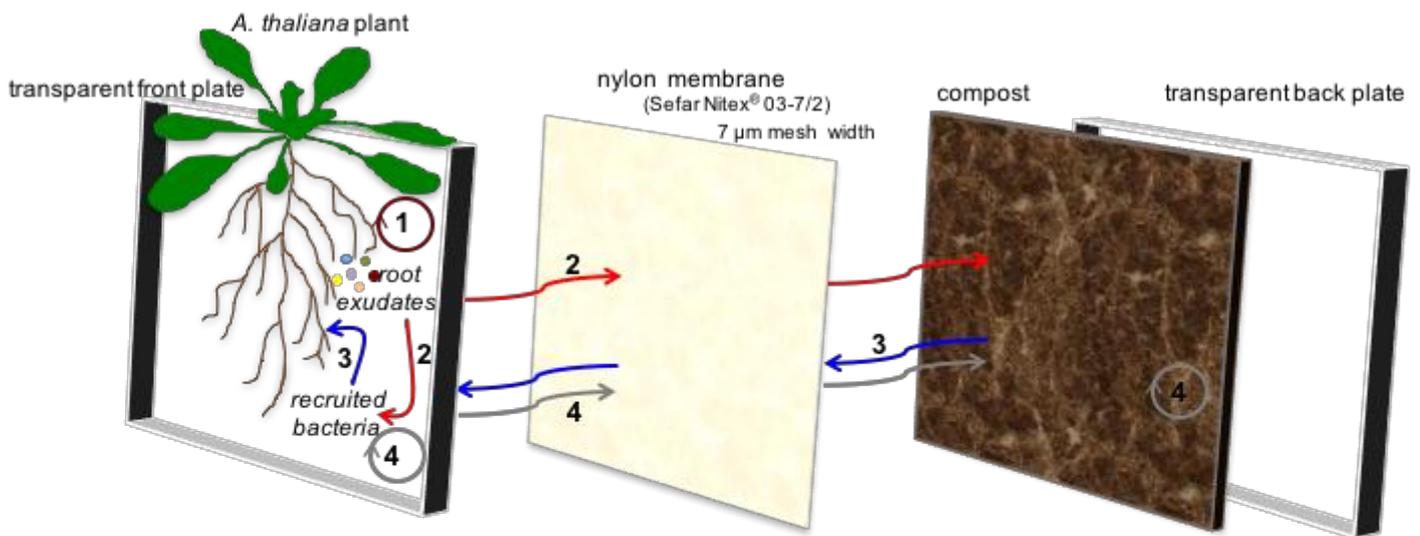


Figure 4. The rhizobox design may affect signaling in the rhizosphere and root microbiome activity. The four categories of interactions recognized to occur in the rhizosphere may be affected: (1) root-root interactions, (2) root to microorganism interactions through root exudates, (3) microorganism to plant interactions including long-distance interactions from bacteria in compost and short-distance interactions from recruited bacteria in the rhizosphere and, (4) microorganism to microorganism interactions that undergo intra- and inter-species signaling. The presence of a permeable membrane allows bacteria, nutrient and chemical compound exchanges and prevents roots from penetrating the compost.

Supporting Information

Influence of plant culture system: pot vs rhizobox, on the *Arabidopsis thaliana* growth and root microbiome

Laure Mignerot^{1,5}, Nils Hennion¹, Kévin Gravouil², Benoît Porcheron¹, Mickaël Durand^{1,6}, Laurence Maurousset¹, Yann Héchard³, Joanne Bertaux⁴, Thierry Ferreira², Nathalie Pourtau¹, Anne Mercier^{2,3} and Rémi Lemoine^{1*}

^{1,2,3,4}Ecologie et Biologie des Interactions, UMR 7267, CNRS Université de Poitiers, 86073 Poitiers, France ¹Team Sugar and Exchanges Plant – Environment, ²Cooperative Laboratory Thanaplast^{SP}-Carbios, ³Team Water Microbiology, ⁴Team Ecology, Evolution, Symbiosis, ⁵Present address: Algal Genetics Group, UMR 8227 Integrative Biology of Marine Models, Station biologique de Roscoff, CS 90074, 29688, Roscoff, France, ⁶Present address: INRA-AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR1318, ERL CNRS 3559, Saclay Plant Sciences, Route de Saint-Cyr, 78026 Versailles, France

*Corresponding author: remi.lemoine@univ-poitiers.fr

Supporting Information

Part 1: Detailed experimental procedure (3 pages)

Part 2: Additional information and results (3 pages, 3 figures)

Fig. S1. Schematic overview of the fractionation procedure

Fig. S2. The relative abundance of bacteria in the different fractions changes according to the plant culture system and the distance from the root

Fig. S3. The rhizobox design may affect signaling in the rhizosphere and root microbiome activity

Part 3: Additional data (3 pages)

Table S1: Relative abundance of the major bacterial phyla present in the fractions associated with the root system of *A. thaliana* grown in pot and in rhizobox

Table S2: Relative abundance of the major bacterial genera present in the fractions associated with the root system of *A. thaliana* grown in pot and in rhizobox

PART 1: DETAILED EXPERIMENTAL PROCEDURE

Plant material and growth condition

Arabidopsis thaliana (L.) Heynath ecotype Col-0 plants were cultivated in a 3 mm sieved organic compost (Peltracom Belgium, LP502, white peat and black peat, pH: 5.5-6, EC: 270-500 $\mu\text{S}/\text{cm}$).

The compost was autoclaved once (110 °C, 1.5 bar) to prevent pest development (preliminary experiments demonstrated the absence of effect of soil autoclaving on plant development) and rehydrated (150 mL of liquid per L of compost) with Peter's nutrient solution (20 N, 8.7 P, 16.6 K and micronutrients, Everris, France). Seeds were sown in a drop of nutrient agar medium (0.65% agar, Murashige and Skoog medium, M0232, Duchefa Biochemie) on the surface of either 9 cm diameter pots or rhizoboxes. The rhizoboxes were composed of two Plexiglas plates of 20 cm x 20 cm and spaced on both sides with 1 cm x 20 cm (width x length) bars, as previously described (Durand *et al.*, 2016). The root system was separated from compost by a nylon membrane with a 7 μm mesh width (Sefar Nitex[®] 03-7/2).

Plants in pots and rhizoboxes were placed in a phytotron, with 23 °C/18 °C, 10 h/14 h day/night at a 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ light intensity (PAR) at the plant level, and a 50%/70% day/night relative hygrometry. Throughout the experiment, the compost water content was maintained (watered 3 times a week), with the amount of missing water determined by weighing rhizoboxes and pots. Therefore, using similar features from the compost preparation to the plant growth conditions, the experiment was designed to limit the influence of parameters other than the plant culture system.

Plant tissue analysis

Leaf area and number, water content, biomass, and root/shoot ratio

The projected leaf area was determined with photographs of plants using the threshold color plugin from ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Leaf number was counted on the same photographs.

Root and rosette were harvested separately at day 40 after planting. Water content was determined in rosette and root as previously described (Durand *et al.*, 2016). Briefly, fresh weight was scored immediately after separation of root and rosette. Dry weight was scored after 24 h at 80 °C. Water content was then determined as [(fresh weight/dry weight)/fresh weight] x 100. Root/shoot ratio was defined as [root dry weight/rosette dry weight].

Rosettes were also used for element, soluble and insoluble sugars, proteins and chlorophyll measurements.

Element analysis

The concentration of the elements in 5 mg rosette samples was estimated by atomic absorption spectrometry and soluble anions extracted by water, using ion chromatography in a specialized laboratory (IC2MP at University of Poitiers).

Soluble sugars and starch measurements

Sucrose, Glucose and Fructose were extracted from approximately 10 mg of lyophilized tissue sample by three washings (1.5 mL and twice with 0.5 mL) in methanol:

chloroform:water (12:5:3, v/v/v). Supernatants containing soluble sugars were pooled, mixed with 0.6 volume of water, and centrifuged. The upper aqueous phase was collected and evaporated at 50 °C with a concentrator (MiVac Quattro; Genevac). Soluble sugars were resuspended in 500 µL of water and quantified using the Suc/Fru/D-Glc Assay Kit (Megazyme).

Starch content was measured from the pellet obtained after methanol: chloroform:water (12:5:3, v/v/v) washings using the Total Starch HK Assay Kit (Megazyme).

Proteins

Protein quantification was made on 25 mg of lyophilized tissue powder in 500 µL of buffer medium (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM DTT, 0.1 % Triton-X100). Then samples were centrifuged (10 min at 10 000 g, 4 °C) and absorbance was measured at 595 nm with Bradford's reagent.

Total Chlorophyll

Chlorophylls were extracted from 25 mg of lyophilized tissue powder in 15 mL acetone 80%. After centrifugation (10 min at 5 000 g), absorbance of the supernatant was measured at 645 nm, 652 nm and 663 nm. Chlorophylls content was calculated according to Arnon's formula (Arnon, 1949)

$$\text{Chlorophyll a (g l}^{-1}\text{)} = 0.0127 \times A_{663} - 0.00269 \times A_{645}$$

$$\text{Chlorophyll b (g l}^{-1}\text{)} = 0.0029 \times A_{663} - 0.00468 \times A_{645}$$

$$\text{Total Chlorophyll (g l}^{-1}\text{)} = 0.0202 \times A_{663} + 0.00802 \times A_{645}$$

Sample collection of root microbiome

At day 40 after planting, root microbiome was collected from five plant replicates grown in pot according to the procedure described by Barillot *et al.* (2012). Briefly, each plant replicate was removed from its pot and four fractions were separated out: compost (here named fraction [A]), rhizosphere compartment (fraction [C]), rhizoplane compartment (fraction [D]) and endosphere compartment (fraction [E]), as illustrated in the supporting Fig. S1. The fractionation method is based on successive washing and shaking steps of the roots. The flasks containing washing solutions were weighed before and after sampling to estimate the quantity (e.g. fresh weight) of each fraction collected.

For fraction [A], 500 mg of compost collected at distance from the roots were added to 50 mL of a sterile 0.9% NaCl solution. The roots were separated from the compost and the excess compost was manually shaken off the roots, paying attention to the root integrity and leaving approximately 1 mm of compost still attached to the roots (e.g. until root non-adhering compost particles were completely removed). Fraction [C] was afterwards collected by placing the roots into a sterile flask with 25 mL of sterile NaCl 0.9% solution and vigorously stirred for 10 s at 3 200g (Fig. S1, root wash 1). The roots were removed with sterile forceps and subjected to a second wash in order to detach the compost adhering to the root surface. Supernatants from the two washes were filtered on 860 µm sieve to eliminate remaining residuals in suspension. An additional wash step in NaCl 0.9% solution was performed as previously described, however the supernatants were discarded (Fig. S1, root wash 2).

For the collection of the fraction [D], roots removed with sterile forceps were subsequently washed in 25 mL of a sterile 0.9% NaCl solution containing Tween 80 (0.01% v/v) and vigorously stirred for 10 s at 3 200 g (Fig. S1, root wash 3). The roots were subjected to a second wash in order to collect tightly adhering microorganisms at the root surface.

Supernatants from the two washes were filtered on a 860 μm sieve.

Finally, 250 mg (fresh weight) of washed roots were stored as fraction [E] at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until DNA extraction.

The compost suspensions from fractions [A, C, D] were incubated on an orbital shaker (200 g, 20 min, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$) before centrifugation (3 200 g, 15 min, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Fractions were homogenized by pipetting into a 2 mL tube with NaCl 0.9% and centrifuging for 5 min at 12 000 g. The supernatants were discarded, leaving only the fraction behind.

Similarly, root-associated microbiome was collected from five plant replicates grown in rhizobox using the same fractionation procedure as applied for plant grown in pot, designating four fractions [A, C, D, E] linked to root distance (Fig. S1). Fraction [B] was obtained by placing the nylon membrane cut into small strips and transferred to a sterile flask with 50 mL of sterile NaCl 0.9% solution and by vigorous stirring for 10 s at 3 200 g (Fig. S1, membrane wash 1). The supernatant was discarded and the nylon membrane was subjected to a second wash with 50 mL of sterile NaCl 0.9% solution containing Tween 80 (0.01% v/v) in order to collect microorganisms tightly adhering to the membrane surface (Fig. S1, membrane wash 2).

All the fractions [A, (B), C, D, E] separated out plants from both plant culture experimental systems were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until DNA extraction.

DNA extraction from root-associated fractions

DNA extraction of the five biological replicates from the fractions [A, (B), C, D, E] separated out plants grown in pot and in rhizobox was performed using the same procedure based on the ISO 11063 (ISO 11063, 2010). Briefly, the samples were mixed with 1 mL of a solution containing 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; pH 8.0), 50 mM NaCl, and 2% (w/v) sodium dodecyl sulphate (SDS) in a bead-beater tube containing 0.5 (± 0.05) g of 106 μm diameter glass beads and four glass beads of 2 mm diameter (Sigma). The samples were then homogenized for 20 s at $5\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ with a bead beater (FastPrep Instrument, MP Biomedicals), incubated twice for 15 min at $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ and then centrifuged at 12 000 g for 10 min. The collected supernatants were incubated for 10 min on ice with 1/10 volume of 3 M potassium acetate (pH 5.5) and centrifuged at 14 000 g for 10 min. After precipitation with one volume of ice-cold isopropanol, the nucleic acids were washed with 70% ethanol. Aliquots (100 μL) of crude DNA extracts from the five biological replicates per fraction were purified from residual impurities using polyvinyl-polypyrrolidone (PVPP, Sigma–Aldrich) as previously described (Ranjard *et al.*, 2003; Plassard *et al.*, 2012; Terrat *et al.*, 2012, 2015). PVPP-columns were prepared by adding 110 mg of PVPP powder (particles $< 160\text{ }\mu\text{m}$) to Micro-Spin Chromatography columns (Bio-Rad) and 400 μL of H_2O prior to a centrifugation 2 min at 1 000 g. This procedure was repeated twice prior to crude DNA purification. The collected eluate was then subjected to a second purification step using the GeneClean Turbo kit, according to the manufacturer's instructions (QBiogene). The DNA extracts from the fractions [E] were incubated with RNase (Promega, France) at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min prior to the second purification step. Quality and size of the crude and purified extracted DNA were checked by electrophoresis in a 1% agarose gel run in 0.5X TAE (Tris/Acetate/EDTA) buffer and visualized by ethidium bromide staining (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). DNA quantifications were estimated with the BIO-1D image analysis software (Vilber Lourmat) using a standard curve of *Hind*III-digested λ DNA fragments (Promega). Aliquots of diluted DNA were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ready for molecular applications.

Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) analysis of 16S rRNA gene

Quantitative PCR assays targeting the 16S rRNA genes were carried out using a SYBR Green detection system in a LightCycler 1.5 instrument (Roche Applied Science). The 10 μ L reaction mixture contained 0.5 μ M of the 341F (5'-CCTACGGGAGGAGCAG-3') and 515R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGGCA-3') primers (Baker *et al.*, 2003) and 1X of LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} Sybr Green I mix (Roche Applied Science). Thermal cycling conditions were as follows: an initial activation cycle at 95 °C for 10 min and 35 cycles at 95 °C for 15 s; 60 °C for 10 s; 72 °C for 15 s. An additional 65 to 95 °C step (0.5 °C/s) was added to obtain a specific denaturation curve for each amplified sequence products. Standard curve was obtained with serial dilutions of a sample containing a 1 500 bp fragment of the 16S rRNA gene from *Pseudomonas aeruginosa* PA14 amplified using a 27F-1492R primers set (Baker *et al.*, 2003). No-template control was run for each qPCR assay, as an inter-run calibrator control sample to remove potential inter-run variations and avoid biased bacterial community comparisons from different runs. Moreover, all DNA were tested for the inhibitory effects of co-extracted substances prior to quantification runs by determining the 16S rRNA gene copy number in 10-fold dilutions of DNA. Two independent qPCR analyses were carried out for each biological replicate from each fraction [A, (B), C, D, E] for both plant culture systems. Bacterial qPCR data were normalized to account for the fresh weight of each sample.

Meta-barcoded pyrosequencing

Bacterial diversity was determined for each biological replicate from each fraction [A, (B), C, D, E] for both plant culture systems using 454 pyrosequencing of the V3-V5 region of the 16S rRNA ribosomal genes as described by Terrat *et al.* (2015). PCR were performed in triplicate in 50 μ L PCR with 0.5 μ M of F479 (5'-CAGCMGCYGCNGTAANAC-3') and R888 (5'-CCGYCAATTCMTTTRAGT-3') forward and reverse primers (Baker *et al.*, 2003), 1X PCR mix buffer with 200 μ M of each dNTP and 1U of Phusion Hot Start II high-fidelity DNA polymerase (Fisher Thermo Scientific). Each amplification was prepared from the same DNA input quantity in order to normalize the libraries and achieve even representation of each library in the pyrosequencing results. The PCR conditions were as follows: 98 °C for 1 min, 35 cycles of 30 s at 95 °C, 50 °C for 30 s and 72 °C for 1 min, followed by 5 min at 72 °C. No-template control was run for each PCR. Triplicate PCR products for each sample were pooled, purified using the MinElute gel extraction kit (Qiagen) and quantified using the Qubit® DNA HS Assay kit on a Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies). Purified PCR products were then specifically tagged in a second PCR of 9 cycles, conducted under similar conditions, using primers containing pyrosequencing adaptors and ten base pair multiplex identifiers (MIDs) added to the reverse primers at 5' position (Berry *et al.*, 2011, Terrat *et al.*, 2012). PCR products were purified using the PCR clean-up Kit according to the manufacturer's instructions (Macherey-Nagel) and quantified as previously described. The size and purity of the PCR products were checked using a MultiNA bioanalyzer (Shimadzu). Equimolar PCR products (1×10^9 molecules/ μ L) were pooled for a single sequencing reaction run. The Lib-L kit (Roche Applied Science) was used for emPCR and unidirectional sequencing of the amplicon library. Pyrosequencing runs were carried out in a GS 454 Sequencer (Roche Applied Science) according to the manufacturer's recommendations.

Bioinformatic analysis of pyrosequencing data

Pyrosequencing data were analyzed using the GnS-PIPE (version 1.1.13) pipeline described by Terrat *et al.* (2015). The parameters used for each bioinformatic step are summarized in the next table. Briefly, the raw reads were sorted according to MIDs. All reads with mismatches in the primer sequence and ambiguities in sequence, sequence length less than 350 bp and without presence of exact primer sequences were discarded. Rigorous dereplication (i.e. clustering of strictly identical sequences) was performed using a PERL program. The retained dereplicated reads were then aligned using INFERNAL alignment (Cole *et al.*, 2014).

Table. Bioinformatic parameters and databases used in the analysis of pyrosequencing data

	Step	Description	Parameter
GnS-PIPE (Terrat et al. 2015)	Pre-processing	Minimum length threshold	350
		Number of ambiguities tolerated	0
		Detection of proximal primer sequence	Complete and perfect
		Detection of distal primer sequence	Complete and perfect
	Random selection	Same high-quality reads for each sample	Yes
	Clustering	Chosen level of similarity	95%
		Ignoring differences in homopolymer lengths	Yes
	Filtering	Chosen clustering similarity threshold	95%
		Used taxonomic database	SILVA (r114)
		Chosen taxonomic level	Phylum
Taxonomy	Used taxonomic database	SILVA (r114)	
	Method or tool of comparison	USEARCH	
	Similarity or confidence threshold	80%	
Analysis	Diversity indices (computation)	Number of OTU, Shannon and Evenness	
R analysis	Post-processing	Principal Coordinate Analysis (PCoA) - vegan Heatmap - gplots	Bray-Curtis distance > 1% relative abundance

Operational taxonomic units (OTUs) were clustered with a 95% similarity cut-off at the genus level as recommended by the GnS-pipe pipeline to obtain reliable representation of bacterial communities through taxonomic classification of short 16S rRNA gene sequences, taking into account error rate from high throughput sequencing and also the variability of the 16S rRNA genes in bacterial genomes (Vetrovský and Baldrian, 2013). All the retained high-quality reads were taxonomically assigned against a curated database derived from SILVA r114 (Quast *et al.*, 2013) available from the GnS-PIPE. The 16S rRNA gene sequences of chloroplast were excluded. Also, during the analysis, all singletons corresponding to reads detected only once and not clustered (that might be artefacts such as PCR chimeras and large sequencing errors produced by the PCR and the pyrosequencing) were checked on the basis of the quality of their taxonomic assignments (Terrat *et al.*, 2015).

Sequence data were clustered from the five biological replicates per fraction. Normalization by random selection was carried out to obtain the same number of reads for each fraction and to avoid biased bacterial community comparisons.

All the taxonomy-based analysis using similarity approaches against SILVA r114 reference database obtained from the GnS-PIPE were then post-processed using R packages (R

Development Core Team, 2004). Bray-Curtis distances were calculated from the normalized OTU tables for each fraction to construct a dissimilarity matrix and Principal Coordinate Analysis (PCoA) was carried out with the Vegan package in R (Oksanen *et al.*, 2015). The complexity of the bacterial communities in the different root-associated fractions was also investigated by measures of within-sample diversity (α -diversity) including richness (number of genus-level OTUs), Shannon and Evenness indices using the defined OTU composition at the genus level. Finally, heatmap was built up from the relative abundance values of the most dominant bacterial genera across the samples (relative abundance > 1%) using gplots R package (Warnes *et al.*, 2015).

Statistical analysis

Data from qPCR, richness and diversity indices were analysed using non-parametric Kruskal-Wallis (significance assessed at the level of $p < 0.05$) and *post hoc* Wilcoxon tests. Data from physiological parameters were analysed using two/k sample permutation test. All statistical analyses were performed under R project (R Development Core Team, 2004).

Nucleotide sequence accession number

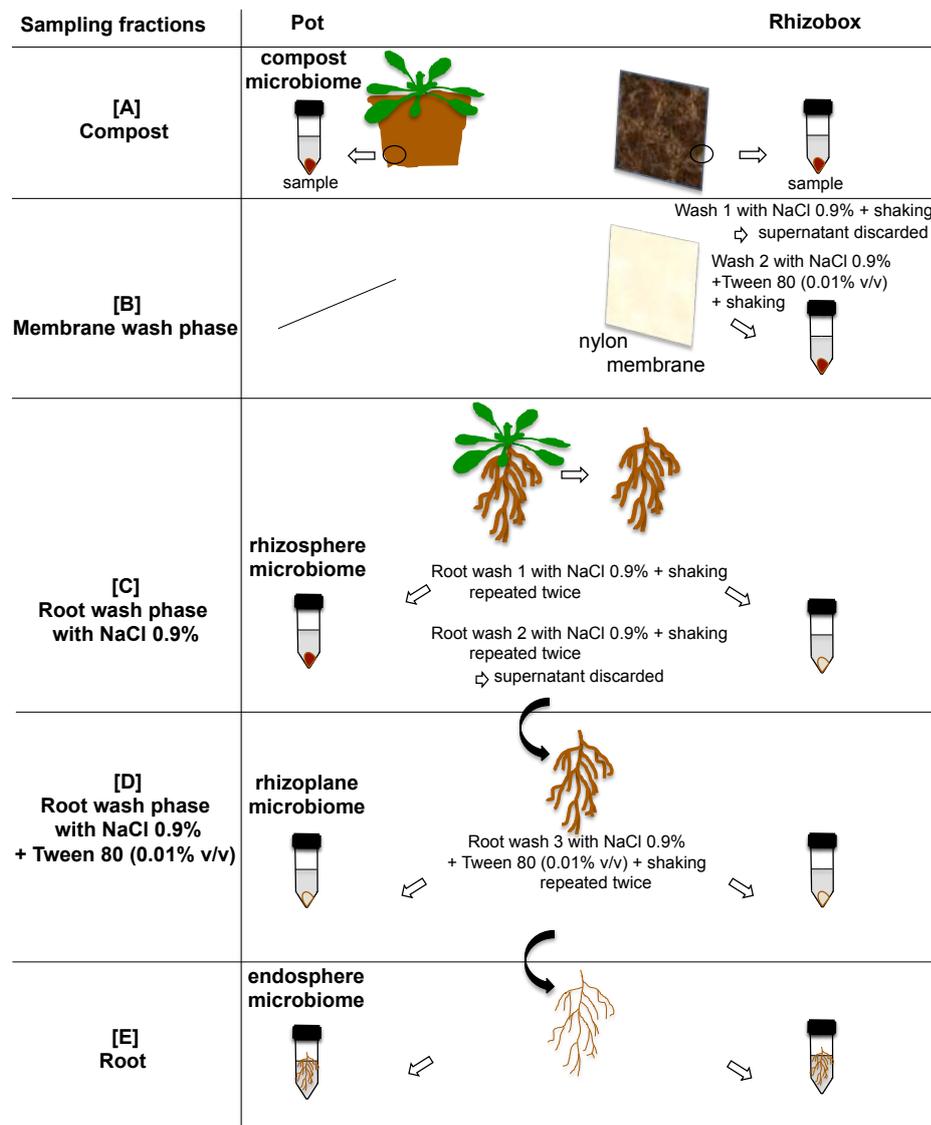
The dataset is available on the EBI database system in the Sequence- Read Archive (SRA), under study accession number PRJEB21668 (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB21668>)

References

- Arnon, D.I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta Vulgaris*. *Plant physiol* **24**: 1-15.
- Baker, G.C., Smith, J.J., and Cowan, D.A. (2003) Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods* **55**: 541e555.
- Barillot, C.D.C., Sarde, C.O., Bert, V. Tarnaud, E., and Cochet, N. (2012) A standardized method for the sampling of rhizosphere and rhizoplan soil bacteria associated to a herbaceous root system. *Ann Microbiol* **63**: 471-476.
- Berry, D., Ben Mahfoudh, K., Wagner, M., and Loy, A. (2011) Barcoded primers used in multiplex amplicon pyrosequencing bias amplification. *Appl Environ Microbiol* **77**: 7846-7849.
- Cole, J.R., Wang, Q., Fish, J.A, Chai, B., McGarrell, D.M., Sun, *et al.* (2014) The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* **37**: D141-D145.
- Durand, M., Porcheron, B., Hennion, N., Maurousset, L., Lemoine, R. and Pourtau, N. (2016) Water deficit enhances C export to the roots in *Arabidopsis thaliana* plants with contribution of sucrose transporters in both shoot and roots. *Plant Physiol* **170**: 1460-1479.
- ISO Standard method 11063. (2010) Soil quality - Method to directly extract DNA from soil samples. 20 p

- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., *et al.* (2013) vegan: community ecology package. R package version 2.3-470 0. <http://cran.r-project.org/packages=vegan> (Accessed 10 January 2017).
- Plassart, P., Terrat, S., Thomson, B., Griffiths, R., Dequiedt, S., Lelievre, M., *et al.* (2012) Evaluation of the ISO standard 11063 DNA extraction procedure for assessing soil microbial abundance and community structure. *PLoS One* **7**: e44279.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., *et al.* (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web based tools. *Nucleic Acids Res* **41**: D590-D596.
- Ranjard, L., Lejon, D.P.H., Mougél, C., Schehrer, L., Merdinoglu, D., and Chaussod, R. (2003) Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environ Microbiol* **5**: 1111-1120.
- R Development Core Team (2004) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; ISBN 3-900051-07-0, URL. <http://www.R-project.org> (Accessed 10 January 2017).
- Terrat, S., Christen, R., Dequiedt, S., Lelievre, M., Nowak, V., Regnier, T., *et al.* (2012) Molecular biomass and MetaTaxogenomic assessment of soil microbial communities as influenced by soil DNA extraction procedure. *Microb Biotechnol* **5**: 135-141.
- Terrat, S., Plassart, P., Bourgeois, E., Ferreira, S., Dequiedt, S., Adele-Dit-De-Renseville, N., *et al.* (2015) Meta-barcoded evaluation of the ISO standard 11063 DNA extraction procedure to characterize soil bacterial and fungal community diversity and composition. *Microb Biotechnol* **8**: 131-142.
- Vetrovský, T., and Baldrian, P. (2013) The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS One* **8**: e57923.
- Warnes, G.R., Bolker, B., Bonebakker, L., Gentleman, R., Huber, W., Liaw, A., *et al.* (2015). gplots: Various R programming tools for plotting data. R package version 2.16.0. <http://cran.r-project.org/package=gplots> (Accessed 10 January 2017).

PART 2: ADDITIONAL INFORMATION AND RESULTS

**Fig. S1. Schematic overview of the fractionation procedure**

Root-associated microbiomes of *A. thaliana* plants grown in pot and in rhizobox from the same compost soil and seedlings were separated in different fractions: rhizosphere (designated fraction [C]), rhizoplane (fraction [D]), and endosphere (fraction [E])

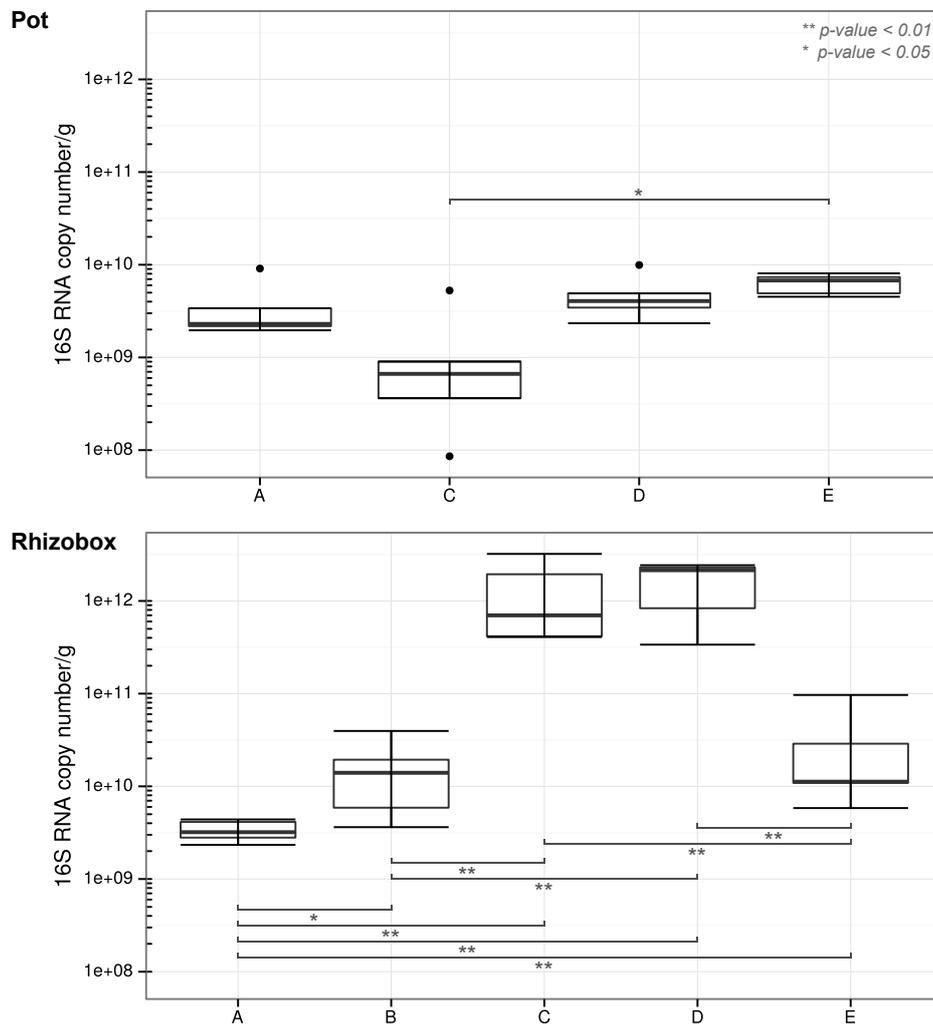


Fig. S2. The relative abundance of bacteria in the different fractions changes according to the plant culture system and the distance from the root

The variation of 16S rDNA copies/g of the different fractions was estimated by qPCR 40 days after *A. thaliana* planting.

For each fraction, the Tukey box was obtained from the biological replicates (n=5 plants). Box: Tukey box with median values (bold line), upper hinge of the box indicating 75th percentile of the data set, lower indicating 25th percentile and standard deviation (whiskers): maximum and minimum values. Black points: outliers values. Asterisks indicate a statistically significant difference (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; Kruskal-Wallis (not shown) and *post hoc* Wilcoxon tests).

For plant grown in pot, the medians of the bacterial 16S rRNA gene copy numbers per g of fraction ranged from 6.65×10^8 to 6.76×10^9 . Interestingly, for rhizobox, the medians of the bacterial 16S rRNA gene copy numbers per g of fraction ranged from 3.20×10^9 in fraction [A] to 6.99×10^{11} and 2.15×10^{12} in fraction [C] and [D] respectively.

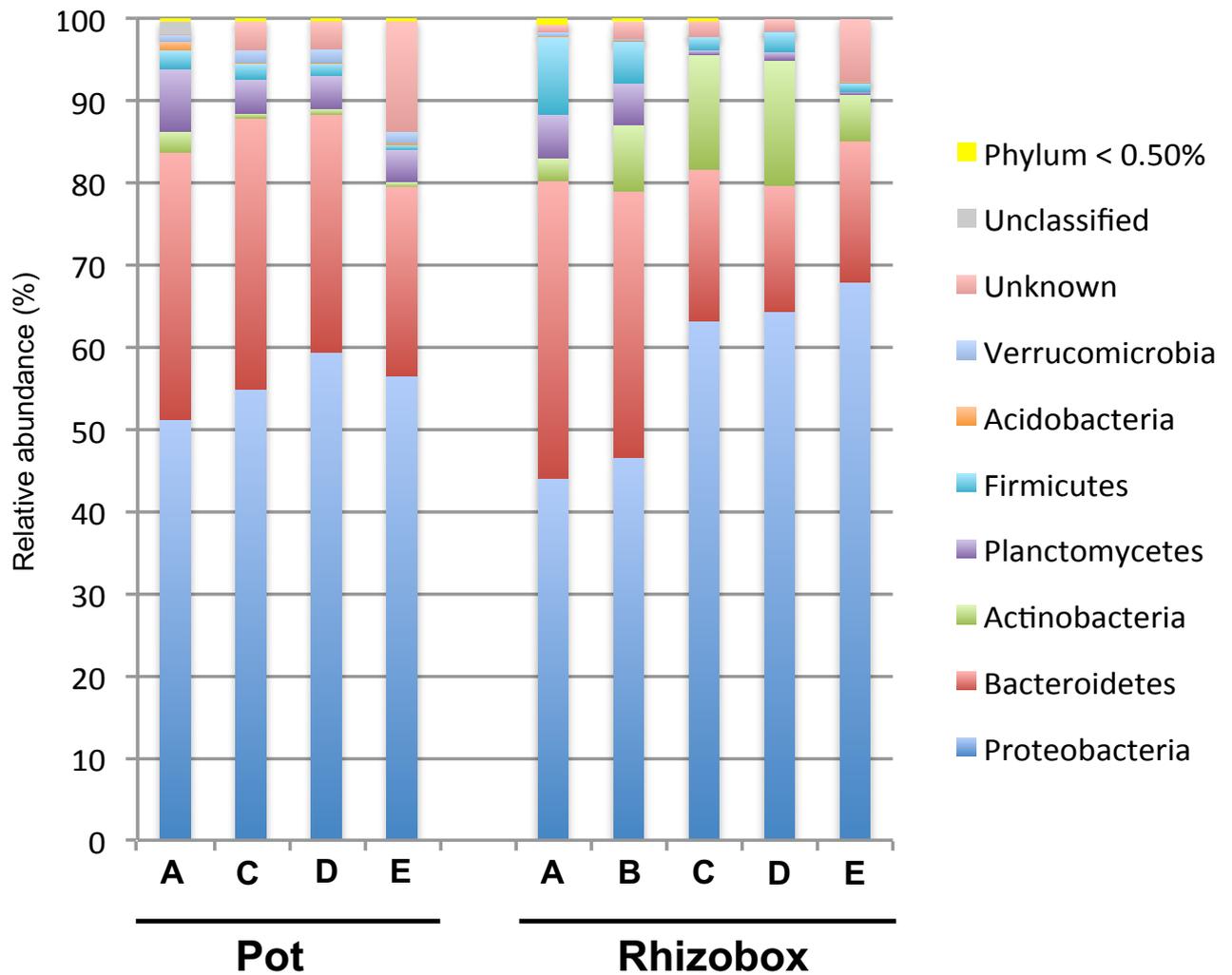


Fig. S3. Phylum composition of the bacterial community in the different fractions according to the distance from the roots of *A. thaliana* grown in pot and in Rhizobox. [A] compost, [B] Nylon membrane, [C] rhizosphere, [D] rhizoplane and [E] endosphere. Only phyla with a relative abundance more than 0.50% from the total sequences list in at least one fraction were represented (see Supporting Information Table S1). For each fraction, the average relative abundance was obtained from the biological replicates (n=5 plants).

PART 3: ADDITIONAL DATA

Table S1: Relative abundance (%) of the major bacterial phyla present in the fractions associated with the root system of *A. thaliana* grown in pot and in rhizobox.

Phylum presents at more than 0.05% relative abundance in at least one fraction are reported.

Fractions [A]: compost, [B]: membrane (only for rhizobox), [C]: rhizosphere, [D]: rhizoplane and [E]: endosphere (see supporting Fig. S1). Each value represents the mean and standard error of the mean (SEM).

Bacterial phylum	Relative abundance (%)									
	Pot					Rhizobox				
	A	C	D	E	A	B	C	D	E	
Acidobacteria	1.06 (0.12)	0.11 (0.05)	0.11 (0.05)	0.20 (0.04)	0.15 (0.08)	0.11 (0.05)	0.02 (0.02)	0.02 (0.02)	0.04 (0.02)	
Actinobacteria	2.57 (0.44)	0.59 (0.08)	0.68 (0.10)	0.63 (0.05)	2.68 (0.24)	8.09 (0.98)	13.98 (2.96)	15.23 (1.82)	5.74 (1.33)	
Armatimonadetes	0.06 (0.05)	0.07 (0.03)	0.15 (0.11)	0.04 (0.02)	0.02 (0.02)	0.04 (0.03)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.07 (0.05)	
Bacteroidetes	32.50 (2.47)	32.97 (1.90)	28.90 (2.08)	23.07 (3.04)	36.28 (0.70)	32.41 (2.99)	18.47 (1.37)	15.38 (2.38)	17.19 (1.92)	
Chlamydiae	0.11 (0.02)	0.06 (0.03)	0.02 (0.02)	0.00 (0.00)	0.02 (0.02)	0.09 (0.03)	0.11 (0.04)	0.02 (0.02)	0.02 (0.02)	
Chlorobi	0.02 (0.02)	0.22 (0.11)	0.00 (0.00)	0.04 (0.03)	0.09 (0.03)	0.17 (0.04)	0.04 (0.03)	0.07 (0.04)	0.04 (0.03)	
Cyanobacteria	0.00 (0.00)	0.07 (0.03)	0.00 (0.00)	0.04 (0.02)	0.00 (0.00)	0.02 (0.02)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	
Fibrobacteres	0.21 (0.03)	0.07 (0.03)	0.06 (0.02)	0.00 (0.00)	0.15 (0.06)	0.09 (0.03)	0.07 (0.03)	0.09 (0.06)	0.02 (0.02)	
Firmicutes	2.22 (0.26)	1.89 (0.55)	1.57 (0.42)	0.59 (0.05)	9.43 (0.28)	5.06 (0.49)	1.68 (0.23)	2.44 (0.39)	1.07 (0.35)	
Gemmatimonadetes	0.13 (0.07)	0.06 (0.02)	0.07 (0.03)	0.07 (0.03)	0.49 (0.13)	0.07 (0.03)	0.00 (0.00)	0.02 (0.02)	0.02 (0.02)	
Planctomycetes	7.62 (1.17)	4.15 (0.35)	4.02 (0.29)	3.92 (0.58)	5.31 (0.31)	5.07 (1.00)	0.49 (0.24)	0.97 (0.37)	0.31 (0.13)	
Proteobacteria	51.18 (1.31)	54.91 (1.87)	59.41 (2.15)	56.42 (2.68)	44.00 (0.74)	46.57 (1.91)	63.16 (2.37)	64.32 (1.64)	67.84 (2.30)	
Verrucomicrobia	0.86 (0.16)	1.55 (0.52)	1.59 (0.46)	1.36 (0.42)	0.49 (0.14)	0.20 (0.12)	0.00 (0.00)	0.04 (0.02)	0.20 (0.08)	
Unknown	0.06 (0.27)	3.26 (0.81)	3.38 (0.16)	13.58 (1.72)	0.79 (0.17)	1.94 (0.67)	1.98 (0.35)	1.41 (0.22)	7.44 (2.13)	
Unclassified	1.40 (0.02)	0.02 (0.02)	0.02 (0.02)	0.00 (0.00)	0.07 (0.04)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	
Phylum < 0.05%	0.00	0.00	0.02	0.04	0.04	0.06	0.00	0.00	0.00	

Table S2: Relative abundance (%) of the major bacterial genera present in the fractions associated with the root system of *A. thaliana* grown in pot and in rhizobox.

Genera present at more than 1.00% relative abundance in at least one fraction are reported. Each value represents the mean and standard error of the mean (SEM).

Bacterial genus	Relative abundance (%)									
	Pot					Rhizobox				
	A	C	D	E	A	B	C	D	E	
Alkanibacter	3.48 (0.85)	1.37 (0.38)	0.70 (0.23)	0.52 (0.24)	7.80 (0.91)	0.87 (0.40)	0.18 (0.08)	0.09 (0.06)	0.11 (0.03)	
Aquicella	0.26 (0.12)	0.15 (0.05)	0.11 (0.02)	0.04 (0.02)	1.14 (0.24)	0.83 (0.24)	0.99 (0.24)	1.08 (0.26)	0.66 (0.19)	
Asticcacaulis	0.45 (0.09)	1.30 (0.32)	1.31 (0.26)	0.97 (0.13)	0.34 (0.08)	2.38 (0.46)	5.85 (1.12)	4.31 (0.72)	3.96 (0.93)	
Bacillus	0.09 (0.04)	0.17 (0.07)	0.22 (0.08)	0.06 (0.02)	1.44 (0.21)	0.39 (0.11)	0.11 (0.09)	0.09 (0.03)	0.02 (0.02)	
Bacteroides	2.88 (0.82)	2.63 (0.23)	2.26 (0.30)	2.30 (0.49)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.02 (0.02)	0.02 (0.02)	0.00 (0.00)	
Bosea	0.07 (0.03)	0.19 (0.04)	0.15 (0.05)	0.22 (0.08)	0.13 (0.05)	0.22 (0.12)	0.16 (0.08)	0.15 (0.08)	0.90 (0.24)	
Bradyrhizobium	1.30 (0.23)	0.63 (0.15)	0.74 (0.12)	1.08 (0.15)	0.68 (0.12)	0.45 (0.12)	0.35 (0.05)	0.42 (0.12)	0.39 (0.15)	
Carnobacterium	1.30 (0.25)	0.31 (0.12)	0.15 (0.05)	0.09 (0.03)	4.31 (0.21)	1.94 (0.28)	0.60 (0.12)	0.95 (0.12)	0.72 (0.22)	
Caulobacter	1.03 (0.12)	1.35 (0.22)	1.76 (0.31)	1.47 (0.17)	3.92 (0.73)	0.85 (0.37)	1.46 (0.51)	1.26 (0.37)	1.31 (0.43)	
Chitinophaga	10.61 (1.47)	5.59 (0.77)	6.07 (0.73)	3.18 (0.64)	18.39 (0.50)	10.60 (2.01)	7.00 (1.23)	3.61 (0.99)	4.52 (1.53)	
Cytophaga	0.54 (0.13)	1.04 (0.19)	1.15 (0.10)	1.01 (0.35)	0.92 (0.18)	0.26 (0.10)	0.09 (0.04)	0.07 (0.03)	0.20 (0.08)	
Devosia	2.00 (0.22)	2.29 (0.28)	1.98 (0.18)	1.75 (0.26)	2.75 (0.27)	1.78 (0.42)	0.53 (0.12)	0.75 (0.11)	0.29 (0.13)	
Dyadobacter	0.24 (0.02)	1.02 (0.28)	1.02 (0.22)	0.37 (0.08)	1.30 (0.28)	2.52 (0.43)	1.89 (0.28)	2.27 (0.39)	2.83 (0.55)	
Dyella	2.44 (0.78)	0.28 (0.05)	0.41 (0.12)	0.15 (0.10)	0.71 (0.10)	2.24 (0.58)	3.24 (1.11)	3.80 (1.39)	9.00 (3.02)	
Enhydrobacter	2.29 (0.47)	3.55 (0.60)	2.29 (0.29)	2.21 (0.37)	0.13 (0.06)	0.46 (0.11)	0.64 (0.16)	0.20 (0.06)	0.16 (0.10)	
Ferruginibacter	1.38 (0.18)	1.67 (0.31)	1.18 (0.29)	0.70 (0.14)	0.98 (0.12)	0.93 (0.17)	0.40 (0.16)	0.28 (0.15)	0.35 (0.20)	
Filimonas	1.68 (0.56)	1.11 (0.08)	0.94 (0.18)	0.63 (0.15)	0.28 (0.08)	0.41 (0.11)	0.00 (0.00)	0.18 (0.08)	0.09 (0.07)	
Flavisolibacter	1.57 (0.24)	1.39 (0.12)	1.09 (0.12)	0.91 (0.16)	1.29 (0.29)	0.48 (0.17)	0.18 (0.14)	0.24 (0.13)	0.24 (0.08)	
Flavobacterium	1.83 (0.33)	2.78 (0.38)	2.00 (0.41)	2.08 (0.50)	1.27 (0.47)	8.82 (2.93)	2.56 (1.05)	1.96 (0.27)	2.30 (0.60)	
Flexibacter	3.61 (0.42)	5.83 (0.83)	5.44 (0.68)	6.44 (1.32)	0.96 (0.09)	0.83 (0.25)	0.09 (0.06)	0.07 (0.02)	0.04 (0.02)	
Gemmata	1.32 (0.27)	0.35 (0.05)	0.54 (0.12)	0.63 (0.07)	1.00 (0.15)	0.94 (0.09)	0.04 (0.02)	0.04 (0.02)	0.09 (0.05)	
Holospora	0.63 (0.11)	0.20 (0.10)	0.22 (0.09)	0.11 (0.04)	0.15 (0.08)	2.98 (0.50)	5.15 (1.77)	2.86 (0.93)	0.33 (0.09)	
Hydrotalea	0.24 (0.08)	0.24 (0.09)	0.30 (0.10)	0.04 (0.02)	0.15 (0.05)	1.41 (0.18)	1.08 (0.37)	1.96 (0.93)	2.58 (0.90)	
Inhella	0.00 (0.00)	0.67 (0.30)	0.80 (0.35)	1.20 (0.46)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	
Lactobacillus	0.04 (0.03)	0.35 (0.28)	0.39 (0.22)	0.04 (0.03)	0.98 (0.12)	1.82 (0.25)	0.68 (0.15)	0.88 (0.24)	0.17 (0.09)	

Table S2: end

Bacterial genus	Relative abundance (%)									
	Pot					Rhizobox				
	A	C	D	E	A	B	C	D	E	
Mesorhizobium	0.95 (0.28)	0.17 (0.07)	0.26 (0.03)	0.20 (0.07)	0.07 (0.03)	0.09 (0.05)	0.02 (0.02)	0.04 (0.02)	0.07 (0.04)	
Methylobacillus	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.24 (0.08)	0.69 (0.17)	0.18 (0.03)	0.29 (0.14)	0.86 (0.19)	
Mucilaginibacter	0.65 (0.20)	0.91 (0.08)	0.57 (0.12)	0.35 (0.08)	2.64 (0.31)	0.50 (0.16)	0.42 (0.20)	0.33 (0.13)	0.18 (0.09)	
Niabella	0.24 (0.06)	2.66 (0.47)	2.50 (0.75)	2.08 (0.41)	0.00 (0.00)	0.02 (0.02)	0.02 (0.02)	0.11 (0.11)	0.04 (0.03)	
Nocardioides	0.22 (0.06)	0.09 (0.07)	0.02 (0.02)	0.11 (0.04)	1.05 (0.10)	0.19 (0.07)	0.00 (0.00)	0.04 (0.02)	0.06 (0.03)	
Novosphingobium	0.28 (0.08)	1.00 (0.30)	0.91 (0.22)	0.76 (0.20)	1.20 (0.16)	1.29 (0.37)	2.34 (0.25)	2.57 (0.33)	0.81 (0.16)	
Opitutus	0.58 (0.15)	1.39 (0.42)	1.46 (0.43)	1.25 (0.45)	0.30 (0.12)	0.02 (0.02)	0.00 (0.00)	0.02 (0.02)	0.15 (0.06)	
Paenibacillus	0.47 (0.07)	0.20 (0.04)	0.30 (0.09)	0.15 (0.03)	1.16 (0.19)	0.28 (0.12)	0.09 (0.06)	0.29 (0.12)	0.05 (0.03)	
Paucibacter	2.68 (0.84)	1.13 (0.18)	1.61 (0.34)	2.18 (0.51)	0.00 (0.00)	0.02 (0.02)	0.00 (0.00)	0.02 (0.03)	0.00 (0.00)	
Phenylobacterium	1.10 (0.11)	1.00 (0.13)	1.22 (0.09)	1.62 (0.22)	2.85 (0.49)	0.68 (0.16)	0.13 (0.04)	0.13 (0.08)	0.13 (0.03)	
Phycisphaera	0.48 (0.16)	0.57 (0.09)	0.44 (0.16)	0.54 (0.15)	2.38 (0.29)	0.97 (0.30)	0.00 (0.00)	0.06 (0.03)	0.00 (0.04)	
Planctomyces	3.39 (0.75)	1.37 (0.18)	0.83 (0.08)	0.91 (0.14)	0.49 (0.14)	0.78 (0.19)	0.11 (0.05)	0.20 (0.11)	0.02 (0.02)	
Pseudomonas	0.88 (0.33)	2.19 (0.49)	1.66 (0.34)	0.56 (0.17)	0.17 (0.05)	0.41 (0.15)	0.68 (0.22)	1.89 (0.64)	4.49 (1.47)	
Pseudoxanthomonas	0.00 (0.00)	0.54 (0.12)	0.94 (0.26)	1.37 (0.41)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	
Rhizobium	0.77 (0.15)	4.24 (1.00)	4.85 (0.80)	7.70 (2.31)	0.49 (0.12)	4.94 (1.35)	5.97 (1.91)	9.50 (3.90)	8.40 (1.40)	
Rhodanobacter	1.03 (0.20)	0.17 (0.07)	0.19 (0.08)	0.17 (0.04)	0.90 (0.27)	0.28 (0.07)	0.15 (0.08)	0.17 (0.08)	0.55 (0.18)	
Rhodococcus	0.35 (0.13)	0.09 (0.04)	0.15 (0.06)	0.15 (0.06)	0.21 (0.04)	7.32 (1.06)	13.87 (2.93)	15.06 (1.85)	5.47 (1.41)	
Rickettsia	0.22 (0.07)	0.09 (0.06)	0.15 (0.09)	0.02 (0.02)	1.44 (0.16)	0.20 (0.05)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	
Solimonas	4.27 (1.57)	0.33 (0.15)	0.13 (0.05)	0.04 (0.02)	0.00 (0.00)	0.04 (0.03)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	
Sphingobacterium	0.62 (0.12)	1.57 (0.13)	0.59 (0.15)	0.43 (0.12)	2.94 (0.35)	0.41 (0.12)	0.73 (0.06)	0.31 (0.14)	0.13 (0.06)	
Sphingomonas	2.44 (0.49)	0.81 (0.18)	1.61 (0.19)	1.11 (0.16)	0.56 (0.10)	1.64 (0.37)	0.48 (0.10)	0.44 (0.13)	0.37 (0.06)	
Sphingopyxis	0.39 (0.13)	0.41 (0.05)	0.55 (0.15)	0.65 (0.08)	1.26 (0.08)	0.20 (0.10)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.02 (0.01)	
Spirosoma	0.41 (0.16)	0.37 (0.16)	0.35 (0.10)	0.20 (0.03)	1.80 (0.10)	0.91 (0.32)	0.18 (0.08)	0.26 (0.10)	0.20 (0.09)	
Terrimonas	0.13 (0.08)	0.50 (0.19)	0.41 (0.20)	0.32 (0.09)	0.02 (0.02)	1.01 (0.30)	1.08 (0.36)	1.76 (0.60)	1.54 (0.59)	
Thermomonas	0.24 (0.07)	0.39 (0.21)	0.33 (0.08)	0.30 (0.04)	0.02 (0.02)	0.94 (0.33)	1.21 (0.30)	1.94 (0.64)	3.22 (1.27)	
Variovorax	0.65 (0.09)	1.56 (0.31)	1.77 (0.31)	1.25 (0.40)	0.96 (0.14)	1.35 (0.12)	1.45 (0.43)	0.90 (0.32)	2.13 (0.44)	
Xanthomonas	1.88 (0.13)	0.46 (0.10)	0.48 (0.12)	0.22 (1.34)	2.53 (0.16)	1.59 (0.36)	1.26 (0.40)	1.61 (0.26)	0.44 (0.12)	
Unclassified	1.23 (0.25)	3.28 (0.82)	3.40 (0.17)	13.61 (1.72)	0.82 (0.16)	1.98 (0.67)	1.98 (0.36)	1.41 (0.23)	7.42 (2.13)	
Unknown	9.29 (0.57)	20.01 (2.45)	22.48 (1.30)	19.04 (1.20)	6.38 (0.23)	14.04 (3.78)	27.77 (8.21)	25.95 (7.46)	23.34 (3.40)	

Lignée attendue	gène ciblé	Fond génétique
<i>CRsuc1-suc2F</i>	<i>AtSUC1</i>	<i>suc2F</i>
<i>CRsuc5</i>	<i>AtSUC5</i>	Col-0
<i>suc1-CRsuc5</i>	<i>AtSUC5</i>	<i>suc1</i>
<i>sweet11-12-CR13</i>	<i>AtSWEET13</i>	<i>sweet11-12</i>
<i>sweet11-12-CR14</i>	<i>AtSWEET14</i>	<i>sweet11-12</i>
<i>sweet11-12-CR15</i>	<i>AtSWEET15</i>	<i>sweet11-12</i>
<i>sweet11-12-CR13-CR14</i>	<i>AtSWEET13 et 14</i>	<i>sweet11-12</i>
<i>sweet11-12-CR13-CR15</i>	<i>AtSWEET13 et 15</i>	<i>sweet11-12</i>
<i>sweet11-12-CR14-CR15</i>	<i>AtSWEET14 et 15</i>	<i>sweet11-12</i>
<i>sweet11-12-CR13-CR14-CR15</i>	<i>AtSWEET13, 14 et 15</i>	<i>sweet11-12</i>

Tableau S1. Récapitulatif des gènes ciblés et des fonds génétiques utilisés pour les transformations en vue d'obtenir les lignées attendues, grâce à la technique CRISPR/Cas9.

Annexe II : Obtention de mutants par la technique CRISPR/Cas9

Les transporteurs de saccharose retrouvés dans les feuilles et les racines d'*Arabidopsis thaliana* sont nombreux : 5 de type SUC (AtSUC1, 2, 3, 4 et 5) et 4 ou 5 de type SWEET (AtSWEET11, 12, 13 et 15 dans les feuilles et AtSWEET11, 12, 13, 14 et 15 dans les racines) suivant le compartiment (**Chapitres IV et V** ; Durand *et al.*, 2016). De plus, lors de l'étude des mutants pour un gène certains autres ont des expressions qui augmentent. Par exemple, lors de l'étude du mutant KO *suc1* (**Chapitre IV**) il a été observé que dans ces plantes l'expression du gène *AtSUC5* est supérieure à celle retrouvée dans les plantes sauvages. De même, les plantes mutées pour le gène *AtSWEET11* ne présentent pas de phénotype particulier mais le double mutant KO pour les gènes *AtSWEET11* et *AtSWEET12* (*sweet11-12*) présente un retard de développement (Chen *et al.*, 2012). Dans ce double mutant, l'expression du gène *AtSWEET13* est supérieure à celle retrouvée dans les plantes sauvages (résultats obtenus au laboratoire ; Chen *et al.*, 2012). Ceci indique donc des possibilités de complémentations fonctionnelles entre les transporteurs d'une même famille. De ce fait ; il est difficile de travailler sur le rôle d'un gène seul si d'autres prennent le relais. C'est pourquoi j'ai commencé à réaliser des mutants multiples pour ces transporteurs. La technique CRISPR/Cas9, un outil d'édition du génome récemment développé, a ouvert de nouvelles perspectives dans ce domaine. En effet, cette technique permet de cibler spécifiquement le locus désiré en introduisant des mutations ponctuelles. De plus, par cette technique le transgène nécessaire à l'induction de la mutation peut être éliminé par ségrégation au cours des générations suivantes, faisant de cet outil un outil plus précis et moins invasif que la mutagenèse par insertion d'ADN-T (Fauser *et al.*, 2014). Ces expérimentations ont été effectuées en parallèle des autres et n'ont pu malheureusement être terminées. L'avancement des différentes lignées sera présenté dans les paragraphes suivants. Les mutants obtenus par cette technique seront annotés avec « CR » précédant le nom du gène pour le préciser (par exemple le mutant *suc5* obtenu par la technique CRISPR/Cas9 sera nommé « CR*suc5* »). Les gènes ciblés et les fonds génétiques utilisés pour les transformations en vue d'obtenir les lignées attendues, grâce à la technique CRISPR/Cas9, sont présentés dans le **Tableau S1**.

4.1 Mutants CR*suc1-suc2F*

Les gènes *AtSUC1* et *AtSUC2* codent pour les transporteurs de saccharose les plus exprimés dans les racines ainsi que dans les feuilles (Durand *et al.*, 2016). Leurs séquences nucléotidiques sont proches et la séquence de l'ADNc d'*AtSUC1* peut remplacer celle d'*AtSUC2* quand elle est exprimée sous le promoteur d'*AtSUC2* (Wippel et Sauer, 2012). De plus, ces deux gènes sont régulés par la

Col-0 : Aagttgaattactttacttttttttaggtaaataaacttaatatgacttcaaaaaatagacattaataaaatttgtaaacttaattaattgatatt
gattaattcaaatacttagaacaattttaattctcatgtaaagatactgaccaaaaaatataactactaaaaaaggacgtccgttaaattat
aaccttaaatattcttgtaacaactaagtttagtcaactaaaaaaacaaaacaagaggagtaaatgacctactgccacgtctcctcacattgtcatgcac
tcacacaaatgagatttctaactggtctcttatctggaaaataatctcattcttcttctcctgcctataaatacaactccaatgtctcatctctacatcaca
aactaaatccccactttcacaacaaaaaactctttcttttctgtctgctgttttcttttcataATGGGAGCCTTGGGAAGCAGAAAGAGCCGCCA
ACAATG[X]CTACGGCGTTAGAGACACAGTCGTCACCGGAAGATCTCGGTCAACCATCTCCTCTGCGTAAGATCATCTCCG
CRsuc5.1 : ACAATGACTACGGCGTTAGAGACACAGTCGTCACCGGAAGATCTCGGTCAACCATCTCCTCTGCGTAAGATCATCTCCG
CRsuc5.2 : ACAATGACTACGGCGTTAGAGACACAGTCGTCACCGGAAGATCTCGGTCAACCATCTCCTCTGCGTAAGATCATCTCCG
CRsuc5.3 : ACAAT - CTACGGCGTTAGAGACACAGTCGTCACCGGAAGATCTCGGTCAACCATCTCCTCTGCGTAAGATCATCTCCG
CRsuc5.4 : ACAATG -----
Col-0 : TCGCTTCAATCGCCGCCGGTGTACAGTTCGGGTGGGCCTTACAGCTTCTCTTCTGACTCCTTACATACAACTCCTCGGGA
CRsuc5.4 : ----- GACTCCTTACATACAACTCCTCGGGA
Col-0 : TCCCTCACAAATGGTCGTCTTACATGTGGCTTGTGGTCCTATCTCCGGCATGATTGTTCAACCGATCGTCGGTTACCACA
GTGACCGATGCGAGTCCAGATTGCGTCGCCGTCGTCCTTTCATTGCCCGGAGTCGACTCGTAGCCGTCTCGGTTTTCC
TTATCGGATTCGCGGCGGATATGGGACATAGTTTTGGAGATAAACTCGAGAACAAGGTAAGGACTCGAGCCATTATAAT
CTTCTAACCGGGTTTTGGTTCCTCGACGTGGCTAACAACACCTTACAAGGACCATGCCGTGCTTCTTAGCCGATTTAGC
CGCCGGAGACGCTAAAAAACGCGAGTCGAAACGCGTGTTCCTTCTTTATGGCGGTTGGAAACGTTTTGGGTTACG
CTGCTGGATCTTACACTAACCTTACAAAATGTTTCCTTTCACAATGACAAAAGCTTGCACATCTATTGTGCGAATCTCAA
GACTTGTTCCTTCTTATCCATCACTCTCCTCTTATCGTCACATTCTCGTCTCTATGGTACGTTAAAGACAAACAATGGTCTC
CACCTCAAGGAGACAAGGAGGAGAAAACATCAAGTCTTTTTTTCTTGGAGAAATCTTGGAGCTGTTAGACACATGAAA
CGTCCCATGGTGATGCTTCTAATTGTCACGGTCATTAATTGGATCGCTTGGTTCCATTTATTTGTATGATACCGATTGGA
TGGGTCGTGAAGTGTACGGTGGAAACTCAGATGGAGATGAACGATCGAAGAACTTTACGACCAAGGAGTTCAGGCTG
GTGCATTGGGATTGATGTTAATTCTATACTTCTTGGTTTCGTGTCACCTGGTGTGAATCGATTGGTCGGAAAATGGGAG
GAGCTAAACGACTTTGGGGATGTGTGAATTCATACTCGCCATAGGTTTGGCCATGACGGTCTTGTACTAAATCGGCT
GAGCATACCGGGAAATCGCCGGTCTTTAGCCGGACCGAGCAGTGGTATTAAGCCGGAGTATTTAGTCTCTTTACCGT
TCTTGGTATCCCATTGGCCgtaagtacacttttgtttgtcctttgttttctttacaatttaggttgtaaccgattcttttctgtgtaattatgaca
gATTACTTACAGTATTCCATTTGCACTAGCGTCCATTTCTCAACCAATTCCGGTGCCGCCAAGgtaatttcattatttaaagt
taagtacaatctaattggtcagattctgataatgtaggacatattagcatttattgagttcaaactgttgattgaataattaattgaaaagattatggttcaat
ttgtgtattattgtatctatctattcaaaagtaattcttctttattgcataggagaaaaaggagtaaatatttctttgtaactttttcaagtctttctgtt
aatgtggattatctaccaagtttatctatagcatttaattaggtgagattattaacttaattatattaattaagatttctatgtaactgctcttatatttcattatc
cataggtttcatcattcatgcacctaattgttgaaacgtagacagtttctttgcaacataagtaaatatttaaattaacgaaaacgttttcttttacagGAC
TTTCATTAGGCGTTTTAAATATAGCGATTTGTATACCACAAATGATAGTATCATTCTCAAGTGGACCATTGGACGCTCAATT
CGGCGGTGGAAACCTACCTTCATTTGTGGTCGGAGCAATTGCCGCGCGGTTAGTGGAGTCTTAGCGTTAACCGTTTTAC
CTTACCGCTCCGGACGCACCAGCCATGTCAGGGGCTATGGGATTCCATTAGttaactagttttacatatatatgaatttccatcta
acagtattgttgcaaaagtgaacccccaaaaaatggataaagtgagaaaaataaaccttggctgctgtctttactgttcttttagtttttttttttactt
ttgtattgatgttagtcaattgttttctgtttgtttggacgttaataaattctgtgtttgact

Figure S1. Séquence nucléotidique du gène *AtSUC5*.

Les lettres en majuscule correspondent aux séquences des exons et les lettres en minuscule correspondent aux séquences des introns. Le site de coupure par l'enzyme Cas9 est symbolisé par « [X] ». La séquence des quatre lignées *CRsuc5* est alignée sur celle des plantes Col-0 autour de la zone de mutation.

carence hydrique de manière opposée (*AtSUC1* est surexprimé en cas des carence hydrique et *AtSUC2* réprimé, **Chapitre IV** ; Durand *et al.*, 2016). Enfin, les deux gènes *AtSUC1* et *AtSUC2* sont co-localisés dans les zones d'élongation des racines (**Chapitre IV et V**). Tous ces résultats peuvent suggérer une complémentation fonctionnelle potentielle des deux protéines. Il a donc été décidé de réaliser une mutation sur le gène *AtSUC1* sur un mutant *suc2*. Le mutant KO *suc2.2* présente un retard de développement très important et risque de compliquer l'obtention d'un double mutant. C'est pourquoi c'est la lignée *suc2F* qui a été utilisée. Cette lignée *suc2F* est un mutant *suc2* complémenté avec le gène *AtSUC2* sous le contrôle du promoteur *pCmGAS1* (Srivastava *et al.*, 2008). *AtSUC2* ne s'exprime donc que dans les fines nervures des feuilles dans ce mutant et permet de palier le fort retard de croissance des plantes mutantes pour le gène *AtSUC2*.

L'obtention des plasmides pour effectuer la transformation est initiée et doit être continuée afin de produire les souches bactériennes permettant la transformation des plantes *suc2F*.

4.2 Mutants *CRsuc5* et *suc1-CRsuc5*

Au cours de l'étude du mutant KO *suc1* (**Chapitre IV**), nous avons observé une expression plus importante du gène *AtSUC5* dans les plantes mutantes que dans les plantes sauvages. Il a donc été décidé d'obtenir le double mutant *suc1-suc5* afin de vérifier qu'il n'y avait pas de complémentation fonctionnelle par *AtSUC5* dans le mutant *suc1*. Une tentative d'obtention du double mutant *suc1-suc5* par croisement des simples mutants T-DNA avait donc été tentée mais la proximité spatiale des deux gènes sur le chromosome 1 rend quasi-impossible les évènements de recombinaison. Il a donc été choisi d'utiliser la technique CRISPR/Cas9 pour muter le gène *AtSUC5* dans le mutant *suc1*. Les clonages nécessaires pour la transformation des plantes ont donc été réalisés (**Chapitre II**), suivant le protocole et les plasmides (pEn-Chimera et pDe-Cas9) fournis par le laboratoire du Docteur Puchta (Botanisches Institut II, Karlsruhe, Allemagne). Nous avons ensuite réalisé les transformations sur des plantes de génotype Col-0 (afin d'avoir un simple mutant *CRsuc5* obtenu par CRISPR/Cas9) et sur plantes de génotype mutant KO *suc1* (pour obtenir le double mutant *suc1-suc5*). Nous avons ensuite réalisé la sélection des plantes transformées et obtenu différentes lignées.

Nous avons obtenu quatre lignées mutées pour le gène *AtSUC5* dans un fond génétique de génotype Col-0 (*CRsuc5*). Ces quatre lignées ont directement été obtenues en lignées homozygotes et la présence des mutations a été vérifiée par HRM (High Resolution Melting-curve) puis la nature de ces mutations a été vérifiée par séquençage. Sur ces lignées, deux lignées présentent une insertion d'un nucléotide au niveau du site de la coupure par le gène Cas9 (dans le premier exon, **Figure S1**), une lignée présente une délétion d'un nucléotide au même endroit et une quatrième lignée présente une délétion de 127 pb en aval du site de coupure. Toutes ces modifications entraînent l'induction d'un

A	Descendance théorique	SUC5/CRsuc5	
		25% SUC5/SUC5	25% CRsuc5/CRsuc5
		50% SUC5/CRsuc5	
B	Descendance observée pour la première lignée hétérozygote SUC5/CRsuc5	SUC5/CRsuc5	
		28,8% SUC5/SUC5	0% CRsuc5/CRsuc5
		71,2% SUC5/CRsuc5	
C	Descendance observée pour la seconde lignée hétérozygote SUC5/CRsuc5	SUC5/CRsuc5	
		32,6% SUC5/SUC5	0% CRsuc5/CRsuc5
		67,4% SUC5/CRsuc5	

Figure S2. Tableaux de croisement entre deux individus hétérozygotes.

A. Tableau théorique de croisement entre deux individus hétérozygotes d'après la génétique mendélienne. **B et C.** Tableaux de la descendance observée entre deux individus hétérozygotes SUC5/CRsuc5 pour deux lignées différentes.

codon stop rapidement. Ces quatre lignées sont donc utilisables pour étudier la mutation du gène *AtSUC5*, et ne possèdent pas d'ADN-T dans leur génome.

Nous avons aussi obtenu deux lignées mutées pour le gène *AtSUC5* dans un fond génétique de génotype mutant *suc1*. Ces deux lignées sont homozygotes mutées pour le gène *AtSUC1* (puisque le fond génétique est une lignée mutante *suc1* homozygote) et hétérozygotes pour le gène *AtSUC5*. Néanmoins, aucune lignée mutée pour le gène *AtSUC5* de manière homozygote n'a pu être obtenue dans la descendance de ces plantes, malgré un nombre important de descendants testés. La génétique mendélienne prédit que la descendance d'autofécondation d'une plante mutante hétérozygote pour un gène donné doit aboutir à l'obtention d'une descendance composée de 50 % d'hétérozygotes, 25 % d'individus homozygotes sauvages et 25 % d'individus homozygotes mutés (**Figure S2, A**). Environ 100 plantes issues des deux lignées ont été testées (par HRM) pour leur homozygotie pour *CRsuc5* et aucune ne présentait cette homozygotie. Les deux lignées testées (pour le gène *AtSUC5*) présentent (**Figure S2, B et C**) environ 30 % de descendance homozygote sauvage et 70 % d'hétérozygotes. Une hypothèse peut donc être que les graines de mutants homozygotes mutées ne peuvent pas germer. Une analyse du taux de germination a été réalisée sur 100 graines, après 8 jours de culture *in vitro* (MS ½). Les résultats montrent que 96 % des graines Col-0 germent, que 91 % des graines de simple mutant KO *suc1* (homozygotes) germent et que 92 % des graines issues de parents hétérozygotes pour *AtSUC5* (et homozygotes mutés pour *AtSUC1*) germent. Ceci indique donc que le biais observé dans les ratios de descendance de parents homozygotes n'est probablement pas dû à un problème lors de la germination des graines homozygotes mutées. Une seconde hypothèse est alors que l'absence de descendance homozygote mutée (*suc5*) vient d'un problème lors de la fécondation ou du développement de la graine aboutissant à l'absence de production de la graine double homozygote muté pour *AtSUC1* et *AtSUC5*. Cette hypothèse est plus difficile à vérifier expérimentalement mais le fait qu'*AtSUC1* soit impliqué la croissance du tube pollinique (Stadler *et al.*, 1999 ; Sivitz *et al.*, 2008) peut soutenir cette hypothèse. En effet, il a été montré que le mutant KO *suc1* présente une perturbation au niveau de la croissance du tube pollinique qui entraîne un plus faible taux de transmission des allèles mutés *suc1* à la descendance (Sivitz *et al.*, 2008). De plus, *AtSUC5* est particulièrement exprimé dans les graines en développement (Baud *et al.*, 2005) et les graines issues de l'homozygote muté *suc5* présentent un retard de développement dû à des problèmes de réserves de la graine (Pommerrenig *et al.*, 2013). L'absence des deux gènes chez le double mutant homozygote peut éventuellement créer des perturbations trop importantes au niveau de la graine, entraînant l'avortement des graines homozygotes mutées et donc l'impossibilité d'obtenir des mutants homozygotes sur les deux gènes.

4.3 Mutants *CRsweets*

Les transporteurs AtSWEET11 à 15 sont des transporteurs de saccharose exprimés dans la racine d'*Arabidopsis thaliana* dont l'expression augmente généralement en cas de déficit hydrique (**Chapitre IV** ; Durand *et al.*, 2016). Les simples mutants *sweet11* ou *sweet12* ne présentent pas de perturbation du développement mais le double mutant *sweet11-12* présente un retard de croissance (Chen *et al.*, 2012). De plus, ces gènes ont des séquences nucléotidiques proches et ont tous une fonction de transport du saccharose. Ainsi, la redondance de fonctionnement chez les AtSWEET pourrait engendrer une reprise du rôle des AtSWEET mutés par d'autres transporteurs de type SWEET. Par exemple, dans les plantes de lignées mutés *sweet11-12*, l'expression du gène *AtSWEET13* augmente comparé à des plantes sauvages (résultats obtenus au laboratoire ; Chen *et al.*, 2012). Nous souhaitons donc obtenir des mutants multiples pour ces transporteurs afin de pouvoir étudier leurs implications dans les racines, notamment en condition de déficit hydrique. C'est pourquoi l'obtention des triples mutants à partir du fond génétique double mutant *sweet11-12* est en cours. Nous souhaitons donc obtenir les triples mutants *sweet11-12-CR13*, *sweet11-12-CR14* et *sweet11-12-CR15* (ce dernier est déjà caractérisé par Chen *et al.*, 2015). Mais pour aller plus loin, l'obtention des quadruples et quintuples mutants est en cours (*sweet11-12-CR13-CR14*, *sweet11-12-CR13-CR15*, *sweet11-12-CR14-CR15* et *sweet11-12-CR13-CR14-CR15*). Les transformations pour les triples mutants ont été réalisées et les graines issues ont été sélectionnées avec l'herbicide. L'étape de vérification de la perte de l'ADN-T dans les plantes reste à réaliser ainsi que la sélection de plantes homozygotes mutées.

Pour les quadruples et le quintuple mutant, l'obtention des plasmides à insérer dans une souche d'*Agrobacterium* pour effectuer la transformation est en cours.

Les transporteurs de saccharose et la répartition du carbone chez *Arabidopsis thaliana* : rôle dans l'adaptation du système racinaire aux contraintes de l'environnement

L'objectif de cette thèse était d'élucider le rôle des transporteurs de saccharose dans les racines d'*Arabidopsis thaliana* pour mieux comprendre la répartition du carbone dans la plante entière.

Nous nous sommes focalisés sur l'étude des deux principaux transporteurs de saccharose exprimés dans les racines : AtSUC1 et AtSUC2. Une étude du mutant KO *suc1* et une étude des plantes greffées présentant la mutation KO du gène *AtSUC2* uniquement dans les racines (micro-greffe) ont été réalisées sur des plantes au stade adulte (30 à 32 jours après semis) cultivées en rhizobox. De plus, les localisations de l'expression des gènes et des protéines de ces transporteurs ont été réalisées dans les racines de plantes adultes pour la première fois. La localisation de l'expression d'*AtSUC1* dans les pointes racinaires, nous a permis de conclure sur un rôle potentiel d'AtSUC1 dans la répartition du saccharose dans les zones de croissance des racines et/ou un rôle dans la signalisation glucidique, probablement en lien avec l'acide abscissique. Les résultats montrent qu'AtSUC2 aurait un rôle dans le développement racinaire, certainement *via* le déchargement du saccharose du phloème dans les zones d'élongation des racines et dans le rechargement du phloème le long des racines (notamment dans les départs de racines latérales). De plus, AtSUC2 pourrait avoir un rôle dans l'augmentation locale d'hexoses liée à l'émergence des racines latérales. Enfin, nos résultats indiquent une contradiction entre la localisation de l'expression du gène *AtSUC2* retrouvée dans le parenchyme cortical et la localisation de la protéine qui n'est pas retrouvée dans ces cellules. Néanmoins les deux approches s'accordent sur la localisation dans les cellules compagnes.

Mots clefs : AtSUCs, saccharose, racines, transport, phloème

Sucrose transporters and carbon partitioning in *Arabidopsis thaliana*: role in root system adaptation to environmental constraints

The aim of this thesis was to elucidate the role of sucrose transporters in the roots of *Arabidopsis thaliana* to have a better comprehension of the carbon partitioning in the whole plant.

We focused on the study of the two main sucrose transporters expressed in the roots: AtSUC1 and AtSUC2. A study of the KO mutant *suc1* and a study on grafted plants with the KO mutation of the *AtSUC2* gene only in the roots (micro-graft) were carried out on adult plants (30 to 32 days after sowing) grown in rhizobox. In addition, the localization of the expression of the genes and proteins of transporters were carried out in the roots of adult plants for the first time. The localization of *AtSUC1* expression in the root tips allowed us to conclude on a potential role of AtSUC1 in sucrose distribution in root growth areas and/or a role in carbohydrate signalization, probably related to abscisic acid. The results also showed that AtSUC2 has a role in root development and certainly *via* sucrose phloem unloading in root elongation's areas and in the phloem reloading along the roots (especially in sites of emergence of lateral roots). In addition, AtSUC2 may have a role in the local increase of hexoses associated with the emergence of lateral roots. Finally, our results indicate a contradiction between the localization of the *AtSUC2* gene expression found in the cortical parenchyma and the localization of the protein that is not found in these cells. Nevertheless the two approaches agree on the localization in the companion cells.

Key words: AtSUCs, sucrose, roots, transport, phloem