



**HAL**  
open science

# Régulation du développement racinaire par la signalisation nitrate dépendante de NRT1.1 chez *Arabidopsis thaliana*: contrôle post-transcriptionnel de NRT1.1 et impact sur la distribution racinaire de l'auxine

Amel Maghiaoui

## ► To cite this version:

Amel Maghiaoui. Régulation du développement racinaire par la signalisation nitrate dépendante de NRT1.1 chez *Arabidopsis thaliana*: contrôle post-transcriptionnel de NRT1.1 et impact sur la distribution racinaire de l'auxine. Biologie végétale. Montpellier SupAgro, 2020. Français. NNT : 2020NSAM0031 . tel-04083565

**HAL Id: tel-04083565**

**<https://theses.hal.science/tel-04083565v1>**

Submitted on 27 Apr 2023

**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.

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE MONTPELLIER SUPAGRO

En Biologie, Interactions, Diversité Adaptative des Plantes (BIDAP)

École doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau  
Portée par l'Université de Montpellier

Unité de recherche Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes (B&PMP)

Régulation du développement racinaire par la  
signalisation nitrate dépendante de NRT1.1 chez  
*Arabidopsis thaliana* : Contrôle post-transcriptionnel de  
NRT1.1 et impact sur la distribution racinaire de l'auxine

Présentée par Amel Maghiaoui  
Le 17 Décembre 2020

Sous la direction de Alain Gojon  
et Liên BACH

Devant le jury composé de

Catherine CURIE, Directrice de Recherche, CNRS Montpellier  
Sophie FILLEUR, Maître de conférences, Université Paris 7 - Diderot  
Anne KRAPP, Directrice de Recherche, INRAE Versailles  
Laurent LAPLAZE, Directeur de Recherche, IRD Montpellier  
Laurent NUSSAUME, Directeur de Recherche, CEA Cadarache  
Alain GOJON, Directeur de Recherche, INRAE Montpellier  
Liên Bach, Maître de conférences, Université Montpellier

Présidente du Jury  
Rapporteuse  
Rapporteuse  
Examineur  
Examineur  
Directeur de Thèse  
Co-encadrante de Thèse



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER

Montpellier  
SupAgro



# Sommaire

## Sommaire

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>3</b>
<b>ABREVIATIONS</b> .....	<b>4</b>
<b>CHAPITRE I : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>5</b>
I.    LE NITRATE, UN NUTRIMENT ESSENTIEL POUR LES PLANTES.....	6
II.   L'ABSORPTION RACINAIRE DU NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ET SES REGULATIONS.....	7
1) <i>Les systèmes de prélèvement et d'assimilation du NO<sub>3</sub><sup>-</sup></i> .....	7
2) <i>Les transporteurs membranaires de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et leur rôle dans l'absorption racinaire</i> .....	7
3) <i>Les régulations de l'absorption racinaire du NO<sub>3</sub><sup>-</sup></i> .....	10
III.  REGULATION DU DEVELOPPEMENT RACINAIRE PAR LE NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .....	13
1) <i>Description générale du RSA</i> .....	14
2) <i>Le NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et sa place dans la régulation du RSA</i> .....	15
IV.  NRT1.1, UN ACTEUR MAJEUR DE LA SIGNALISATION NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .....	19
V.   OBJECTIFS DE LA THESE .....	25
<b>REVUE : NRT1.1-CENTERED NITRATE SIGNALING IN PLANTS</b> .....	<b>26</b>
<b>CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>27</b>
I.    MATERIEL VEGETAL.....	28
II.   CONDITIONS DE CULTURE .....	28
1) <i>Culture en serre</i> .....	28
2) <i>Culture en chambre de culture</i> .....	28
III.  GENOTYPAGE.....	29
IV.  STERILISATION DES GRAINES .....	30
V.   EXTRACTION D'ARN ET PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL (RT-QPCR) .....	30
VI.  ARCHITECTURE RACINAIRE .....	31
VII.  TRAITEMENTS PHARMACOLOGIQUES .....	32
VIII. ANALYSES BIOCHIMIQUES .....	32
1) <i>Extraction des fractions microsomales</i> .....	32
2) <i>Extraction des protéines</i> .....	33
3) <i>Dosage des protéines</i> .....	33
4) <i>Immunoprécipitation</i> .....	34
5) <i>Préparation des gels SDS-PAGE</i> .....	34
6) <i>Western Blot</i> .....	35
IX.  COLORATION A LA β-GLUCURONIDASE .....	36
X.   OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES .....	36
1) <i>Imagerie Confocale à balayage laser</i> .....	36
2) <i>Imagerie à épifluorescence</i> .....	37
3) <i>Imagerie à épifluorescence de champ plein</i> .....	37
<b>CHAPITRE III : ROLE DE NRT1.1 DANS LE TRAFIC DE L'AUXINE CONTROLANT LE DEVELOPPEMENT DES RACINES LATERALES EN REPONSE AU NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b> .....	<b>38</b>
I.    INTRODUCTION .....	39
II.   MAGHIAOUI <i>ET AL.</i> , (2020A) .....	42
III.  RESULTATS COMPLEMENTAIRES .....	43
1) <i>La répression de l'expression de TAR2 est-elle la cause majeure de l'effet de NRT1.1 sur le développement des PRLs ?</i> .....	43
2) <i>Certains gènes YUC sont régulés par le NO<sub>3</sub><sup>-</sup></i> .....	45



## Sommaire

- 3) *Impact des mutations du résidu T101 de NRT1.1 sur la régulation de l'expression de TAR2 et LAX3* 46
- 4) *Conclusion*.....47

### **CHAPITRE IV : ETUDE DE LA REGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE DE NRT1.1 .....48**

- I. INTRODUCTION ..... 49
  - 1) *Contexte* .....49
  - 2) *Objectifs du travail*.....49
  - 3) *Mécanismes impliqués dans la dynamique des protéines membranaires*.....51
  - 4) *NRT1.1 est-il régulé de manière post-traductionnelle par un mécanisme d'ubiquitination en réponse à des fluctuations de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ?*.....54
- II. RESULTATS ..... 54
  - 1) *Le NO<sub>3</sub><sup>-</sup> réprime l'expression de la protéine NRT1.1 dans les PRLs et à l'apex de la racine primaire*..54
  - 2) *Effet du NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sur l'expression du gène et de la protéine NRT1.1 native dans les racines et les parties aériennes*.....55
  - 3) *Régulation post-transcriptionnelle de NRT1.1 dans les cotylédons en réponse au NO<sub>3</sub><sup>-</sup>*.....57
  - 4) *Dynamique de la protéine NRT1.1 en réponse à une carence en NO<sub>3</sub><sup>-</sup>* .....58
  - 5) *Dynamique intracellulaire de NRT1.1 en réponse au NO<sub>3</sub><sup>-</sup>*.....60
  - 6) *La dégradation de la protéine NRT1.1 pourrait mettre en jeu son ubiquitination* .....61
- III. DISCUSSION..... 62
  - 1) *Régulation post-transcriptionnelle de NRT1.1 dans les parties aériennes*.....62
  - 2) *Régulation post-transcriptionnelle de NRT1.1 dans les racines* .....63

### **CHAPITRE V : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....66**

- I. NRT1.1 : CHEF D'ORCHESTRE DANS LE CONTROLE DU DEVELOPPEMENT DES PRLS EN REPONSE AU NO<sub>3</sub><sup>-</sup> .... 67
- II. LES REGULATIONS POST-TRANSCRIPTIONNELLES DE NRT1.1..... 68
- III. RECHERCHE DE NOUVEAUX ACTEURS MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS LA REGULATION DU DEVELOPPEMENT DES PRLS PAR NRT1.1..... 70

### **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....71**



## Remerciements

### Remerciements

À mon directeur de Thèse, Alain Gojon et à ma co-directrice de Thèse, Liên Bach, pour toutes ces opportunités durant ces trois dernières années, pour votre confiance et votre engagement respectif, recevez mes plus sincères remerciements. Merci également à vous deux pour ce sang froid lors de notre escapade particulièrement mouvementée à Taïwan, je suis à présent prête pour un deuxième séisme.

Je tiens à remercier et témoigner ma plus profonde considération à mon jury de Thèse pour avoir accepté d'évaluer mon travail, je vous souhaite une bonne lecture.

Un grand merci à Laurence Lejay et Antoine Martin pour votre aide, vos conseils et votre implication, ainsi qu'au meilleur TiREX que l'on souhaiterait tous avoir dans son équipe, Jossia, pour ses talents de folie et de correctrice, à David et Valentin, colocataires de bureau, sans qui la thèse n'aurait pas été aussi sympathique, au reste de l'équipe Intégration et également à l'ensemble du laboratoire B&PMP.

Enfin, mes remerciements affectueux et chaleureux vont aussi à mon entourage proche et plus particulièrement à une personne qui se reconnaîtra à la lecture de ses mots.



## Abréviations

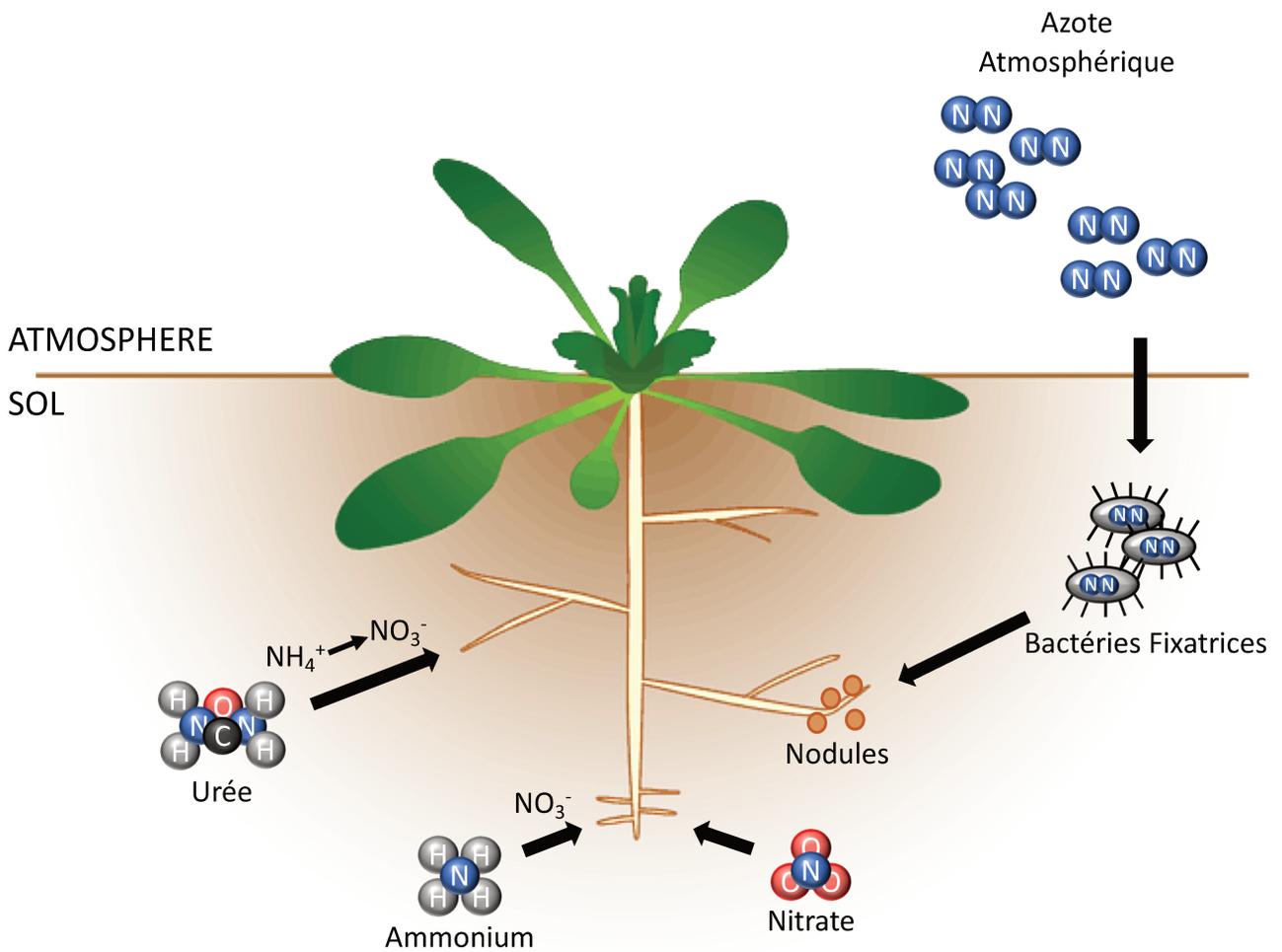
### Abréviations

ABA : Acide Abscissique	MZ : Zone Méristématique
ADN: Acide DésoxyriboNucléique	N : Azote
ADN-T : ADN de Transfert	N <sub>2</sub> : Diazote atmosphérique
AIA : Acide Indol-3-Acétique	N <sub>2</sub> O : Protoxyde d'azote
ARN : Acide RiboNucléique	NAXT1 : Nitrate Excretion Transporter 1
ARNm : ARN messenger	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> : Nitrite
C : Carbone	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> : Nitrate
Ca <sup>2+</sup> : Calcium	NH <sub>3</sub> : Ammoniac atmosphérique
CBL : Calcineurin B-Like protein	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : Ammonium
CEPs : C-terminal Encoded Peptides	NiR : Nitrite Réductase
CHX : Cycloheximide	NR : Nitrate Réductase
CIPK : Cbl-Interacting Protein Kinase	NRT : Nitrate Transporter
CLC : Chloride Channels	NRT1/ PTR /NPF : Nitrate Transporter 1/Peptide Transporter Family
CLE : Clavata Embryo Surrounding Region Related	NUE : Nitrogen Use Efficiency
CLO <sub>3</sub> <sup>-</sup> : Chlorate	PIN : Pin-formed
CO <sub>2</sub> : Dioxyde de Carbone	PNR : Primary Nitrate Response
Col : Ecotype Columbia	PRL : Primordium de RLs
dNTP : Désoxyribonucléotide Triphosphate	RSA : Root System Architecture
DZ : Zone de Différentiation	RLs : Racine Latérales
EZ : Zone d'Élongation	SLAC1/SCLH : Slow Anion Channel-Associated 1 Homologues
GFP : Green Fluorescent Protein	SNR : Secondary Nitrate Response
Gln : Glutamine	T101 : Thréonine 101
Glu : Glutamate	TAR : Tryptophan AminoTransferase related
GOGAT : Glutamate Synthase	X-Gluc : Acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta- D-glucuronique
GS : Glutamine Synthétase	YFP : Yellow Fluorescent Protein
GUS : β-Glucuronidase	
HATS : High Affinity Transport System	
LATS : Low Affinity Transport System	
L-Trp : L-Tryptophane	



# CHAPITRE I :

## **Introduction bibliographique**



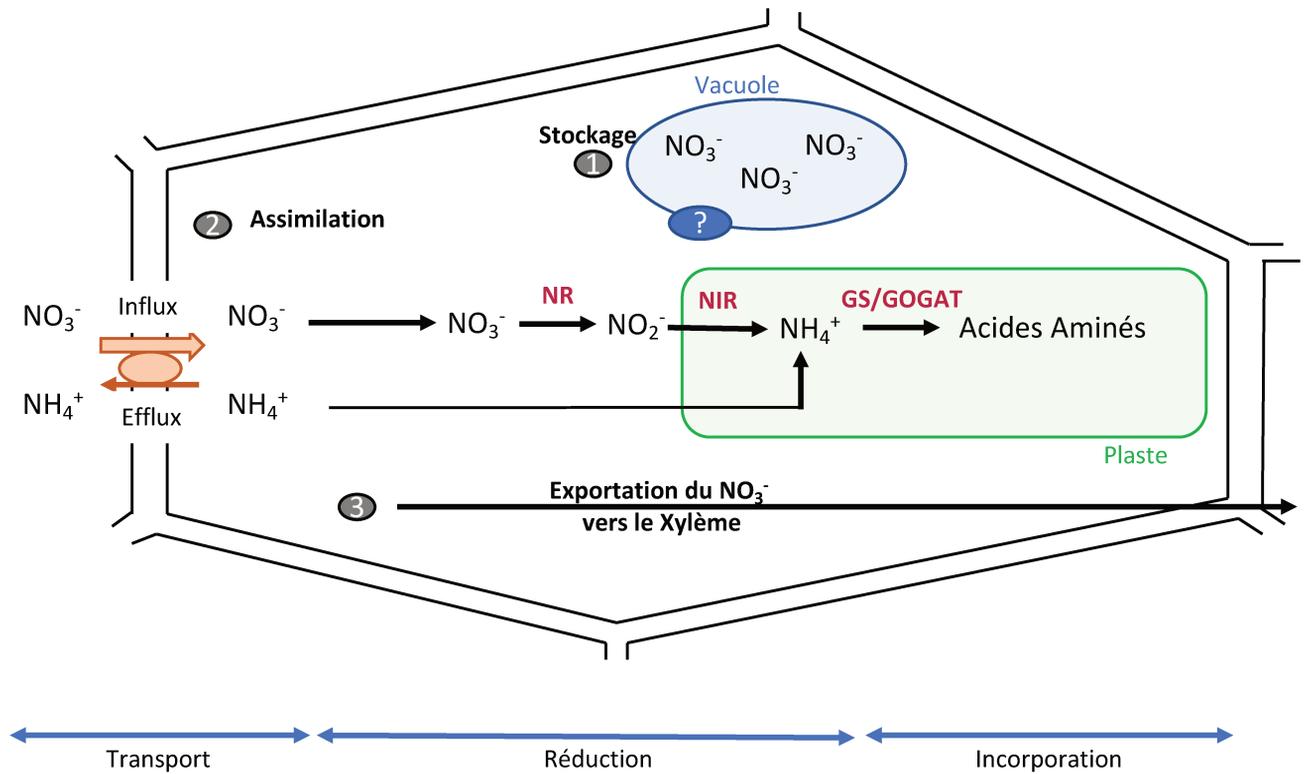
**Figure I.1: Les différentes formes azotées disponibles pour les plantes.**

Le  $NO_3^-$  représente généralement la source principale de N pour la majorité des espèces végétales. Les ions  $NO_3^-$  sont très mobiles dans le sol, à l'inverse de l'ion  $NH_4^+$  qui diffuse beaucoup moins rapidement du fait de ses interactions avec les colloïdes du sol. Sous l'action de bactéries du sol,  $NH_4^+$  est souvent transformé en  $NO_3^-$ . Tout comme  $NH_4^+$ , l'urée n'est le plus souvent pas absorbée telle quelle par les plantes. Elle est hydrolysée en  $NH_4^+$  par des enzymes présentes dans le sol. Enfin, l' $N_2$  atmosphérique ne constitue une source de N que pour certaines espèces capables d'établir une symbiose avec des bactéries fixatrices qui le transforment en  $NH_4^+$ .

### I. Le nitrate, un nutriment essentiel pour les plantes

L'étude de la nutrition azotée des plantes présente un double intérêt, à la fois du point de vue fondamental et du point de vue appliqué. D'une part, contrairement aux animaux, les plantes possèdent la capacité d'assurer l'assimilation primaire de l'azote (N), c'est-à-dire l'intégration des formes minérales de l'azote dans les biomolécules. Il s'agit d'une caractéristique majeure de leur autotrophie, au même titre que la photosynthèse. D'autre part, l'optimisation des rendements en agriculture a été en partie assurée par une consommation massive d'engrais azotés, qui devient maintenant excessive avec une application annuelle de plus de  $80 \times 10^{12}$  g d'N (Miller and Cramer, 2004). Avec une utilisation de seulement 30 à 50% des engrais apportés, la majeure partie de l'N de ces engrais est perdue par lessivage dans le sol (Tilman *et al.*, 2002). Ceci entraîne la contamination des eaux souterraines, et favorise l'eutrophisation des eaux superficielles ainsi que l'enrichissement atmosphérique en ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) et en protoxyde d'azote ( $\text{N}_2\text{O}$ ). Cet usage massif a par conséquent des coûts importants au niveau économique et écologique. Ainsi, la balance entre les effets favorables et nuisibles des engrais azotés a évolué défavorablement depuis une cinquantaine d'années, ce qui motive la conduite de projets de recherches destinés à améliorer l'efficacité d'utilisation de l'N (NUE ; Nitrogen Use Efficiency) par les cultures. En amont, ceci nécessite la compréhension des mécanismes d'absorption et d'assimilation de l'N chez ces cultures.

L'azote est un macroélément majeur qui influence fortement la croissance et le développement des plantes. L'N représente également jusqu'à 5% de la matière sèche végétale (Morot-Gaudry, 1997), et entre dans la composition des principales biomolécules telles que les acides aminés et nucléiques, les protéines ou encore les hormones. Les plantes assurent leur nutrition azotée à partir de deux formes inorganiques prédominantes dans les sols : le nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) et l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) (Nacry *et al.*, 2013). Néanmoins et dans une moindre mesure, elles peuvent également prélever l'N sous forme organique (urée, acides aminés) (Dechorgnat *et al.*, 2011). De même, certaines espèces comme les légumineuses, peuvent indirectement assurer leur nutrition azotée à partir du diazote atmosphérique ( $\text{N}_2$ ), en créant une symbiose avec des bactéries fixatrices de  $\text{N}_2$  (Gordon *et al.*, 2001) (Figure I.1). Dans les zones tempérées, le  $\text{NO}_3^-$  constitue la forme préférentiellement utilisée par une majorité d'espèces de plantes supérieures (Crawford and Forde, 2002 ; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Cependant, la concentration en  $\text{NO}_3^-$  du sol peut varier très fortement (du  $\mu\text{M}$  au  $\text{mM}$ ) en fonction des saisons, du climat et selon les horizons du sol, ce qui en fait très souvent un facteur limitant du développement et de la croissance des végétaux (Miller *et al.*, 2007).



**Figure I.2 : Schéma représentatif de l'assimilation de l'azote minéral dans une cellule racinaire.**

Dans le sol, les plantes absorbent l'N principalement sous la forme de nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) ou d'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ). Dans la cellule racinaire, le  $\text{NO}_3^-$  peut être stocké dans la vacuole, transporté jusqu'aux parties aériennes via le xylème ou assimilé par l'action séquentielle de la nitrate réductase (NR), de la nitrite réductase (NiR), de la glutamine synthétase (GS) et de la glutamate synthase (GOGAT). Le  $\text{NH}_4^+$  absorbé est principalement directement assimilé dans les racines par la voie GS/GOGAT.

### II. L'absorption racinaire du $\text{NO}_3^-$ et ses régulations

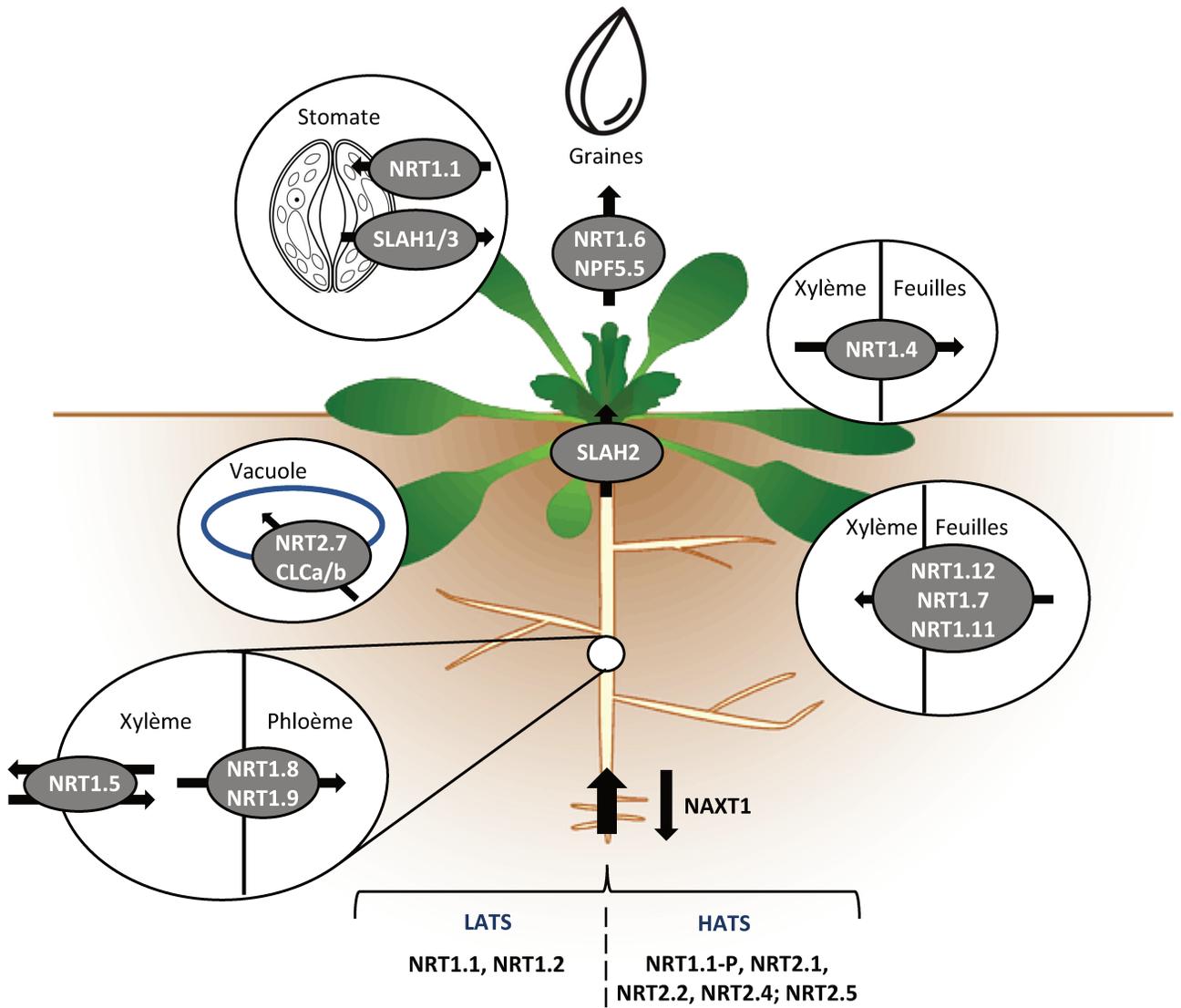
#### 1) Les systèmes de prélèvement et d'assimilation du $\text{NO}_3^-$

Les plantes assurent l'absorption du  $\text{NO}_3^-$  présent dans le sol grâce à deux types de systèmes de transport localisés dans la membrane plasmique des cellules épidermiques et corticales de la racine : les systèmes de transport à forte affinité, HATS (High Affinity Transport System), et les systèmes de transport à faible affinité LATS (Low Affinity Transport System). Les transporteurs HATS et LATS jouent respectivement un rôle prédominant lorsque le  $\text{NO}_3^-$  est présent dans la solution du sol en concentration faible (inférieure à 1 mM) et élevée (supérieure à 1 mM) (Orsel *et al.*, 2002).

Suite à son absorption, le devenir du  $\text{NO}_3^-$  est multiple puisqu'il peut être soit stocké dans les vacuoles racinaires, soit transporté radialement dans la racine et exporté vers les parties aériennes via le xylème, soit directement assimilé par les cellules racinaires. Dans les feuilles, le  $\text{NO}_3^-$  peut également être soit assimilé, soit accumulé dans les vacuoles (Crawford and Forde, 2002). L'assimilation du  $\text{NO}_3^-$  se définit par l'incorporation d'un atome d'azote aux molécules carbonées et comprend plusieurs étapes. Pour résumer, dans le cytoplasme des cellules racinaires ou foliaires, le  $\text{NO}_3^-$  est d'abord réduit en nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) par la nitrate réductase (NR), puis le  $\text{NO}_2^-$  est transporté dans les plastes où il est réduit en ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) par la nitrite réductase (NiR). L' $\text{NH}_4^+$  est ensuite incorporé dans le squelette carboné du Glutamate (Glu), via la glutamine synthétase (GS) pour produire la Glutamine (Gln). Enfin, la glutamate synthase (GOGAT) catalyse le transfert du groupement amide de la Gln vers l'acide  $\alpha$ -cétogultarate afin de générer deux molécules de Glu dont l'une sert de substrat de la GS pour la formation de la Gln et l'autre est une source d'azote organique pour synthétiser l'ensemble des acides aminés par transamination (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010) (Figure I.2).

#### 2) Les transporteurs membranaires de $\text{NO}_3^-$ et leur rôle dans l'absorption racinaire

Chez *A.thaliana*, les transporteurs de  $\text{NO}_3^-$  ont été identifiés au sein de quatre familles de protéines: (i) Chloride Channels (CLC), (ii) Slow Anion Channel-Associated 1 Homologues (SLAC1/SCLH), (iii) Nitrate Transporter 1/Peptide Transporter Family (NRT1/ PTR /NPF) et (iv) Nitrate Transporter 2 (NRT2) (Wang *et al.*, 2012 ; Hirel and Krapp, 2020) (Figure I.3). L'ensemble de ces transporteurs assure une grande variété d'étapes de transport individuelles



**Figure I.3 :** Localisation et fonction physiologique des protéines des familles de canaux CLCs et SLACs/SCLH, et de transporteurs NRT1/ PTR /NPF et NRT2 impliqués dans l'absorption racinaire de  $\text{NO}_3^-$  et son allocation entre les différents organes chez *A.thaliana*.

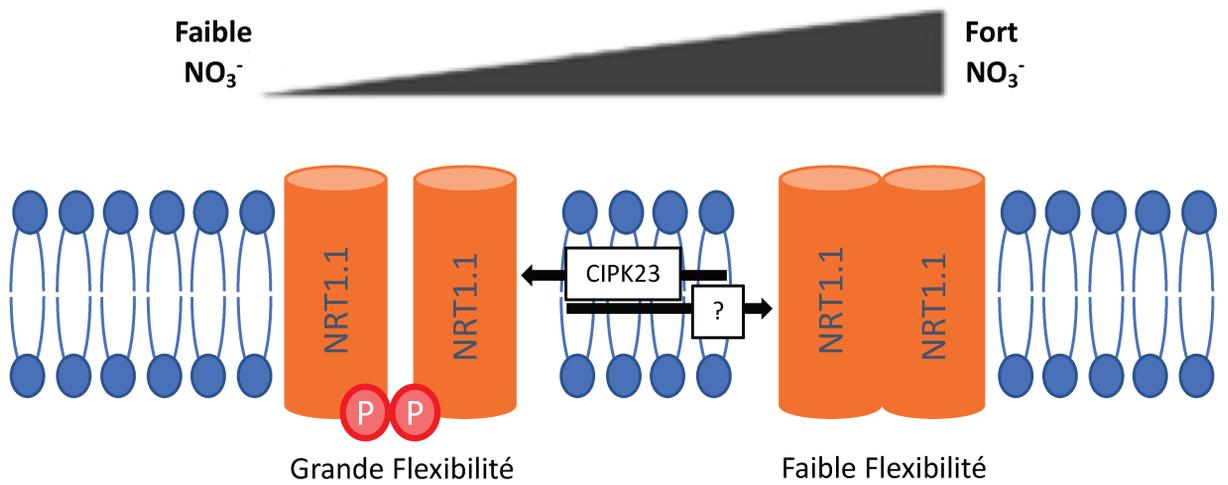
## Chapitre I

entre les racines et le milieu, mais aussi en interne à la plante, aux niveaux subcellulaire, cellulaire et tissulaire. En ce qui concerne spécifiquement l'absorption racinaire, qui nous intéresse plus particulièrement dans le cadre de cette thèse, seuls des transporteurs NRT1/PTR/NPF ou NRT2 y participent. En conséquence, seules ces deux familles seront décrites plus en détail ci-dessous.

### a) La famille NRT1/PTR/NPF

Les transporteurs NRT1/PTR/NPF sont présents chez tous les organismes et ont été identifiés à l'origine comme des transporteurs de peptides. Chez les plantes, ils sont représentés par des familles multigéniques particulièrement fournies, avec une spécificité de substrat très variable. Ainsi, la famille NRT1/PTR/NPF comprend 53 membres chez *Arabidopsis*, dont pour l'instant 16 ont été caractérisés essentiellement comme des transporteurs à faible affinité pour le  $\text{NO}_3^-$  (LATS). Cependant, d'autres membres de la famille peuvent transporter des acides aminés, des peptides, des glucosinolates, du chlorate et des hormones comme de l'auxine ou de l'acide abscissique (ABA) (Leran *et al.*, 2014). La structure commune prédite présente 12 domaines transmembranaires reliés par une longue boucle cytosolique entre les domaines 6 et 7 (Tsay *et al.*, 2007).

Le premier transporteur de  $\text{NO}_3^-$  identifié chez les plantes appartient à cette famille et est CHL1/NPF6.3/NRT1.1 (par la suite dénommé NRT1.1 par simplicité). Son gène a été isolé par criblage de mutants d'insertion ADN-T résistants au chlorate ( $\text{ClO}_3^-$ ), un analogue toxique du  $\text{NO}_3^-$  (Tsay *et al.*, 1993). La localisation tissulaire de l'expression de ce gène, notamment dans les cellules épidermiques et dans la stèle, a suggéré une fonction de NRT1.1 dans l'absorption racinaire du  $\text{NO}_3^-$  et dans la translocation du  $\text{NO}_3^-$  vers les parties aériennes (Leran *et al.*, 2013 ; Wang *et al.*, 2020) (Figure I.3). De manière inhabituelle pour un transporteur membranaire d'ion, NRT1.1 se comporte un transporteur à double affinité pour le  $\text{NO}_3^-$  (faible et forte). Son d'affinité change en fonction de l'état de phosphorylation du résidu Thréonine 101 (T101) en réponse aux fluctuations de la disponibilité de  $\text{NO}_3^-$ . En effet, lorsque le  $\text{NO}_3^-$  est peu abondant, le résidu T101 est phosphorylé par CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 23 (CIPK23), et NRT1.1 fonctionne comme un transporteur à forte affinité. A l'inverse, lorsque NRT1.1 est déphosphorylé dans des conditions de fort  $\text{NO}_3^-$ , la protéine fonctionne comme un transporteur à faible affinité (Liu *et al.*, 1999 ; Liu and Tsay, 2003 ; Wang *et al.*, 1998). Des études sur la structure de la protéine NRT1.1 suggèrent que la phosphorylation de T101 influence fortement



**Figure I.4 : Modification fonctionnelle du transporteur NRT1.1 en fonction de la concentration en  $\text{NO}_3^-$  et de l'état de phosphorylation de la protéine.**

NRT1.1 est phosphorylé (P) au niveau du résidu T101 en condition de faible concentration en  $\text{NO}_3^-$ . Cette phosphorylation perturbe la structure en dimère et augmente la flexibilité structurelle du transporteur NRT1.1, conduisant à une affinité élevée pour le  $\text{NO}_3^-$ . Lorsque le  $\text{NO}_3^-$  est présent en forte concentration, le résidu T101 est déphosphorylé. NRT1.1 fonctionne comme un dimère dont la flexibilité structurelle est diminuée, ce qui le transforme en transporteur à faible affinité.

## Chapitre I

l'état de monomérisation/dimérisation de la protéine afin de moduler l'affinité du transporteur NRT1.1 pour le  $\text{NO}_3^-$  (Parker and Newstead, 2014). Par conséquent, la régulation post-traductionnelle de NRT1.1 par phosphorylation rend ce transporteur sensible à une large gamme de concentrations de  $\text{NO}_3^-$  (Ho *et al.*, 2009 ; Liu and Tsay, 2003) (Figure I.4). Malgré ces données, l'importance quantitative de NRT1.1 dans l'absorption du  $\text{NO}_3^-$  à forte affinité reste controversée (Glass and Kotur, 2013 ; Wen and Kaiser, 2018).

Au sein de la famille NRT1/PTR/NPF, il existe également d'autres transporteurs impliqués dans l'absorption racinaire du  $\text{NO}_3^-$ . Il s'agit de NRT1.2/NPF4.6 et NAXT1/NPF2.7 (Nitrate Excretion Transporter 1) (Iqbal *et al.*, 2020). NRT1.2/NPF4.6 agit comme un transporteur LATS. Localisée à l'apex racinaire, la protéine est impliquée dans l'influx de  $\text{NO}_3^-$ , tandis que NAXT1 est responsable de l'efflux de  $\text{NO}_3^-$  des cellules vers le sol et est localisé au niveau du cortex de la racine (Huang *et al.*, 1999 ; Iqbal *et al.*, 2020 ; Segonzac *et al.*, 2007).

Concernant les autres membres NRT1/PTR/NPF, ils sont à ce jour associés à des étapes de transport interne de la plante. NPF7.3/NRT1.5 est un transporteur bidirectionnel (influx/efflux) jouant un rôle dans l'entrée du  $\text{NO}_3^-$  à l'intérieur du xylème et permettant ainsi la translocation du  $\text{NO}_3^-$  vers les parties aériennes (Lin *et al.*, 2008). NPF7.2/NRT1.8 et NPF2.9/NRT1.9 contribuent à la régulation du transport longue distance du  $\text{NO}_3^-$  entre la racine et les feuilles en assurant la réabsorption dans les cellules de la stèle du  $\text{NO}_3^-$  de la sève du xylème (Li *et al.*, 2010 ; Wang and Tsay, 2011). NPF2.3 est un transporteur d'efflux du  $\text{NO}_3^-$  exprimé dans les cellules du péricycle et intervient en condition de stress salin pour assurer le transport du  $\text{NO}_3^-$  (Taochy *et al.*, 2015). NPF6.2/NRT1.4 charge le  $\text{NO}_3^-$  du xylème vers les organes sources et NPF1.1/NRT1.12, NPF1.2/NRT1.11, NPF2.13/NRT1.7 régissent le transport du  $\text{NO}_3^-$  issu des organes sources vers le phloème pour assurer sa remobilisation vers les organes puits (Chiu *et al.*, 2004 ; Fan *et al.*, 2009 ; Hsu and Tsay, 2013). NPF2.12/NRT1.6 et NPF5.5 contribuent tous deux au transport du  $\text{NO}_3^-$  vers et dans les graines. NPF2.12/NRT1.6 assure l'approvisionnement en  $\text{NO}_3^-$  des graines en développement et NPF5.5 joue un rôle dans l'accumulation du  $\text{NO}_3^-$  dans l'embryon (Almagro *et al.*, 2008 ; Lérant *et al.*, 2015) (Figure I.3).

### b) La famille NRT2

La famille des transporteurs NRT2 a été identifiée pour la première fois chez *Aspergillus nidulans*, puis chez les plantes (Filleur and Daniel-Vedele, 1999 ; Unkles *et al.*, 1991). *A.thaliana* possède 7 gènes NRT2, qui codent tous pour des transporteurs HATS d'influx de

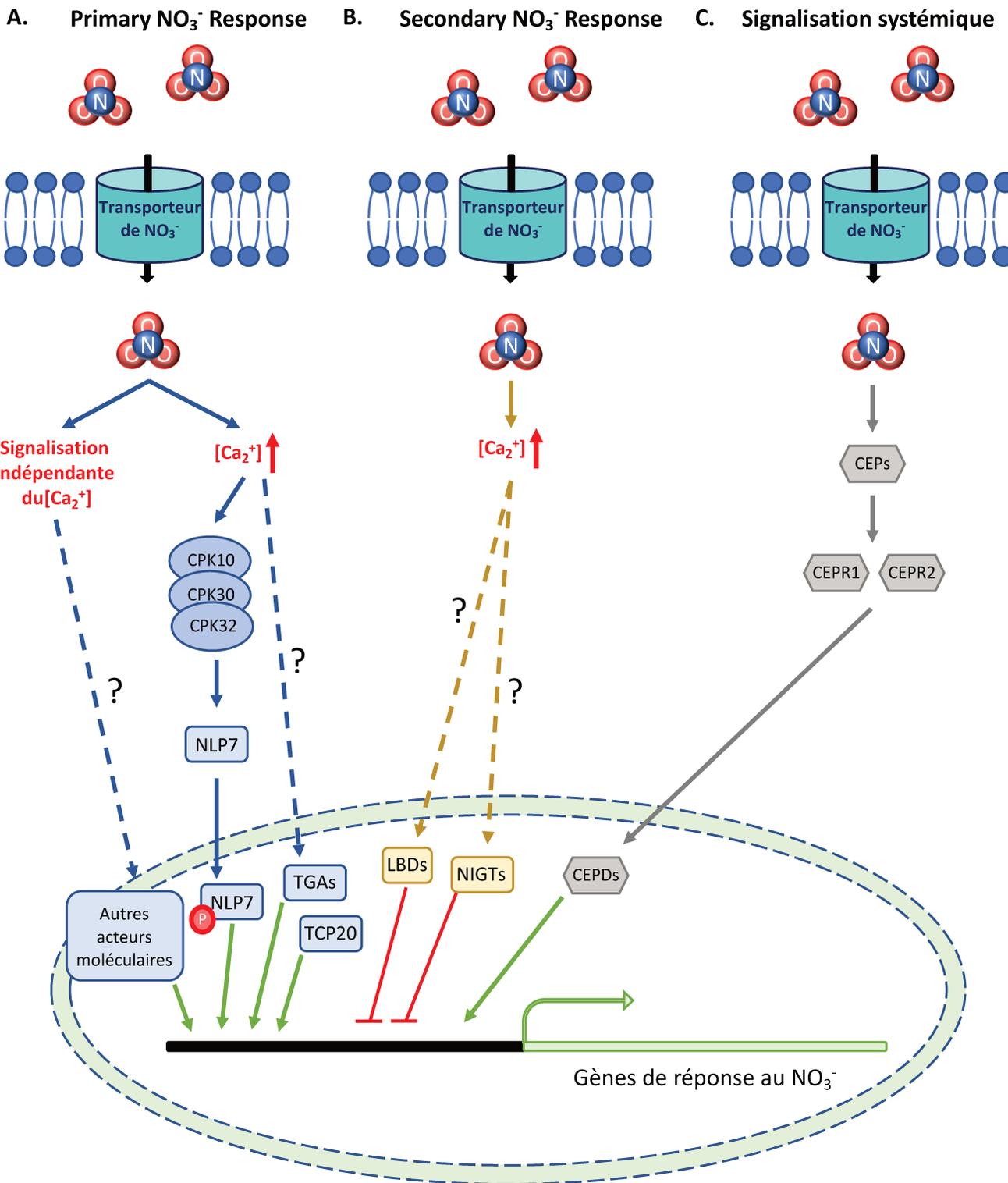


## Chapitre I

$\text{NO}_3^-$  dont l'activité est saturable à des concentrations de  $\text{NO}_3^-$  inférieures à 0,5-1 mM. Comme les transporteurs NRT1/PTR/NPF, les protéines NRT2 possèdent 12 domaines transmembranaires mais ne présentent pas d'homologie de séquence avec eux (von Wittgenstein *et al.*, 2014). Une autre particularité des transporteurs NRT2 c'est qu'ils sont incapables de transporter seuls le  $\text{NO}_3^-$ . Ils doivent en effet interagir avec la protéine partenaire NAR2.1, qui appartient à la famille NAR2 (NRT3), pour être actifs (sauf pour NRT2.7), et forment une unité fonctionnelle composée d'un dimère NRT2 et d'un dimère NAR2 (Chopin *et al.*, 2007 ; Kotur and Glass, 2015 ; Kotur *et al.*, 2012). NRT2.1, NRT2.2, NRT2.4 et NRT2.5 sont tous des transporteurs racinaires d'influx de  $\text{NO}_3^-$ , mais interviennent différemment en réponse aux variations des conditions externes en  $\text{NO}_3^-$ . *NRT2.1* est exprimé dans les cellules corticales et épidermiques de la racine et semble être de loin le composant principal du système HATS (Wirth *et al.*, 2007). En effet, l'inactivation du gène *NRT2.1* conduit à une très forte réduction de la croissance de la plante en situation de faible concentration en  $\text{NO}_3^-$  dans le milieu (Krapp, 2015), et à une perte d'environ 75% de l'absorption du  $\text{NO}_3^-$  (Cerezo *et al.*, 2001). Le transporteur NRT2.2 semble jouer un rôle mineur dans l'absorption du  $\text{NO}_3^-$  car il intervient uniquement en complément du transporteur NRT2.1 (Li *et al.*, 2007). Les transporteurs NRT2.4 et NRT2.5 participent à l'absorption du  $\text{NO}_3^-$  à très forte affinité en situation de carence sévère en  $\text{NO}_3^-$  (Lezhneva *et al.*, 2014). Il est intéressant de noter que NRT2.4 et NRT2.5 sont également exprimés dans les feuilles, où ils contribuent au chargement du  $\text{NO}_3^-$  dans le phloème (Kiba *et al.*, 2012 ; Lezhneva *et al.*, 2014). Bien que NRT2.3 et NRT2.6 soient capables d'assurer le transport du  $\text{NO}_3^-$  comme décrit dans les analyses faites en ovocytes de *Xenopus*, leur fonction *in planta* reste inconnue (Kotur *et al.*, 2012). Enfin, contrairement à toutes les autres protéines NRT2, qui sont des transporteurs localisés à la membrane plasmique, NRT2.7 est localisé dans le tonoplaste et est particulièrement important pour l'accumulation du  $\text{NO}_3^-$  dans les graines (Chopin *et al.*, 2007) (Figure I.3).

### 3) Les régulations de l'absorption racinaire du $\text{NO}_3^-$

Les transporteurs de  $\text{NO}_3^-$  sont nombreux et variés et nécessitent des régulations fines afin de coordonner leur expression. D'une manière générale, l'absorption racinaire de  $\text{NO}_3^-$  est modulée en réponse à la fois à de nombreux facteurs de l'environnement (disponibilité de l'N et des autres éléments minéraux dans le sol, lumière,  $\text{CO}_2$ , etc...) et à des modifications du statut interne de la plante (statut nutritionnel en N et en C, hormones, espèces réactives de l'oxygène, etc...) (voir Nacry *et al.*, 2013 ; O'Brien *et al.*, 2016 pour revue). Cependant, et pour rester cohérent avec la thématique du travail de thèse, seules seront détaillées ci-après les



**Figure I.5 : Voies de régulation des gènes impliqués dans le transport et de l'assimilation du NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.**

La régulation des gènes en réponse au NO<sub>3</sub><sup>-</sup> met en jeu 3 voies de signalisation majeures. **A.** Lors de la réponse primaire au NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, l'influx de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> dans la cellule induit une augmentation rapide des niveaux cytoplasmiques de calcium (Ca<sub>2</sub><sup>+</sup>), qui a pour conséquence l'activation de facteurs de transcription tels que NLP7, TGA1/4 et TCP20 qui sont des régulateurs de l'expression des gènes impliqués dans l'assimilation du NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. En parallèle, une voie de signalisation indépendante du Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> peut également être activée, mais les acteurs restent à définir. **B.** En réponse à de plus fortes concentrations de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, la réponse secondaire au NO<sub>3</sub><sup>-</sup> induit au moins deux familles de répresseurs des gènes impliqués dans le transport et l'assimilation du NO<sub>3</sub><sup>-</sup> : LBD37, LBD38 et LBD39 ainsi que NIGT1.1, NIGT1.2, NIGT1.3 et NIGT1.4. **C.** En plus de ces deux voies, une régulation systémique permet de stimuler l'expression de gènes (notamment *NRT2.1*) en réponse à des signaux de carence en NO<sub>3</sub><sup>-</sup> : les peptides CEPs qui, après perception par leurs récepteurs CEPRs dans les feuilles, induisent les deux gènes *CEPD1* et *CEPD2* codant des glutarédoxines qui sont transportées vers les racines où elles activent l'expression de *NRT2.1*.

## Chapitre I

régulations impliquées dans les réponses des systèmes de transport racinaires aux variations de disponibilité externe du  $\text{NO}_3^-$ . Ces réponses sont complexes pour au moins deux raisons. Premièrement, outre son rôle clé de source azotée essentielle, le  $\text{NO}_3^-$  est aussi une molécule signal contrôlant de nombreux aspects du métabolisme et du développement des plantes (Crawford, 1995). Ainsi, le  $\text{NO}_3^-$  peut agir directement au travers de son effet sur les systèmes chargés de sa perception (« senseurs » de  $\text{NO}_3^-$ ), ou indirectement par l'action régulatrice que peuvent avoir les produits de son assimilation (acides aminés notamment). Deuxièmement, il a souvent été observé que le  $\text{NO}_3^-$  pouvait avoir un effet « dual » (positif ou négatif) sur ses propres systèmes de transport, en fonction des conditions, suggérant des interactions complexes entre les voies de signalisation (Nacry *et al.*, 2013). Malgré cette complexité intrinsèque, au moins trois voies de signalisation ont commencé à être élucidées au niveau moléculaire pour expliquer l'effet signal du  $\text{NO}_3^-$  sur ses transporteurs racinaires (Figure I.5).

### a) *Les réponses à court terme au $\text{NO}_3^-$ ou « Primary Nitrate Response (PNR) »*

La PNR correspond à de profondes reprogrammations du transcriptome dans les minutes et heures qui suivent l'apport de  $\text{NO}_3^-$  à des plantes qui en avaient été préalablement privées (Medici and Krouk, 2014). Une étude transcriptionnelle du génome d'*Arabidopsis* a notamment montré que 10% du génome est contrôlé par le  $\text{NO}_3^-$  (Krouk *et al.*, 2010a). Sont concernés les gènes codant pour les transporteurs de  $\text{NO}_3^-$  et ceux impliqués dans l'assimilation du  $\text{NO}_3^-$  dont l'induction par cet ion est une des manifestations de la PNR, mais également les gènes impliqués dans le métabolisme primaire et secondaire (Wang *et al.*, 2004). La voie de signalisation de la PNR agit localement. Elle a fait l'objet de nombreuses études, et commence à être bien connue (Liu *et al.*, 2017) (Figure I.5A). Brièvement, l'apport de  $\text{NO}_3^-$  dans le milieu extérieur induit une augmentation très rapide et transitoire (« spike ») de la concentration cytoplasmique du calcium (Riveras *et al.*, 2015), qui agit comme un messenger secondaire et active CPK10, CPK30 et CPK32, un sous-groupe de kinases dépendantes du calcium (Liu *et al.*, 2017). Ces kinases sont responsables de la phosphorylation du facteur de transcription NLP7, qui a pour effet d'activer sa rétention dans le noyau des cellules, lui permettant ainsi de réguler la transcription de ses gènes cibles (Liu *et al.*, 2017 ; Marchive *et al.*, 2013). NLP7 a été identifié comme un régulateur majeur de la PNR car il gouverne la réponse au  $\text{NO}_3^-$  de nombreux gènes, dont ceux codant des transporteurs racinaires de  $\text{NO}_3^-$  NRT1 et NRT2 (Alvarez *et al.*, 2020 ; Castaings *et al.*, 2009 ; Marchive *et al.*, 2013). Il est très probable que d'autres membres de la famille NLP (9 chez *Arabidopsis*), dont NLP6 en particulier, jouent un



## Chapitre I

rôle semblable et en partie redondant avec celui de NLP7 (Guan *et al.*, 2017 ; Konishi and Yanagisawa, 2013). Par ailleurs, il a également été démontré qu'une partie de la PNR fait appel à une voie de signalisation indépendante du calcium, et que celle dépendante du calcium implique l'action d'une phospholipase C, requise pour la production d'inositol 1,4,5 triphosphate qui agit comme un signal inducteur du spike de calcium (Riveras *et al.*, 2015).

Plusieurs autres régulateurs des gènes codant les transporteurs racinaires de  $\text{NO}_3^-$  ont été identifiés comme participant également à la PNR, mais sans que leur mécanismes d'action ne soient encore bien caractérisés. Il s'agit en particulier des facteurs de transcription TGA1 et TGA4, dont la mutation réduit l'induction de gènes par le  $\text{NO}_3^-$ , comme *NRT2.1* par exemple (Alvarez *et al.*, 2014). De même, le facteur de transcription TCP20 tient une place importante dans la PNR, en induisant l'expression de *NRT1.1*, mais uniquement en condition de faible apport en  $\text{NO}_3^-$  (Guan *et al.*, 2014).

### *b) Les réponses à moyen terme au $\text{NO}_3^-$ ou « Secondary Nitrate Response (SNR) »*

Une autre signalisation locale dépendante de  $\text{NO}_3^-$  agit sur des durées plus longues (plusieurs jours) en réponse aux concentrations élevées en  $\text{NO}_3^-$  et aboutit pour certains gènes à un effet inverse de celui de la PNR. Par exemple, *NRT2.1* est fortement induit en temps court dans le cadre de la PNR, mais au contraire fortement réprimé par la suite si la concentration du  $\text{NO}_3^-$  dans le milieu est élevée (Filleur and Daniel-Vedele, 1999 ; Krouk *et al.*, 2006 ; Munos *et al.*, 2004 ; Zhuo *et al.*, 1999). Une privation de  $\text{NO}_3^-$  ou une diminution de sa concentration externe permet de lever cette répression et de rétablir un niveau élevé d'expression de *NRT2.1* (Lejay *et al.*, 1999 ; Zhuo *et al.*, 1999). Cette réponse « secondaire » est interprétée comme étant due à un mécanisme de rétro-inhibition qui inactive le système d'absorption à forte affinité de  $\text{NO}_3^-$  lorsque cet ion est abondant (et peut donc être prélevé par les systèmes à faible affinité), ou lorsque la plante est en situation de satiété en N (Nacry *et al.*, 2013). Les mécanismes de la SNR sont moins bien caractérisés que ceux de la PNR. Néanmoins, plusieurs études indiquent qu'ils impliquent l'action de régulateurs négatifs, dont les gènes sont eux-mêmes induits par  $\text{NO}_3^-$  dans le cadre de la PNR (Figure I.5B). Par exemple, l'expression de *NRT2.1* est réprimée par deux familles de facteurs de transcription : les LBD37, LDB38 et LBD39 d'une part (Rubin *et al.*, 2009), et les NIGT1.1, NIGT1.2, NIGT1.3 et NIGT1.4, d'autre part (Kiba *et al.*, 2018 ; Maeda *et al.*, 2018 ; Medici *et al.*, 2015). Or, les gènes codant ces facteurs de transcription sont tous induits par le  $\text{NO}_3^-$  lors de la PNR (Kiba *et al.*, 2018 ; Maeda *et al.*, 2018 ; Medici *et al.*,



## Chapitre I

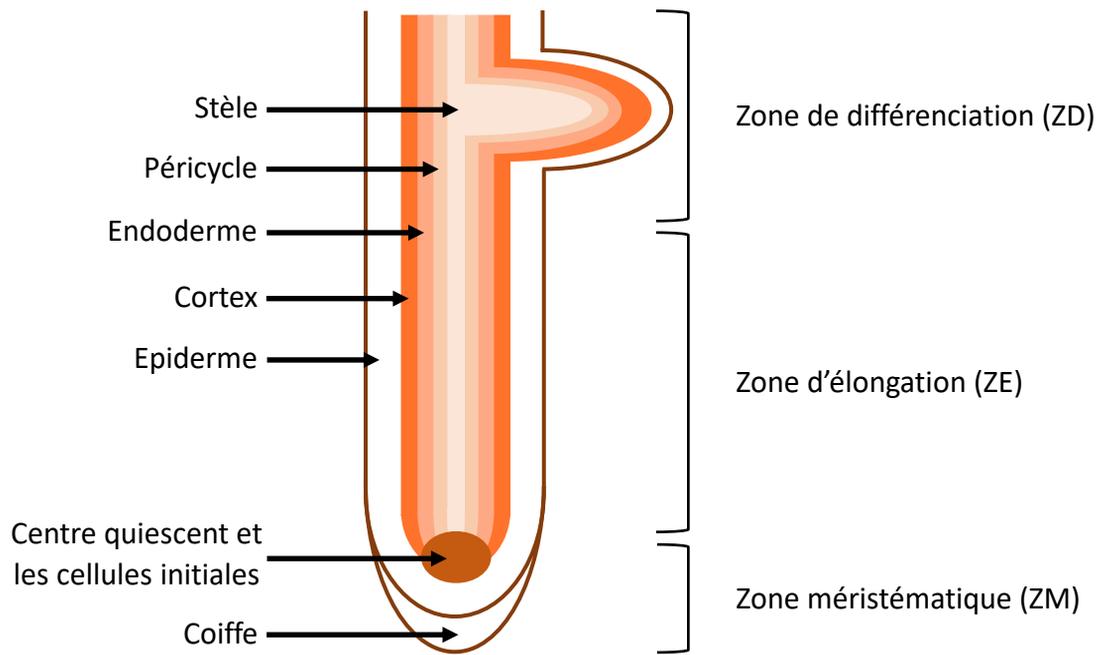
2015 ; Rubin *et al.*, 2009). Ainsi, c'est l'induction concomitante de *NRT2.1* et des gènes de ses répresseurs qui explique que *NRT2.1* soit réprimé dans un second temps, après que les produits de traduction des *LBD* et *NIGT* aient pu être synthétisés et activés.

### c) La signalisation systémique de la disponibilité externe en $\text{NO}_3^-$

Un troisième mécanisme de régulation agit sur les transporteurs racinaires de  $\text{NO}_3^-$  avec des effets similaires à ceux de la SNR, à savoir répression en situation de satiété en N de la plante et à l'inverse stimulation en situation de carence en N. Cependant, et contrairement à la SNR, elle fait appel à une signalisation systémique impliquant des échanges de signaux entre feuilles et racines. La preuve de la régulation des transporteurs racinaires par une signalisation systémique a été apportée par des expériences de split-root, consistant à moduler l'apport de  $\text{NO}_3^-$  de manière différente sur deux parties du système racinaire. Par exemple, la privation de  $\text{NO}_3^-$  sur une partie du système racinaire entraîne une réponse compensatoire dans les autres racines dont l'alimentation en  $\text{NO}_3^-$  n'a pas été modifiée, et où l'expression de *NRT2.1* et l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  sont stimulées (Gansel *et al.*, 2001 ; Ruffel *et al.*, 2011). Dans ce cas, la stimulation de l'expression de *NRT2.1* ne s'explique pas par une modification de la concentration externe de  $\text{NO}_3^-$ , qui est restée inchangée, mais par l'action de signaux provenant des feuilles qui ont informé les racines alimentées avec  $\text{NO}_3^-$  que le reste du système racinaire en a été privé. Les mécanismes moléculaires responsables de cette régulation ont été récemment élucidés (Ohkubo *et al.*, 2017 ; Tabata *et al.*, 2014) (Figure I.5C). Brièvement, la privation de  $\text{NO}_3^-$  d'une partie du système racinaire y induit l'expression de gènes codant des peptides signaux (CEPs : C-terminal Encoded Peptides), qui sont produits et exportés vers les feuilles via le xylème. Dans les feuilles, les CEPs sont perçus par deux récepteurs kinases spécifiques (CEPR1 et CEPR2), qui induisent en réponse l'expression de deux gènes (*CEPD1* et *CEPD2*) codant des glutarédoxines. Ces glutarédoxines synthétisées dans les feuilles sont à leur tour exportées vers les racines, où elles stimulent l'expression de *NRT2.1* par un mécanisme d'action encore inconnu.

### III. Régulation du développement racinaire par le $\text{NO}_3^-$

Dans les sols naturels ou agricoles, la capacité des plantes à acquérir rapidement et efficacement des éléments nutritifs peut déterminer leur succès compétitif et leur productivité. Une des stratégies que peuvent adopter les plantes pour optimiser leur prélèvement des éléments nutritifs est la régulation de la plasticité de leur système racinaire. Les profondes modifications



**Figure I.6 : Morphologie de la racine primaire chez *Arabidopsis thaliana*.**

Représentation schématisique d'une racine principale, qui se compose radialement de cinq tissus distincts: la stèle qui renferme les tissus conducteurs (le phloème et le xylème), le péricycle, l'endoderme, le cortex et l'épiderme. L'apex de la racine contient le méristème apical, où les différentes lignées cellulaires sont déterminées. Les cellules du centre quiescent se divisent en produisant des initiales (précurseurs) des différents tissus. L'apex est protégé par la coiffe racinaire et la columelle. La racine est aussi divisée en trois zones selon l'activité cellulaire : une zone de différenciation (DZ), une zone d'élongation (ZE) et une zone méristématique (ZM).

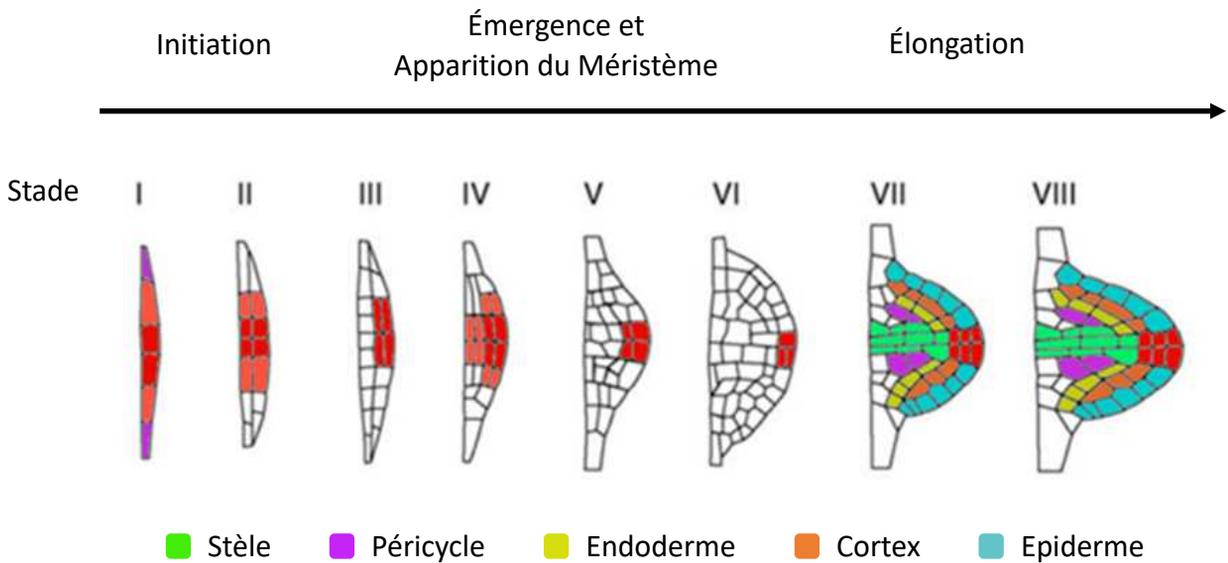
## Chapitre I

de taille et d'architecture du système racinaire (Root System Architecture ; RSA) résultent majoritairement d'un développement accru de racines latérales (RLs), plus sensibles aux fluctuations nutritionnelles que les racines primaires, qui permet d'augmenter le volume de sol exploré par la plante. Les plantes sont donc capables de modifier profondément leur développement post-embryonnaire en fonction des conditions fluctuantes afin d'optimiser leur nutrition en exploitant préférentiellement les zones du sol riches en nutriments (Forde, 2014 ; Motte *et al.*, 2019).

### 1) Description générale du RSA

La racine primaire d'*A.thaliana* est un modèle simple formé lors de l'embryogénèse (Figure I.6). Vu comme un ensemble de cylindres concentriques, elle se compose de cinq tissus distincts : l'épiderme, le cortex, l'endoderme, le péricycle, et la stèle qui renferme les tissus vasculaires de la plante. L'apex de la racine primaire est protégé par un tissu protecteur nommé la coiffe. La racine primaire peut aussi se décomposer selon 3 zones développementales distinctes et consécutives le long de son axe longitudinal. Dans la zone la plus proche du centre quiescent, connu sous le nom de zone méristématique (MZ), les cellules se divisent pour donner naissance aux différentes files cellulaires de la racine primaire. Dans la zone d'élongation (EZ), les cellules s'allongent et se différencient progressivement sans autre division cellulaire. Enfin, la zone de différenciation (DZ) est constituée de cellules matures et différenciées qui ne s'allongent plus. C'est à partir de cette dernière zone que se forment les RLs (Dolan *et al.*, 1993 ; Verbelen *et al.*, 2006).

La ramification du système racinaire est un processus développemental post-embryonnaire qui nécessite la formation de novo des RLs à partir de cellules différenciées. La RL est issue d'une toute première étape de réactivation du péricycle qui correspond à une compétence mitotique (c'est-à-dire à une « remise en route » du cycle cellulaire). Le péricycle est composé de deux types cellulaires, déterminés par leur position autour du cylindre central : les cellules du péricycle localisées aux pôles de phloème sont complètement différenciées et ne peuvent plus rentrer dans le cycle cellulaire, tandis que celles localisées aux pôles de protoxylème sont maintenues dans un état pré-mitotique (G2 du cycle cellulaire) leur permettant de se diviser rapidement (Parizot *et al.*, 2008). Ce maintien de la compétence mitotique permet à un petit groupe de cellules du péricycle de se diviser et de se différencier pour former la RL. La formation des RLs a été décrite au niveau anatomique par Malamy et Benfey (1997) et



**Figure I.7 :** Représentation schématique des 8 Stades développementaux de la formation du primordium de racine latérale (PRLs) chez *Arabidopsis thaliana*.

L'auxine (représenté en rouge) est le signal précurseur de la formation des PRLs. **Stade I.** L'initiation de la racine débute avec une première division asymétrique et produit 2 petites cellules centrales flanquées de 2 cellules plus larges. **Stade II.** Les cellules produites se divisent à leur tour pour former une couche externe et une couche interne. **Stade III – IV.** De nouveaux cycles de divisions se succèdent pour former un dôme à quatre couches cellulaires, qui perce l'endoderme. **Stade V.** Le PRL est formé et traverse le cortex. **Stade VI – VII.** Le PRL se distingue de la racine primaire et s'organise. **Stade VIII.** Le PRL est totalement formé et émerge de l'épiderme de la racine primaire pour donner naissance à une RL. (D'après De Smet et al., 2015).

## Chapitre I

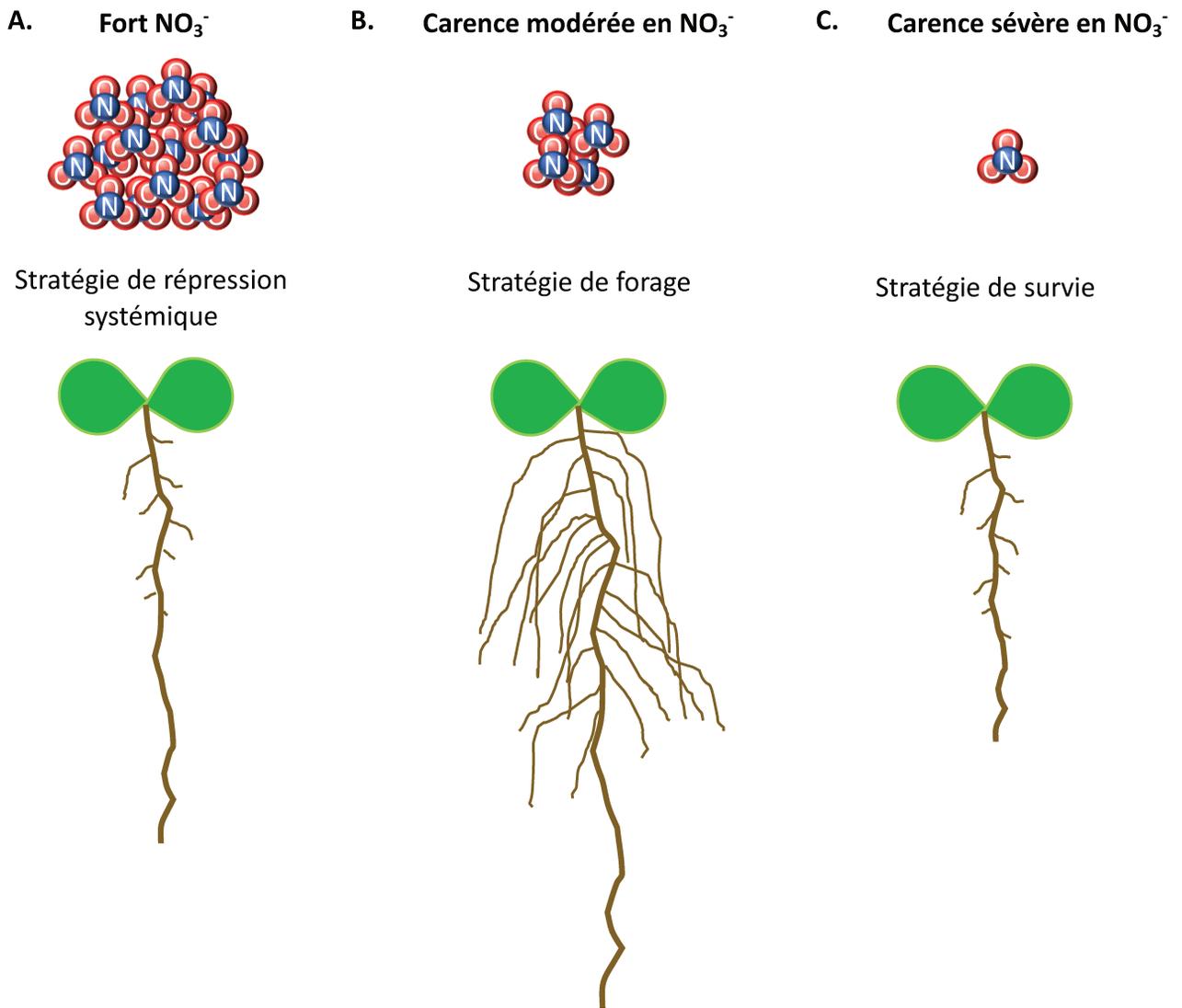
comprend huit stades (Figure I.7). Le stade I se définit comme les premières divisions anticlines se produisant dans le péricycle (Casimiro *et al.*, 2003). Le stade II correspond à des divisions périclines qui permettent au péricycle de se séparer en deux sous-couches interne et externe. Une troisième et quatrième sous-couche résultent de divisions périclines supplémentaires (Stade III et IV). L'ensemble de ces cellules constitue le primordium de RL (PRL) qui prend un aspect bombé et commence à traverser l'endoderme. Au cours du stade V, le PRL acquiert un nouveau méristème apical racinaire (MAR) similaire à celui de la racine primaire et essentiel à la croissance de la RL après émergence. Enfin, le PRL traverse les différentes couches cellulaires pour donner naissance à une RL émergée (stade VI – VIII) (Goh *et al.*, 2016). Tout au long de sa progression, le PRL se développe sous la pression mécanique des tissus environnants. Lors de l'initiation de la RL, les cellules présentes autour du PRL néo-synthétisé, s'adaptent et réorganisent activement leur propriété afin de laisser place à l'apparition d'un nouvel organe (Lucas *et al.*, 2013). Au cours de son émergence, le PRL est confronté à de nombreuses barrières tissulaires (endodermiques, corticales et épidermiques), conduisant à des interactions biomécaniques entre ces tissus et le primordium (Swarup *et al.*, 2008).

### 2) *Le NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et sa place dans la régulation du RSA*

Compte tenu de la forte mobilité du NO<sub>3</sub><sup>-</sup> dans le sol et de sa quantité limitée disponible dans une zone de sol donnée, l'effet du NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sur le développement des RLs est complexe puisqu'il repose à la fois sur sa concentration et sa distribution très fluctuante. Une étude récente montre que différents traits racinaires peuvent répondre de manière différente aux carences en nutriments et qu'ils présentent une sensibilité dose-dépendante en fonction de la carence imposée, ce qui peut prêter à confusion lorsque l'on compare des résultats issus de différentes études (Gruber *et al.*, 2013). Dans ce qui suit, nous détaillons les mécanismes de signalisation du NO<sub>3</sub><sup>-</sup> qui régulent le développement des RLs en réponse à des niveaux variables d'alimentation en NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figure I.8).

#### a) *Effet répressif des fortes teneurs en NO<sub>3</sub><sup>-</sup> : une stratégie de répression systémique*

Lorsque les conditions en NO<sub>3</sub><sup>-</sup> externe sont plus que suffisantes (>10 mM), les plantes mettent en place une répression systémique du développement des racines latérales (Zhang *et al.*, 1999) (Figure I.8A). Un des mécanismes pouvant expliquer cet effet inhibiteur des fortes concentrations en NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sur le développement des RLs fait intervenir des acteurs de la voie de



**Figure I.8 : Effet du  $\text{NO}_3^-$  sur l'architecture du système racinaire.**

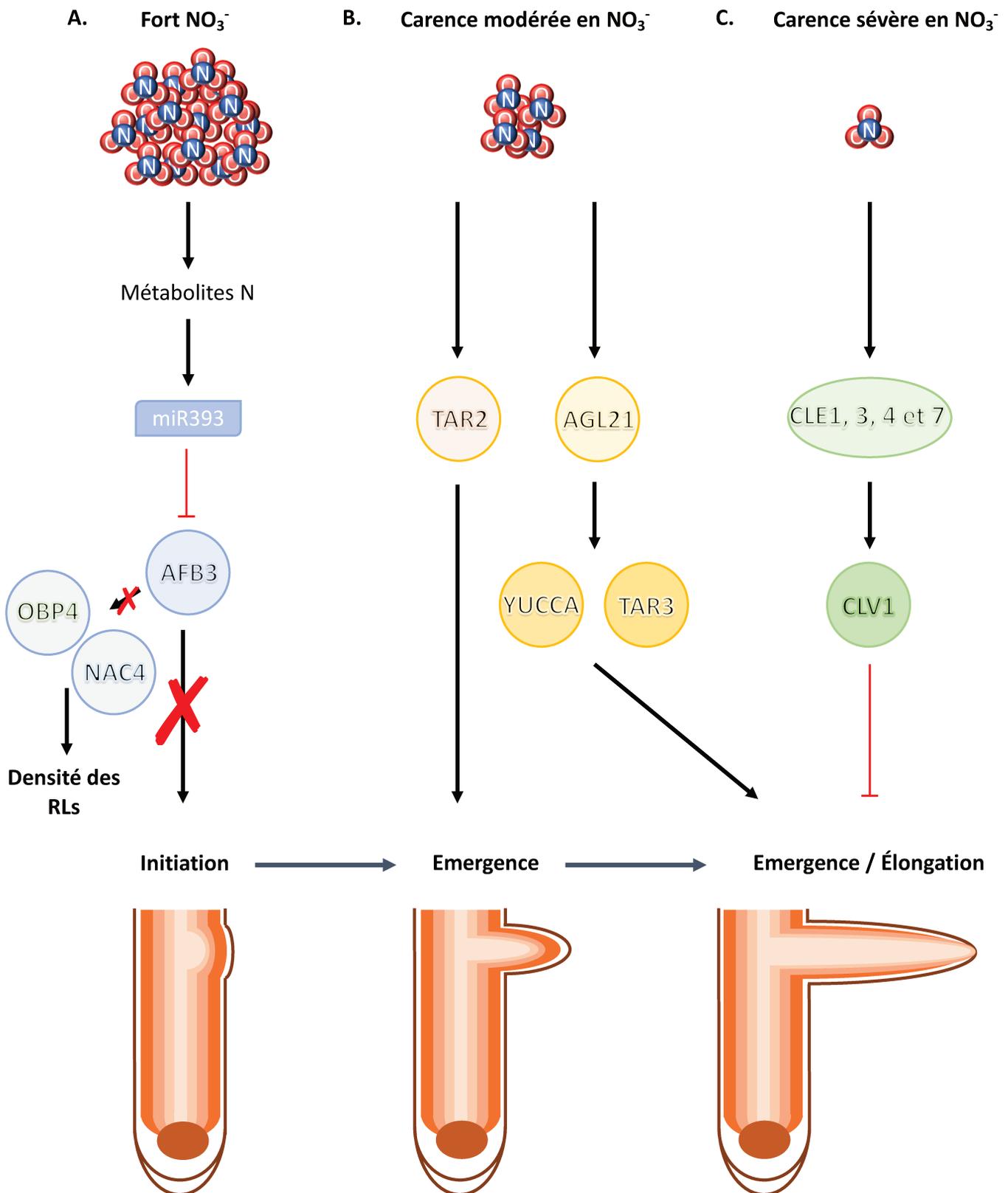
Selon les concentrations externes en  $\text{NO}_3^-$ , les plantes développent différentes stratégies pour optimiser leur croissance racinaire. **A.** En excès de  $\text{NO}_3^-$  ( $> 10 \text{ mM}$ ), les plantes répriment leur développement racinaire via une voie de signalisation systémique. **B.** En condition de carence modérée en  $\text{NO}_3^-$ , les plantes développent leur système racinaire pour augmenter le volume de sol qu'elles explorent. **C.** En situation de carence sévère en  $\text{NO}_3^-$ , les plantes adoptent une stratégie de survie en inhibant le développement de leurs racines. (D'après Giehl et von Wirén et al., 2014).

## Chapitre I

signalisation de l'auxine (Figure I.9A). Des travaux menés sur le récepteur AUXIN SIGNALING F-BOX3 (AFB3) et sur miR393 montrent que ce module régule l'initiation des RLs en réponse au  $\text{NO}_3^-$  (Vidal *et al.*, 2010). Les résultats de cette étude indiquent que si *AFB3* est fortement induit par le  $\text{NO}_3^-$ , l'expression de la protéine est ensuite réprimée par l'action de miR393 qui clive ses transcrits. La production de métabolites azotés (après réduction et assimilation du  $\text{NO}_3^-$ ) provoque l'augmentation des niveaux miR393 matures. Ces derniers régulent négativement (par une boucle de rétrocontrôle négative) les niveaux de transcrits de *AFB3*, menant à la répression de l'initiation des RLs en fonction des conditions externes en  $\text{NO}_3^-$  et du statut N des plantes. D'autres études ont permis d'étendre cette voie par la découverte de deux facteurs de transcription NAC4 et OBP4, induits en réponse au  $\text{NO}_3^-$  (Vidal *et al.*, 2013). Dans le péricycle, *AFB3* permet l'activation de NAC4 et OBP4 pour réguler la densité des RLs. Récemment, il a été mis en évidence que le facteur de transcription OBP4 régule négativement *XTH9*. Ce dernier code une xyloglucane endotransglucosilase (XTH) qui joue un rôle essentiel dans les parois cellulaires et qui par conséquent régule la densité des LRs (Xu and Cai, 2019).

### *b) Effet stimulateur d'une carence modérée en azote : une stratégie de forage*

Lorsque le  $\text{NO}_3^-$  devient limitant dans le sol (< 1 mM), les plantes développent une stratégie d'exploration du sol en stimulant l'émergence et la croissance en longueur des RLs (Figure I.8B). Deux études montrent que cette stratégie repose sur l'induction de la biosynthèse d'auxine afin d'assurer un développement précoce des PRLs (Figure I.9B). La première étude montre que l'effet stimulateur d'une carence modérée en N sur la formation des racines latérales fait intervenir le gène *TAR2* (*tryptophan aminotransferase related 2*) codant pour une enzyme de la voie de biosynthèse de l'auxine L-Tryptophane (L-Trp) dépendante. Celui-ci est exprimé au niveau du péricycle et du système vasculaire de la racine primaire et son expression est stimulée dans des conditions de faible azote, permettant ainsi une accumulation d'auxine dans les PRLs en développement. Les mutants nuls *tar2c* présentent une diminution du nombre de LRs visibles dont la longueur moyenne est plus courte. Inversement, la surexpression de *TAR2* augmente le nombre de racines latérales en condition de carence modérée en N. Ainsi, ces résultats indiquent qu'une faible carence en azote conduit à une stimulation de l'émergence des LRs et que ce mécanisme est dépendant d'une biosynthèse d'auxine médiée par *TAR2* (Ma *et al.*, 2014). Un autre exemple de l'effet stimulateur des faibles concentrations en  $\text{NO}_3^-$  sur le développement des RLs provient d'une étude menée sur le facteur de transcription MADS-box



**Figure I.9 : Régulation du système racinaire en réponse au  $\text{NO}_3^-$ .**

Selon les concentrations externes, le  $\text{NO}_3^-$  régule l'ensemble des phases de développement des racines latérales. **A.** Les fortes concentrations inhibent l'initiation des RLs via le complexe AFB3/miR393, mais stimulent la densité des RLs par l'action de AFB3 et NAC4. **B.** En situation de carence modérée, le  $\text{NO}_3^-$  induit deux voies de signalisation : (i) TAR2 induit l'émergence des RLs ; (ii) AGL21 induit les enzymes YUCCA et TAR3 et ensemble ils actionnent à la fois l'étape d'émergence et d'élongation. **C.** En carence sévère en  $\text{NO}_3^-$ , l'émergence et l'élongation des RLs sont réprimés par les peptides CLE1, 3, 4 et 7 et leur récepteur CLV1.

## Chapitre I

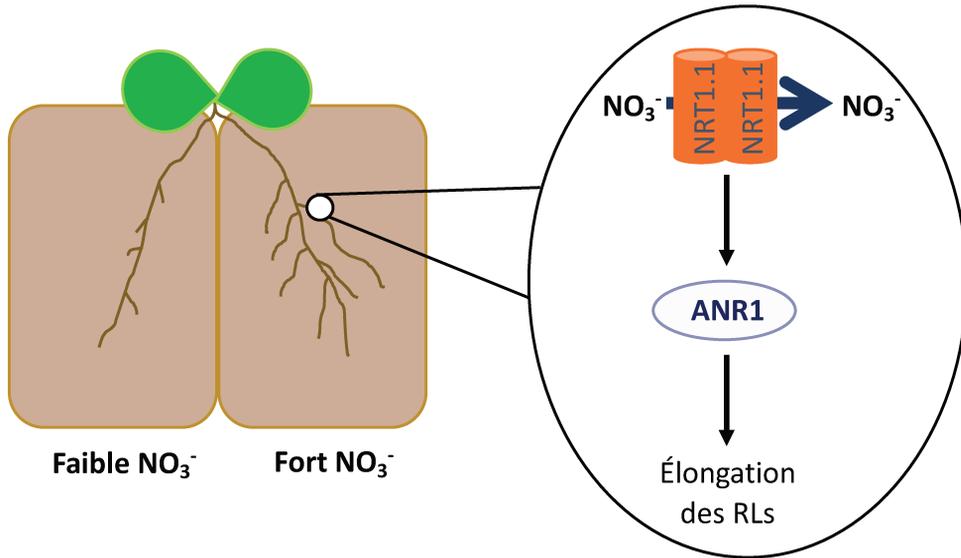
AGL21 (Agamous-Like 21). En réponse à une carence modérée en  $\text{NO}_3^-$ , les plantes mutantes *agl21* présentent des RLs plus courtes tandis que la surexpression d'*AGL21* augmente à la fois le nombre et la longueur des RLs visibles en comparaison à des plantes sauvages. Ces différents phénotypes racinaires sont respectivement corrélés à une répression ou induction des gènes *YUCCAs* (*YUC5* et *YUC8*) et *TAR3* (Tryptophan aminotransferase related 3), tous impliqués la biosynthèse d'auxine. Ces résultats suggèrent donc que AGL21 est un régulateur positif du développement des RLs en particulier au moment de l'étape d'élongation de ces dernières, en améliorant la biosynthèse locale de l'auxine dans la racine lors d'une carence modérée en  $\text{NO}_3^-$  (Yu *et al.*, 2014).

### c) Effet inhibiteur d'une carence sévère en azote : une stratégie de survie

En cas de carence sévère en  $\text{NO}_3^-$  dans le sol ( $\leq 100 \mu\text{M}$ ), le développement et l'élongation des RLs sont réprimés chez les plantes (Figure I.8C). Cette stratégie dite de « survie » permet aux plantes de ne pas mobiliser leurs ressources pour coloniser inutilement une zone du sol impropre à leur nutrition, et pour au contraire les réserver à l'exploitation d'autres zones où le  $\text{NO}_3^-$  est en concentration suffisante (Gruber *et al.*, 2013).

Un mécanisme d'inhibition du développement des RL a été identifié (Figure I.9C). Il fait intervenir une famille de petits peptides de signalisation : la famille CLAVATA 3 EMBRYO SURROUNDING REGION RELATED (CLE). Ces CLE sont de petits peptides de 12 à 13 acides aminés capables de se lier à des récepteurs kinases de type LRR-RLK CLAVATA1 (CLV1) pour contrôler le développement des plantes à différents stades notamment au niveau de la maintenance du méristème apical caulinaire. Une étude récente démontre leur rôle dans le développement du RSA en réponse à une carence sévère en  $\text{NO}_3^-$  (Araya *et al.*, 2014). Dans ces conditions, le gène *CLE3* (en plus de *CLE1*, *CLE4* et *CLE7*) est induit au niveau des tissus vasculaires. De petits peptides *CLE3* sont alors produits et sécrétés au niveau du péricycle et se lient à leur récepteur CLV1 exprimé au niveau des cellules compagnes du phloème. Ce module de signalisation composé des peptides CLE et du récepteur CLV1 réprime alors spécifiquement la croissance et l'émergence des PRLs (mais non l'initiation des LRs) sous carence sévère en N. Par conséquent, la surexpression des CLE réprime la croissance des PRLs ainsi que leur émergence hors de la racine primaire alors qu'à l'inverse, le mutant *clv1* présente une augmentation de la croissance de ses LRs (Araya *et al.*, 2014).

## Stratégie d'exploitation du $\text{NO}_3^-$ dans le sol



**Figure I.10 :** Illustration schématique de la réponse du développement des RLs à un apport localisé de  $\text{NO}_3^-$ .

Bien qu'un apport de  $\text{NO}_3^-$  à concentration élevée sur l'ensemble du système racinaire aboutisse à une répression du développement des RLs (voir Figure I.8), c'est l'inverse qui est observé si cet apport est localisé sur une petite partie seulement du système racinaire. Ceci révèle que le  $\text{NO}_3^-$  a un effet stimulateur local sur le développement des RLs, qui dépend de NRT1.1 et ANR1. Cet effet est contrebalancé en situation d'apport homogène car le prélèvement de grandes quantités de  $\text{NO}_3^-$  par l'ensemble du système racinaire active la répression systémique, ce qui n'est pas le cas lorsque seule une petite partie des racines peut assurer ce prélèvement (D'après Mounier et al., 2014).

## Chapitre I

Par ailleurs, de nombreuses études montrent que les premiers acteurs capables de moduler le RSA en réponse à une carence prolongée en  $\text{NO}_3^-$  sont les transporteurs NRT1.1 et NRT2.1. Grâce à leur double fonction de transporteur/senseur, ces deux protéines peuvent contrôler le développement des racines latérales en l'absence de  $\text{NO}_3^-$  ou à très faible concentration. Dans ces conditions, NRT2.1 agirait en tant que senseur de  $\text{NO}_3^-$ , pour réprimer l'initiation des RLs indépendamment de sa fonction de transport de  $\text{NO}_3^-$  (Little *et al.*, 2005). Le mécanisme d'action de NRT2.1 reste cependant inconnu. A l'inverse, le rôle de NRT1.1 dans la régulation du développement racinaire a été considérablement plus étudié, notamment dans l'équipe qui a proposé un modèle de mécanisme d'action. L'approfondissement de ce modèle a été un objectif majeur du travail de cette thèse, et les éléments bibliographiques concernant le rôle de senseur joué par NRT1.1 ont donc été traités en détail dans la partie IV de ce chapitre (ci-dessous).

### *d) Effet stimulateur local du $\text{NO}_3^-$ : une stratégie d'exploitation des ressources du sol*

Les données exposées dans les paragraphes précédents correspondent à ce qui est observé en réponse à différents niveaux de nutrition N (carence sévère, carence modérée, nutrition abondante) appliqués de manière homogène à tout le système racinaire. Elles illustrent l'effet « dual » du  $\text{NO}_3^-$  sur le développement des RLs, soit stimulateur (carence modérée vs carence sévère), soit inhibiteur (fortes concentrations vs carence modérée). Cependant, la disponibilité du  $\text{NO}_3^-$  dans le sol est rarement homogène. En réponse à une distribution hétérogène du  $\text{NO}_3^-$ , la plupart des plantes sont capables de rediriger préférentiellement la croissance de leurs RLs vers des zones plus riches en  $\text{NO}_3^-$  (Giehl *et al.*, 2012). Ainsi, des RLs au contact d'une concentration locale élevée en  $\text{NO}_3^-$  peuvent augmenter fortement leur croissance si le reste du système racinaire en est privé (Figure I.10). Ceci illustre encore l'effet « dual » du  $\text{NO}_3^-$  : (i) un effet stimulateur associé à un apport localisé en  $\text{NO}_3^-$ , la prolifération des RLs dans le sol se produit là où le  $\text{NO}_3^-$  est présent et (ii) un effet répresseur faisant intervenir une régulation systémique, majoritairement contrôlée par le statut N de la plante entière (voir 2a ci-dessus). Chez *Arabidopsis*, une application locale de  $\text{NO}_3^-$  en forte concentration provoque une élévation des RLs. En revanche, chez d'autres espèces végétales cultivées comme le maïs, l'orge ou encore le riz, une série d'expériences ont démontré que l'approvisionnement local en  $\text{NO}_3^-$  peut considérablement stimuler la production de racines latérales (densité des RLs et longueur moyenne) (Yu *et al.*, 2015 ; Zhang *et al.*, 1999). Un des premiers acteurs moléculaires identifiés dans cette voie de signalisation est le facteur de transcription ANR1 de la famille des MADS-BOX. Positionné en aval de NRT1.1, ANR1 agit comme un régulateur positif de



## Chapitre I

l'élongation des RLs (Remans *et al.*, 2006). De plus, des études menées sur le riz indiquent que miR444a participe à la croissance des RLs en régulant l'expression des homologues d'ANR1 (Yan *et al.*, 2014). En utilisant un système de split root, Mounier *et al.*, (2014) suggèrent que NRT1.1 est un déterminant majeur de la colonisation préférentielle des RLs des zones riches en  $\text{NO}_3^-$  en empêchant à la fois la croissance des RLs en réponse à une faible teneur en  $\text{NO}_3^-$ , grâce à son rôle dans le transport d'auxine (voir ci-dessous, partie IV de ce chapitre), et en stimulant la croissance des RLs en réponse à une forte teneur en  $\text{NO}_3^-$ , grâce à un mécanisme encore non caractérisé.

### IV. NRT1.1, un acteur majeur de la signalisation $\text{NO}_3^-$

NRT1.1 a été initialement caractérisé comme un classique transporteur membranaire impliqué dans l'absorption racinaire du  $\text{NO}_3^-$  (Huang *et al.*, 1996 ; Tsay *et al.*, 1993), avec toutefois la particularité d'avoir une double affinité pour son substrat (Liu and Tsay, 2003). Cependant, des analyses plus poussées des mutants déficients pour NRT1.1 (mutants *chl1*) ont révélé à partir du début des années 2000, des phénotypes qui s'expliquaient difficilement par une simple perte d'activité de transport de  $\text{NO}_3^-$  (Guo *et al.*, 2001 ; Munos *et al.*, 2004). Premièrement, ces mutants présentaient des phénotypes en l'absence de  $\text{NO}_3^-$  dans le milieu extérieur, ce qui indiquait une fonction pour NRT1.1 indépendante du  $\text{NO}_3^-$  (Guo *et al.*, 2001 ; Hachiya *et al.*, 2011 ; Krouk *et al.*, 2010b). Deuxièmement, ces mutants présentaient des modifications des réponses de la plante au  $\text{NO}_3^-$  davantage imputables à une altération des voies de signalisation qu'à un défaut d'absorption (Alboresi *et al.*, 2005 ; Krouk *et al.*, 2006 ; Munos *et al.*, 2004 ; Remans *et al.*, 2006). Ainsi a émergé l'hypothèse que NRT1.1 n'était pas qu'un simple transporteur membranaire, mais jouait en fait un double rôle de transport/signalisation (Krouk *et al.*, 2006 ; Munos *et al.*, 2004 ; Remans *et al.*, 2006). Par analogie à ce qui était déjà décrit à l'époque chez la levure pour ce type de protéine à fonction duale (Holsbeeks *et al.*, 2004), il a été proposé que NRT1.1 soit en fait un « transcepteur » pour le  $\text{NO}_3^-$  (transporteur/récepteur) (Gojon *et al.*, 2011).

Depuis, cette hypothèse a été largement confirmée par de nombreux travaux de différentes équipes, qui étayaient la conclusion que NRT1.1 est un acteur majeur des voies de signalisation du  $\text{NO}_3^-$  chez *Arabidopsis*, notamment en jouant un rôle de senseur de  $\text{NO}_3^-$  activant les cascades de transduction du signal. De fait, NRT1.1 gouverne toute une palette de réponses de la plante au  $\text{NO}_3^-$ , qui comprend : la PNR (Ho *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2009), la SNR (Bouguyon *et*



## Chapitre I

*al.*, 2015 ; Munos *et al.*, 2004) ; la germination (Alboresi *et al.*, 2005), le développement de la racine primaire (Walch-Liu and Forde, 2008), celui des RLs (Krouk *et al.*, 2010b ; Remans *et al.*, 2006 ; Zhang *et al.*, 2019), et la floraison (Teng *et al.*, 2019). En conséquence, l'étude des mécanismes de la signalisation NO<sub>3</sub><sup>-</sup> médiée par NRT1.1 chez *A.thaliana* est devenue un domaine de recherche très actif, et la littérature à ce sujet est de plus en plus abondante (>100 publications référencées dans WoS depuis 2010). L'analyse de l'ensemble de cette littérature dépasse largement le cadre de ce chapitre d'introduction bibliographique. Cependant, au vu de l'évolution rapide des connaissances, il nous a paru important d'en faire la synthèse sur les aspects qui concernent le sujet de cette thèse, à savoir le rôle de NRT1.1 dans les signalisations des réponses fonctionnelles et surtout développementales des racines au NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, telles que décrites dans les parties précédentes de ce chapitre. Ceci a été fait de deux manières : (i) un article de revue (Maghiaoui *et al.*, 2020b) : NRT1.1-centered nitrate signaling in plants, publié en août 2020 dans *Journal of Experimental Botany*), qui détaille les développements les plus récents à ce sujet (l'article est inclus en fin de chapitre), et (ii) le texte ci-dessous, qui présente les grandes lignes de ce rôle de NRT1.1 (sans les détailler autant que dans l'article), en se focalisant sur les points nécessaires à la compréhension du travail de la thèse.

Du point de vue historique, la première indication d'une autre fonction de NRT1.1 que celle du transport de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> provient d'une analyse phénotypique de mutants *chl1* réalisée par l'équipe du Prof. N. Crawford (University of California, San Diego, USA), montrant des altérations du développement des jeunes organes (racines, feuilles, boutons floraux) même lorsque le NO<sub>3</sub><sup>-</sup> n'est pas présent dans le milieu (Guo *et al.*, 2001). Par la suite, les deux premiers articles introduisant l'hypothèse d'un rôle de signalisation de NRT1.1 ont été le fruit du travail de l'équipe, et ont montré que les mutants *chl1* présentaient un défaut de régulation de l'accumulation des transcrits *NRT2.1* en conditions répressives en NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (SNR) (Munos *et al.*, 2004), et de régulation du développement des RLs (perte de la stimulation locale de ce développement par le NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (Remans *et al.*, 2006). Enfin, l'implication de NRT1.1 dans la PNR a été démontrée conjointement par les équipes du Prof N. Crawford (Wang *et al.*, 2009) et du Dr. Y-F Tsay (Academia Sinica, Taipei, Taiwan) (Ho *et al.*, 2009).

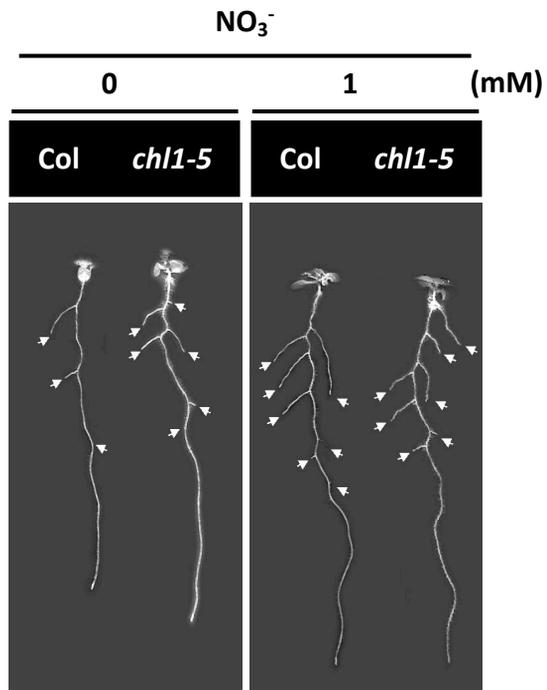
En ce qui concerne la PNR, l'inactivation du gène *NRT1.1* entraîne une forte atténuation de l'induction par le NO<sub>3</sub><sup>-</sup> de nombreux gènes associés à l'absorption et à l'assimilation du NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, comme *NRT2.1*, *NRT2.2*, *NIA1* et *NiR* (Ho *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2009), ou aux voies de signalisation de la PNR elle-même, comme *TGA1* et *TGA4* (Alvarez *et al.*, 2014). La



## Chapitre I

démonstration que le rôle de senseur de NRT1.1 est indépendant de sa fonction de transporteur a été apportée par le mutant *chl1-9*. Chez *chl1-9*, le gène *NRT1.1* est affecté par une mutation ponctuelle qui entraîne la substitution dans la protéine de la Proline 492 en Leucine (P492L). Cette substitution supprime la capacité de NRT1.1 à transporter le  $\text{NO}_3^-$ , mais n'affecte pas sa capacité à activer la PNR (Ho *et al.*, 2009). Malgré cette preuve objective de la fonction de signalisation de NRT1.1, son action sur la PNR est loin d'être simple et reste encore largement incomprise. Premièrement, la PNR ne requiert pas toujours NRT1.1. Elle en dépend lorsque l'apport du  $\text{NO}_3^-$  est réalisé sur des plantes préalablement cultivées sur  $\text{NH}_4^+$ , mais pas sur des plantes préalablement carencées en N (Muños *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2009). Deuxièmement, les altérations observées chez les mutants *chl1* correspondent davantage à un ralentissement plutôt qu'à une suppression totale de la PNR. Par exemple, *NRT2.1* finit par être induit de manière quasi-complète chez *chl1-5* après plusieurs jours de culture sur  $\text{NO}_3^-$  (Muños *et al.*, 2004). Ces observations révèlent l'existence d'autres senseurs de  $\text{NO}_3^-$ , capables de pallier à l'absence de NRT1.1 dans certaines conditions. Troisièmement, NRT1.1 active la PNR de manière dépendante de la concentration externe en  $\text{NO}_3^-$ , mais avec une cinétique bi-phasique similaire à celle de son activité de transport (Ho *et al.*, 2009). L'activation par NRT1.1 de la PNR à faible ou forte affinité pour  $\text{NO}_3^-$  dépend de la phosphorylation de son résidu Thréonine 101 (Ho *et al.*, 2009). À faible concentration de  $\text{NO}_3^-$ , le complexe CBL1/9-CIPK23 phosphoryle NRT1.1, qui n'est alors capable d'activer qu'une faible induction du gène *NRT2.1*. Par contre, pour des concentrations plus élevées en  $\text{NO}_3^-$ , NRT1.1 n'est pas phosphorylé, et active une forte induction de *NRT2.1*. Quatrièmement, le gène *NRT1.1* est lui-même une cible de la PNR, puisqu'il est inductible par le  $\text{NO}_3^-$  (Tsay *et al.*, 1993), ce qui le met au centre d'un réseau dynamique complexe de régulations positives et négatives (voir l'article de revue Maghiaoui *et al.*, 2020b).

Les mécanismes par lesquels NRT1.1 active l'action des autres régulateurs clés de la PNR (CPK10, CPK30, CPK32, NLP6, NLP7, TGA1, TGA4) restent largement inconnus. NRT1.1 semble toutefois agir à un niveau très amont dans la voie de signalisation, puisque sa mutation prévient les augmentations des concentrations cytoplasmiques d'inositol 1,4,5 triphosphate et de  $\text{Ca}^{2+}$ , considérées comme des étapes initiales de la PNR (Riveras *et al.*, 2015). Cependant, il existe aussi une voie indépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  mais toujours dépendante de NRT1.1, qui est notamment responsable de l'induction des gènes du récepteur d'auxine AFB3 et des facteurs de transcription NAC4 et OFB4, impliqués dans la régulation du développement racinaire (Vidal *et al.*, 2010). De manière inattendue, une étude récente chez le riz (Hu *et al.*, 2019) a



**Figure I.11 :** Phénotype de réponse racinaire au NO<sub>3</sub><sup>-</sup> du mutant *chl1-5* en comparaison à la plante sauvage.

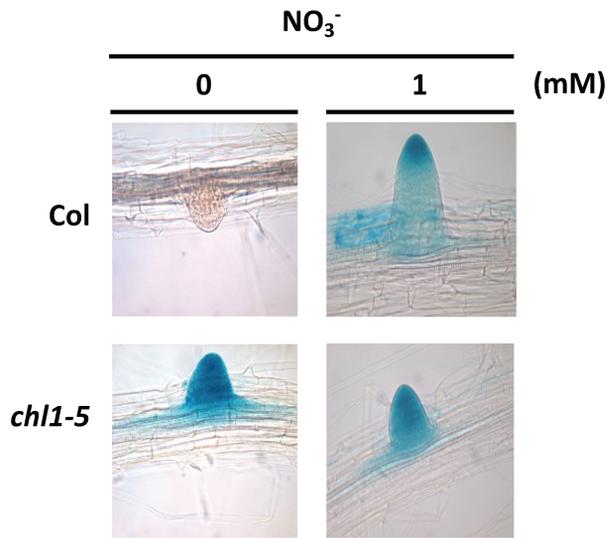
(D'après Krouk et al., 2010b).

## Chapitre I

amené des hypothèses totalement différentes en ce qui concerne le mode d'action d'OsNRT1.1B (l'orthologue présumé de NRT1.1) dans la PNR, qui font appel à une interaction entre OsNRT1.1B et OsSPX4, le régulateur central de la signalisation phosphate chez cette espèce (voir l'article de revue Maghiaoui *et al.*, 2020b).

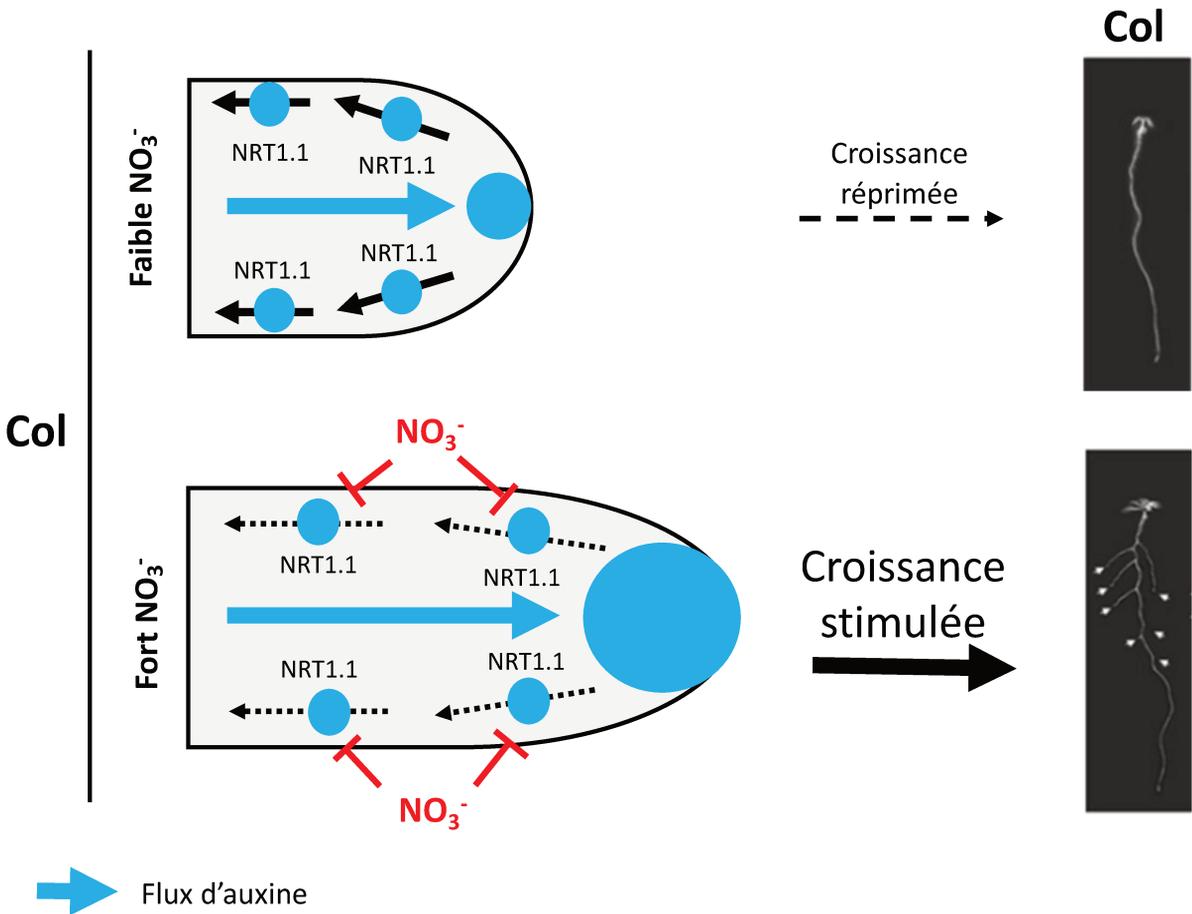
En ce qui concerne la SNR, l'implication de NRT1.1 est surtout documentée pour la répression à long terme de *NRT2.1* par les concentrations élevées de  $\text{NO}_3^-$ . Cette répression est totalement supprimée de manière durable chez les mutants *chl1*, même pour des conditions très répressives (Bouguyon *et al.*, 2015 ; Munos *et al.*, 2004). L'effet de NRT1.1 est local (uniquement dans les racines au contact de concentrations élevées de  $\text{NO}_3^-$ ) (Krouk *et al.*, 2006), ce qui confirme que son action répressive passe par la SNR, et probablement pas par la signalisation systémique dépendante des CEPs. Les mécanismes d'action de NRT1.1 sont là aussi inconnus. Cependant, la mutation de *NRT1.1* pénalise l'induction par le  $\text{NO}_3^-$  des gènes *LBD39*, *NIGT1.3* et *NIGT1.4* (Bouguyon *et al.*, 2015 ; Medici *et al.*, 2015). Ceci suggère que la SNR pourrait être inhibée pour *NRT2.1* chez les mutants *chl1* parce que l'absence de NRT1.1 prévient l'induction PNR-dépendante des gènes codant les répresseurs de *NRT2.1*.

En ce qui concerne la régulation du développement racinaire par le  $\text{NO}_3^-$ , NRT1.1 joue un rôle essentiel dans la réponse locale au  $\text{NO}_3^-$ , qui stimule spécifiquement le développement des RLs suite à un apport localisé de  $\text{NO}_3^-$  (Remans *et al.*, 2006). Ainsi, les mutants *chl1* ont perdu une partie de leur capacité à faire croître de manière privilégiée leurs RLs dans les zones du milieu où le  $\text{NO}_3^-$  est abondant (Remans *et al.*, 2006). L'analyse de ce phénotype a révélé que l'action de NRT1.1 est en fait de réprimer le développement des RLs en l'absence ou à faible concentration (<0,5 mM) de  $\text{NO}_3^-$  (Krouk *et al.*, 2010b). Ceci positionne donc NRT1.1 comme un acteur de l'inhibition observée en réponse à une carence sévère (voir ci-dessus). La répression exercée par NRT1.1 est évidemment levée chez les mutants *chl1*, qui présentent donc une densité de RLs fortement augmentée par rapport au sauvage sur milieu sans  $\text{NO}_3^-$  (Figure I.11), et un développement homogène des RLs dans les différentes zones du milieu, qu'elles soient riches ou non en  $\text{NO}_3^-$ . Cette répression est également levée chez les plantes sauvages alimentées avec une concentration suffisamment élevée en  $\text{NO}_3^-$  (1 mM), ce qui explique l'effet stimulateur du  $\text{NO}_3^-$  sur le développement des RLs (Figure I.11, comparer aussi Figures I.8B et I.8C). NRT1.1 intervient à un stade précoce du développement des RLs, avant l'émergence des PRLs (Krouk *et al.*, 2010b). Son effet inhibiteur s'explique par le fait que NRT1.1 exerce un contrôle sur l'action de l'auxine dans les PRLs pré-émergés, en y empêchant l'accumulation de



**Figure I.12 : Effet de la mutation de *NRT1.1* sur l'accumulation d'auxine dans les PRLs.**

Visualisation du gradient d'auxine dans les PRLs par coloration histochimique de l'activité GUS chez des lignées exprimant *DR5::GUS* dans le fond génétique sauvage Col ou mutant *chl1-5* en réponse au  $\text{NO}_3^-$  (D'après Krouk et al., 2010b).



**Figure I.13 : Modèle du contrôle du développement des RLs par *NRT1.1* en réponse au  $\text{NO}_3^-$ .**

En condition de faible  $\text{NO}_3^-$  ( $\ll 1$  mM), *NRT1.1* réprime le développement des PRLs en favorisant le transport basipète d'auxine hors de ces PRLs, empêchant ainsi son accumulation au niveau de l'apex. À l'inverse, la présence de  $\text{NO}_3^-$  ( $\sim 1$  mM) dans le milieu inhibe le transport d'auxine par *NRT1.1*, conduisant à son accumulation à l'extrémité du PRL et par conséquent à la stimulation de la croissance du PRL. (D'après Krouk et al., 2010b).

## Chapitre I

l'hormone en l'absence, mais pas en présence de  $\text{NO}_3^-$  (Figure I.12). De manière inattendue, l'utilisation de systèmes d'expression hétérologue (levure, cellules BY2 ou ovocytes de *Xénope*) et l'analyse *in planta* ont permis de montrer qu'en absence ou à faible concentration de  $\text{NO}_3^-$ , NRT1.1 est capable de réaliser un influx d'auxine en plus de celui du  $\text{NO}_3^-$ , et que cette activité de transport d'auxine est inhibée par le  $\text{NO}_3^-$  de manière concentration dépendante (Bouguyon *et al.*, 2015 ; Krouk *et al.*, 2010b ; Wei *et al.*, 2018 ; Zhang *et al.*, 2019). Or, NRT1.1 est exprimé dans les PRLs, et sa localisation tissulaire y correspond au trajet du transport basipète d'auxine vers la racine primaire (Benková *et al.*, 2003 ; Krouk *et al.*, 2010b), suggérant qu'il participe au retrait plutôt qu'à l'accumulation d'auxine dans le PRL. L'ensemble de ces observations a abouti à la proposition d'un modèle expliquant l'effet stimulateur du  $\text{NO}_3^-$  sur le développement des PRLs (Krouk *et al.*, 2010b). Ce modèle (Figure I.13) postule qu'en absence ou à faible concentration externe en  $\text{NO}_3^-$ , NRT1.1 transporte l'auxine hors des PRLs, et en freine ainsi le développement. À concentration élevée de  $\text{NO}_3^-$ , le transport d'auxine par NRT1.1 est réprimé, ce qui permet à l'hormone de s'accumuler dans les PRLs et d'en stimuler le développement. Ce modèle propose donc un mécanisme pour l'action de senseur de  $\text{NO}_3^-$  de NRT1.1, puisqu'il explicite comment cette protéine transforme une modification de concentration externe en  $\text{NO}_3^-$  en une modification d'un signal endogène : l'auxine. D'autres travaux ont fortement conforté ce modèle, et appuyé la conclusion que NRT1.1 est un régulateur clé de l'effet stimulateur du  $\text{NO}_3^-$  sur le développement des RLs (Bouguyon *et al.*, 2015 ; Bouguyon *et al.*, 2016 ; Mounier *et al.*, 2014 ; Zhang *et al.*, 2019).

Par la suite, l'analyse de l'effet de mutations ponctuelles de NRT1.1 a révélé que ces mutations n'affectent pas de la même manière les différentes réponses de la plante au  $\text{NO}_3^-$  médiées par NRT1.1 (Bouguyon *et al.*, 2015). Par exemple, si la substitution T101D, qui mime la phosphorylation constitutive de NRT1.1 par CBL1/9-CIPK23, réduit fortement la PNR dépendante de NRT1.1, elle n'empêche pas la répression du développement des PRLs exercée par NRT1.1. Au contraire, la substitution T101A, qui prévient la phosphorylation de NRT1.1, atténue fortement son effet régulateur sur le développement des PRLs mais sans affecter la PNR. Ces observations sont cohérentes avec l'effet de ces mutations sur la capacité de transport d'auxine de NRT1.1, puisque T101A réduit fortement cette capacité, alors que ce n'est pas le cas pour T101D (Bouguyon *et al.*, 2015 ; Zhang *et al.*, 2019). Ceci suggère que les formes phosphorylée et non-phosphorylée de NRT1.1 ne jouent pas les mêmes rôles de signalisation. La forme phosphorylée de NRT1.1 est responsable du transport de l'auxine et donc la régulation du développement des PRLs, alors que la forme non-phosphorylée de NRT1.1 est responsable



## Chapitre I

de la PNR. Ceci indique également que les voies de transduction activant les différentes réponses au  $\text{NO}_3^-$  en aval de NRT1.1 sont au moins en partie distinctes puisqu'elles peuvent être inactivées indépendamment les unes des autres. Ainsi, ces travaux proposent que la protéine NRT1.1 a évolué avec de multiples mécanismes de signalisation, et est une protéine multifonctionnelle capable d'activer des réponses indépendantes, en fonction des conditions externes en  $\text{NO}_3^-$ .

À cette complexité fonctionnelle s'est récemment ajoutée une complexité des mécanismes de régulation de NRT1.1 au niveau post-transcriptionnel. Outre l'effet majeur de la phosphorylation du résidu T101 décrit ci-dessus, l'utilisation de protéines fusion NRT1.1-GFP et NRT1.1-mCherry, exprimées respectivement sous le contrôle du promoteur endogène (inductible par le  $\text{NO}_3^-$ ) ou d'un promoteur inductible à l'œstradiol (mais insensible au  $\text{NO}_3^-$ ), a montré dans les deux cas que l'abondance de la protéine NRT1.1 est réprimée par le  $\text{NO}_3^-$  dans les PRLs (Bouguyon *et al.*, 2016). En effet, en l'absence de  $\text{NO}_3^-$ , NRT1.1 est présente dans les PRLs dès un stade précoce de développement (stade IV-V), alors qu'elle n'y apparaît qu'après le stade VIII (émergence) en présence de  $\text{NO}_3^-$  (Figure I.14). Ainsi, dans les PRLs, la régulation post-transcriptionnelle de NRT1.1 s'oppose à celle transcriptionnelle du gène, indiquant que le  $\text{NO}_3^-$  stimule le développement de ces PRLs non seulement en réprimant l'activité de transport d'auxine de NRT1.1, mais aussi en retardant son expression (Figure I.15). À l'inverse, la régulation post-transcriptionnelle de NRT1.1 dans l'épiderme et le cortex de la racine primaire correspond à une stimulation de l'expression de la protéine NRT1.1 par le  $\text{NO}_3^-$ , qui va dans le même sens que la régulation transcriptionnelle (Bouguyon *et al.*, 2016). Le fait que la régulation post-transcriptionnelle de NRT1.1 par le  $\text{NO}_3^-$  ait des effets opposés dans des tissus pourtant adjacents (PRLs et épiderme/cortex) a très certainement une forte signification fonctionnelle. L'effet négatif du  $\text{NO}_3^-$  sur l'expression de la protéine NRT1.1 dans les PRLs est cohérent avec l'observation que NRT1.1 y joue un rôle en l'absence ou à faible concentration de  $\text{NO}_3^-$ . De même, l'effet positif du  $\text{NO}_3^-$  dans l'épiderme et le cortex est aussi cohérent avec l'observation que NRT1.1 y joue un rôle en réponse à l'apport de  $\text{NO}_3^-$ , notamment en y induisant l'expression des gènes codant les autres transporteurs de  $\text{NO}_3^-$  via la PNR (Figure I.15). Il apparaît donc que la régulation post-transcriptionnelle de NRT1.1 module l'expression de la protéine pour assurer sa présence dans chaque tissu dans les conditions où elle y joue un rôle spécifique.



### V. Objectifs de la thèse

Les travaux antérieurs de l'équipe décrits ci-dessus ont montré que NRT1.1 joue un rôle majeur dans la régulation du développement racinaire chez *Arabidopsis thaliana*. En plus de sa fonction de transporteur de  $\text{NO}_3^-$ , NRT1.1 participe largement à la régulation du développement des PRLs en réponse au  $\text{NO}_3^-$ . Le modèle proposé par Krouk *et al.*, (2010b) met en avant la capacité de transport d'auxine de NRT1.1 comme mécanisme central de sa fonction de régulation du développement des PRLs (Figure I.13). Bien que cette capacité ait été confirmée par d'autres études ultérieures (Bouguyon *et al.*, 2015 ; Wei *et al.*, 2018 ; Zhang *et al.*, 2019), il reste surprenant que le seul transport d'auxine par NRT1.1 soit la cause unique du contrôle exercé par cette protéine sur le développement des PRLs. En effet, le trafic général d'auxine dans les PRLs est également déterminé non seulement par l'activité de nombreux autres transporteurs, mais aussi par la biosynthèse locale de l'hormone. Ainsi, le premier objectif de la thèse a été d'étudier de manière plus globale comment NRT1.1 orchestre le développement des PRLs en réponse au  $\text{NO}_3^-$ , en déterminant si cette protéine agit également de manière indirecte sur l'activité d'autres transporteurs d'auxine, ou sur celle des enzymes impliquées dans sa biosynthèse. Le travail sur la régulation des transporteurs d'auxine par NRT1.1 avait été initié par Eléonore Bouguyon, dans le cadre de sa thèse dans l'équipe. J'ai poursuivi ce travail, en y ajoutant l'étude de la voie de biosynthèse. En particulier, il a été suggéré que la régulation du développement des RLs par le  $\text{NO}_3^-$  dépendrait de la synthèse locale d'auxine médiée par l'enzyme TAR2 (Ma *et al.*, 2014). Pour poursuivre ce premier axe de la thèse, nous avons donc cherché à savoir si TAR2 est impliquée dans le modèle du développement des RLs étudié.

Par ailleurs, les résultats obtenus précédemment sur la régulation post-transcriptionnelle de l'expression de NRT1.1 mettent en avant un effet opposé du  $\text{NO}_3^-$  sur la protéine NRT1.1 en fonction des tissus racinaires (Bouguyon *et al.*, 2016). Dans l'épiderme et le cortex de la racine primaire, le  $\text{NO}_3^-$  favorise l'expression de la protéine, alors que c'est l'inverse dans les PRLs. Le second objectif de la thèse a été d'étendre l'étude de la régulation post-transcriptionnelle de NRT1.1 à d'autres tissus ou organes de la plante (parties aériennes notamment), de la compléter par une approche biochimique, et de rechercher les mécanismes impliqués. Dans ce but, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle la dynamique cellulaire de NRT1.1 (endocytose, recyclage, dégradation) puisse être affectée par le  $\text{NO}_3^-$ , pour expliquer l'effet de cet ion sur la présence ou l'absence de la protéine à la membrane plasmique, suivant les tissus considérés.



Revue :

# **NRT1.1-centered nitrate signaling in plants**

**Amel Maghiaoui, Alain Gojon, Liên Bach (2020b)**





REVIEW PAPER

# NRT1.1-centered nitrate signaling in plants

Amel Maghiaoui, Alain Gojon, and Liên Bach\*

Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes (BPMP), UMR 5004 CNRS/INRAE/SupAgro-M/UM2, Institut de Biologie Intégrative des Plantes, Place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France

\* Correspondence: [lien.bach@supagro.fr](mailto:lien.bach@supagro.fr)

Received 31 March 2020; Editorial decision 17 July 2020; Accepted 14 August 2020

Editor: Miriam Gifford, University of Warwick, UK

## Abstract

Plants need efficient nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) sensing systems and sophisticated signaling pathways to develop a wide range of adaptive responses to external fluctuations of  $\text{NO}_3^-$  supply. In *Arabidopsis thaliana*, numerous molecular regulators have been identified to participate in signaling pathways that respond specifically to  $\text{NO}_3^-$ . In contrast, only a single  $\text{NO}_3^-$  sensing system has been described to date, relying on the NRT1.1 (NPF6.3/CHL1)  $\text{NO}_3^-$  transceptor. NRT1.1 governs a wide range of responses to  $\text{NO}_3^-$ , from fast reprogramming of genome expression (the primary nitrate response) to longer-term developmental changes (effects on lateral root development). NRT1.1 appears to be at the center of a complex network of signaling pathways, involving numerous molecular players acting downstream and/or upstream of it. Interestingly, some of these regulators are involved in crosstalk with the signaling pathways of other nutrients, such as inorganic phosphate or potassium. Although NRT1.1-mediated  $\text{NO}_3^-$  sensing and signaling has mostly been documented in *Arabidopsis*, recent evidence indicates that similar mechanisms involving NRT1.1 orthologues are operative in rice. This review aims to delineate how the NRT1.1 sensing system and the downstream/upstream transduction cascades are integrated to control both the expression of  $\text{NO}_3^-$ -responsive genes and the induced plasticity of root development.

**Keywords:** Nitrate transport, NRT1.1, nutrient crosstalk, nutrient signaling, primary nitrate response, root architecture.

## Introduction

Nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) is the main source of nitrogen (N) for nutrition of most terrestrial plants (Crawford and Glass, 1998; Näsholm *et al.*, 2009). However, the  $\text{NO}_3^-$  concentration in the soil solution is highly variable (from the  $\mu\text{M}$  to the  $\text{mM}$  range) in both time and space (Miller *et al.*, 2007). As a consequence, plants display a spectacular plasticity of physiological and developmental processes that are sensitive to N, which can be very quickly reprogrammed to react to fluctuations in external  $\text{NO}_3^-$  availability (Nacry *et al.*, 2013; Kiba and Krapp, 2016; Fredes *et al.*, 2019). Many of these responses rely on sensing and signaling pathways that are specific to  $\text{NO}_3^-$ . Indeed, in addition to being a nutrient,  $\text{NO}_3^-$  is also a signal molecule that is itself perceived by the plant. The main

evidence for this is the observation that a significant proportion of the molecular, physiological, and developmental responses triggered by a change in external  $\text{NO}_3^-$  supply are unchanged in nitrate reductase null mutants as compared with the wild type (Zhang *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2004). Nitrate reductase is the first enzyme of the  $\text{NO}_3^-$  assimilation pathway; this observation thus shows that in these cases the production of downstream metabolites from  $\text{NO}_3^-$  has no importance, and that it is specifically the availability of  $\text{NO}_3^-$  that is sensed by the plant.

The processes under control by  $\text{NO}_3^-$  sensing are numerous and diverse, but two main aspects have received particular attention, namely the transcriptional reprogramming of gene

expression, and the adaptive response of the root system architecture (Nacry *et al.*, 2013; Forde, 2014; Vidal *et al.*, 2015; O'Brien *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2018a). In *Arabidopsis*,  $\text{NO}_3^-$  has been reported to regulate the expression of more than 2000 genes (nearly 10% of the genome). The effects can be extremely fast (within minutes; Varala *et al.*, 2018), and these short-term effects on gene expression are collectively referred to as the primary nitrate response (PNR) (Medici and Krouk, 2014; Zhao *et al.*, 2018a). One aim of the PNR is to enable the fast setting up of the transport and metabolic machinery necessary for the uptake and assimilation of  $\text{NO}_3^-$ . Therefore, the target genes commonly investigated in the PNR encode membrane  $\text{NO}_3^-$  transporters and assimilatory enzymes, which are generally induced within a few hours following  $\text{NO}_3^-$  supply. In the longer term (i.e. a few days), the effects of  $\text{NO}_3^-$  are not limited to the transcriptome, but also modulate plant growth and development (Nacry *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2018a; Fredes *et al.*, 2019), especially at the level of the root system, which displays a dramatic plasticity in response to  $\text{NO}_3^-$  (Forde, 2014).

The molecular mechanisms underlying the action of  $\text{NO}_3^-$  sensing and signaling systems in plants have been extensively investigated during the past 20 years, particularly in *Arabidopsis thaliana*. In this species, one of the first milestones was the identification of ANR1 (*Arabidopsis* Nitrate Regulated 1), the first transcription factor to be identified as participating in a  $\text{NO}_3^-$  signaling response, namely the regulation of lateral root elongation by  $\text{NO}_3^-$  (Zhang and Forde, 1998). Another milestone in *Arabidopsis* was the identification of the  $\text{NO}_3^-$  sensor NRT1.1 (also called NPF6.3 or CHL1) (Muños *et al.*, 2004; Remans *et al.*, 2006a; Ho *et al.*, 2009). In mutants deficient for NRT1.1 (*chl1* mutants), a large number of responses activated by  $\text{NO}_3^-$  are suppressed or strongly attenuated, including large-scale transcriptome reprogramming and modulation of the root system architecture (Gojon *et al.*, 2011; Forde, 2014; Medici and Krouk, 2014; Zhao *et al.*, 2018a). On the basis of these observations, NRT1.1 is expected to act upstream of the signaling pathways triggering these responses. More recently, many more molecular players in  $\text{NO}_3^-$  signaling have been identified in *Arabidopsis* (Gaudinier *et al.*, 2018; Varala *et al.*, 2018; Alvarez *et al.*, 2019, 2020; Brooks *et al.*, 2019). However, despite the fact that NRT1.1 (together with its OsNRT1.1A and OsNRT1.1B homologues in rice) remains the most documented  $\text{NO}_3^-$  sensor to date, its integration upstream of the complex network of signaling cascades involving all these regulators is in general not understood.

In this review, we provide an overview of recent studies on  $\text{NO}_3^-$  signaling (mostly in *Arabidopsis*) with a focus on the changes in gene expression and root development induced by  $\text{NO}_3^-$ . In addition, we aim to highlight the functional relationships between the NRT1.1 sensor and other confirmed molecular players in  $\text{NO}_3^-$  signaling acting downstream or upstream of NRT1.1. We also briefly summarize the growing evidence indicating that NRT1.1 and OsNRT1.1B also play a key role in the crosstalk between the signaling pathways of various nutrients, such as  $\text{NO}_3^-$ , inorganic phosphate (Pi), and  $\text{K}^+$ .

## NRT1.1-mediated nitrate sensing

NRT1.1 belongs to the large NPF (NITRATE PEPTIDE TRANSPORTER FAMILY) family of membrane transporters (Leran *et al.*, 2014), and was initially characterized as a low-affinity transporter located at the plasma membrane and involved in root uptake of  $\text{NO}_3^-$  (Tsay *et al.*, 1993). However, it is now considered as a pivotal  $\text{NO}_3^-$  sensor, as it governs an impressive range of responses to  $\text{NO}_3^-$ . These include the PNR and longer-term transcriptional changes, root and shoot growth and development, germination, flowering, and  $\text{NO}_3^-$ -dependent tolerance or sensitivity to various abiotic stresses, such as drought and salinity, or ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), acidic, and cadmium toxicities (Gojon *et al.*, 2011; Mao *et al.*, 2014; Fang *et al.*, 2016; O'Brien *et al.*, 2016; Álvarez-Aragón and Rodríguez-Navarro, 2017; Jian *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2018a; Teng *et al.*, 2019). Therefore, NRT1.1 has been proposed to correspond to a “transceptor” (transporter/receptor) that fulfills a dual  $\text{NO}_3^-$  transport and sensing function (Ho *et al.*, 2009; Gojon *et al.*, 2011).

Two main lines of evidence support the conclusion that NRT1.1 is not only a  $\text{NO}_3^-$  transporter but has additional functions, including a signaling role. First, *chl1* knockout mutants display phenotypes on  $\text{NO}_3^-$ -free media, indicating an action of NRT1.1 that cannot be explained by its  $\text{NO}_3^-$  transport activity. Second, responses to  $\text{NO}_3^-$  signaling mediated by NRT1.1 are either not affected by point mutations that impair the  $\text{NO}_3^-$  transport capacity of the protein or, conversely, are suppressed by point mutations that do not prevent  $\text{NO}_3^-$  transport, indicating that NRT1.1 has independent transport and signaling functions.

Two typical examples of the action of NRT1.1 in the absence of  $\text{NO}_3^-$  are the NRT1.1-dependent repression of lateral root primordium (LRP) development (Krouk *et al.*, 2010; Bouguyon *et al.*, 2015) and NRT1.1-induced  $\text{NH}_4^+$  toxicity (Hachiya *et al.*, 2010; Jian *et al.*, 2018). Indeed, *chl1* knockout mutants show strongly stimulated LRP development and an increased tolerance to high  $\text{NH}_4^+$  provision compared with the wild type when  $\text{NO}_3^-$  is absent from (or present at a very low concentration in) the medium. Interestingly, these phenotypes are lost when  $\text{NO}_3^-$  is provided to the plants at a relatively high concentration (e.g. 1 mM), which suggests that in these cases, NRT1.1 participates in the transduction of the  $\text{NO}_3^-$  signal by stopping its action in the presence of  $\text{NO}_3^-$ . At least for its role in regulating LRP development, the action of NRT1.1 in the absence of  $\text{NO}_3^-$  is explained by its direct effect on hormone (namely auxin) signaling in root tissues (Krouk *et al.*, 2010; see also details below).

By contrast, many phenotypes of *chl1* knockout mutants are observable only in the presence of  $\text{NO}_3^-$ , but these phenotypes are lost in a particular mutant, *chl1-9*, in which NRT1.1 harbors a substitution (P492L) that suppresses its root  $\text{NO}_3^-$  uptake activity (Ho *et al.*, 2009). A typical example of this is the PNR, which can be activated by NRT1.1<sup>P492L</sup> as the native protein (Ho *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). This finding suggested that NRT1.1 does not need to transport  $\text{NO}_3^-$  into the cell to transduce the  $\text{NO}_3^-$  signal, and therefore acts as a *bona fide* receptor. The reasons why the P492L substitution

prevents  $\text{NO}_3^-$  uptake by NRT1.1 are not known with certainty, but may be related to the fact that the NRT1.1<sup>P492L</sup> mutant predominantly displays intracellular localization rather than being correctly located at the plasma membrane (Bouguyon *et al.*, 2015). Thus, this also suggests that NRT1.1 does not need to be at the plasma membrane to trigger the  $\text{NO}_3^-$  signal, but can sense  $\text{NO}_3^-$  intracellularly. Another key residue of NRT1.1 involved in the modulation of its transport/signaling functions is T101, which can be phosphorylated by CIPK23 (CBL-Interacting Protein Kinase 23) in response to low  $\text{NO}_3^-$  supply (Ho *et al.*, 2009). Phosphorylation of T101 transforms NRT1.1 into a high-affinity  $\text{NO}_3^-$  transporter, whereas the non-phosphorylated form is a low-affinity transporter, giving this protein a dual-affinity capability that is rather unique among  $\text{NO}_3^-$  transporters (Wang *et al.*, 1998, Liu and Tsay, 2003, L eran *et al.*, 2014). Interestingly, point mutants of NRT1.1 at T101 have provided additional evidence that the  $\text{NO}_3^-$  transport and sensing actions of NRT1.1 can be uncoupled, confirming that these actions rely on independent functions of the protein. Indeed, the non-phosphorylatable NRT1.1<sup>T101A</sup> mutant, which is transport competent, fails to trigger several NRT1.1-dependent  $\text{NO}_3^-$  signaling responses, whereas the phosphomimic NRT1.1<sup>T101D</sup> mutant, which has a much lower  $\text{NO}_3^-$  transport capacity, is able to activate these responses (Walch-Liu and Forde, 2009, Bouguyon *et al.*, 2015, Zhang *et al.*, 2019).

Recently, the hypothesis that NRT1.1 homologues also act as transceptors in other species was strongly supported by the observation that OsNRT1.1A and OsNRT1.1B are key regulators of  $\text{NO}_3^-$ -responsive genes in rice, including those associated with the PNR, and are strong genetic determinants of N use efficiency in this species (Hu *et al.*, 2015, 2019; Wang *et al.*, 2018b).

## Signaling cascades downstream of NRT1.1

### Primary nitrate response

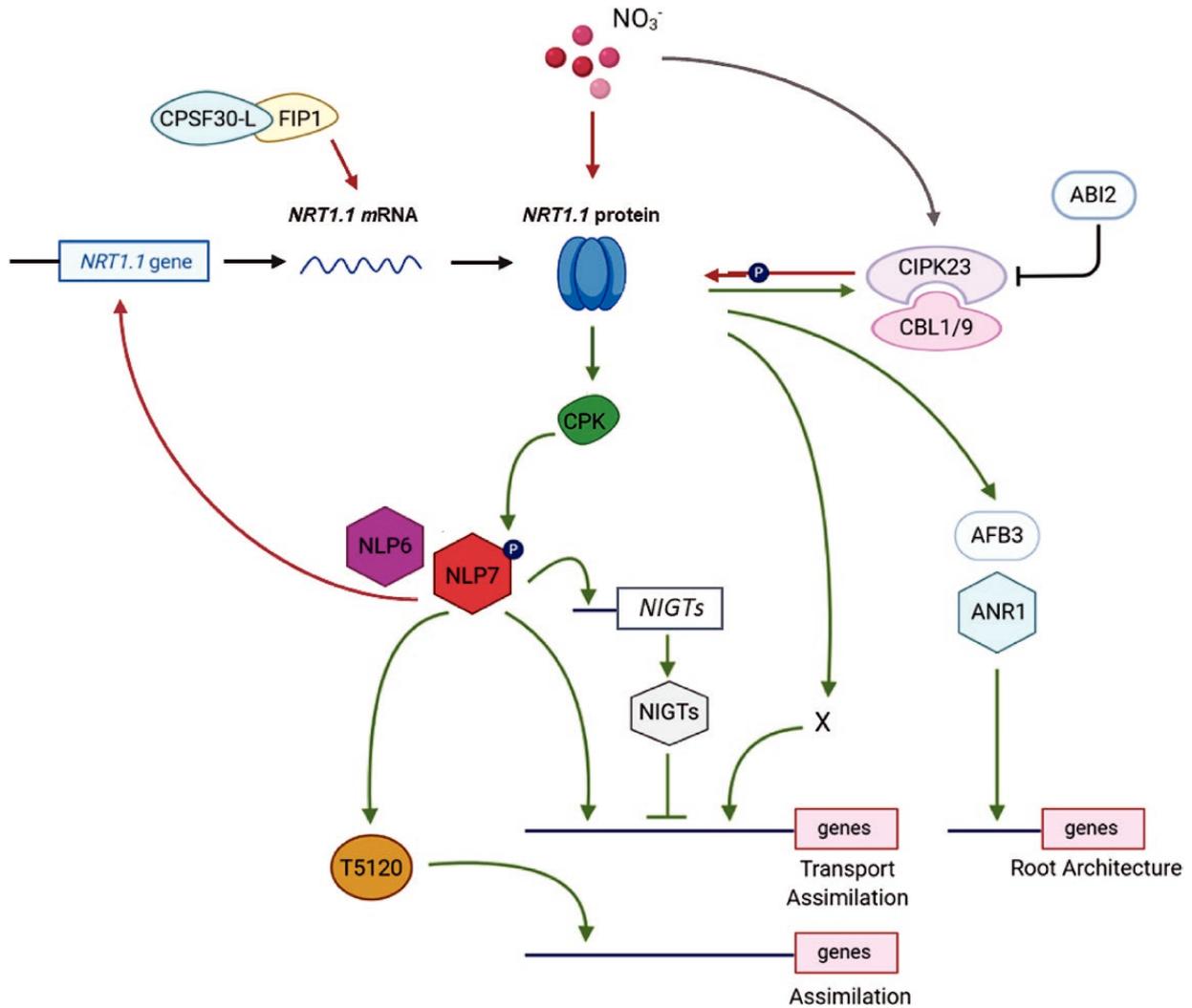
The PNR has been extensively described in recent reviews (Medici and Krouk, 2014; Vidal *et al.*, 2015; O'Brien *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2018a). Therefore, only the pivotal underlying mechanisms will be detailed here, with a focus on the most recent reports and on the links between these mechanisms and the NRT1.1 transceptor.

In Arabidopsis, under most (but not all) conditions, the PNR requires a functional NRT1.1 protein (Ho *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2009). More specifically, it is the non-phosphorylated form of NRT1.1 that appears to be predominantly involved, as it triggers a strongly amplified response of  $\text{NO}_3^-$ -inducible genes compared with the phosphorylated form (Ho *et al.*, 2009). In addition to NRT1.1, central players in the PNR are the NIN-LIKE PROTEIN NLP6 and NLP7 transcription factors (Fig. 1). Indeed, knockout mutation of either *NLP6* or *NLP7* results in decreased induction of many target genes of the PNR that are positively regulated by  $\text{NO}_3^-$  (Castaings *et al.*, 2009; Guan *et al.*, 2017). *NLP6* and *NLP7* may have redundant roles because the double *nlp6nlp7* mutant displays even lower

expression levels of  $\text{NO}_3^-$ -inducible genes than the single mutants (Guan *et al.*, 2017). Furthermore, it has been shown that both *NLP6* and *NLP7* are subject to strong nuclear retention under  $\text{NO}_3^-$  supply, to trigger, at least for *NLP7*, changes in the transcription of a huge number of  $\text{NO}_3^-$ -responsive genes (Marchive *et al.*, 2013; Guan *et al.*, 2017; Alvarez *et al.*, 2020). This function in  $\text{NO}_3^-$  signaling may be shared by several, if not all, members of the NLP family (nine in total). Indeed, all NLPs are able to bind to  $\text{NO}_3^-$ -responsive regulatory cis-elements (Konishi and Yanagisawa, 2013). Furthermore, a general suppression of NLP function mediated by the expression of the *NLP6-SUPRD* chimeric transcriptional repressor yielded severe alterations in the expression of  $\text{NO}_3^-$ -inducible genes (Konishi and Yanagisawa, 2013). Finally, a recent study revealed that most NLPs can physically interact with each other through their C-terminal PB1 domain (Konishi and Yanagisawa, 2019). These interactions are expected to generate different combinations of homo- or heterodimers that may play specific roles in the PNR. However, the actual implication of *NLP6/NLP7* homo- and heterodimers in triggering the PNR is questioned by the observation that these complexes predominantly reside outside the nucleus in  $\text{NO}_3^-$ -fed plants (Guan *et al.*, 2017).

The long non-coding RNA T5120 was recently shown to contribute to the PNR (Liu *et al.*, 2019). T5120 is directly up-regulated by *NLP7*, and its mutation impairs the  $\text{NO}_3^-$  induction of typical PNR target genes through an as yet uncharacterized mechanism. Interestingly, although T5120 is required for the correct induction of *NIA*, *NIR*, and *GLN1.1* genes, which encode nitrate reductase, nitrite reductase, and glutamine synthetase enzymes, respectively, it has no impact on the induction of  $\text{NO}_3^-$  transporter genes (Liu *et al.*, 2019). This shows that T5120 participates, downstream of *NLP7*, in a PNR pathway that specifically up-regulates  $\text{NO}_3^-$  assimilation but not  $\text{NO}_3^-$  transport (Fig. 1).

Two separate models have recently been proposed to explain how the upstream sensing of  $\text{NO}_3^-$  by NRT1.1 transceptors turns on the NLP function in the PNR, in Arabidopsis and rice, respectively (Fig. 2). In Arabidopsis,  $\text{NO}_3^-$  provision results in a transient increase in the cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration (Riveras *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019). This  $\text{Ca}^{2+}$  spike was shown to activate a subgroup of type III calcium-dependent protein kinases (CPK10, CPK30, and CPK32) that are responsible for phosphorylating *NLP7* at S205, which in turn mediates nuclear retention of *NLP7* and activates the PNR (Liu *et al.*, 2017). On the other hand, the cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  response to  $\text{NO}_3^-$  was reported to depend on NRT1.1 because the  $\text{Ca}^{2+}$  spike is not recorded in *chl1* mutants (Riveras *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2019). Moreover, in agreement with the hypothesis that the non-phosphorylated form of NRT1.1 (at T101) is more effective than the phosphorylated form in triggering the PNR (Ho *et al.*, 2009), the transient accumulation of  $\text{Ca}^{2+}$  in the cytoplasm of root cells following exposure to  $\text{NO}_3^-$  was shown to be much greater in plants expressing the non-phosphorylatable NRT1.1<sup>T101A</sup> mutant than in those expressing the phosphomimic NRT1.1<sup>T101D</sup> mutant (Zhang *et al.*, 2019). Although the dependence of CPK10/30/32 activation on NRT1.1 has not been demonstrated to date, these observations suggest that  $\text{Ca}^{2+}$  acts as a

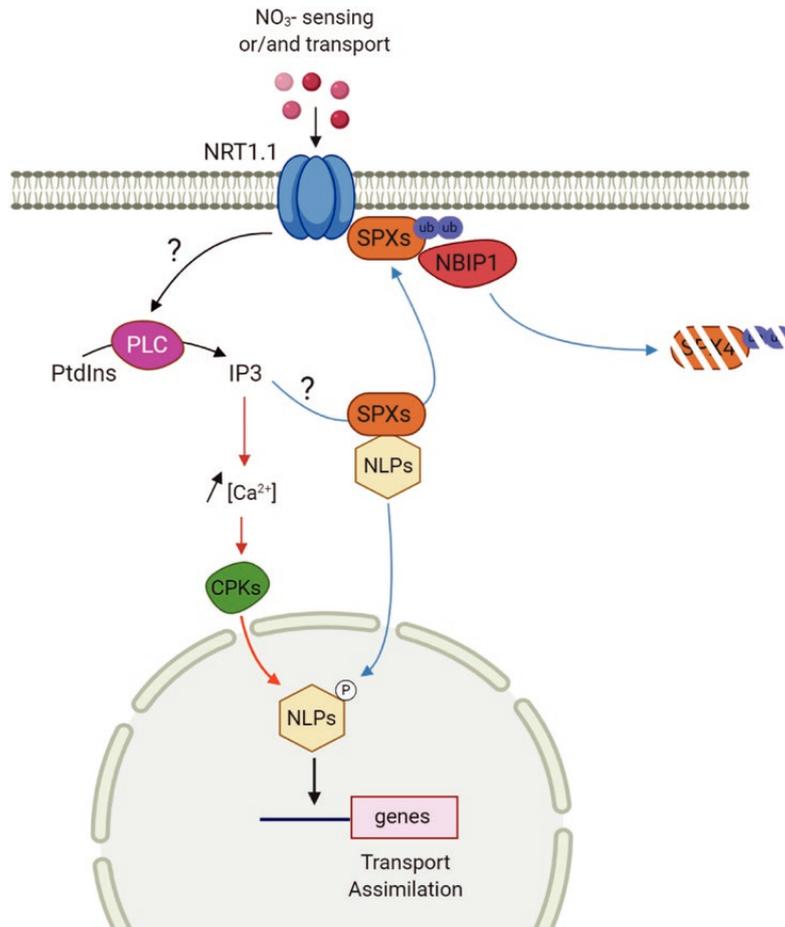


**Fig. 1.** Upstream and downstream NRT1.1 signal transduction cascades that regulate plant responses to nitrate. At the transcript level, *NRT1.1* expression is inducible through the action of positive regulators such as NLP7 or CPSF30.L. At the post-translational level, the CIPK23–CBL9 complex plays a role in the transport and signaling function of the NRT1.1 transceptor by phosphorylating the T101 residue, while ABI2 acts in preventing the regulation of NRT1.1 by CIPK23. Upstream NRT1.1 transduction cascades are represented by red arrows. The NRT1.1-mediated Ca<sup>2+</sup>-dependent NO<sub>3</sub><sup>-</sup> signaling pathway requires calcium-dependent kinases (CPK10/30/32), which connect the influx of calcium and the phosphorylation of target proteins. In particular, CPK signaling phosphorylates NLP7, mediating its nuclear retention and thus activating the primary nitrate response (PNR). In addition, NLP7 also directly up-regulates negative regulators, the *NIGT* genes. Consequently, primary nitrate responses are initially activated and then repressed by the expression of *NIGT* genes. The long non-coding RNA T5120 is up-regulated by NLP7 to induce the expression of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> assimilation genes, whereas it has no impact on the induction of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporter genes. Evidence has also been provided for a second Ca<sup>2+</sup>- independent pathway (indicated by X). In response to high NO<sub>3</sub><sup>-</sup> provision, another NRT1.1-dependent signaling pathway stimulates changes in root architecture through the induction of the *AFB3* auxin receptor gene and the *ANR1* transcription factor. Downstream NRT1.1 transduction cascades are represented by green arrows. ABI2, Abscisic Acid-Insensitive 2; AFB3, Auxin Signaling F-box 3; ANR1, Arabidopsis Nitrate Regulated 1; CPSF30.L, Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor 30-L; FIP1, Factor Interacting with Poly(A) polymerase 1.

second messenger in the PNR transduction pathway, within a NRT1.1–CPK–NLP7 regulatory module. Given that in the experiments of Liu et al. (2017) more than half of the NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-responsive genes were reported to depend on CPK10/30/32, the NRT1.1–CPK–NLP7 module is expected to play a major role in transducing the NO<sub>3</sub><sup>-</sup> signal. However, evidence has been provided for a second, Ca<sup>2+</sup>-independent pathway (Riveras et al., 2015). Furthermore, the mechanism by which NRT1.1 triggers a transient increase in cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentration remains to be elucidated. Riveras et al. (2015) indicated that the NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-dependent Ca<sup>2+</sup> signal requires the activity of

a phospholipase C and an increase in the cytoplasmic inositol 1,4,5-triphosphate concentration, but the phospholipase C is still unknown, as is its functional relationship with NRT1.1.

In rice, a recent report proposed a notably different model for the transduction mechanisms of the NO<sub>3</sub><sup>-</sup> signal in the PNR (Hu et al., 2019). It was found that OsNRT1.1B, the postulated orthologue of the Arabidopsis NRT1.1 transceptor, interacts with the phosphate signaling repressor protein OsSPX4, and that OsSPX4 suppresses, through protein–protein interaction, the activity (nuclear retention) of OsNLP3, a key OsNLP of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> signaling in rice. The OsNRT1.1B–OsSPX4 interaction



**Fig. 2.** Proposed model integrating the NRT1–CPK–NLP and NRT1–SPX–NLP modules required to activate the primary nitrate response in response to  $\text{NO}_3^-$  provision. By combining different information from Arabidopsis and rice, two different models for  $\text{NO}_3^-$  signaling pathways can be proposed to connect the NRT1.1 transceptor and the master regulator NLP. In response to  $\text{NO}_3^-$  provision, the transceptor activity of NRT1.1 leads to an increase in phospholipase C (PLC) activity, thereby increasing the concentration of 1,4,5-inositol triphosphate (IP3) in the cytosol. In the first model, IP3 induces the opening of  $\text{Ca}^{2+}$  channels, leading to the accumulation of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ . This second messenger activates NLP-dependent  $\text{NO}_3^-$  responses through a mechanism involving CPKs and NLP phosphorylation (red arrows). In the second model, since SPXs are inositol pyrophosphate (PtdIns) sensors, an increased IP3 concentration may modify SPX–NLP or NRT1–SPX interactions, leading to the degradation of SPX protein mediated by NRT1.1–NBIP1 E3 ligase and to NLP cytoplasmic–nuclear shuttling to activate  $\text{NO}_3^-$ -responsive genes (blue arrows).

is promoted by  $\text{NO}_3^-$  and leads to the recruitment of OsNBIP1 (NRT1.1B interacting protein 1), a E3 ubiquitin ligase that mediates the ubiquitination and degradation of OsSPX4. This in turn releases OsNLP3 from its interaction with OsSPX4 and results in the activation of OsNLP3, which triggers the PNR.

It is unknown whether a NRT1.1–CPK–NLP7-like module is also active in rice, and, conversely, whether a OsNRT1.1B–OsSPX4–OsNLP3-like module is also active in Arabidopsis. Given the presence of SPX proteins in Arabidopsis (Puga *et al.*, 2017) and the known effect of NRT1.1 on the phosphate signaling pathway in this species (Medici *et al.*, 2019; see below), it is tempting to postulate that both modules coexist in the same species (see Poza-Carrión and Paz-Ares, 2019). This in turn raises the question of how the modules are integrated or not. Interestingly, a direct connection between the two modules downstream of NRT1.1 may involve inositol polyphosphates as common activators. It has been shown that SPX proteins act as inositol polyphosphate sensors and that this sensing mechanism regulates the association between

SPX proteins and transcription factors involved in Pi signaling (Wild *et al.*, 2016; Puga *et al.*, 2017). Therefore, it is conceivable that upon  $\text{NO}_3^-$  supply, the NRT1.1-dependent increase in cytoplasmic inositol 1,4,5-triphosphate concentration leads to modified SPX–NLP or NRT1.1–SPX interactions, which in turn can suppress the repression of NLPs by SPX–NLP complexation. On the other hand, because  $\text{Ca}^{2+}$  channels have been shown to be activated by inositol polyphosphates in animals (Mikoshiha, 2007), it is possible that the increase in cytoplasmic inositol 1,4,5-triphosphate concentration also triggers the  $\text{Ca}^{2+}$  secondary signal, activating the CPKs for phosphorylation of NLPs (Fig. 2). The comparative investigation of both models in various species will represent an exciting area of research in the coming years.

The precise mechanism of  $\text{NO}_3^-$  sensing by NRT1.1 remains unclear. However, Hu *et al.* (2019) showed that  $\text{NO}_3^-$  enhanced the OsNRT1.1B–OsSPX4 interaction *in vitro*, and that mutation of the His362 residue that is crucial for the  $\text{NO}_3^-$  transport activity of OsNRT1.1B prevented this interaction.

These observations suggest that the sensing and transport of  $\text{NO}_3^-$  by NRT1.1 proteins depend on the same recognition site involving a conserved His residue (His362 in OsNRT1.1B and His356 in AtNRT1.1) and that binding of  $\text{NO}_3^-$  to this site is the trigger for the NRT1.1–SPX interaction and the downstream signaling cascade, even though this binding does not lead to  $\text{NO}_3^-$  influx into the cell across the plasma membrane (as for the NRT1.1<sup>P492L</sup> mutant in Arabidopsis, for instance). This makes an interesting parallel with several nutrient transceptors in yeast, where transport and sensing rely on the same ligand recognition site but signaling and transport can be uncoupled because effective signaling does not require full completion of the transport cycle (Van Zeebroeck et al., 2009; Popova et al., 2010).

In addition to the NLPs, two other important players in the PNR downstream of NRT1.1 are CIPK8 and CIPK23 (Fig. 1). Both *CIPK8* and *CIPK23* genes are induced by  $\text{NO}_3^-$  in a NRT1.1-dependent manner (Ho et al., 2009; Hu et al., 2009), but CIPK8 and CIPK23 play distinct roles. Although the underlying mechanism remains unknown, CIPK8 is required for fully activating the PNR in response to high  $\text{NO}_3^-$  supply, but not when  $\text{NO}_3^-$  is provided at low concentration (Hu et al., 2009). CIPK23 is, with the help of its protein partners CBL9 or CBL1 (Calcineurin B-Like Protein9 or 1), the kinase that phosphorylates NRT1.1 at T101 (Ho et al., 2009). Therefore, CIPK23 plays a dual role in transducing the  $\text{NO}_3^-$  signal. First, because its expression is under the control of the NRT1.1-dependent  $\text{NO}_3^-$  signaling pathway, CIPK23 may act as a downstream component of this pathway for transducing the  $\text{NO}_3^-$  signal through changes in the phosphorylation of its target proteins. Second, because NRT1.1 is one of these targets, CIPK23 also acts as an upstream regulator of the NRT1.1-dependent  $\text{NO}_3^-$  signaling pathway (see below).

### Secondary or longer-term nitrate responses

Besides the PNR,  $\text{NO}_3^-$  signaling has also longer-term effects [sometimes referred to as the secondary nitrate response (SNR)] on many genes targeted by the PNR, but often with an opposite outcome. For instance, although the key high-affinity root  $\text{NO}_3^-$  uptake transporter gene *NRT2.1* is a typical PNR-induced gene, it is repressed by NRT1.1-dependent  $\text{NO}_3^-$  signaling in response to high  $\text{NO}_3^-$  supply for several days (Muños et al., 2004; Krouk et al., 2006). Unlike in the PNR, this repression can be triggered by the phosphomimic NRT1.1<sup>T101D</sup> mutant but not the non-phosphorylatable NRT1.1<sup>T101A</sup> mutant, suggesting that it is a specific function of the phosphorylated form of NRT1.1 (Bouguyon et al., 2015). These observations indicate that the phosphorylated and non-phosphorylated forms of NRT1.1 have specific signaling roles: feedback repression by high  $\text{NO}_3^-$  for the former and PNR for the latter.

Recent studies have provided some insight into the regulators, especially transcription factors, that act downstream of NRT1.1 to trigger these longer-term repressive effects on  $\text{NO}_3^-$ -induced genes. A first example is the *LBD39* transcription factor gene, which, together with *LBD37* and *LBD38*, is

induced by  $\text{NO}_3^-$  and encodes a negative regulator of other  $\text{NO}_3^-$ -inducible genes, including *NRT2.1* (Rubin et al., 2009). Noteworthy, the expression of *LBD39* has been reported to be controlled by NRT1.1 in the opposite manner to *NRT2.1*, suggesting that NRT1.1-dependent repression of *NRT2.1* may result from the up-regulation of *LBD39* by NRT1.1 (Bouguyon et al., 2015). More recently, four *NIGT1/HRS1/HHO GARP G2*-like transcription factor genes (*NIGT1.1*, *1.2*, *1.3*, and *1.4*) were identified as central regulators of the feedback repression of many  $\text{NO}_3^-$ -inducible or N starvation-inducible genes, partly under the control of NRT1.1 (Medici et al., 2015; Kiba et al., 2018; Maeda et al., 2018). These four genes encode redundant negative regulators of the high-affinity  $\text{NO}_3^-$  transport genes *NRT2.1*, *NRT2.4*, and *NRT2.5*, which most probably act by direct binding to their promoters (Kiba et al., 2018). All four *NIGT1s* are dependent on a NLP-mediated signaling cascade for their induction by  $\text{NO}_3^-$  (Maeda et al., 2018). However, only *NIGT1.3* (*HHO1*) and *NIGT1.4* (*HRS1*) seem to be specifically regulated by  $\text{NO}_3^-$  signaling, as *NIGT1.1* and *NIGT1.2* are also induced by reduced N metabolites (Kiba et al., 2018). Accordingly, the induction of both *NIGT1.3* and *NIGT1.4* by  $\text{NO}_3^-$  is impaired in *chl1* mutants (Medici et al., 2015), suggesting that the negative NLP–NIGT1 cascade may gather two different regulatory modules: one involving NIGT1.3 and NIGT1.4, which is specifically activated by NRT1.1-dependent  $\text{NO}_3^-$  signaling, and a second one relying on NIGT1.1 and NIGT1.2, which is responsive to a more general N signaling mechanism. The NIGT1s have many target genes in common with NLP7 on these genes. Therefore, depending on their direct regulation by NLPs and/or NIGT1s, many N-responsive genes are controlled either by the negative NLP–NIGT1 cascade only (if they are direct targets of NIGT1s but not of NLPs) or by the competition between positive NLP and negative NLP–NIGT1 cascades (if they are direct targets of both NIGT1s and NLPs) (Fig. 1). Because it is expected that the positive NLP cascade acts faster than the negative NLP–NIGT1 cascade, this explains why many genes, such as *NRT2.1*, are rapidly and strongly induced by  $\text{NO}_3^-$  supply, before being down-regulated after several hours or days. Moreover, NIGT1s are under autoregulation (Maeda et al., 2018), which adds to the complexity of the NLP/NIGT1 functional interaction.

### NRT1.1-mediated regulation of root system architecture

The NRT1.1-dependent repression of LRP development in the absence of, or at low external availability of,  $\text{NO}_3^-$  has been explained by the fact that NRT1.1 facilitates auxin transport out of the LRPs, and therefore prevents the accumulation of the hormone that is required for stimulating the outgrowth of these organs (Krouk et al., 2010). The auxin transport capacity of NRT1.1 was demonstrated in various heterologous expression systems, including *Xenopus* oocytes (Krouk et al., 2010; Bouguyon et al., 2015; Wei et al., 2018; Zhang et al., 2019). These observations provide a hypothesis explaining a signaling

role of NRT1.1 in the absence of  $\text{NO}_3^-$ . Most importantly, NRT1.1-mediated auxin transport was shown to be inhibited by  $\text{NO}_3^-$  in a dose-dependent manner (Krouk *et al.*, 2010), suggesting that NRT1.1 transduces a  $\text{NO}_3^-$  signal by transforming a change in  $\text{NO}_3^-$  concentration into a change in auxin flux. Interestingly, the auxin transport capacity of the phosphomimic NRT1.1<sup>T101D</sup> mutant is higher than that of the non-phosphorylatable NRT1.1<sup>T101A</sup> mutant, suggesting that the form of NRT1.1 that is phosphorylated at T101 is predominantly responsible for the regulation of LRP development by  $\text{NO}_3^-$  (Bouguyon *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2019). Accordingly, both the activity of the auxin biosensor *DR5* in LRPs and the outgrowth of these LRPs are responsive to  $\text{NO}_3^-$  in wild-type plants and transgenic lines expressing the NRT1.1<sup>T101D</sup> mutant, but not in *chl1* mutants and transgenic lines expressing the NRT1.1<sup>T101A</sup> mutant (Bouguyon *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2019).

In addition to this direct effect on auxin distribution in LRPs, it has recently been demonstrated that NRT1.1 plays a much wider role in the overall traffic and signaling of auxin associated with LRP development (Maghiaoui *et al.*, 2020). First, NRT1.1 represses auxin biosynthesis in the root stele in the absence of  $\text{NO}_3^-$ , through down-regulation of the expression of the *TAR2* auxin biosynthesis gene. Second, NRT1.1 represses the expression of *LAX3*, a key auxin carrier gene required for lowering the mechanical resistance of primary root tissues overlying the LRPs (Swarup *et al.*, 2008). Therefore, NRT1.1 appears to repress LRP development in the absence of  $\text{NO}_3^-$  by blocking the action of auxin at various key steps, from the biosynthesis of the hormone and its accumulation in the LRPs to its role in facilitating the outgrowth of the LRPs through the parent root (Maghiaoui *et al.*, 2020).

There is evidence that NRT1.1 also participates in another signaling pathway stimulating lateral root (LR) growth in response to high  $\text{NO}_3^-$  provision, through mechanisms unrelated to its auxin transport capacity. Indeed,  $\text{NO}_3^-$  stimulation of the expression of the *AFB3* (*Auxin Signaling F-Box 3*) auxin receptor gene and of the *ANR1* transcription factor gene was reported to require a functional NRT1.1 protein (Remans *et al.*, 2006a; Vidal *et al.*, 2014). *AFB3* governs both primary and LR growth, and *ANR1* is a key regulator of LR elongation in response to  $\text{NO}_3^-$  (Gan *et al.*, 2012; Vidal *et al.*, 2013). The hypothesis that these actions of NRT1.1 in promoting root growth in response to  $\text{NO}_3^-$  supply are independent from its repression of LRP outgrowth in the absence of  $\text{NO}_3^-$  is supported by the recent observation that it is the non-phosphorylated form of NRT1.1 at T101 that is responsible for the induction of *ANR1* in response to  $\text{NO}_3^-$  (Zhang *et al.*, 2019). This suggests a dual role for NRT1.1 in the  $\text{NO}_3^-$  regulation of root development and growth. On the one hand, the phosphorylated form inhibits LRP outgrowth in the absence (or at low concentrations) of  $\text{NO}_3^-$  by preventing auxin stimulation of this outgrowth. On the other hand, the non-phosphorylated form stimulates LR development and elongation at high  $\text{NO}_3^-$  concentrations by triggering the induction of *ANR1* and *AFB3* expression through the PNR pathway (Fig. 1). Regarding this latter case, *ANR1* and *AFB3* are most probably only two examples of

a much more general mechanism. Indeed, regulatory genes that are associated with the PNR and that control the expression of  $\text{NO}_3^-$  transporters or assimilation enzymes, such as *NLP6/NLP7*, *NIGT1.4 (HRS1)*, *TGA1/TGA4*, *CPK10/CPK30/CPK32*, and *TCP20*, have been reported to also modulate the response of root development to  $\text{NO}_3^-$  (Alvarez *et al.*, 2014; Guan *et al.*, 2014; Medici *et al.*, 2015; Canales *et al.*, 2017; Guan *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017; Sato *et al.*, 2017). This shows that the  $\text{NO}_3^-$  signaling pathways governing  $\text{NO}_3^-$  uptake and assimilation and those triggering the adaptive developmental responses of the root system may share many common branches. This probably explains why the NRT1.1 transceptor has so many effects on plant physiology and development (Bouguyon *et al.*, 2015).

### Transcriptional and post-transcriptional regulation of NRT1.1

In Arabidopsis, NRT1.1 is not a constitutive sensing system that permanently resides in the root cells, but is instead strongly modulated by  $\text{NO}_3^-$  signals at both the transcriptional and post-transcriptional levels.

At the transcriptional level, in addition to being most likely activated by NRT1.1 in the PNR, *NLP7* was shown to bind to the *NRT1.1* promoter, and to stimulate the expression of *NRT1.1* in the presence of both  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  in the external medium, but not when  $\text{NO}_3^-$  is present as the sole N source (Zhao *et al.*, 2018b). This shows that NRT1.1 and *NLP7* can regulate each other, creating a feed-forward regulatory loop. Using an artificial  $\text{NO}_3^-$ -responsive *NRP-YFP* transgene, the same authors demonstrated that *NLP7* works upstream of NRT1.1 in triggering  $\text{NO}_3^-$  regulation of *NRP-YFP* expression under mixed  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  supply, but works independently of NRT1.1 when only  $\text{NO}_3^-$  is provided. Conversely, ectopic expression of *NRT1.1* in a *nlp7* mutant background restored the  $\text{NO}_3^-$  induction of *NRP-YFP* at least partially (Zhao *et al.*, 2018b), indicating that NRT1.1 is able to activate other downstream positive regulators of the PNR besides *NLP7* (Fig. 1). These observations show that the functional interaction between NRT1.1 and *NLP7* is not obligatory, but depends on factors other than the presence of  $\text{NO}_3^-$ , such as  $\text{NH}_4^+$  availability. This helps to understand why the PNR requires NRT1.1 when  $\text{NO}_3^-$  is supplied to plants previously grown on  $\text{NH}_4^+$  succinate, but not when it is supplied to N-starved plants (Wang *et al.*, 2009). Most probably, as yet unknown alternative signaling modules, which possibly rely on  $\text{NO}_3^-$  sensors other than NRT1.1, are involved in transducing the  $\text{NO}_3^-$  signal depending on the presence or absence of  $\text{NH}_4^+$ . This raises the questions of why  $\text{NH}_4^+$  is so important for controlling the NRT1.1–*NLP*  $\text{NO}_3^-$  signaling module in Arabidopsis, and whether this is also the case in species with preferential  $\text{NH}_4^+$  nutrition, such as rice.

At the post-transcriptional level, the CIPK23 kinase has a strong impact through T101 phosphorylation on many aspects of the structure, dynamics, and activity of NRT1.1. In addition to regulating the dual affinity of NRT1.1 for  $\text{NO}_3^-$  transport, as mentioned above, T101 phosphorylation has been reported

to regulate the dimerization and/or structural flexibility of NRT1.1 (Parker and Newstead, 2014; Sun *et al.*, 2014), and the intracellular trafficking of the protein (Zhang *et al.*, 2019). In particular, the non-phosphorylated form undergoes more intense endocytosis in root cells than the phosphorylated form, resulting in a lower accumulation of the protein at the plasma membrane (Zhang *et al.*, 2019). Most importantly, because (as detailed above) the phosphorylated and non-phosphorylated forms of NRT1.1 trigger different signaling pathways, CIPK23 plays a key role in controlling the signaling function of NRT1.1 and therefore in directing the transceptor's action towards the activation of specific responses. This emphasizes the point that the mechanisms acting upstream of NRT1.1 are as important as those involved in the downstream transduction cascades in determining the plant's responses to  $\text{NO}_3^-$ .

Three additional regulators, ABI2 (Abscisic Acid-Insensitive 2), CPSF30-L (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor 30-L), and FIP1 (Factor Interacting with Poly(A) polymerase 1), were recently reported to control NRT1.1 at the post-transcriptional level, partly through their effect on CIPK23 (Fig. 1). ABI2 is a phosphatase of the PP2C family, which acts in preventing the regulation of NRT1.1 by CIPK23 (Fig. 1). To be functional, CIPK23 needs to interact with the CBL1 or CBL9 calcium-sensing proteins. Activation of the CIPK23/CBL complex involves autophosphorylation of CIPK23 and phosphorylation of CBL1/9 by CIPK23. It has been reported that ABI2 is able to dephosphorylate both CIPK23 and CBL1, leading to the deactivation of the kinase complex (Léran *et al.*, 2015). Because ABI2 is repressed by abscisic acid, this suggests that the activity of the NRT1.1-dependent  $\text{NO}_3^-$  sensing system may be responsive to various stresses through abscisic acid signaling.

The cleavage and polyadenylation specificity factor *CPSF30* gene encodes two proteins, the 28 kDa CPSF30-S and the 65 kDa CPSF30-L, but only CPSF30-L has been shown to participate in  $\text{NO}_3^-$  signaling (Li *et al.*, 2017). CPSF30-L interacts with FIP1, a component of the polyadenylation complex (Li *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018b). Interestingly, different forms of polyadenylated *NRT1.1* mRNA were found in the single *cpsf30* and *fip1* mutants and in the double *fip1cpsf30* mutant compared with the wild type, suggesting that CPSF30-L and FIP1 functionally interact to modulate alternative polyadenylation of the 3' untranslated region in *NRT1.1* mRNA (Wang *et al.*, 2018b). Both *CPSF30* and *FIP1* are believed to participate in the same signaling pathway required for full activation of the PNR on key  $\text{NO}_3^-$  utilization genes such as *NLA1*, *NIR*, and *NRT2.1*. However, only CPSF30-L was shown to control *NRT1.1* mRNA accumulation, by up-regulating it in the presence of  $\text{NO}_3^-$ , whereas FIP1 acts as a repressor of *CIPK8* and *CIPK23* (Li *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018a). Although CPSF30-L works upstream of NRT1.1, it modulates the PNR in an NLP7-independent manner, confirming the conclusion from the study of Zhao *et al.* (2018b) that NRT1.1 can trigger the PNR through the activation of other signaling mechanisms besides the canonical NLP7 pathway. FIP1 may act on NRT1.1 specifically at the post-translational level, through altered *CIPK23* expression. Accordingly, the *fip1* mutant displays a reduced root  $\text{NO}_3^-$  uptake, which is in agreement with

the fact that increased *CIPK23* expression leads to reduced transport capacity of NRT1.1 due to phosphorylation at T101 (Wang *et al.*, 2018b).

## Combined signaling with other mineral nutrients

Nitrate acquisition must be co-regulated with that of other nutrients, to ensure proper nutritional balance (Marschner, 2012). Significant progress has recently been made in understanding how plants simultaneously integrate and transduce several signaling pathways from different nutrients (Giehl *et al.*, 2014; Kellermeier *et al.*, 2014). Here, we report recent advances deciphering the molecular mechanisms that integrate NRT1.1-dependent  $\text{NO}_3^-$  pathways with those of Pi and  $\text{K}^+$ .

### Nitrate and phosphate signaling crosstalk

Phosphorus (P) is an essential structural component of nucleic acids, phospholipids, and the energy currency of the cell (ATP/ADP), but its availability in soil in the form of Pi is usually limiting. Plants have evolved a variety of strategies to enable growth in limited Pi soils, from the induction of phosphate transporters to the alteration of root architecture (Wu *et al.*, 2013; Péret *et al.*, 2014).  $\text{NO}_3^-$  and Pi are the major sources of N and P for plants and are involved in signaling pathways to handle many N and P responses. Until recently, these signaling pathways have been extensively studied separately, and Pi signaling is usually investigated in the context of Pi starvation. In this case, the MYB transcription factors PHR1 (Arabidopsis) and OsPHR2 (rice) activate the expression of *Pi-Starvation-Induced (PSI)* genes, leading to improved Pi utilization (Rubio *et al.*, 2001). Studies in rice have shown that variations in Pi status alter the cytoplasmic–nuclear shuttling of OsPHR2. Under high-Pi conditions, OsPHR2 physically interacts with the repressor protein OsSPX4 in the cytosol, preventing its translocation to the nucleus. When little Pi is available, OsSPX4 is degraded by the 26S proteasome, resulting in the release of OsPHR2 in the nucleus and the activation of the expression of *PSI* genes (Lv *et al.*, 2014). The recent report by Hu *et al.* (2019) on the OsNRT1.1B–OsSPX4–OsNLP3 module for  $\text{NO}_3^-$  signaling highlights a strong parallelism between Pi and  $\text{NO}_3^-$  signaling mechanisms, because the regulation of OsNLP3 by OsSPX4 resembles that of OsPHR2. Furthermore, OsSPX4 is common to the two signaling pathways. This led to the demonstration that the activation of the OsNRT1.1B–OsSPX4–OsNLP3 signaling pathway by  $\text{NO}_3^-$  also activates Pi starvation signaling to ensure the coordinated utilization of N and P in rice plants. The authors showed that high  $\text{NO}_3^-$  activates Pi acquisition and promotes the expression of *PT* (phosphate transporter genes) in an OsNRT1.1B-dependent manner, providing further evidence to support the essential role of OsNRT1.1B in the  $\text{NO}_3^-$ -activated Pi response. As detailed above, under high- $\text{NO}_3^-$  conditions, OsNRT1.1-B can interact with OsSPX4 to promote its ubiquitination and its degradation through a newly identified E3 ligase, OsNBIP1. Consequently, as is the case for OsNLP3, OsPHR2 is released

into the nucleus, leading to the up-regulation of Pi acquisition genes. Thus, the coordinated activation of OsPHR2 and OsNLP3 ensures the co-regulation of Pi and  $\text{NO}_3^-$  utilization genes, maintaining a physiologically relevant N/P balance.

Another example of direct interaction between the  $\text{NO}_3^-$  and Pi signaling pathways is related to the Arabidopsis transcription factor NIGT1.4 (HRS1). As detailed above, transcription of the *NIGT1.4* gene is induced by  $\text{NO}_3^-$  in a NRT1.1-dependent manner, and NIGT1.4 acts under high  $\text{NO}_3^-$  supply as a negative regulator of an array of N starvation-responsive genes, including *NRT2.1* and *NRT2.4* (Kiba *et al.*, 2018). However, NIGT1.4 is also regulated by Pi because Pi starvation decreases the accumulation of NIGT1.4 protein (Medici *et al.*, 2015). Importantly, NIGT1.4 and its closest homologue, NIGT1.3 (HHO1), were shown to repress primary root growth in response to Pi deficiency conditions, but only when  $\text{NO}_3^-$  is present, indicating their role in the  $\text{NO}_3^-$ -Pi signaling interaction (Medici *et al.*, 2015). Recent studies have uncovered two transcriptional NIGT1.4-centered cascades directly linking P and N nutritional regulation, NLP7-NIGT1.4 and PHR1-NIGT1.4, both of which down-regulate  $\text{NO}_3^-$  uptake in opposition to the activation of  $\text{NO}_3^-$  uptake by the NLPs, either to govern complex  $\text{NO}_3^-$ -induced gene expression or to repress  $\text{NO}_3^-$  uptake under Pi starvation (Kiba *et al.*, 2018; Maeda *et al.*, 2018). Additionally, NIGT1.4 is involved in activating the expression of *PT* genes under high  $\text{NO}_3^-$  and low Pi conditions, providing important potential targets for N/P interactive regulation under varying Pi availability.

#### Nitrate and potassium crosstalk

Although  $\text{K}^+$  has often been overshadowed by N and P, this cation is also an essential macronutrient that fulfills important functions for metabolism, growth, and stress adaptation. Its functions include enzyme activation, osmotic adjustment, and electrical neutralization, as well as the maintenance of turgor pressure (Marschner, 2012). In plant cells,  $\text{K}^+$  and  $\text{NO}_3^-$  are the most abundant inorganic cation and anion, and  $\text{K}^+$  is the preferred counter-ion for  $\text{NO}_3^-$  xylem loading in order to maintain the cation/anion balance during ion absorption and transport in plants (Ródenas *et al.*, 2017). Despite the needed coordination of  $\text{K}^+$  and  $\text{NO}_3^-$  utilization in plants, little is known about the molecular co-regulatory mechanisms. However, a number of studies in Arabidopsis have uncovered a  $\text{K}^+$  uptake regulatory pathway in response to  $\text{K}^+$  deficiency, in which the  $\text{K}^+$  channel AKT1 is activated by the  $\text{Ca}^{2+}$  sensors CBL1/9 and the kinase CIPK23 (Xu *et al.*, 2006). Interestingly, the  $\text{NO}_3^-$  transporter NRT1.1 is also subject to the same post-translational regulation, indicating that CIPK23 may coordinate  $\text{K}^+$  and  $\text{NO}_3^-$  uptake under nutrient-limited conditions (Xu *et al.*, 2006; Ho *et al.*, 2009). Under conditions of sufficient  $\text{K}^+$  and  $\text{NO}_3^-$ , CIPK23 is inactive in the cytoplasm and unable to phosphorylate its targets. In this case, AKT1 is less active in  $\text{K}^+$  uptake and the non-phosphorylated NRT1.1 behaves as a low-affinity  $\text{NO}_3^-$  transporter. When little  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{K}^+$  are available, CIPK23 is recruited at the plasma membrane by CBL1/9 through a potential  $\text{Ca}^{2+}$  signaling pathway. Phosphorylated NRT1.1 shows higher affinity for  $\text{NO}_3^-$ , and

phosphorylated AKT1 enhances  $\text{K}^+$  influx (Lee *et al.*, 2007; Ho *et al.*, 2009).

## Conclusion and perspectives

The recent period has been particularly exciting in the field of  $\text{NO}_3^-$  sensing and signaling. First, the far-reaching action of the NRT1.1 or NRT1.1-like transceptors has been firmly confirmed and extended to rice in addition to Arabidopsis. Second, the mechanisms of  $\text{NO}_3^-$  perception by these transceptors have begun to be unraveled, providing insight into how these mechanisms connect the transceptors with the previously known downstream regulators of  $\text{NO}_3^-$  signaling pathways (e.g. NLPs). Third, the number of these downstream regulators identified to date has dramatically increased, thereby revealing a much more complex overall picture for  $\text{NO}_3^-$  signaling pathways than previously anticipated. This has been particularly the case with the advent of large-scale studies investigating the genome-wide structure of the transcriptional regulatory networks involved in N signaling in Arabidopsis. Indeed, compared with the total of 16 transcription factors identified as being associated with N signaling a few years ago (Gaudinier *et al.*, 2018), hundreds of transcriptional regulators, among which a majority are transcription factors, are now proposed to respond to and/or mediate N signaling (Gaudinier *et al.*, 2018; Varala *et al.*, 2018; Alvarez *et al.*, 2019, 2020; Brooks *et al.*, 2019). Although the role of most of them in conveying specifically the  $\text{NO}_3^-$  signal in connection with the NRT1.1 transceptor needs to be clarified, their identification opens the way for much more refined investigation of the functional architecture of the regulatory networks, in terms of both temporal dynamics (Varala *et al.*, 2018; Brooks *et al.*, 2019) and hierarchical transcription factor-to-transcription factor interaction cascades (Alvarez *et al.*, 2019, 2020). There is no doubt that understanding how this highly complex functional architecture is dynamically modulated in response to various environmental cues for optimizing plant N nutrition in a wide range of fluctuating edaphic and climatic scenarios will be an exciting challenge.

In addition, the precise mechanisms underlying the  $\text{NO}_3^-$  sensing function of NRT1.1 need to be elucidated. This calls in particular for further structural/functional analyses aiming to identify the structural features that make NRT1.1 and its orthologues such unique dual-function proteins. First, the  $\text{NO}_3^-$  perception site needs to be precisely determined to clarify whether it is the same as the transport site, or not. Second, the structural basis of the intriguing dual  $\text{NO}_3^-$ /auxin substrate specificity of NRT1.1 deserves investigation. This is particularly important because, since the first proposal that NRT1.1 has an auxin transport capacity (Krouk *et al.*, 2010), many more members of the NRT1.1/Peptide transporters family (NPF) have been functionally characterized as hormone transporters (Kanno *et al.*, 2012, Chiba *et al.*, 2015, Tal *et al.*, 2016, Corratgé-Faillie and Lacombe, 2017). Site-directed mutagenesis strategies will certainly help to address these questions, especially because physical interactions between NRT1.1s and downstream signaling proteins can be investigated *in vitro* (Hu

*et al.*, 2019), and because NRT1.1 proteins seem to be easily functionally expressed in heterologous systems.

Finally, the existence of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sensors other than NRT1.1s remains an open question. In *Arabidopsis*, an interesting candidate is the high-affinity NO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporter NRT2.1. Indeed, NRT2.1 has been reported to regulate LRP initiation in the absence of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, suggesting that this protein has an additional function besides NO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport (Little *et al.*, 2005; Remans *et al.*, 2006b). Even more intriguing is the observation that NRT2.1 is a strong determinant of plant susceptibility to *Pseudomonas syringae* (Camañes *et al.*, 2012). Although the underlying mechanisms have not been elucidated, a connection between NRT2.1 and hormone signaling pathways has been proposed to account for these NO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport-independent functions of the protein (Camañes *et al.*, 2012). In agreement with this hypothesis, OsNRT2.1 and OsNRT2.4 were recently shown to promote root growth in rice plants by regulating auxin transport (Wei *et al.*, 2018; Naz *et al.*, 2019). Because NRT2 transporters form protein complexes with NAR2 proteins, an interesting finding in this context is that OsNAR2.1 interacts with two nitrilases, OsNIT1 and OsNIT2, and that this interaction strongly stimulates auxin synthesis from indole-3-acetaldoxime (Song *et al.*, 2020). To date, other than being involved in protein complexes with NRT2s, no biochemical function has been attributed to NAR2 proteins. Therefore, these observations raise the question of whether a putative transceptor role of the NRT2 transporters may in fact be due to a specific signaling function of their NAR2 partner proteins, possibly through changes in auxin synthesis in response to NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

## Acknowledgements

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche program “Programme PCRI ANR-16-CE20-0022”. We would like to thank members of the lab for discussion.

## References

- Alvarez JM, Moyano TC, Zhang T, *et al.* 2019. Local changes in chromatin accessibility and transcriptional networks underlying the nitrate response in *Arabidopsis* roots. *Molecular Plant* **12**, 1545–1560.
- Alvarez JM, Riveras E, Vidal EA, *et al.* 2014. Systems approach identifies TGA1 and TGA4 transcription factors as important regulatory components of the nitrate response of *Arabidopsis thaliana* roots. *The Plant Journal* **80**, 1–13.
- Alvarez JM, Schinke AL, Brooks MD, Pasquino A, Leonelli L, Varala K, Safi A, Krouk G, Krapp A, Coruzzi GM. 2020. Transient genome-wide interactions of the master transcription factor NLP7 initiate a rapid nitrogen-response cascade. *Nature Communications* **11**, 1157.
- Álvarez-Aragón R, Rodríguez-Navarro A. 2017. Nitrate-dependent shoot sodium accumulation and osmotic functions of sodium in *Arabidopsis* under saline conditions. *The Plant Journal* **91**, 208–219.
- Bouguyon E, Brun F, Meynard D, *et al.* 2015. Multiple mechanisms of nitrate sensing by *Arabidopsis* nitrate transceptor NRT1.1. *Nature Plants* **1**, 15015.
- Brooks MD, Cirrone J, Pasquino AV, *et al.* 2019. Network Walking charts transcriptional dynamics of nitrogen signaling by integrating validated and predicted genome-wide interactions. *Nature Communications* **10**, 1569.
- Camañes G, Pastor V, Cerezo M, García-Andrade J, Vicedo B, García-Agustín P, Flors V. 2012. A deletion in NRT2.1 attenuates *Pseudomonas*

*syringae*-induced hormonal perturbation, resulting in primed plant defenses. *Plant Physiology* **158**, 1054–1066.

Canales J, Contreras-López O, Álvarez JM, Gutiérrez RA. 2017. Nitrate induction of root hair density is mediated by TGA1/TGA4 and CPC transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **92**, 305–316.

Castangs L, Camargo A, Pocholle D, *et al.* 2009. The nodule inception-like protein 7 modulates nitrate sensing and metabolism in *Arabidopsis*. *The Plant Journal: for cell and molecular biology* **57**, 426–435.

Chiba Y, Shimizu T, Miyakawa S, Kanno Y, Koshiba T, Kamiya Y, Seo M. 2015. Identification of *Arabidopsis thaliana* NRT1/PTR FAMILY (NPF) proteins capable of transporting plant hormones. *Journal of Plant Research* **128**, 679–686.

Corratgé-Faillie C, Lacombe B. 2017. Substrate (un)specificity of *Arabidopsis* NRT1/PTR FAMILY (NPF) proteins. *Journal of Experimental Botany* **68**, 3107–3113.

Crawford NM, Glass ADM. 1998. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science* **3**, 389–395.

Fang XZ, Tian WH, Liu XX, Lin XY, Jin CW, Zheng SJ. 2016. Alleviation of proton toxicity by nitrate uptake specifically depends on nitrate transporter 1.1 in *Arabidopsis*. *New Phytologist* **211**, 149–158.

Forde BG. 2014. Nitrogen signalling pathways shaping root system architecture: an update. *Current Opinion in Plant Biology* **21**, 30–36.

Fredes I, Moreno S, Díaz FP, Gutiérrez RA. 2019. Nitrate signaling and the control of *Arabidopsis* growth and development. *Current Opinion in Plant Biology* **47**, 112–118.

Gan Y, Bernreiter A, Filleur S, Abram B, Forde BG. 2012. Overexpressing the *ANR1* MADS-box gene in transgenic plants provides new insights into its role in the nitrate regulation of root development. *Plant & Cell Physiology* **53**, 1003–1016.

Gaudinier A, Rodríguez-Medina J, Zhang L, *et al.* 2018. Transcriptional regulation of nitrogen-associated metabolism and growth. *Nature* **563**, 259–264.

Giehl RF, Gruber BD, von Wirén N. 2014. It's time to make changes: modulation of root system architecture by nutrient signals. *Journal of Experimental Botany* **65**, 769–778.

Gojon A, Krouk G, Perrine-Walker F, Laugier E. 2011. Nitrate transceptor(s) in plants. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2299–2308.

Guan P, Ripoll JJ, Wang R, Vuong L, Bailey-Steinitz LJ, Ye D, Crawford NM. 2017. Interacting TCP and NLP transcription factors control plant responses to nitrate availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **114**, 2419–2424.

Guan P, Wang R, Nacry P, Breton G, Kay SA, Pruneda-Paz JL, Davani A, Crawford NM. 2014. Nitrate foraging by *Arabidopsis* roots is mediated by the transcription factor TCP20 through the systemic signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **111**, 15267–15272.

Hachiya T, Watanabe CK, Boom C, Tholen D, Takahara K, Kawai-Yamada M, Uchimiya H, Uesono Y, Terashima I, Noguchi K. 2010. Ammonium-dependent respiratory increase is dependent on the cytochrome pathway in *Arabidopsis thaliana* shoots. *Plant, Cell & Environment* **33**, 1888–1897.

Ho CH, Lin SH, Hu HC, Tsay YF. 2009. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell* **138**, 1184–1194.

Hu B, Jiang Z, Wang W, *et al.* 2019. Nitrate–NRT1.1B–SPX4 cascade integrates nitrogen and phosphorus signalling networks in plants. *Nature Plants* **5**, 401–413.

Hu B, Wang W, Ou S, *et al.* 2015. Variation in NRT1.1B contributes to nitrate-use divergence between rice subspecies. *Nature Genetics* **47**, 834–838.

Hu HC, Wang YY, Tsay YF. 2009. AtCIPK8, a CBL-interacting protein kinase, regulates the low-affinity phase of the primary nitrate response. *The Plant Journal* **57**, 264–278.

Jian S, Liao Q, Song H, Liu Q, Lepo JE, Guan C, Zhang J, Ismail AM, Zhang Z. 2018. NRT1.1-Related NH<sub>4</sub><sup>+</sup> toxicity is associated with a disturbed balance between NH<sub>4</sub><sup>+</sup> uptake and assimilation. *Plant Physiology* **178**, 1473–1488.

Kanno Y, Hanada A, Chiba Y, Ichikawa T, Nakazawa M, Matsui M, Koshiba T, Kamiya Y, Seo M. 2012. Identification of an abscisic acid

- transporter by functional screening using the receptor complex as a sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **109**, 9653–9658.
- Kellermeier F, Armengaud P, Seditas TJ, Danku J, Salt DE, Amtmann A.** 2014. Analysis of the root system architecture of *Arabidopsis* provides a quantitative readout of crosstalk between nutritional signals. *The Plant Cell* **26**, 1480–1496.
- Kiba T, Inaba J, Kudo T, et al.** 2018. Repression of nitrogen starvation responses by members of the *Arabidopsis* GARP-type transcription factor NIGT1/HRS1 subfamily. *The Plant Cell* **30**, 925–945.
- Kiba T, Krapp A.** 2016. Plant nitrogen acquisition under low availability: regulation of uptake and root architecture. *Plant & Cell Physiology* **57**, 707–714.
- Konishi M, Yanagisawa S.** 2013. *Arabidopsis* NIN-like transcription factors have a central role in nitrate signalling. *Nature Communications* **4**, 1617.
- Konishi M, Yanagisawa S.** 2019. The role of protein-protein interactions mediated by the PB1 domain of NLP transcription factors in nitrate-inducible gene expression. *BMC Plant Biology* **19**, 90.
- Krouk G, Lacombe B, Bielach A, et al.** 2010. Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Developmental Cell* **18**, 927–937.
- Krouk G, Tillard P, Gojon A.** 2006. Regulation of the high-affinity  $\text{NO}_3^-$  uptake system by NRT1.1-mediated  $\text{NO}_3^-$  demand signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **142**, 1075–1086.
- Lee SC, Lan WZ, Kim BG, Li L, Cheong YH, Pandey GK, Lu G, Buchanan BB, Luan S.** 2007. A protein phosphorylation/dephosphorylation network regulates a plant potassium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **104**, 15959–15964.
- Léran S, Edel KH, Pervent M, Hashimoto K, Corratgé-Faillie C, Offenborn JN, Tillard P, Gojon A, Kudla J, Lacombe B.** 2015. Nitrate sensing and uptake in *Arabidopsis* are enhanced by ABI2, a phosphatase inactivated by the stress hormone abscisic acid. *Science Signaling* **8**, ra43.
- Léran S, Varala K, Boyer JC, et al.** 2014. A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. *Trends in Plant Science* **19**, 5–9.
- Li Z, Wang R, Gao Y, et al.** 2017. The *Arabidopsis* *CPSF30-L* gene plays an essential role in nitrate signaling and regulates the nitrate transceptor gene *NRT1.1*. *New Phytologist* **216**, 1205–1222.
- Little DY, Rao H, Oliva S, Daniel-Vedele F, Krapp A, Malamy JE.** 2005. The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **102**, 13693–13698.
- Liu KH, Niu Y, Konishi M, et al.** 2017. Discovery of nitrate–CPK–NLP signalling in central nutrient-growth networks. *Nature* **545**, 311–316.
- Liu KH, Tsay YF.** 2003. Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *The EMBO Journal* **22**, 1005–1013.
- Liu F, Xu Y, Chang K, Li S, Liu Z, Qi S, Jia J, Zhang M, Crawford NM, Wang Y.** 2019. The long noncoding RNA *T5120* regulates nitrate response and assimilation in *Arabidopsis*. *New Phytologist* **224**, 117–131.
- Lv Q, Zhong Y, Wang Y, et al.** 2014. SPX4 negatively regulates phosphate signaling and homeostasis through its interaction with PHR2 in rice. *The Plant Cell* **26**, 1586–1597.
- Maeda Y, Konishi M, Kiba T, Sakuraba Y, Sawaki N, Kurai T, Ueda Y, Sakakibara H, Yanagisawa S.** 2018. A NIGT1-centred transcriptional cascade regulates nitrate signalling and incorporates phosphorus starvation signals in *Arabidopsis*. *Nature Communications* **9**, 1376.
- Maghiaoui A, Bouguyon E, Cuesta C, Perrine-Walker F, Alcon C, Krouk G, Benková E, Nacry P, Gojon A, Bach L.** 2020. The *Arabidopsis* NRT1.1 transceptor coordinately controls auxin biosynthesis and transport to regulate root branching in response to nitrate. *Journal of Experimental Botany* **71**, 4480–4494.
- Mao QQ, Guan MY, Lu KX, Du ST, Fan SK, Ye YQ, Lin XY, Jin CW.** 2014. Inhibition of nitrate transporter 1.1-controlled nitrate uptake reduces cadmium uptake in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **166**, 934–944.
- Marchive C, Roudier F, Castaings L, Bréhaut V, Blondet E, Colot V, Meyer C, Krapp A.** 2013. Nuclear retention of the transcription factor NLP7 orchestrates the early response to nitrate in plants. *Nature Communications* **4**, 1713.
- Marschner P.** ed. 2012. *Marschner's mineral nutrition of higher plants*, 3rd edition. London: Elsevier Science.
- Medici A, Krouk G.** 2014. The primary nitrate response: a multifaceted signalling pathway. *Journal of Experimental Botany* **65**, 5567–5576.
- Medici A, Marshall-Colon A, Ronzier E, Szponarski W, Wang R, Gojon A, Crawford NM, Ruffel S, Coruzzi GM, Krouk G.** 2015. AtNIGT1/HRS1 integrates nitrate and phosphate signals at the *Arabidopsis* root tip. *Nature Communications* **6**, 6274.
- Medici A, Szponarski W, Dangeville P, et al.** 2019. Identification of molecular integrators shows that nitrogen actively controls the phosphate starvation response in plants. *The Plant Cell* **31**, 1171–1184.
- Mikoshiba K.** 2007.  $\text{IP}_3$  receptor/ $\text{Ca}^{2+}$  channel: from discovery to new signaling concepts. *Journal of Neurochemistry* **102**, 1426–1446.
- Miller AJ, Fan X, Orsel M, Smith SJ, Wells DM.** 2007. Nitrate transport and signalling. *Journal of Experimental Botany* **58**, 2297–2306.
- Muños S, Cazettes C, Fizames C, Gaymard F, Tillard P, Lepetit M, Lejay L, Gojon A.** 2004. Transcript profiling in the *chl1-5* mutant of *Arabidopsis* reveals a role of the nitrate transporter NRT1.1 in the regulation of another nitrate transporter, NRT2.1. *The Plant Cell* **16**, 2433–2447.
- Nacry P, Bouguyon E, Gojon A.** 2013. Nitrogen acquisition by roots: physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource. *Plant and Soil* **370**, 1–29.
- Näsholm T, Kielland K, Ganeteg U.** 2009. Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytologist* **182**, 31–48.
- Naz M, Luo B, Guo X, Li B, Chen J, Fan X.** 2019. Overexpression of nitrate transporter *OsNRT2.1* enhances nitrate-dependent root elongation. *Genes* **10**, 290.
- O'Brien JA, Vega A, Bouguyon E, Krouk G, Gojon A, Coruzzi G, Gutiérrez RA.** 2016. Nitrate transport, sensing, and responses in plants. *Molecular Plant* **9**, 837–856.
- Parker JL, Newstead S.** 2014. Molecular basis of nitrate uptake by the plant nitrate transporter NRT1.1. *Nature* **507**, 68–72.
- Péret B, Desnos T, Jost R, Kanno S, Berkowitz O, Nussaume L.** 2014. Root architecture responses: in search of phosphate. *Plant Physiology* **166**, 1713–1723.
- Popova Y, Thayumanavan P, Lonati E, Agrochão M, Thevelein JM.** 2010. Transport and signaling through the phosphate-binding site of the yeast Pho84 phosphate transceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **107**, 2890–2895.
- Poza-Carrón C, Paz-Ares J.** 2019. When nitrate and phosphate sensors meet. *Nature Plants* **5**, 339–340.
- Puga MI, Rojas-Triana M, de Lorenzo L, Leyva A, Rubio V, Paz-Ares J.** 2017. Novel signals in the regulation of Pi starvation responses in plants: facts and promises. *Current Opinion in Plant Biology* **39**, 40–49.
- Remans T, Nacry P, Pervent M, Filleur S, Diatloff E, Mounier E, Tillard P, Forde BG, Gojon A.** 2006a. The *Arabidopsis* NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **103**, 19206–19211.
- Remans T, Nacry P, Pervent M, Girin T, Tillard P, Lepetit M, Gojon A.** 2006b. A central role for the nitrate transporter NRT2.1 in the integrated morphological and physiological responses of the root system to nitrogen limitation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **140**, 909–921.
- Riveras E, Alvarez JM, Vidal EA, Oses C, Vega A, Gutiérrez RA.** 2015. The calcium ion is a second messenger in the nitrate signaling pathway of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **169**, 1397–1404.
- Ródenas R, García-Legaz MF, López-Gómez E, Martínez V, Rubio F, Ángeles Botella M.** 2017.  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  and  $\text{SO}_4^{2-}$  deprivation reduced LKT1-mediated low-affinity  $\text{K}^+$  uptake and SKOR-mediated  $\text{K}^+$  translocation in tomato and *Arabidopsis* plants. *Physiologia Plantarum* **160**, 410–424.
- Rubin G, Tohge T, Matsuda F, Saito K, Scheible WR.** 2009. Members of the *LBD* family of transcription factors repress anthocyanin synthesis and affect additional nitrogen responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**, 3567–3584.
- Rubio V, Linhares F, Solano R, Martín AC, Iglesias J, Leyva A, Paz-Ares J.** 2001. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes & Development* **15**, 2122–2133.
- Sato T, Maekawa S, Konishi M, Yoshioka N, Sasaki Y, Maeda H, Ishida T, Kato Y, Yamaguchi J, Yanagisawa S.** 2017. Direct transcriptional

- activation of *BT* genes by NLP transcription factors is a key component of the nitrate response in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **483**, 380–386.
- Song M, Fan X, Chen J, Qu H, Luo L, Xu G.** 2020. OsNAR2.1 interaction with OsNIT1 and OsNIT2 functions in root-growth responses to nitrate and ammonium. *Plant Physiology* **183**, 289–303.
- Sun J, Bankston JR, Payandeh J, Hinds TR, Zagotta WN, Zheng N.** 2014. Crystal structure of the plant dual-affinity nitrate transporter NRT1.1. *Nature* **507**, 73–77.
- Swarup K, Benková E, Swarup R, et al.** 2008. The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature Cell Biology* **10**, 946–954.
- Tal I, Zhang Y, Jørgensen ME, et al.** 2016. The *Arabidopsis* NPF3 protein is a GA transporter. *Nature Communications* **7**, 11486.
- Teng Y, Liang Y, Wang M, Mai H, Ke L.** 2019. Nitrate Transporter 1.1 is involved in regulating flowering time via transcriptional regulation of *FLOWERING LOCUS C* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* **284**, 30–36.
- Tsay YF, Schroeder JI, Feldmann KA, Crawford NM.** 1993. The herbicide sensitivity gene *CHL1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* **72**, 705–713.
- Van Zeebroeck G, Bonini BM, Versele M, Thevelein JM.** 2009. Transport and signaling via the amino acid binding site of the yeast Gap1 amino acid transporter. *Nature Chemical Biology* **5**, 45–52.
- Varala K, Marshall-Colón A, Cirrone J, et al.** 2018. Temporal transcriptional logic of dynamic regulatory networks underlying nitrogen signaling and use in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **115**, 6494–6499.
- Vidal EA, Álvarez JM, Gutiérrez RA.** 2014. Nitrate regulation of *AFB3* and *NAC4* gene expression in *Arabidopsis* roots depends on NRT1.1 nitrate transport function. *Plant Signaling & Behavior* **9**, e28501.
- Vidal EA, Álvarez JM, Moyano TC, Gutiérrez RA.** 2015. Transcriptional networks in the nitrate response of *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology* **27**, 125–132.
- Vidal EA, Moyano TC, Riveras E, Contreras-López O, Gutiérrez RA.** 2013. Systems approaches map regulatory networks downstream of the auxin receptor AFB3 in the nitrate response of *Arabidopsis thaliana* roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **110**, 12840–12845.
- Walch-Liu P, Forde BG.** 2009. Nitrate and glutamate as environmental cues for behavioural responses in plant roots. *Plant Cell Environment* **32**, 682–693.
- Wang W, Hu B, Yuan D, et al.** 2018b. Expression of the nitrate transporter gene *OsNRT1.1A/OsNPF6.3* confers high yield and early maturation in rice. *The Plant Cell* **30**, 638–651.
- Wang R, Liu D, Crawford NM.** 1998. The *Arabidopsis* CHL1 protein plays a major role in high-affinity nitrate uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **95**, 15134–15139.
- Wang R, Tischner R, Gutiérrez RA, Hoffman M, Xing X, Chen M, Coruzzi G, Crawford NM.** 2004. Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **136**, 2512–2522.
- Wang R, Xing X, Wang Y, Tran A, Crawford NM.** 2009. A genetic screen for nitrate regulatory mutants captures the nitrate transporter gene *NRT1.1*. *Plant Physiology* **151**, 472–478.
- Wang C, Zhang W, Li Z, Li Z, Bi Y, Crawford NM, Wang Y.** 2018a. *FIP1* plays an important role in nitrate signaling and regulates *CIPK8* and *CIPK23* expression in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* **9**, 593.
- Wei J, Zheng Y, Feng H, Qu H, Fan X, Yamaji N, Ma JF, Xu G.** 2018. *OsNRT2.4* encodes a dual-affinity nitrate transporter and functions in nitrate-regulated root growth and nitrate distribution in rice. *Journal of Experimental Botany* **69**, 1095–1107.
- Wild R, Gerasimaite R, Jung JY, et al.** 2016. Control of eukaryotic phosphate homeostasis by inositol polyphosphate sensor domains. *Science* **352**, 986–990.
- Wu P, Shou H, Xu G, Lian X.** 2013. Improvement of phosphorus efficiency in rice on the basis of understanding phosphate signaling and homeostasis. *Current Opinion in Plant Biology* **16**, 205–212.
- Xu J, Li HD, Chen LQ, Wang Y, Liu LL, He L, Wu WH.** 2006. A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K<sup>+</sup> transporter AKT1 in *Arabidopsis*. *Cell* **125**, 1347–1360.
- Zhang X, Cui Y, Yu M, Su B, Gong W, Baluška F, Komis G, Šamaj J, Shan X, Lin J.** 2019. Phosphorylation-mediated dynamics of nitrate transceptor NRT1.1 regulate auxin flux and nitrate signaling in lateral root growth. *Plant Physiology* **181**, 480–498.
- Zhang H, Forde BG.** 1998. An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* **279**, 407–409.
- Zhang H, Jennings A, Barlow PW, Forde BG.** 1999. Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **96**, 6529–6534.
- Zhao L, Liu F, Crawford NM, Wang Y.** 2018a. Molecular regulation of nitrate responses in plants. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 2039.
- Zhao L, Zhang W, Yang Y, Li Z, Li N, Qi S, Crawford NM, Wang Y.** 2018b. The *Arabidopsis* *NLP7* gene regulates nitrate signaling via NRT1.1-dependent pathway in the presence of ammonium. *Scientific Reports* **8**, 1487.





**CHAPITRE II :**

**Matériels et Méthodes**

**Tableau II.1 : Récapitulatif des lignées transgéniques utilisées dans ce manuscrit**

Lignées	Fond génétique	Description et Références bibliographiques
Col (Columbia)	Col-0	Lignée sauvage
<i>chl1-5</i>	Col-0	Lignée mutante <i>KO</i> de délétion de NRT1.1 (Tsay <i>et al.</i> , 1993 ; Munos, 2004)
<i>chl1-9</i>	Col-0	Lignée mutante EMS (Méthanesulfonate d'éthyle) de NRT1.1 (Ho <i>et al.</i> , 2009)
<i>chl1-12</i>	Col-0	Lignée mutante d'insertion ADN-T (SALK_034596)
pNRT1.1::NRT1.1-GFPloop	<i>chl1-5</i>	Lignée transgénique exprimant le gène <i>NRT1.1</i> fusionné au gène <i>GFP</i> sous le contrôle du promoteur natif NRT1.1 (Krouk <i>et al.</i> , 2010b ; Bouguyon <i>et al.</i> , 2015)
pNRT1.1::NRT1.1T101A	<i>chl1-5</i>	Lignée transgénique exprimant la version mutée (substitution de T101 par A) du gène <i>NRT1.1</i> sous le contrôle du promoteur natif NRT1.1 (Krouk <i>et al.</i> , 2010b ; Bouguyon <i>et al.</i> , 2015)
pNRT1.1::NRT1.1T101D	<i>chl1-5</i>	Lignée transgénique exprimant la version mutée (substitution de T101 par D) du gène <i>NRT1.1</i> sous le contrôle du promoteur natif NRT1.1 (Krouk <i>et al.</i> , 2010b ; Bouguyon <i>et al.</i> , 2015)
pOestradiol::NRT1.1-mCherry	<i>chl1-5</i>	Lignée transgénique exprimant le gène <i>NRT1.1</i> fusionné à la mCherry sous le contrôle du promoteur inductible à l'oestradiol (Swarup, 2004 ; Bouguyon <i>et al.</i> , 2016)
<i>tar2c</i>	Col-0	Lignée mutante du gène <i>TAR2</i> obtenue par le Centre de Ressources Biologiques d' <i>Arabidopsis thaliana</i> (ABRC ; Ma <i>et al.</i> , 2014)
OETAR2	<i>tar2c</i>	Lignée transgénique exprimant le gène <i>TAR2</i> sous le contrôle d'un promoteur constitutif (Ma <i>et al.</i> , 2014)
pTAR2-GUS	Col-0, <i>chl1-5</i>	Lignée transgénique exprimant le gène rapporteur <i>GUS</i> sous le contrôle du promoteur natif TAR2 (Ma <i>et al.</i> , 2014)
DR5-GFP	Col-0, <i>tar2c</i>	Lignée transgénique exprimant le gène <i>GFP</i> sous le contrôle du promoteur rapporteur de l'auxine, DR5 (Ulmasov <i>et al.</i> , 1997)
<i>chl1-5xtar2c</i>	Col-0	Lignée mutante des gènes <i>NRT1.1</i> et <i>TAR2</i>

## Chapitre II

### I. Matériel végétal

L'ensemble des lignées transgéniques qui ont été utilisées ou mentionnées au cours de cette thèse sont répertoriés dans les tableaux II.1 et II.2. Les mutants KO homozygotes *chl1-5* ont été criblés sur la descendance F2 et F3 par PCR comme décrit par Mounier *et al.*, (2014).

### II. Conditions de culture

Les plantes d'*Arabidopsis thaliana* ont été cultivées en chambre de culture et/ou en serre avec une alternance de 16 heures de jour à 20°C et 8 heures de nuit à 19°C à une hygrométrie autour de 50 à 55% (jours longs).

#### 1) Culture en serre

L'amplification des croisements et des lots de graines des lignées sauvages ou transgéniques pour la culture *in vitro* et en hydroponie a été réalisée en serre. Pour compléter l'éclairage des conditions de cultures en serre, des lampes à vapeur de sodium sont utilisées de façon à maintenir une intensité photonique autour de 150  $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

#### 2) Culture en chambre de culture

Les graines stériles sont semées sur boîtes de Pétri (12×12) verticales et les graines non stériles sont déposées dans des eppendorfs de 1.5 mL dont la moitié inférieure a été retirée et délimitée par une grille en inox.

Pour la culture *in vitro*, le milieu de culture standard contient : 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ; 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 250  $\mu\text{M}$   $\text{K}_2\text{SO}_4$  ; 250  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2,2\text{H}_2\text{O}$  ; 50  $\mu\text{M}$   $\text{KCl}$  ; 30  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$  ; 5  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$  ; 1  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$  ; 1  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4,5\text{H}_2\text{O}$  ; 0.1  $\mu\text{M}$   $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  ; 0.1 mM Na-Fe-EDTA. La solution du milieu est tamponnée avec du 2.5 Mm MES et le pH est ajusté à 5,8 (KOH 2N). Le milieu de culture sans N est complété avec la concentration appropriée de  $\text{KNO}_3$  (0, 1 ou 10 mM) ou de L-Glutamine (Gln ; 0.5 mM) pour chaque expérience comme décrit dans les légendes des figures correspondantes. Avant autoclave, la solution du milieu de culture est solidifiée avec de l'agar de type A à 0.7% (Sigma, Saint Louis, Mo). Après stockage pendant au moins 24h à 4°C à l'obscurité, les boîtes de Pétri contenant les graines stériles sont transférées

**Tableau II.2 : Récapitulatif des lignées transgéniques mentionnées dans ce manuscrit**

Lignées	Fond génétique	Description et Références bibliographiques
pDR5::Venus	Col-0	Lignée transgénique exprimant le gène <i>VENUS</i> (forme modifiée de YFP-NLS) sous le contrôle du promoteur rapporteur de l'auxine DR5 (Brunoud <i>et al.</i> , 2012)
pPIN1::PIN1-GFP	Col-0, <i>chl1-5</i>	Lignée transgénique exprimant le gène <i>PIN1</i> fusionné au gène <i>GFP</i> sous le contrôle du promoteur natif (Benková <i>et al.</i> , 2003)
pPIN2::PIN2-GFP	Col-0, <i>chl1-5</i>	Lignée transgénique exprimant le gène <i>PIN2</i> fusionné au gène <i>GFP</i> sous le contrôle du promoteur natif <i>PIN2</i> (Xu et Scheres, 2005)
pPIN3::PIN3-GFP	Col-0, <i>chl1-5</i>	Lignée transgénique exprimant le gène <i>PIN3</i> fusionné au gène <i>GFP</i> sous le contrôle du promoteur natif <i>PIN3</i> (Zádníková <i>et al.</i> , 2010)
pPIN4::PIN4-GFP	Col-0, <i>chl1-5</i>	Lignée transgénique exprimant le gène <i>PIN4</i> fusionné au gène <i>GFP</i> sous le contrôle du promoteur natif <i>PIN4</i> (Vietsen, 2005)
pPIN7::PIN7-GFP	Col-0, <i>chl1-5</i>	Lignée transgénique exprimant le gène <i>PIN7</i> fusionné au gène <i>GFP</i> sous le contrôle du promoteur natif <i>PIN7</i> (Blilou <i>et al.</i> , 2005; Mravec <i>et al.</i> , 2008)
pAUX1::AUX1-YFP	Col-0, <i>chl1-5</i>	Lignée transgénique exprimant le gène <i>AUX1</i> fusionné au gène <i>YFP</i> sous le contrôle du promoteur natif <i>AUX1</i> (Swarup, 2004)
pLAX3::LAX3-YFP	Col-0, <i>chl1-5</i>	Lignée transgénique exprimant le gène <i>LAX3</i> fusionné au gène <i>YFP</i> sous le contrôle du promoteur natif <i>LAX3</i> (Swarup <i>et al.</i> , 2008)
pABCB4::ABCB4-GFP	Col-0, <i>chl1-5</i>	Lignée transgénique exprimant le gène <i>ABCB4</i> fusionné au gène <i>GFP</i> sous le contrôle du promoteur natif <i>ABCB4</i> (Cho <i>et al.</i> , 2007)
pABCB19::ABCB19-GFP	Col-0, <i>chl1-5</i>	Lignée transgénique exprimant le gène <i>ABCB19</i> fusionné au gène <i>GFP</i> sous le contrôle du promoteur natif <i>ABCB19</i> (Bailly <i>et al.</i> , 2008)
pABCB1::ABCB1-GFP	Col-0, <i>chl1-5</i>	Lignée transgénique exprimant le gène <i>ABCB1</i> fusionné au gène <i>GFP</i> sous le contrôle du promoteur natif <i>ABCB1</i> (Mravec <i>et al.</i> , 2008)

## Chapitre II

dans une chambre de croissance jours longs à 22°C avec une intensité lumineuse de 230 mmol.m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>.

Pour la culture en milieu hydroponique, avant que la racine ne traverse complètement le milieu gélosé, les eppendorfs sont transférés sur des disques de PVC préalablement perforés et placés sur une plaque. La plaque est ensuite déposée sur une bassine contenant la solution nutritive suivante : 0.25 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ; 1mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 1mM MgSO<sub>4</sub> ; 0.1mM Na-Fe-EDTA ; 50mM KCL ; 30μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> ; 5μM ZnSO<sub>4</sub> ; 1μM CuSO<sub>4</sub> ; 0.1μM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>] et complétée par 0 ou 1 mM KNO<sub>3</sub>. Chaque semaine, la solution du milieu est remplacée par une nouvelle solution nutritive.

### III. Génotypage

Les échantillons sont broyés *via* l'utilisation du broyeur Retsch Mixer Mills MM400 (agitation de 30s à 25 vibrations.s<sup>-1</sup>). L'extraction des ADNs issus du broyat a été réalisée à l'aide d'un Tampon Edwards contenant 200 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 250 mM NaCl ; 25 mM EDTA ; 0,5% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). Les échantillons sont soumis à une agitation forte en présence du Tampon Edwards durant 5 minutes puis centrifugés par la centrifugeuse Micro Star 17R (VWR) à 13200 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube et une solution de Chloroforme/alcool isoamylique (24:1) est ajoutée de volume à volume. Après une deuxième centrifugation, le surnageant est transféré dans un nouveau tube en présence d'isopropanol, ajouté volume à volume et le tout est centrifugé à 13200 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé avec de l'éthanol 70% puis centrifugé à 13200 rpm pendant 5 minutes. Après élimination du surnageant, le culot sec repris dans 40 μL H<sub>2</sub>O milliQ stérile. Les échantillons d'ADNs sont dosés au Microspectrophotomètre Nanodrop ND-1000 afin de déterminer la concentration et la pureté (ratio DO260/DO280).

Une réaction PCR est réalisée selon les instructions fournies par le kit Promega GoTaq<sup>®</sup> G2 DNA Polymerase. Les ADNs sont mélangés au Tampon 5X GoTaq, à 0,2 mM dNTPs, à 0,2 μM d'amorces Forward et Reverse et à l'enzyme GoTaq G2 DNA Polymerase (5u/μL) et subissent le programme suivant : une première dénaturation de 2 minutes à 95°C, 35 cycles × (une dénaturation de 30 secondes à 95°C, une hybridation des amorces à 55°C pendant 30 secondes et une élongation à 72°C à durée définie selon la taille du fragment à amplifier) et une

**Tableau II.3 : Amorces de PCR pour le géotypage des lignées utilisées dans ce manuscrit**

<b>Nom</b>	<b>Séquence 5' – 3' des amorces</b>
NRT1.1 del up F	CCCGAGAGCTCAGTTTGAGA
NRT1.1 del up R	TGGGGTGATCCGTAAGATTC
NRT1.1 del down R	TATCCTTCACACACATGCATGAC
SALK_143208.56.00. x LP	CTGCAACAGTGAAAAACATGG
SALK_143208.56.00. x RP	TATGTTAGCATATGGCCCGTG
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTCGGAAC

## Chapitre II

élongation finale à 72°C pendant 1 minute. La lecture des fragments d'ADN se fait grâce à un gel d'agarose à 1% contenant du Safe View™ Nucleic Acid Stains (DNA Stains) (50 µL/100 mL) et à une électrophorèse à 150 V pendant 20 minutes. Les lots d'amorces utilisés sont répertoriés dans le tableau II.3.

### IV. Stérilisation des graines

La stérilisation des graines s'est faite à l'aide d'une solution contenant une pastille de Bayrochlore, de l'éthanol 96% et d'eau déminéralisée. Après ajout de la solution de stérilisation, les graines sont placées sous agitation forte durant 8 minutes. La solution de stérilisation est ensuite retirée et un lavage à l'éthanol absolu est effectué pour entièrement éliminer la solution de stérilisation. Enfin, les graines sont séchées soit sur papier Whatman stérile, soit 24h dans un eppendorf sous hotte à flux laminaire avant d'être semées.

### V. Extraction d'ARN et PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)

Avant extraction, les échantillons (parties racinaires, parties foliaires et/ou plante entière) ont été récoltés dans un tube eppendorf de 2 mL contenant deux billes en acier puis congelés dans de l'azote liquide avant d'être broyés par agitation à l'aide d'un broyeur Retsch Mixer Mills MM400 (agitation de 30s à 25 vibrations.s<sup>-1</sup>). Le broyât obtenu est repris dans 1 mL de réactif TRIzol (Thermo Fisher Scientific). Le mélange est homogénéisé par inversion puis laissé 5 minutes à température ambiante pour permettre la dissociation complète des complexes nucléo-protéiques. Un volume de 200 µL de chloroforme est ajouté au mélange suivi d'une centrifugation à 12000g à 4°C pendant 15 minutes. Les ARNs totaux contenus dans la phase aqueuse (environ 500 µL) sont transférés dans un nouveau tube eppendorf de 1,5 mL et précipités par ajout de 500 µL d'isopropanol (volume à volume). L'ensemble est centrifugé à 12000g à 4°C pendant 10 minutes. Après élimination du surnageant par inversion, le culot est lavé à l'éthanol 75% accompagné d'une centrifugation à 12000g pendant 5 minutes. Après élimination de l'éthanol, les culots sont séchés 5 minutes maximum puis repris dans 20 µL d'H<sub>2</sub>O RNase-free. Une fois extraits, les ARNs sont dosés (Micro-spectrophotomètre Nanodrop ND-1000) afin de déterminer leur concentration et leur pureté (ratio DO260/DO280).

La conversion des ARNm en ADNc est réalisée à l'aide de la reverse transcription M-MLV selon les recommandations du fabricant. Brièvement, cette étape se décompose de la façon

**Tableau II.4 : Amorces de RT-qPCR utilisées dans ce manuscrit**

<b>Gènes et AGI</b>	<b>Séquence 5' – 3' des amorces</b>
NRT1.1 ( <u>AT1G12110</u> )	Sens : GCACATTGGCATTAGGCTTT Anti-sens : CTCAATCCCCACCTCAGCTA
TAR2 ( <u>AT4G24670</u> )	Sens : CATGATTTGGCTTACTATTTGGCCACAG Anti-sens : GTCTTTCACCAAAGCCCATCCAATC
LAX3 ( <u>AT1G77690</u> )	Sens : TTGTGAGGAGGGCATTGGTA Anti-sens : GGAGAGGCCACCGAGAGT
LDB29 ( <u>AT3G58190</u> )	Sens : GCACATTGGCATTAGGCTTT Anti-sens : CTCAATCCCCACCTCAGCTA
UBIQUITINE10 ( <u>AT4G05320</u> )	Sens : GGGCTTGTATAATCC Anti-sens : AAAGAGTAACAGGAACGGAAACATAG
YUC3 ( <u>AT1G04610</u> )	Sens : ATGGTCGTTCTGAGCGCTGTTC Anti-sens : GCGAGCCAAACGGGCATATACTTC
YUC5 ( <u>AT5G43890</u> )	Sens : TGGGCTCACAACGGAGTTTGAAG Anti-sens : TCGCCGGATTTGTACTIONCACACG
YUC7 ( <u>AT2G33230</u> )	Sens : GGATGGTCGAGTTCTGCAGATTG Anti-sens : TCCTTAAGCCATGAAGGGACATTG
YUC8 ( <u>AT4G28720</u> )	Sens : ATCAACCCTAAGTTCAACGAGTG Anti-sens : CTCCCGTAGCCACCACAAG
YUC9 ( <u>AT1G04180</u> )	Sens : ATTATACGCGGCCGGATTACAG Anti-sens : AGCGATGTTAACGGCGTCTACTG

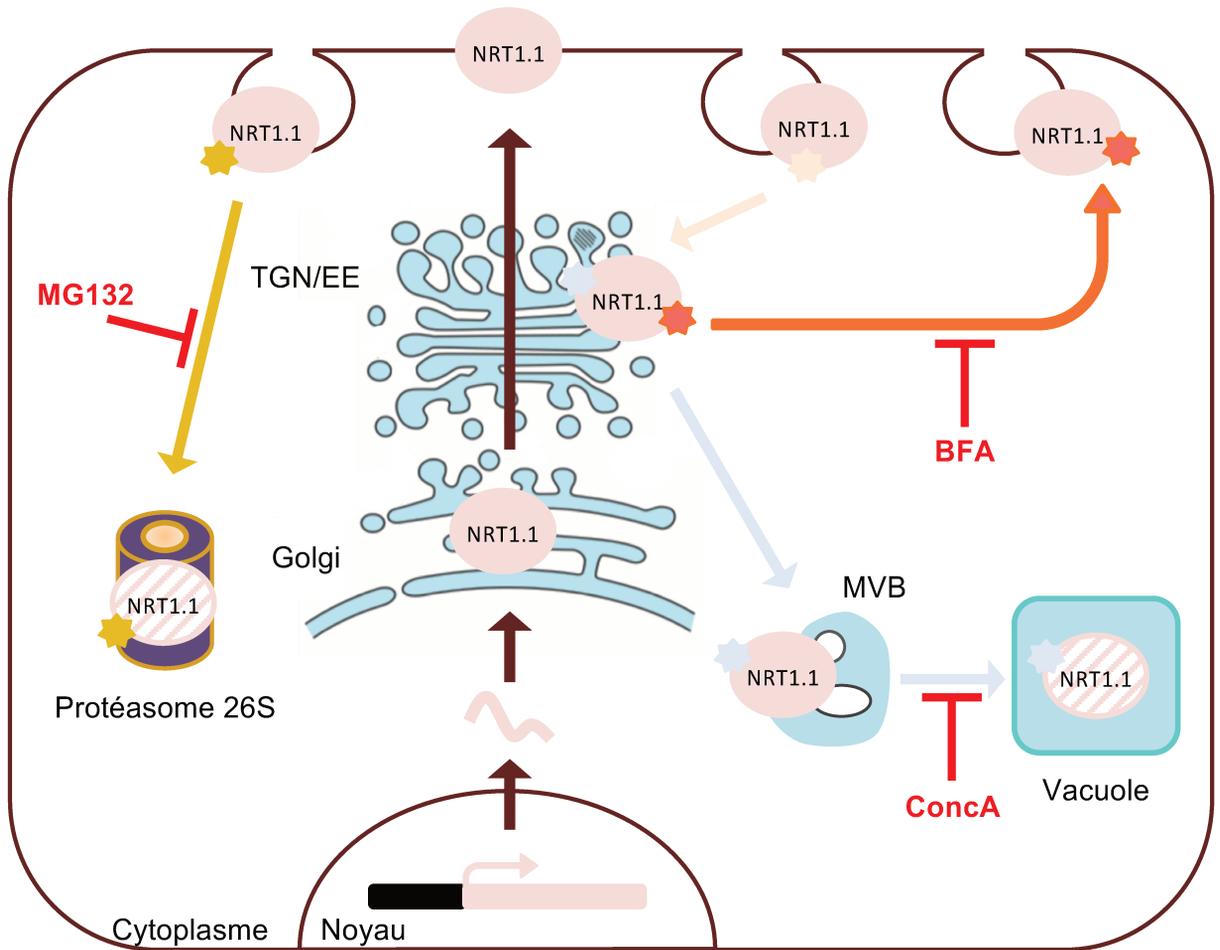
## Chapitre II

suivante : des oligos dT (1  $\mu$ L) sont ajoutés à 5  $\mu$ L d'ARN de chaque échantillon de même concentration qui sont par la suite incubés 5 minutes à 70°C et 5 minutes dans de la glace. Enfin, une solution composée de 5  $\mu$ L de tampon M-MLV (5X), 1,25  $\mu$ L de dNTPs (10 mM) et 0.5  $\mu$ L de reverse transcription M-MLV pour un volume total de 25  $\mu$ L est ajoutée dans le mélange. La synthèse des ADNc se termine par une incubation à 40°C pendant 10 minutes, puis à 50°C pendant 50 minutes et enfin à 70°C pendant 10 minutes. Les échantillons sont dilués quatre fois par d'H<sub>2</sub>O déminéralisée. Les lots d'amorce utilisés sont répertoriés dans le tableau II.4.

L'amplification par PCR quantitative est réalisée à l'aide du kit SYBR Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) avec 2  $\mu$ L d'ADN, 5  $\mu$ L de SybrGreen et 3  $\mu$ L d'amorces (1  $\mu$ M). Les séquences des amorces utilisées, ont été dessinées à l'aide du site « QuantPrime » (tableau II.4). Les conditions d'amplification sont : pré-incubation de 30 secondes à 95°C, 42 cycles d'amplification (5 secondes à 95°C, 10 secondes à 60°C et 30 secondes à 72°C) puis 5 secondes à 95°C suivi de 1 minute à 65°C. Les Crossing point (Cp) ont été calculés par le logiciel LightCycler480 (Roche) avec la méthode du maximum de la dérivée seconde. Ils correspondent au nombre de cycles à partir duquel l'amplification devient linéaire. Ils rendent compte du nombre initial de copies d'ADNc. Les niveaux relatifs des transcrits (RTL) sont calculés par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta C_p}$ . Cette méthode permet de calculer la quantité relative d'un gène d'intérêt par rapport à un gène de référence et afin d'examiner si l'expression des gènes était significativement différente entre les traitements et/ou les génotypes, un test de T-Student a été appliqué.

## VI. Architecture racinaire

L'analyse de l'architecture racinaire a nécessité le repiquage des plantules sur milieu frais à 8 jours de croissance pour faciliter l'analyse finale des plantes âgées de 12 jours. Les boîtes de Pétri ont été numérisées à l'aide d'un scanner Epson Perfection V700 PHOTO (couleur 24 bits; résolution 600 dpi). Les paramètres du système racinaire tels que la longueur de la racine primaire, la longueur, le nombre ainsi que la densité des racines latérales ont été mesurés par le programme Neuron J du logiciel ImageJ. Les photographies du système racinaire de tous les génotypes ont été prises à l'aide d'un appareil photo numérique Nikon D90. Pour analyser les paramètres de croissance des racines, le test statistique de T-Student a été utilisé pour montrer les différences statistiques entre les génotypes et/ou les traitements.



**Figure II.1 : Traitements pharmacologiques possibles sur la dynamique des protéines.**

Différents inhibiteurs pharmacologiques existent pour mettre en évidence la dynamique des protéines membranaires. La Brefeldin A (BFA) bloque les mécanismes de sécrétion et de recyclage et forme ainsi de « grands corps BFA ». La Concanamycine A (ConcA) inhibe la dégradation vacuolaire des protéines. Le MG132 est lui impliqué dans la répression de la dégradation des protéines par le protéasome 26S.

### VII. Traitements pharmacologiques

Plusieurs traitements ont été appliqués pour les observations microscopiques ainsi que pour les études biochimiques. Lors des observations microscopiques au microscope confocal, les plantes ont, soit été transférées à l'obscurité durant 4h ou bien traitées avec un inhibiteur, la concanamycine (ConcA) à 2  $\mu\text{M}$  (DMSO stock 2 mM). Le traitement à la Brefeldin A (BFA) a été effectué à une concentration de 5  $\mu\text{M}$  durant 1h. Ces différents traitements ont soit été appliqués seuls, soit supplémentés de 100  $\mu\text{M}$  de Cycloheximide (CHX). Les plantes traitées avec ces inhibiteurs ont été utilisées lors d'expérimentations indépendantes. Pour cela, les plantes entières âgées de 10 jours ont été transférées sur milieu liquide 0 mM et 1 mM  $\text{KNO}_3$  complémentés des différents inhibiteurs et incubés 1h à T°C ambiante (Figure II.1).

Pour les analyses en Western Blot, les échantillons enrichis des parties racinaires cultivées en hydroponie durant 5 semaines sur 1 mM  $\text{KNO}_3$  ont été transférés soit dans un milieu liquide dépourvu de  $\text{NO}_3^-$ , soit sur milieu 1 mM  $\text{NO}_3^-$  contenant 100  $\mu\text{M}$  de CHX, puis prélevés à 6h et 24h d'incubation.

### VIII. Analyses biochimiques

#### 1) *Extraction des fractions microsomales*

L'extraction des membranes microsomales a été effectuée sur les différents milieux préalablement décrits et dans une pièce à 4°C pour conserver au mieux le matériel biologique. Après récolte, les racines sont séchées *via* l'utilisation d'une essoreuse, pesées puis broyées à l'aide d'un « Waring Blendor » une fois sous vitesse douce puis 4 fois sous vitesse forte pendant 10 secondes. Le broyage des racines est réalisé en présence d'une solution du Tampon de broyage contenant 50 mM Tris ; 500 mM Saccharose ; 10% de Glycérol ; 20 mM Éthylènediaminetétraacétique (EDTA) ; 20 mM d'acide egtazique (EGTA) ; 50 mM Florure de Sodium (NaF) ; 5 mM  $\beta$ -glycérophosphate ; 1 mM phenantroline ; 0.6% Polyvinylpyrrolidone (PVP) et 10 mM d'acide Ascorbique auquel est ajouté juste avant utilisation 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ; 5 mM Dithiothreitol (DTT) et 1 mM  $\text{Na}_2$  Vanadate. Le broyat est ensuite filtré à travers une toile à bluter ( $\varnothing$  100  $\mu\text{m}$ ) puis centrifugé à 13000 rpm pendant 25 minutes à 4°C à l'aide de la centrifugeuse BECKMAN Avanti™ J-25. Le surnageant où se trouvent les microsomes est à nouveau filtré à travers deux filtres de  $\varnothing$  60  $\mu\text{m}$  et  $\varnothing$  45  $\mu\text{m}$  puis la solution obtenue est centrifugée à l'ultracentrifugeuse BECKMAN Coulter Optima™ L-90K à 27000 rpm pendant



## Chapitre II

25 minutes à 4°C. Après l'élimination complète du surnageant, le culot est repris dans une solution de conservation composée de 10 mM Tris pH6-8 ; 20% Glycerol et 250 mM Sorbitol à laquelle est ajouté juste avant usage 1 mM de Pefabloc (PMSF) ; 5 mM Dithiothreitol (DTT) et 2 µg/mL Leupeptine. Le mélange contenant les microsomes est transféré dans un « Potter-Elvehjem » et 10 allers-retours avec le pilon sont nécessaires pour obtenir une homogénéisation efficace. Les microsomes sont ensuite conservés à -80°C.

### **2) Extraction des protéines**

Des analyses de Western Blot ont été aussi effectuées sur des protéines d'intérêt issues d'extraits protéiques de plantes âgées de 12 jours et cultivées sur 0, 1 et 10 mM KNO<sub>3</sub>. Les protéines totales ont été extraites à partir d'environ 1 g de matière fraîche de racines, de feuilles ou de plantes entières. Les extraits protéiques ont été préparés en broyant manuellement les tissus à l'aide d'un mortier et pilon, dans le tampon d'extraction et de lyse RIPA (300 µL pour 100 mg de MF) préalablement préchauffé à 94°C pour faciliter l'extraction. Le Tampon RIPA est composé de 50 mM Tris -HCl ; 25 mM EDTA pH8 et 5% SDS auquel est ajouté pour 1 mL Tampon d'extraction et de lyse RIPA, 1 µL d'un Cocktail d'inhibiteur de Protéase (×1000) et 100 µL DTT 1M. Après l'obtention d'une suspension liquide, le broyat est ensuite transféré dans des tubes Eppendorf (1.5 mL) et vortexé pendant 30 secondes. Une centrifugation est effectuée à 14000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante. Suite à l'élimination de la totalité des débris cellulaires, le surnageant est récupéré et conservé à -20°C.

### **3) Dosage des protéines**

Pour estimer la quantité de protéines totales que contiennent les extraits protéiques, le réactif de Pierce (ThermoFischer Scientific) a été utilisé. Le réactif de Pierce est une méthode colorimétrique rapide et prête à l'emploi pour la quantification totale des protéines. La gamme étalon a été réalisée à partir d'une solution d'albumine provenant de sérum bovin (BSA) à 1 mg/mL pour obtenir des solutions finales à 125 µg/mL ; 250 µg/mL ; 500 µg/mL ; 750 µg/mL ; 1000 µg/mL ; 1500 µg/mL et 2000 µg/mL. La gamme étalon ainsi que les échantillons ont été analysés en *triplica* et déposés sur une plaque transparente de 96 puits. Chaque point de la gamme a été dilué au demi grâce au Tampon d'extraction et de lyse RIPA décrit ci-dessus. De la même façon, chaque répétition des échantillons à doser a été diluée au demi dans de l'H<sub>2</sub>O milliQ. Le réactif de Pierce (1g/20mM) est ensuite ajouté dans chaque puits. Laisser incuber 5



## Chapitre II

minutes sous agitation douce à température ambiante puis la plaque transparente contenant la gamme et les échantillons est placée au lecteur de microplaque Victor<sup>2</sup><sup>™</sup> 1420 Multilabel Counter Wallac (Perkin Elmer life sciences) puis analysée à une absorbance de 660 nm. La lecture est réalisée deux fois et la moyenne des 2 lectures est utilisée pour estimer la concentration finale. Pour évaluer la concentration d'un échantillon, il suffit alors de reporter la mesure sur la courbe étalon de la gamme qui donnera la concentration correspondante.

### **4) Immunoprécipitation**

Le protocole d'immunoprécipitation protéique est celui du kit « Myltenyi Biotech  $\mu$ MACS GFP Tagged Protein Isolation ». Préalablement, 100  $\mu$ L d'échantillon (InPut) ont été prélevés en tant que contrôle. Les extraits de protéines totales ont été transférés dans des Falcon 15 mL dans lesquels ont été rajoutés 50  $\mu$ L de billes  $\mu$ MACS GFP Tagged, puis une incubation d'1h à 4°C a été réalisée sous agitation douce. Le mélange a ensuite été déposé sur une colonne MACS préalablement équilibrée avec 200  $\mu$ L de Tampon RIPA. En parallèle, 100  $\mu$ L d'échantillon passé à travers la colonne MACS (Flowthrough) sont récupérés en tant que contrôle. Les protéines d'intérêt marquées (NRT1.1-GFP) et associées aux billes GFP sont transférées et retenues magnétiquement dans la colonne MACS suite aux quatre premiers lavages avec le Tampon Wash 1 et le dernier lavage avec le Tampon Wash 2, fournis avec le kit. Le Tampon Leammli préparé avec 0.02% Bleu de Bromophenol : 62.5 mM Tris-HCl pH 6 ; 3% SDS ; 10% Glycérol et 0.1 M DTT est préchauffé à 94°C et 20  $\mu$ L sont déposés sur la colonne MACS afin d'éliminer la totalité du Tampon d'extraction et de lyse RIPA. Enfin, les protéines d'intérêt immunoprécipitées sont éluées par l'ajout de 100  $\mu$ L de Tampon Leammli et récupérées dans un nouveau tube.

### **5) Préparation des gels SDS-PAGE**

Les protéines sont séparées sur gel d'acrylamide 12 % préalablement préparé avec deux solutions : une solution de « Running » et une solution de « Stacking » à l'aide du kit de préparation Gel SDS PAGE de chez BIORAD. Après avoir monté les deux plaques de verre sur le support pour les maintenir bien alignées l'une en face de l'autre, la solution de « Running » préparée avec du Tris-HCl 1M pH 8.8, 40% acrylamide/bisacrylamide ; 10% SDS ; 10% Ammonium PerSulfate (APS) et 0.05% Temed, est versée entre elles jusqu'au 3/4. La préparation est ensuite recouverte par environ 1 mL d'isopropanol et la polymérisation dure



## Chapitre II

environ 15 à 20 minutes. Des lavages à l'eau milliQ se succèdent pour éliminer en totalité la solution d'isopropanol puis les plaques en verre sont séchées délicatement pour retirer l'excès d'eau. La solution de « Stacking » composée de Tris-HCl 1M pH 6.8, 40% acrylamide/bisacrylamide ; 10% SDS ; 10% Ammonium PerSulfate (APS) et 0.05% Temed est versée au-dessus du gel polymérisé entre les deux plaques de verre et un peigne de 10 puits est inséré. Après la seconde polymérisation d'environ 15 à 20 minutes, le peigne est retiré et les puits sont nettoyés si besoin.

### 6) *Western Blot*

Les échantillons d'IP, d'InPut, de Flowthrough et de protéines totales sont dénaturés à température ambiante pendant 20 minutes et séparés sur gel d'acrylamide 12% placé dans une cuve. Les échantillons sont déposés dans les puits et le tout est recouvert d'un Tampon de Glycine SDS (Tris 0.25 M ; Glycine 0.192M ; 0.1% SDS). La migration s'effectue à 20 mA pendant 2 h environ, à 4°C. Afin de rendre les protéines accessibles à la détection par les anticorps (Ac) anti-Ubiquitine (@Ub), anti-NRT1.1 (@NRT1.1), anti-GFP (@GFP) et anti-Actine (@ACT), les échantillons sont transférés sur membranes en polyvinylidène (Immobilion-P) activées au Méthanol. Le transfert sur membrane est réalisé par courant électrique de 35 V pendant 16 h à 4°C sous agitation dans une solution de transfert contenant 10 mM CAPS et 10% Méthanol ajusté à pH 11 avec du NaOH 6N. Suite au transfert des protéines sur la membrane, la membrane est lavée avec une solution de PBS 1X pH 7.3 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 40 mM ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 160 mM ; NaCl 1.15 M) sous agitation douce à température ambiante. La membrane a ensuite été saturée par une solution de PBSTB composée de 1X PBS ; 0.1% Tween-20 et 1% BSA à température ambiante sous agitation douce.

L'immunodétection de la protéine NRT1.1 native ou NRT1.1-GFP a été réalisée à l'aide d'un anticorps commercial anti-NRT1.1 issu de lapin et dilué au 1:5000 dans du PBSTB ou à l'aide d'un anticorps monoclonal GFP JL\_8 Takara, issu de souris, et dilué au 1:4000 dans du PBSTB. L'anticorps anti-Actine, issu de lapin, a été utilisé pour contrôler la quantité de protéine déposée dans les puits et a été dilué au 1:2500 dans du PBSTB. L'anticorps anti-Ubiquitine P4D1 (Santa Cruz Biotechnology) issu de souris a été utilisé pour mettre en avant les formes monoubiquitinées et les formes poly-ubiquitinées de liaison de Lysines non spécifique de la protéine NRT1.1 et a été dilué au 1:1000 dans du PBSTB. L'incubation des membranes avec ces différents anticorps a été effectuée durant 2h30 à température ambiante sous agitation



## Chapitre II

douce. Les membranes sont ensuite lavées 2 fois 10 minutes avec la solution de PBSTB et à nouveau incubées pendant 1h30 sous agitation douce à température ambiante, soit avec l'anticorps secondaire issu de lapin (dilution 1:20000 dans le Tampon PBSTB) ou soit avec l'anticorps secondaire issu de souris (dilution 1:10000 dans le Tampon PBSTB) selon l'anticorps primaire utilisé. Enfin quatre lavages dans la solution PBS sous agitation douce à température ambiante pendant 10 minutes/bain ont été réalisés. La détection des protéines a été faite par chimioluminescence par l'emploi d'une solution ECL en utilisant le système d'imagerie LAS3000 (Fujifilm).

### IX. Coloration à la $\beta$ -Glucuronidase

Les plantes entières sont prélevées puis les tissus sont fixés à l'aide du Tampon de préfixation contenant 1,5% Formaldéhyde ; 0,05% Triton et 50 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7 pendant 45 minutes à température ambiante. Cette étape est optimisée par une infiltration de 5 minutes sous cloche à vide et progressivement la cloche est remise à pression atmosphérique. Afin d'éliminer le Tampon de préfixation, les plantes sont lavées deux fois dans 50 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7, puis une fois dans 50 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7 supplémenté de 0,05% Triton. La coloration des tissus est réalisée à l'aide d'une solution contenant : 50 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7 ; 0,5 mM Ferricyanide ; 0,05 mM Ferrocyanide ; 0,05% Triton X100 ; 1 mM X-Gluc pendant 30 sous cloche à vide puis une incubation de 48h à 37°C a été réalisée. La solution de coloration est retirée délicatement et un premier lavage dans 50 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7 durant 5 minutes a été effectué. Les plantes sont ensuite déshydratées progressivement dans une gamme croissante de solution d'éthanol (EtOH) : 30 minutes dans de l'EtOH 20 %, 30 minutes dans de l'EtOH 50 %, 30 minutes dans de l'EtOH 70 %, 30 minutes dans de l'EtOH 80 %, 30 minutes dans de l'EtOH 95 %. Les échantillons sont montés entre lame et lamelle contenant de l'EtOH 100 % + Glycérol (3:1) et observés au microscope droit à épifluorescence BX16. Cette solution est également utilisée pour la conservation des tissus.

### X. Observations microscopiques

#### 1) *Imagerie Confocale à balayage laser*

Les observations microscopiques ont été faites à l'aide du microscope Confocal. Les plantules, immergées dans de l'eau osmosée, sont montées entre lame et lamelle. L'automate



## Chapitre II

utilisé est un microscope inversé LSM 510 META Axiovert 200M équipé d'un objectif Plan-Apochromat 20x/0.75 (Zeiss, Gottingen, Allemagne) et contrôlé par le logiciel LSM 510 du fournisseur. La GFP est excitée à 488 nm par une source Argon et les ondes émises par l'échantillon sont filtrées par une bande passante de 505 – 530 nm. L'ouverture du diaphragme (pinhole) est réglée à 1 unité Airy, la résolution est de  $1024 \times 1024$  pour comparer l'expression et l'accumulation des protéines reportrices.

### ***2) Imagerie à épifluorescence***

Les images mCherry ont été observées à l'objectif  $\times 5$  EC Plan-Neofluar 0.16NA au microscope épifluorescence Zeiss Observer 7/Apotome piloté par le logiciel Zen 2. Les plantules, immergées dans de l'eau osmosée, sont montées entre lame et lamelle. L'acquisition a été réalisée en Z-stack par caméra monochrome Hammamastu Orca Fllach 4 et la mCherry (DsRed) a été excitée à 545 nm et émise à 605 nm.

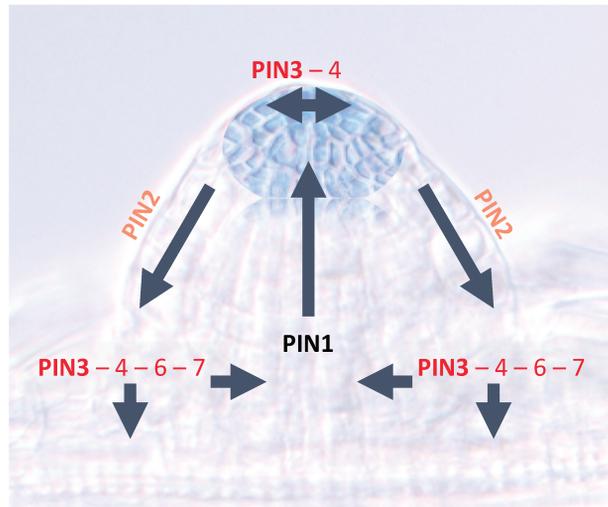
### ***3) Imagerie à épifluorescence de champ plein***

Les observations microscopiques des lignées GUS ont été réalisées à l'aide du microscope droit à épiflorescence BX16 (Olympus, Japon). Les plantules sont montées entre lame et lamelle et immergées dans de l'eau osmosée,. La prise d'images a été possible par la caméra couleur Jenoptik C5 dédiée aux observations en lumière blanche piloté le logiciel Jenoptik.



## CHAPITRE III :

# **Rôle de NRT1.1 dans le trafic de l'auxine contrôlant le développement des racines latérales en réponse au $\text{NO}_3^-$**



**Figure III.1 : Modèle « fontaine » du transport de l'auxine dans le PRL.**

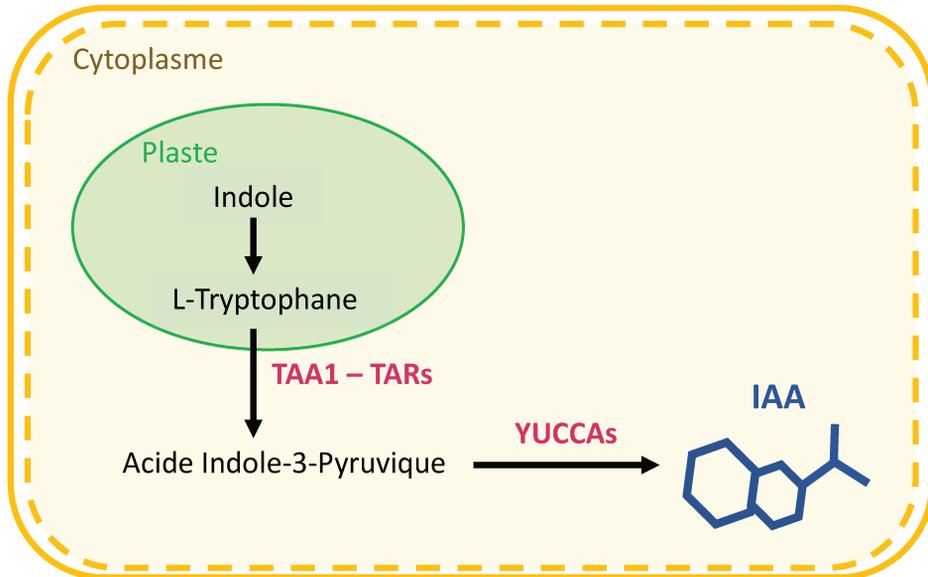
Représentation schématique de la distribution auxinique dans le PRL, assurée par les transporteurs PINs. PIN1 assure le transport acropète de l'hormone, menant à son accumulation à l'apex du primordium. PIN2 gouverne le transport basipète de l'auxine vers l'extérieur du PRL. PIN3 – 4 – 6 – 7 acheminent l'auxine pour être soit évacuée hors du PRL, soit recyclée vers la voie de transport acropète. La coloration bleue visualise l'accumulation d'auxine à l'apex du PRL (activité *DR5::GUS*). A noter que le modèle représenté correspond à celui valable pour un primordium après émergence, car PIN2 n'est pas exprimé avant. D'après Benkova et al., 2003.

### I. Introduction

L'auxine est une phytohormone majeure qui intervient dans de nombreux aspects du développement dont le contrôle de l'architecture de la plante, la réponse à la gravité ou encore l'émission des organes latéraux (Vanneste and Friml, 2009). Il a été longtemps admis que l'auxine est synthétisée au niveau des méristèmes apicaux et qu'elle migre par la suite en direction des autres organes, notamment des racines (Brumos *et al.*, 2018 ; Casimiro *et al.*, 2001 ; Wu *et al.*, 2007). L'auxine est transportée à travers les tissus par deux voies. D'une part, un transport rapide et non-polarisé, assuré par le système vasculaire et qui permet le transport longue distance de l'auxine. D'autre part, un transport de cellule à cellule, lent et polarisé et qui permet de mettre en place des gradients d'auxine locaux, c'est-à-dire une accumulation d'auxine à des positions particulières qui déclenche l'activation de gènes permettant la formation d'un nouvel organe (Friml, 2003 ; Vanneste and Friml, 2009).

Ce transport polarisé nécessite l'action de transporteurs d'auxine qui sont des protéines membranaires, dont la localisation parfois limitée sur une face particulière de la cellule détermine le déplacement de l'auxine dans une direction ou dans une autre. Il existe deux types de transporteurs d'auxine. Les transporteurs d'influx assurent l'entrée de l'auxine dans la cellule comme la protéine AUXIN RESISTANT 1 (AUX1) et des protéines semblables LIKE-AUX1 (LAX) (Marchant *et al.*, 2002 ; Swarup *et al.*, 2008). Les transporteurs d'efflux PINFORMED (PIN) sont responsables de l'export d'auxine hors de la cellule (Kramer and Bennett, 2006). Une autre famille, celle des transporteurs ABCB, joue également un rôle dans le transport de l'auxine (Luschnig, 2002).

De façon générale, le transport polarisé médié par les transporteurs d'auxine est indispensable à la génération des maxima locaux d'auxine permettant la formation des racines latérales. En particulier, un gradient d'auxine est formé dans le PRL en développement et est nécessaire à la formation du méristème de RL (Benková *et al.*, 2003). Selon le modèle « fontaine » proposé par Benkova *et al.*, (2003), ce gradient résulte de l'action de plusieurs transporteurs (Figure III.1). L'auxine pénètre dans le PRL *via* les tissus internes grâce à un transport acropète assuré essentiellement par PIN1. Au niveau de l'apex du PRL, les transporteurs PIN3 et PIN4 redistribuent l'auxine vers l'épiderme de cet organe, où PIN2 en assure le transport basipète vers la base du PRL. A ce niveau, l'auxine est évacuée ou recyclée par l'action conjuguée de PIN3, PIN4, PIN6 et PIN7. La mutation simultanée de plusieurs des



**Figure III.2 : Voie de biosynthèse de la principale forme d’auxine, IAA chez les plantes.**

Synthétisé dans le plaste, à partir de l’indole, le L-Tryptophane est converti en acide indole-3-pyruvique par le complexe enzymatique TAA1 – TARs. Les enzymes YUCCAs catalysent la conversion de l’acide indole-3-pyruvique en acide indole-3-acétique (IAA) (D’après Zhao, 2012).

### Chapitre III

gènes codant ces transporteurs perturbe fortement l'établissement du gradient d'auxine puisqu'elle induit la formation de PRLs désorganisés (Benková *et al.*, 2003). Par exemple, la formation de massifs cellulaires chez le mutant *pin1pin3pin4* traité avec de l'auxine exogène montre que ces transporteurs jouent un rôle prépondérant dans la formation du PRL dès le stade II.

Bien que le transport polarisé de l'auxine dépende essentiellement de l'action des transporteurs d'efflux PINs, l'intervention des transporteurs d'influx AUX/LAX est tout aussi importante. Ces transporteurs assurent l'entrée de l'auxine dans les cellules, et l'injectent ainsi dans les voies de transport polarisé de cellules à cellules, génératrices des gradients d'auxine. La famille AUX/LAX est composée de 4 membres chez *A.thaliana* : AUX1, LAX1, LAX2 et LAX3. Contrairement aux PINs, les différents transporteurs AUX/LAX ont des fonctions spécifiques et ne semblent pas présenter de redondance fonctionnelle (Swarup and Peret, 2012). Pour exemple, l'émergence des RLs fait intervenir AUX1 pour faciliter l'entrée de l'auxine à l'intérieur du PRL, mais aussi LAX3 exprimé dans le cortex et les cellules épidermiques pour induire des enzymes impliquées dans le relâchement des parois cellulaires afin de permettre au PRL d'émerger (Swarup *et al.*, 2008).

De nombreux modèles mathématiques suggèrent que dans les racines, le transport polarisé de l'auxine est amplement suffisant pour générer des gradients d'auxine morphogènes et que la biosynthèse locale d'auxine joue un rôle minime dans le développement racinaire (Grieneisen *et al.*, 2007). Chez les plantes, l'acide indole-3-acétique (IAA) est la principale forme d'auxine (Normanly, 2010). Deux voies de biosynthèse de l'IAA coexistent mais la voie dépendante du Tryptophane (L-Trp) semble être la voie principale (Figure III.2) : l'enzyme tryptophane aminotransférase (TAA1) et deux autres enzymes homologues (TAR1 et TAR2) convertissent le L-Tryptophane en Acide Indole-3-Pyruvique (IPyA) (Stepanova *et al.*, 2008 ; Tao *et al.*, 2008 ; Yamada *et al.*, 2009). Puis, les enzymes appartenant à la famille des flavines monooxygénases YUCCA (YUC) catalysent la conversion de l'IPyA en IAA (Mashiguchi *et al.*, 2011 ; Stepanova *et al.*, 2011 ; Won *et al.*, 2011). Pour déterminer la contribution relative de la biosynthèse locale d'auxine dans le développement racinaire, un système d'expression inductible a été produit pour surexprimer de façon spécifique le gène *YUC3* au niveau des parties aériennes d'un mutant affecté pour les cinq gènes *YUC* (*yucQ*). Bien que cette surexpression conduise et à des phénotypes aériens liés à une surproduction d'auxine, les racines de ces transformants restent courtes et agravitropiques. Ces résultats démontrent que



### Chapitre III

l'auxine produite dans les parties aériennes n'est pas suffisante pour permettre un développement racinaire normal, et qu'une biosynthèse locale d'auxine est nécessaire pour le développement des PRLs (Chen *et al.*, 2013).

Le modèle proposé par Krouk *et al.*, (2010b) postule que la protéine NRT1.1 facilite le transport basipète de l'auxine hors du PRL en absence ou à faible concentration de  $\text{NO}_3^-$  (voir chapitre d'introduction bibliographique Figure I.13). Étant donné la complexité de la régulation de l'accumulation d'auxine au sein des PRLs, qui fait intervenir un grand nombre de transporteurs PIN, AUX/LAX et ABCB, il est possible d'envisager des interactions entre NRT1.1 et les autres transporteurs d'auxine. Notamment, NRT1.1 pourrait moduler les gradients d'auxine dans les PRLs non seulement directement par l'intermédiaire de son activité de transport d'auxine, mais aussi indirectement, en régulant les autres transporteurs de l'hormone au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel via son action sur l'accumulation d'auxine ou par une signalisation  $\text{NO}_3^-$ . De plus, compte-tenu du rôle probable de la biosynthèse locale d'auxine dans le développement des PRLs, il est également envisageable qu'une action indirecte de NRT1.1 sur les gradients locaux de l'hormone puisse cibler les enzymes de cette biosynthèse dans les racines. De fait, une étude récente a montré que le gène *TAR2* est induit par une carence modérée en azote dans la racine, et que sa mutation conduit à une quasi-absence du développement des RLs dans ces conditions (Ma *et al.*, 2014). Or, au début de cette thèse, rien n'était connu sur l'effet de NRT1.1, et plus largement de la signalisation  $\text{NO}_3^-$ , sur l'expression des transporteurs de l'auxine et des enzymes de sa biosynthèse dans les PRLs. Afin de compléter le modèle de Krouk *et al.*, (2010b), nous avons donc étudié l'effet de l'azote et plus spécifiquement du  $\text{NO}_3^-$  et de NRT1.1 sur l'expression des transporteurs d'auxine PIN, AUX/LAX et ABCB et du gène *TAR2* dans les racines. Une partie de ce travail avait été initié lors de la thèse d'Eléonore Bouguyon (2013). Les résultats obtenus ont permis d'approfondir la compréhension du rôle de NRT1.1 dans le contrôle de l'émergence des PRLs. En effet, ces résultats indiquent que l'action de NRT1.1 n'est pas limitée au contrôle des flux de l'hormone à l'intérieur des PRLs (Modèle de Krouk *et al.*, 2010b), mais concerne aussi le contrôle de deux autres processus majeurs du développement de ces organes : (i) la biosynthèse locale d'auxine en amont, qui alimente le transport acropète de l'hormone vers les PRLs, et (ii) la signalisation auxinique en aval, qui gouverne le remodelage des tissus de la racine primaire pour permettre l'émergence des PRLs. Cela a permis de proposer un nouveau modèle de régulation du développement des PRLs par NRT1.1, élargi par rapport à celui proposé par Krouk *et al.*, (2010b). Ce travail a fait l'objet de la publication d'un article scientifique intitulé « The



### Chapitre III

Arabidopsis NRT1.1 transceptor coordinately controls auxin biosynthesis and transport to regulate root branching in response to nitrate » dans *Journal of Experimental Botany*, qui est reproduit ci-dessous. De plus, des résultats complémentaires ont été obtenus après la publication de cet article, et sont présentés à la suite.

#### II. Maghiaoui *et al.*, (2020a)

### The Arabidopsis NRT1.1 transceptor coordinately controls auxin biosynthesis and transport to regulate root branching in response to nitrate

**Amel Maghiaoui**, Eléonore Bouguyon, Candela Cuesta, Francine Perrine-Walker, Carine Alcon, Gabriel Krouk, Eva Benková, Philippe Nacry, Alain Gojon, Liên Bach (2020)





RESEARCH PAPER

# The Arabidopsis NRT1.1 transceptor coordinately controls auxin biosynthesis and transport to regulate root branching in response to nitrate

Amel Maghiaoui<sup>1,\*</sup>, Eléonore Bouguyon<sup>1,\*†</sup>, Candela Cuesta<sup>2,‡</sup>, Francine Perrine-Walker<sup>1,§</sup>, Carine Alcon<sup>1</sup>, Gabriel Krouk<sup>1</sup>, Eva Benková<sup>2</sup>, Philippe Nacry<sup>1</sup>, Alain Gojon<sup>1</sup> and Liên Bach<sup>1,¶</sup>

<sup>1</sup> BPMP, Univ Montpellier, CNRS, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France

<sup>2</sup> Institute of Science and Technology Austria, Klosterneuburg, 3400, Austria

<sup>†</sup> Present address: Site de Bellepierre, UFR Santé, Université de la Réunion, 1 Allée des Aigues Marines, 97487 Saint Denis Cedex, France

<sup>‡</sup> Present address: Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias, Departamento de Biología de Organismos y Sistemas, Universidad de Oviedo, Spain

<sup>§</sup> Present address: School of Life and Environmental Sciences, F22 Life, Earth and Environmental Sciences Building, University of Sydney NSW 2006, Australia

\* These authors contributed equally to this work.

¶ Correspondence: [lien.bach@supagro.fr](mailto:lien.bach@supagro.fr)

Received 12 January 2020; Editorial decision 7 May 2020; Accepted 13 May 2020

Editor: Angus Murphy, University of Maryland, USA

## Abstract

In agricultural systems, nitrate is the main source of nitrogen available for plants. Besides its role as a nutrient, nitrate has been shown to act as a signal molecule in plant growth, development, and stress responses. In Arabidopsis, the NRT1.1 nitrate transceptor represses lateral root (LR) development at low nitrate availability by promoting auxin basipetal transport out of the LR primordia (LRPs). Here we show that NRT1.1 acts as a negative regulator of the *TAR2* auxin biosynthetic gene in the root stele. This is expected to repress local auxin biosynthesis and thus to reduce acropetal auxin supply to the LRPs. Moreover, NRT1.1 also negatively affects expression of the *LAX3* auxin influx carrier, thus preventing the cell wall remodeling required for overlying tissue separation during LRP emergence. NRT1.1-mediated repression of both *TAR2* and *LAX3* is suppressed at high nitrate availability, resulting in nitrate induction of the *TAR2* and *LAX3* expression that is required for optimal stimulation of LR development by nitrate. Altogether, our results indicate that the NRT1.1 transceptor coordinately controls several crucial auxin-associated processes required for LRP development, and as a consequence that NRT1.1 plays a much more integrated role than previously expected in regulating the nitrate response of root system architecture.

**Keywords:** Auxin signaling, development, lateral root primordia, nitrate, NRT1.1, transceptor.

## Introduction

Nitrogen (N) is an essential element that plants can acquire from various inorganic or organic sources in the soil, but nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) is the main form taken up and assimilated by most species (Nacry *et al.*, 2013). Soil  $\text{NO}_3^-$  concentration is often a major factor limiting the growth and yield of crop plants as it fluctuates dramatically in both time and space (Crawford and

Glass 1998; Miller *et al.*, 2007). To cope with this, plants are able to quickly modulate their  $\text{NO}_3^-$  acquisition efficiency according to changes both in their own internal N status and in the external  $\text{NO}_3^-$  availability (Forde 2002; Nacry *et al.*, 2013; Kiba and Krapp 2016; O'Brien *et al.*, 2016). In addition to the regulation of root  $\text{NO}_3^-$  transport systems (Kiba and Krapp, 2016; Bellegarde *et al.*, 2017; Jacquot *et al.*, 2017), modification of root system architecture (RSA) is another key component of this response (Nacry *et al.*, 2013; Forde, 2014; Giehl and von Wirén, 2014; Kiba and Krapp, 2016; O'Brien *et al.*, 2016). In more detail,  $\text{NO}_3^-$  has a dual effect on RSA in many species. On the one hand, high  $\text{NO}_3^-$  provision to the plant has a systemic repressive effect (Zhang and Forde, 1998; Giehl and von Wirén, 2014), and as a consequence mild  $\text{NO}_3^-$  limitation results in a general stimulation of root growth for improved foraging of the soil (Forde, 2002; Hermans *et al.*, 2006; Giehl and von Wirén, 2014). On the other hand,  $\text{NO}_3^-$  supply locally stimulates growth of the roots in contact with a high  $\text{NO}_3^-$  concentration, thereby contributing to preferential colonization and exploitation of the  $\text{NO}_3^-$ -rich areas of the soil (Drew, 1975; Forde, 2002; Ruffel *et al.*, 2011; Nacry *et al.*, 2013). In dicotyledonous species in which the root system is generally constituted of a primary root originating from the embryo on which lateral roots (LRs) develop post-embryonically,  $\text{NO}_3^-$  was generally reported to markedly affect LR development and growth, and to a much lesser extent primary root growth (Forde, 2014). Furthermore, many responses of RSA to changes in  $\text{NO}_3^-$  availability were shown to be due to a signaling rather than a nutritional effect, indicating the crucial role of specific  $\text{NO}_3^-$  sensing and signaling systems (O'Brien *et al.*, 2016; Guan, 2017; Sun *et al.*, 2017).

Compelling evidence indicates that the membrane  $\text{NO}_3^-$  transporter NRT1.1 (CHL1/NPF6.3), first identified as an influx carrier participating in the root uptake of  $\text{NO}_3^-$  (Tsay *et al.*, 1993; Liu and Tsay, 2003), is a central component of the  $\text{NO}_3^-$  sensing and signaling systems in Arabidopsis (Gojon *et al.*, 2009, 2011; Nacry *et al.*, 2013; Forde, 2014; Bouguyon *et al.*, 2015). This led to the proposal that it acts as a  $\text{NO}_3^-$  transceptor (transporter and receptor), with a dual transport and sensing function (Muños *et al.*, 2004; Walch-Liu and Forde, 2008; Ho *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Gojon *et al.*, 2011). In particular, NRT1.1 is a master player in the  $\text{NO}_3^-$  regulation of RSA as it governs many responses of LR growth to  $\text{NO}_3^-$  (Remans *et al.*, 2006; Krouk *et al.*, 2010; Bouguyon *et al.*, 2015; O'Brien *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2017). In Arabidopsis, LRs originate from pericycle founder cells that divide and differentiate in order to initiate a LRP (stage I), which has to develop across overlying tissues to eventually emerge out of the parent root (stage VIII) (Malamy and Benfey, 1997). Through this series of well-defined stages, auxin plays a central role in controlling many steps of LRP development (Dubrovsky *et al.*, 2008; Benková *et al.*, 2003; Bhalerao *et al.*, 2002; Fukaki *et al.*, 2007; Ljung *et al.*, 2001). Within the LRP, an auxin gradient is progressively established with a maximum at the apex that is required for proper growth of the LRP (Benková *et al.*, 2003). This gradient is created by the coordinated activity of efflux proteins (encoded by the *PIN* and *ABCB* gene families) that facilitate movement out of cells and influx transporters (encoded mostly by the *AUX*/

*LAX* gene family) that facilitate auxin entry into cells (Vieten *et al.*, 2007; Petrásek and Friml, 2009). A 'fountain model' was proposed for auxin flow in LRP based on auxin accumulation and auxin transporter expression patterns (Benková *et al.*, 2003). According to this model, an acropetal flow (involving PIN1/7 located in the inner cell layers) allows auxin to come from the primary root stele and to reach the LRP apex where it accumulates, while a basipetal flow (mediated by PIN3/4 in the outer cell layer) redirects the hormone to the primary root. In addition, AUX1, ABCB transporters, and LAX3 have been shown to be involved in LRP development: AUX1 facilitates LRP initiation and emergence (Marchant *et al.*, 2002; Swarup and Péret, 2012) and ABCB1 and ABCB19 physically interact with PIN1 as well as with AUX1 for normal LR initiation and development (Mravec *et al.*, 2008). The influx/efflux auxin transporter ABCB4 (Yang and Murphy, 2009; Wu *et al.*, 2010; Kubeš *et al.*, 2012) was also identified as a negative regulator of LRP initiation (Santelia *et al.*, 2005) through a mechanism remaining to be elucidated. Finally, LAX3 plays an important role in LR emergence processes by increasing the level of auxin in LRP overlying cells, thus leading to a remodeling of cortical/epidermal cell walls that facilitates their separation and allows the outgrowth of the LRP (Swarup *et al.*, 2008).

Within this general scheme, we recently proposed a model for the mechanism by which NRT1.1 regulates LR growth in response to  $\text{NO}_3^-$  (Krouk *et al.*, 2010; Bouguyon *et al.*, 2015, 2016). Using heterologous expression systems, we found that NRT1.1 is able to transport not only  $\text{NO}_3^-$  but also auxin. The auxin influx activity of NRT1.1 is, however, inhibited by  $\text{NO}_3^-$  in a concentration-dependent manner (Krouk *et al.*, 2010). Furthermore, we observed that NRT1.1 is expressed in LRPs only in the absence or at low availability of  $\text{NO}_3^-$  (Bouguyon *et al.*, 2016). Taking into account the perfect match between the localization of the NRT1.1 protein with that of the basipetal transport route for auxin (outer cell layer of LRP), we postulated from the above observations that NRT1.1 mediates auxin influx into the outer cell layer of the LRPs, and thus facilitates the basipetal export of auxin out of these organs in the absence of  $\text{NO}_3^-$  or at low  $\text{NO}_3^-$  concentration (Krouk *et al.*, 2010). Accordingly, in the absence of  $\text{NO}_3^-$  or at low  $\text{NO}_3^-$  concentration, NRT1.1 lowers auxin accumulation/signaling (assessed by *DR5* expression) in the LRPs, which in turn leads to an inhibition of the emergence of the LRPs (Krouk *et al.*, 2010; Bouguyon *et al.*, 2015, 2016; Zhang *et al.*, 2019). At higher (>0.5 mM)  $\text{NO}_3^-$  supply, both NRT1.1 expression in LRPs and NRT1.1-dependent auxin transport activity are inhibited. This results in increased auxin accumulation/signaling in LRPs, which favors their emergence. Therefore, the local stimulation of LR growth by  $\text{NO}_3^-$  is explained by the relief of the repressive action of NRT1.1. Accordingly, null mutants for *NRT1.1* (*chl1* mutants) have a much higher LR density than wild-type plants in the absence, but not in the presence, of  $\text{NO}_3^-$  (Krouk *et al.*, 2010; Bouguyon *et al.*, 2015, 2016).

An important point that remains unclear in this model is to know if, in addition to its direct effect on auxin transport in the LRPs, NRT1.1 also acts indirectly through modified expression/activity of other molecular actors determining auxin distribution in these organs. As a matter of fact, auxin transport

in LRP also involves the action of up to ten other auxin carriers, i.e. PIN1–4, PIN7, ABCB1, ABCB4, ABCB19, AUX1, and LAX3 (see Petrášek and Friml, 2009). Interestingly, earlier transcriptome studies at the whole root or whole plant level have revealed that several auxin transporter genes are responsive to  $\text{NO}_3^-$  (Gutiérrez *et al.*, 2007) in an NRT1.1-dependent manner (Wang *et al.*, 2009). Furthermore, there are reports indicating that responses of RSA to nutrients, including N, can be accounted for by changes in expression of *AUX* and *PIN* genes (Li *et al.*, 2011; Giehl *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2017; Naz *et al.*, 2019). Nevertheless, these considerations do not allow any conclusion on a putative role of NRT1.1 in regulating other auxin carriers for modulating LR development because little is known on the regulation of PIN, ABCB, and *AUX/LAX* expression by  $\text{NO}_3^-$  signaling in LRPs. In addition, recent evidence highlights the importance of not only auxin transport, but also local auxin biosynthesis in determining the changes in auxin accumulation in plant tissues in response to external factors (Brumos *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2018). This suggests that the nutrient regulation of RSA may also rely on a control exerted on auxin biosynthesis pathways. Of particular interest is the observation that the Arabidopsis *TAR2* gene, encoding a tryptophan amino transferase catalysing the first step of the Trp-dependent auxin biosynthetic pathway, is required for stimulation of LR growth in response to mild N limitation (Ma *et al.*, 2014). However, nothing is known on the role of this gene in the local  $\text{NO}_3^-$  stimulation of LRP development in connection with NRT1.1-dependent signaling.

In the current work, we thus aimed to investigate how  $\text{NO}_3^-$  regulates the expression of the major auxin transporters (PINs, ABCBs, *AUX1/LAX3*) and of the *TAR2* auxin biosynthetic enzyme during LRP development, and to determine if this regulation can account for an indirect effect of NRT1.1 on LR growth, through its  $\text{NO}_3^-$  signaling action on auxin transporter or auxin biosynthetic enzyme expression. Our work revealed that NRT1.1 has a much more integrated role in regulating LRP development than previously expected. Indeed, our data indicate that NRT1.1 not only participates in auxin transport in LRPs, but also controls both the upstream biosynthesis of the hormone as a source of auxin for the LRPs and the downstream action of auxin for lowering the mechanical resistance of the primary root tissues to LRP outgrowth.

## Materials and methods

### Plant material

The Arabidopsis accessions used in this study were Columbia (Col-0) and Wassilewskija (WS). The following green fluorescent protein (GFP)/yellow fluorescent protein (YFP)-tagged lines were used and crossed with the *chl1-5* mutant (Tsay *et al.*, 1993): *pDR5::VENUS* (Brunoud *et al.*, 2012), *pPIN1::PIN1-GFP* (Benková *et al.*, 2003), *pPIN2::PIN2-GFP* (Xu and Scheres, 2005), *pPIN3::PIN3-GFP* (Zádníková *et al.*, 2010), *pPIN4::PIN4-GFP* (Vieten, 2005), *pPIN7::PIN7-GFP* (Blilou *et al.*, 2005; Mravec *et al.*, 2008), *pAUX1::AUX1-YFP* (Swarup, 2004), *pLAX3::LAX3-YFP* (Swarup *et al.*, 2008), *DR5::GFP* (Ulmasov *et al.*, 1997), *pTAR2::GUS*, and *tar2c* (Ma *et al.*, 2014). The following GFP-tagged lines were used and crossed with the *chl1-10* mutant (Muños *et al.*, 2004): *pABCB1::ABCB1-GFP* (Mravec *et al.*, 2008),

*pABCB4::ABCB4-GFP* (Cho *et al.*, 2007), and *pABCB19::ABCB19-GFP* (Bailey *et al.*, 2008). Plants homozygous for both the *chl1-5* mutation and genes encoding tagged proteins were screened in F<sub>2</sub> and F<sub>3</sub> offspring by PCR for *chl1-5* deletion as described in Mounier *et al.* (2014) and fluorescence. Transgenic Arabidopsis lines expressing *NRT1.1-GFPLoop* in WT background were obtained as described by Bouguyon *et al.* (2016).

### Plant culture and root growth analysis

Seedlings were grown for 12 d in vertical petri dishes according to Krouk *et al.* (2010). Basal culture medium without N was supplemented with the appropriate concentration of  $\text{KNO}_3$  or Gln for each experiment as described in the figure legends. For analysis of root system architecture, Petri dishes were scanned using an Epson Perfection V700 PHOTO scanner (24-bit color; resolution 600 dpi). The root system parameters such as primary root length, lateral root length and number, and lateral root density were measured by the Neuron J plug-in from ImageJ software. Root system photographs for all genotypes were taken using a Nikon D90 digital camera. To analyse root growth parameters, Student's *t*-test was used to show statistical differences between genotypes and treatments.

### RNA analysis

Root samples were frozen in liquid nitrogen and disrupted for 1 min at maximum speed in a Retch mixer mill MM301 homogenizer. Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific), DNase treated (Qiagen), and purified using an RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen), and reverse transcription was achieved with 4 µg of RNAs with ThermoScript RT-PCR System for First-Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific) using an anchored oligo-dT<sub>(20)</sub> primer. Accumulation of transcript was measured by quantitative real-time PCR (LightCycler 480; Roche Diagnostics) using the LightCycler 480 SYBR Green 1 Master kit (Roche Diagnostics). All steps were performed according to the manufacturer's recommendations. The gene expression was normalized using *CLATHRIN* as an internal standard. The specific primers used are summarized in Supplementary Table S1 at JXB online. In order to examine whether gene expression was significantly different between treatments or genotypes, ANOVA followed by a Turkey test or Student's *t*-test was applied.

### β-Glucuronidase staining

Samples were prefixed for 45 min at room temperature in a solution containing 50 mM  $\text{NaPO}_4$  pH 7, 1.5% formaldehyde, and 0.05% Triton X-100. Then plants were washed three times in 50 mM  $\text{NaPO}_4$  pH 7 with 0.05% Triton X-100. Thereafter, samples were stained in 50 mM  $\text{NaPO}_4$  pH 7, 0.5 mM ferricyanide, 0.5 mM ferrocyanide, 0.05% Triton X-100 and 1 mM X-Gluc at 37 °C for 48 h in the dark. After β-glucuronidase (GUS) staining, plants were washed in 50 mM  $\text{NaPO}_4$  pH 7 for 5 min and chlorophyll was removed by ethanol solutions of increasing concentration.

The samples were mounted in 20% ethanol and were imaged by using a ×10, 0.3 NA or ×40, 0.75 NA objective with an Olympus BX61 microscope equipped with a camera (Jenoptik ProgRes).

### Confocal microscopy

For confocal microscopy, plant samples were mounted in osmoted water and viewed with a Leica SP8 Confocal Microscope (Leica). GFP/YFP was excited at 488 nm with an argon source and re-emitted light was bandpass filtered at 505–530 nm. Laser intensity was adjusted for each line and a pinhole was settled at 1 unit, resolution at 1024×1024 to compare expression and accumulation of reporter proteins. Quantification of fluorescence in roots was performed using ImageJ software. The data represent the mean pixel values in a region of interest.

## Results

### Regulation of auxin carrier mRNA levels in response to $\text{NO}_3^-$

To determine how auxin transporter genes respond to  $\text{NO}_3^-$  and whether this response is dependent on NRT1.1, we measured by quantitative RT-PCR the transcript levels of 10 auxin transporters in roots of both WT and *chl1-5* (*NRT1.1* null mutant) plants grown for 8 d on either N-free medium or medium containing 1 mM  $\text{KNO}_3$ . The 10 auxin transporter genes reported to contribute to auxin traffic in LRs (*PIN1-4*, *PIN7*, *ABCB1*, *ABCB4*, *ABCB19*, *AUX1*, and *LAX3*) were sorted into three different groups according to their expression patterns (Fig. 1). The first one was constituted by *PIN2*, *PIN3*, and *ABCB1*, for which mRNA levels were not significantly influenced either by  $\text{NO}_3^-$  supply or by *chl1-5* mutation (Fig. 1A). The second group gathered *ABCB4*, *ABCB19*, *PIN1*, *PIN4*, and *PIN7*, for which mRNA levels were modulated by  $\text{NO}_3^-$ . Among these genes, *ABCB4* was the only one to be repressed upon  $\text{NO}_3^-$  supply, whereas the others were induced (Fig. 1B). The  $\text{NO}_3^-$  responses of these genes were the same in both WT and *chl1-5* plants, suggesting that NRT1.1 plays no role in these responses. The last group contained *AUX1* and *LAX3* (Fig. 1C). Both genes showed higher expression in the presence of  $\text{NO}_3^-$  as compared with N-free medium in WT plants, but the difference was suppressed or strongly attenuated in the *chl1-5* mutant. This was due to the up-regulation of these two genes in the *chl1-5* mutant as compared with the WT in N-free conditions, but not on 1 mM  $\text{NO}_3^-$ . Therefore, NRT1.1 appears to act as a negative regulator of the expression of both *AUX1* and *LAX3* in the absence, but not in the presence, of  $\text{NO}_3^-$ . Altogether, these data show that although the majority of the auxin carrier genes investigated (7 out of 10) respond to  $\text{NO}_3^-$  provision in the roots, only two of them display a  $\text{NO}_3^-$  response that seems to involve NRT1.1 as a regulator.

### Protein level and localization of auxin carriers in response to $\text{NO}_3^-$

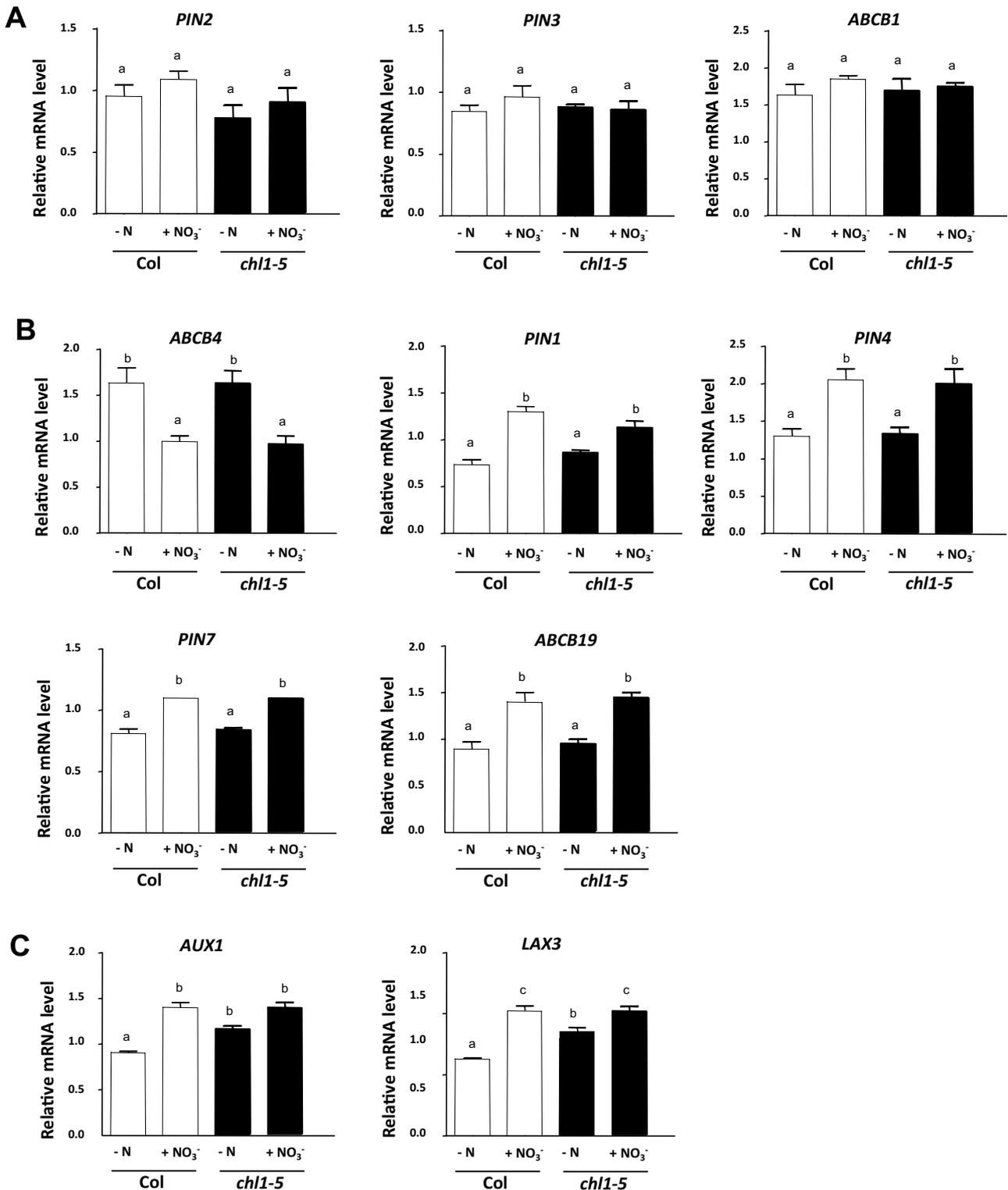
The response to  $\text{NO}_3^-$  of NRT1.1 and of the 10 auxin transporters was evaluated at the protein level in LRP using reporter-tagged transgenic plants (translational fusions with GFP or YFP) in WT or *chl1* mutant genetic background. Confocal sections through roots of transgenic plants grown in similar conditions to those used for the quantitative RT-PCR measurements were performed to compare protein accumulation and localization in LRPs in different conditions and at different developmental stages.

As reported previously (Bouguyon *et al.*, 2016), the protein expression of NRT1.1 in LRPs was strongly regulated by  $\text{NO}_3^-$ . Indeed, the GFP signal in roots of plants expressing an *NRT1.1::GFP* transgene under the control of the *NRT1.1* promoter in *chl1-5* background indicated that NRT1.1 was present in pre-emerged LRPs in the absence, but not in the presence, of 1 mM  $\text{NO}_3^-$  in the medium (see Supplementary Fig. S1). In  $\text{NO}_3^-$ -fed plants, NRT1.1 expression was only observed in LRPs after emergence. Most auxin transporters

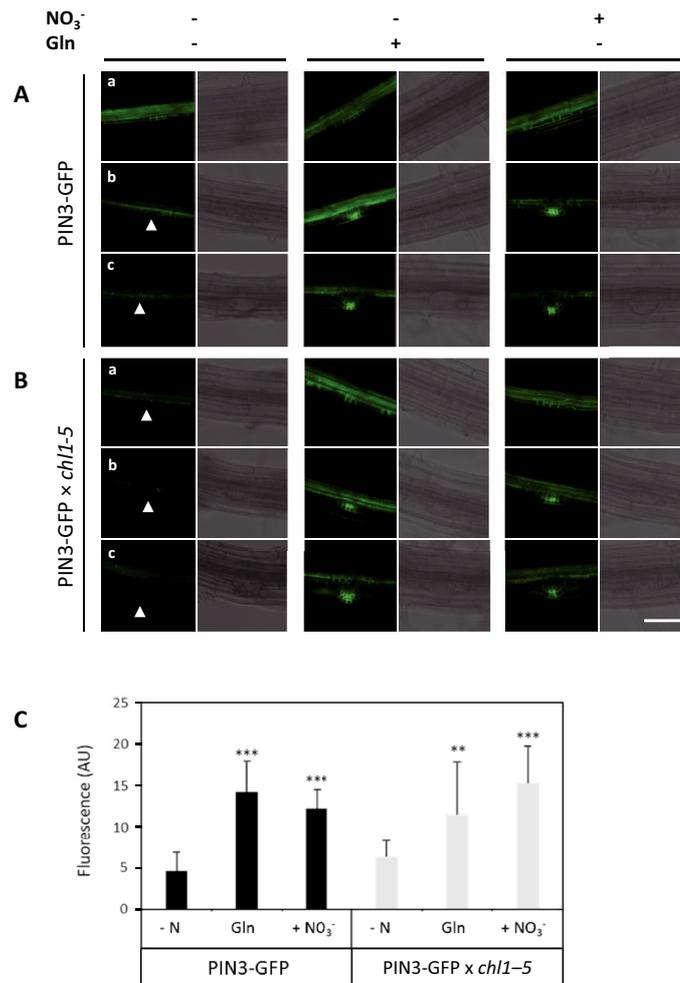
(8 out of 10) do not show any significant  $\text{NO}_3^-$ -dependent change in either protein accumulation or protein localization in the context of LRP development and emergence. In our conditions and regardless of the presence of  $\text{NO}_3^-$ , ABCB4 and PIN4 were not detectable in LRPs and PIN7 appeared to be only transiently expressed at stages I and II but then rapidly disappeared as LRPs progressed to the next phase (data not shown). Moreover, as previously shown (Benková *et al.*, 2003), PIN2 was not expressed in LRPs before emergence (Supplementary Fig. S2). Neither the localization nor the protein abundance of PIN1, ABCB19, and AUX1 was significantly affected by  $\text{NO}_3^-$  or the *chl1* mutation (Supplementary Figs S3–S5). Finally, although the GFP signal associated with the ABCB1–GFP fusion protein seemed slightly increased in the presence of  $\text{NO}_3^-$ , this was not found to be statistically significant after quantification (Supplementary Fig. S6).

In contrast, PIN3 and LAX3 were responsive to  $\text{NO}_3^-$  treatment. In WT plants and in presence of  $\text{NO}_3^-$ , the PIN3–GFP spatio-temporal expression pattern in LRPs was similar to that previously shown (Benková *et al.*, 2003). Indeed, PIN3 was expressed from the first developmental stage to emergence and its early widespread localization was progressively restricted to the meristematic zone (Fig. 2Aa–c, right panels). However, on N-free medium, PIN3–GFP signal became undetectable in LRPs from stage IV–V up to emergence (Fig. 2Ab, c, left panel). To determine whether this was due to a  $\text{NO}_3^-$  specific effect, PIN3–GFP expression was investigated in plants grown on 0.5 mM glutamine as an alternative N source (Fig. 2A, middle panels). Supply of glutamine resulted in a PIN3–GFP expression similar to that recorded with  $\text{NO}_3^-$ , indicating that lack of expression on N-free medium was not due to the absence of  $\text{NO}_3^-$  *per se*, but most probably resulted from N deficiency. In agreement with the hypothesis that PIN3–GFP is not specifically regulated by  $\text{NO}_3^-$ , the effect of N on this protein was NRT1.1-independent since the same pattern was observed in a WT or a *chl1* mutant background (Fig. 2B, C).

As previously shown (Swarup *et al.*, 2008), the LAX3–YFP signal in WT background was detected from stage II to stage VII in mature stele and in cortical or epidermal cells overlaying LRPs under  $\text{NO}_3^-$  supply (Fig. 3Aa–c, right panels). However, the LAX3–YFP signal was strongly decreased in cells overlaying LRPs, regardless of the LRP developmental stage, in response to either N starvation (Fig. 3Aa–c, left panel) or supply of glutamine as a N source (Fig. 3A, middle panel). Interestingly, this down-regulation of LAX3–YFP expression was not recorded in *chl1-5* mutant background (Fig. 3B, C). These data show that NRT1.1 acts as a negative regulator of LAX3 expression in the absence of  $\text{NO}_3^-$ . Interestingly, the *chl1-5* mutation restored LAX3–YFP signal in LRP overlying cells only after LRPs had reached stage IV (Fig. 3A, B, compare (a) with (b, c) stages), indicating that NRT1.1 was responsible for LAX3 extinction at late, but not at early, stages of LRP development. This is fully consistent with the observation that NRT1.1 starts repressing LRP development at stages IV/V (Krouk *et al.*, 2010; Bouguyon *et al.*, 2016). In conclusion, the pattern of LAX3–YFP expression around LRPs in WT and *chl1*



**Fig. 1.** Relative mRNA accumulation of auxin transporters in roots of WT (Col) and *chl1-5* seedlings grown in presence or absence of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. WT and *chl1-5* seedlings were grown for 8 d in vertical agar plates on basal medium supplemented with 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> or not. Transcript levels were quantified in the roots by quantitative RT-PCR using *CLATHRIN* as an internal standard. The 10 auxin transporter genes investigated are grouped into three different classes, according to the response of their mRNA levels to NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and *NRT1.1* mutation: (A) auxin transporters not regulated by NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, (B) auxin transporters regulated by NO<sub>3</sub><sup>-</sup> independently of *NRT1.1*, and (C) auxin transporters regulated by NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in an *NRT1.1*-dependent way. The data are the means ±SE of two replicates from three independent experiments. Statistically significant differences by ANOVA followed by a Tukey test between genotypes or N treatments at *P* < 0.05 are shown by different letters.



**Fig. 2.** PIN3-GFP expression in lateral root primordia is repressed by N starvation both in WT (Col) and in *chl1-5* genetic backgrounds. Seedlings expressing PIN3-GFP in Col (A) or in *chl1-5* (B) genetic background were grown for 8 d in vertical agar plates on basal medium deprived of N (left panel) or supplemented with either 0.5 mM glutamine (Gln; middle panel) or 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (right panel). Primary root portions with lateral root primordia at various developmental stages were observed under confocal microscopy. (a) Stage I–III; (b) stage IV–V; (c) stage VI–VII. Scale bar: 100 μm. The images shown are representative of >20 primordia from >10 plants of three independent experiments. (C) Fluorescence quantification in different root tissues of 8-day-old plants expressing PIN3-GFP in WT or *chl1.5* lines in the absence or presence of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> or glutamine (Gln). Fluorescence was measured in unemerged primordia stage IV to VIII, and emerged primordia. Values are the mean of 5–10 plants from two independent experiments. *P*-values were analysed by Student's *t*-test and differences with N treatments are statistically significant at \*\*\**P*<0.001.

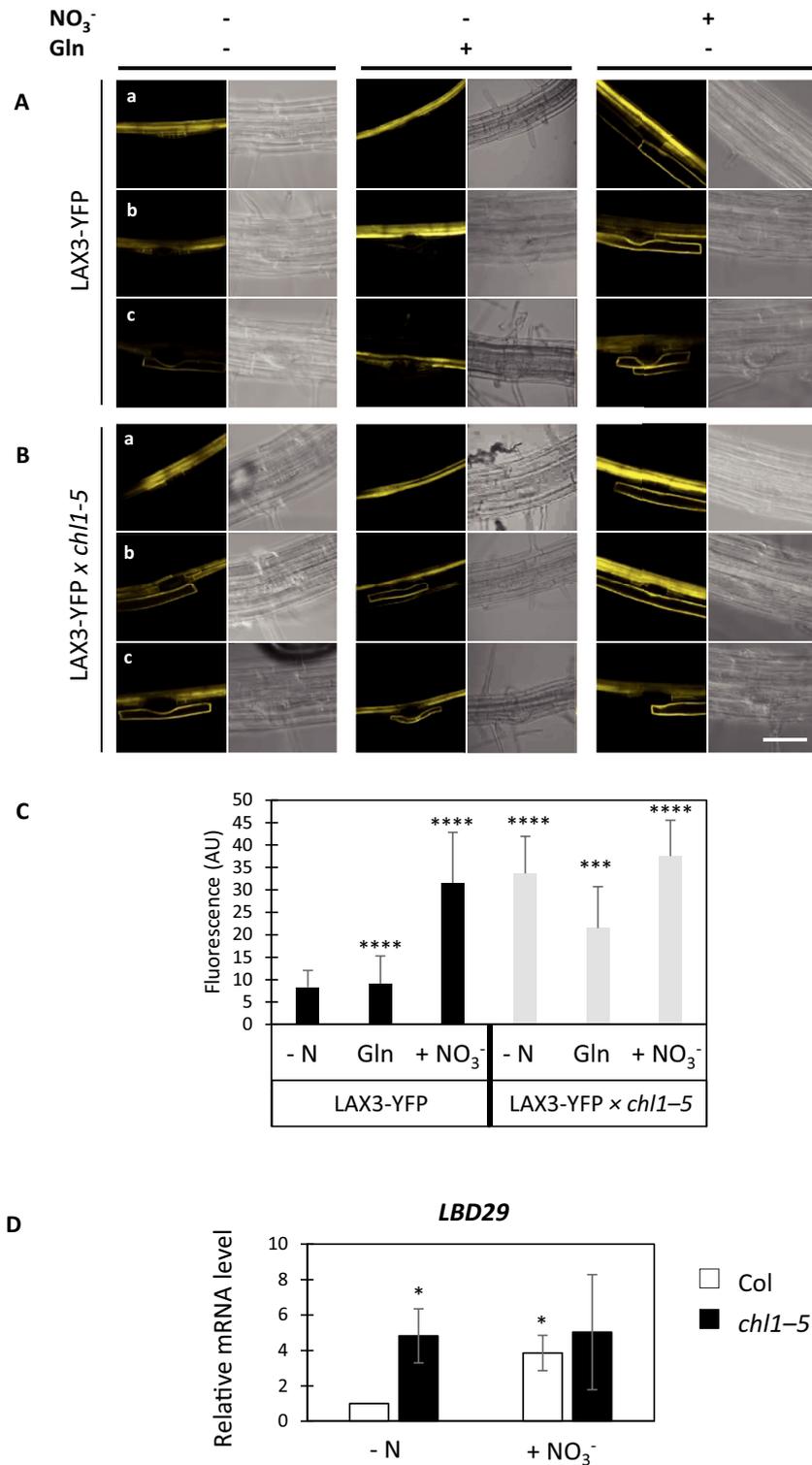
mutant background is in agreement with that of *LAX3* transcript accumulation in the roots (i.e. both are up-regulated by NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in WT plants and by *chl1* mutation in the absence of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

It has been reported that the up-regulation of *LAX3* expression that facilitates LRP outgrowth is triggered by the LBD29 transcription factor (Swarup *et al.*, 2008; Porco *et al.*, 2016). To test whether LBD29 responds to NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in an NRT1.1-dependent manner, its transcript accumulation was investigated in roots of Col or *chl1-5* plants grown on N-free medium or on 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. The data indicate that expression of *LBD29* was strongly induced by NO<sub>3</sub><sup>-</sup> supply as compared with N-free conditions in WT plants, and that it was markedly overexpressed in the *chl1-5* mutant as compared with the WT on N-free medium, but not in the presence of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Fig. 3D). This is fully consistent with the expression patterns of both *LAX3* gene (Fig. 1)

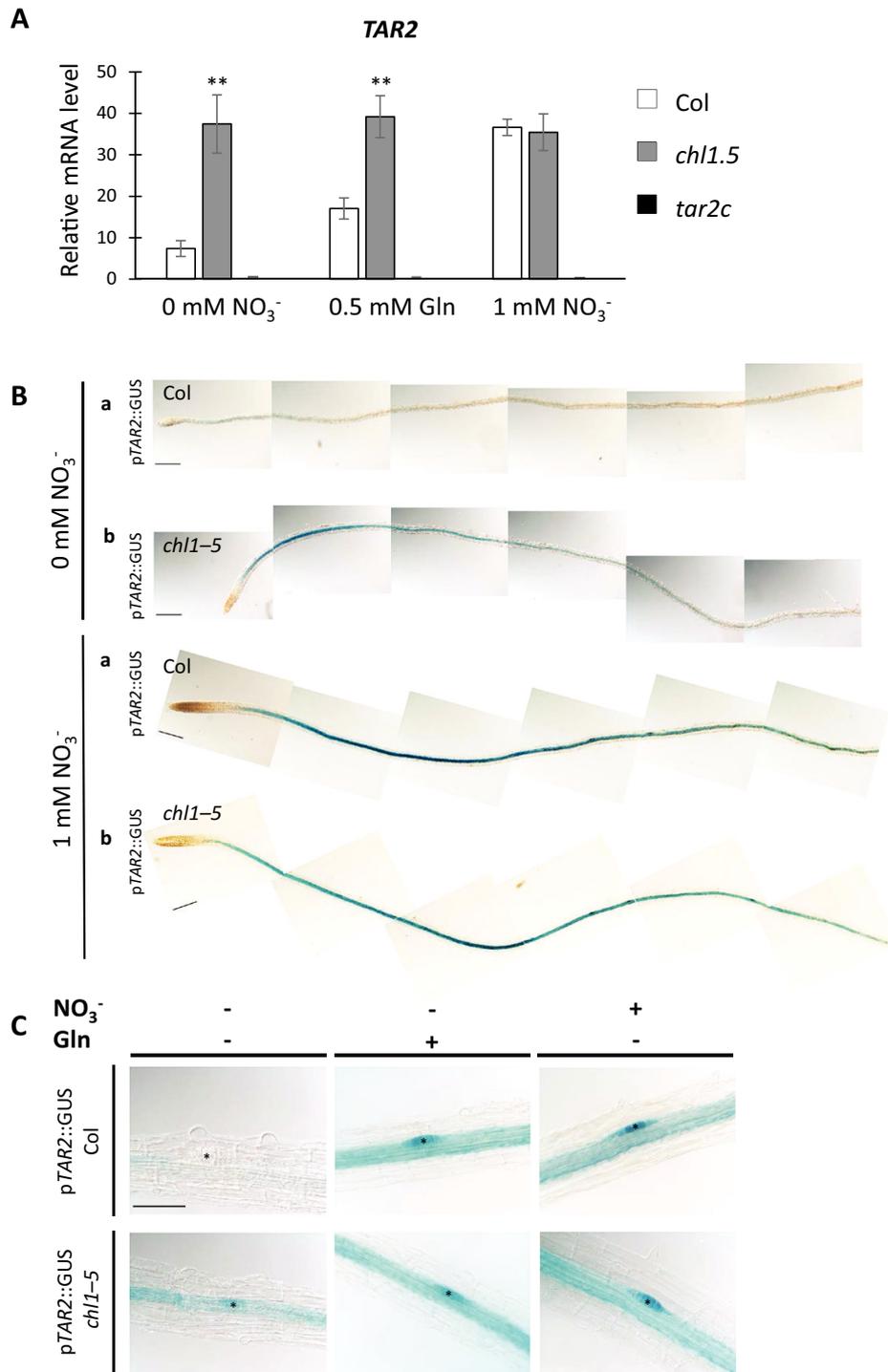
and *LAX3*-GFP protein (Fig. 3), which therefore suggests that *LAX3* response to NO<sub>3</sub><sup>-</sup> is mediated by the NRT1.1-dependent regulation of *LBD29* expression.

#### *The TAR2 auxin biosynthesis enzyme is up-regulated by NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in an NRT1.1-dependent manner*

The *TAR2* gene was reported to be N-responsive and to contribute to the regulation of LR development by NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> supply (Ma *et al.*, 2014). However, its putative role in the specific response to NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in connection with the NRT1.1-dependent pathway is not known. Therefore, we first investigated the effect of the three N regimes (N-free, 0.5 mM glutamine, or 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) on *TAR2* mRNA accumulation in the roots of WT and *chl1-5* plants, as well as in those of the *tar2c* knock-out mutant of *TAR2*. Although *TAR2* mRNA accumulation was previously shown to be down-regulated by increasing



**Fig. 3.** LAX3-YFP expression in tissues overlaying lateral root primordia is repressed in the absence of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in an *NRT1.1*-dependent manner. Seedlings expressing LAX3-YFP in Col (A) or in *chl1-5* (B) genetic background were grown for 8 d in vertical agar plates on basal medium deprived of N (left panel) or supplemented with either 0.5 mM glutamine (middle panel) or 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (right panel). Primary root portions with lateral root primordia at various developmental stages were observed under confocal microscope. (a) Stage I-III, (b) stage IV-V, (c) stage VI-VII. Scale bar: 100 μm. The images shown are representative of >20 primordia from >10 plants of three independent experiments. (C) Fluorescence quantification in different root tissues of 8-day-old plants expressing LAX3-YFP in WT or *chl1.5* lines in the absence or presence of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> or glutamine (Gln). Fluorescence was measured in cortical/epidermal cells surrounding unmerged primordia stage IV to VIII. Values are the mean of 5-10 plants from two independent experiments. *P*-values were analysed by Student's *t*-test and differences with N treatments are statistically significant at \*\*\**P*<0.001 and \*\*\*\**P*<0.0001. (D) Relative mRNA accumulation of LBD29 in roots of Col and *chl1-5* plants grown for 12 d in agar plates on basal medium deprived of N or supplemented with 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. The expression was quantified by RT-qPCR and normalized by *CLATHRIN*. The data are the mean ±SE from three independent experiments. *P*-values were analysed by Student's *t*-test and differences between genotypes are statistically significant at \**P*<0.005.



**Fig. 4.** *TAR2* expression in the roots is repressed in the absence of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in an *NRT1.1*-dependent manner. Wild-type, *chl1-5*, and *tar2c* seedlings were grown for 12 d in vertical agar plates on basal medium deprived of N, or supplemented with either 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> or 0.5 mM L-glutamine. (A) Relative accumulation of *TAR2* transcripts in roots. The data are the mean ±SE of two replicates from three independent experiments. *P*-values were analysed by Student's *t*-test and differences between genotypes are statistically significant at \*\**P*<0.01. (B) Histochemical staining of GUS activity in roots of plants expressing a *pTAR2::GUS* transgene in either WT (Col) or *chl1-5* genetic background. Scale bars represent 0.5 cm. (C) Histochemical staining of GUS activity in the root stele and lateral root primordia of plants expressing a *pTAR2::GUS* transgene in either wild type (Col) or *chl1-5* genetic background. The images shown display root portions with lateral root primordia at stages I–III. The images shown are representative of 10 primordia from >10 plants of two independent experiments. Scale bar: 0.5 cm.

NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> concentrations (Ma *et al.*, 2014), it was in our conditions markedly induced in the WT by N supply as compared with N-free condition, with a much more pronounced

response on NO<sub>3</sub><sup>-</sup> as compared with glutamine (Fig. 4A). This NO<sub>3</sub><sup>-</sup> induction was fully lost in the *chl1-5* mutant because *TAR2* expression was already high in this line on N-free

medium or on Gln. As expected, no significant *TAR2* mRNA level was recorded in the *tar2c* knock-out mutant.

Both the induction of *TAR2* expression by  $\text{NO}_3^-$  and its up-regulation in N-starved *chl1-5* plants as compared with WT were confirmed by histological staining of GUS activity in *pTAR2::GUS* plants (Fig. 4B). As shown previously (Ma *et al.*, 2014), *TAR2* expression in roots was predominantly localized in the stele, and we did not observe *pTAR2* activity in endodermis, cortex, or epidermis (Fig. 4B, C). In the presence of either 0.5 mM Gln or 1 mM  $\text{NO}_3^-$ , strong GUS staining was also observed inside the vast majority (>90%) of young LRPs (stages I–III) in both WT and *chl1-5* plants (Fig. 4C). On N-free medium, GUS staining in LRPs was only visible in ca ~60% of the young LRPs of *chl1-5* plants, and at a lower intensity than that recorded in plants fed with either Gln or  $\text{NO}_3^-$  (Fig. 4C). In all cases, *pTAR2::GUS* expression in LRPs was no longer recorded as soon as these LRPs evolved to later stages of development (stages IV–V onwards). Altogether, the above results show that in the absence of  $\text{NO}_3^-$ , NRT1.1 acts as a strong negative regulator of *TAR2* expression in the stele and to a lower extent in the young LRPs. This indicates that NRT1.1 may control LRP development not only through its auxin transport facilitation within the LRPs (Krouk *et al.*, 2010), but also by modulating auxin biosynthesis in the stele. In addition, these results also show that *TAR2* expression may be responsive not only to NRT1.1-mediated  $\text{NO}_3^-$  signaling but also to another N stimulatory effect that can be activated by Gln supply.

#### *TAR2 is required for the stimulation of lateral root development by $\text{NO}_3^-$ and its regulation by NRT1.1*

The induction of *TAR2* expression in the roots by  $\text{NO}_3^-$  suggests that increased auxin biosynthesis is associated with  $\text{NO}_3^-$  regulation of RSA. To determine whether *TAR2* may contribute to the  $\text{NO}_3^-$  stimulation of LR development by locally increasing auxin provision to LRPs, expression of *DR5::GFP* was investigated in both WT and *tar2c* mutant backgrounds in the roots of plants grown on 1 mM  $\text{NO}_3^-$  (Fig. 5). The GFP signal was predominantly found in the stele and LRPs of both genotypes, but with a strongly reduced intensity in *tar2c* as compared with WT (Fig. 5). The negative effect of *TAR2* mutation on *DR5::GFP* expression in LRPs was found at almost all stages of development, with the exception of stage VII, just prior to emergence (Fig. 5B, C). This indicates that *TAR2*-dependent auxin biosynthesis in the stele and/or the LRPs is required for increasing auxin accumulation/signaling in LRPs in response to  $\text{NO}_3^-$ . Note, however, that although important, the presence of a functional *TAR2* gene is not strictly required to generate *DR5::GFP* expression in the root. This expression is still significant in the stele and in LRPs at all developmental stages in the *tar2c* mutant (Fig. 5A–C), suggesting that auxin partly comes from another source than the *TAR2*-dependent biosynthesis pathway.

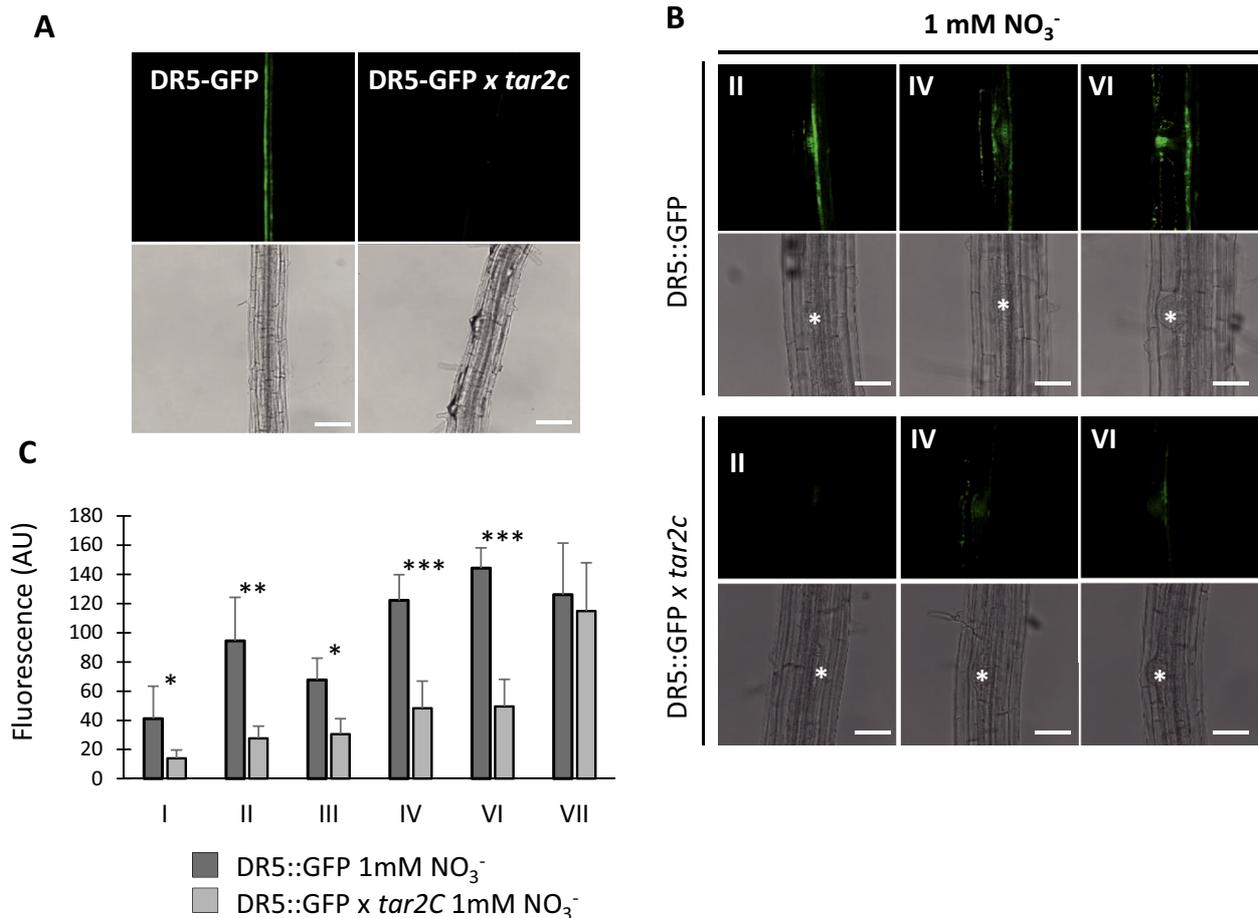
*TAR2* mutation alone (*tar2c* mutant) had only very limited effect, if any, on the growth of the primary root in the three conditions tested (Fig. 6A, B). However, it very significantly

decreased (by nearly 50%) the density of LR in the plants grown on  $\text{NO}_3^-$ , but not in those supplied with either glutamine or N-free medium (Figs 6A, C). This demonstrates that *TAR2* participates in the stimulation of LR development by  $\text{NO}_3^-$ , in agreement with the observations that *TAR2* expression is induced by  $\text{NO}_3^-$  and that its mutation lowers *DR5*-driven expression in LRPs (Figs 4, 5). Combining *NRT1.1* and *TAR2* mutations (double *chl1-5tar2c* mutant) had no additional effect on LR development as compared with the single *TAR2* mutation, but strikingly affected it as compared with the single *NRT1.1* mutation (Fig. 6A, C). Indeed, the dramatic increase of LR density classically observed in *chl1-5* as compared with the WT on  $\text{NO}_3^-$ -free medium (Krouk *et al.*, 2010; Bouguyon *et al.*, 2015) was totally abolished in the double *chl1-5tar2c* mutant. These data indicate that the up-regulation of *TAR2* expression in response to *NRT1.1* mutation (Fig. 4) is most likely one key response required to trigger enhanced LR development in *chl1-5* plants.

## Discussion

### *Nitrate regulation of auxin carriers in lateral root primordia*

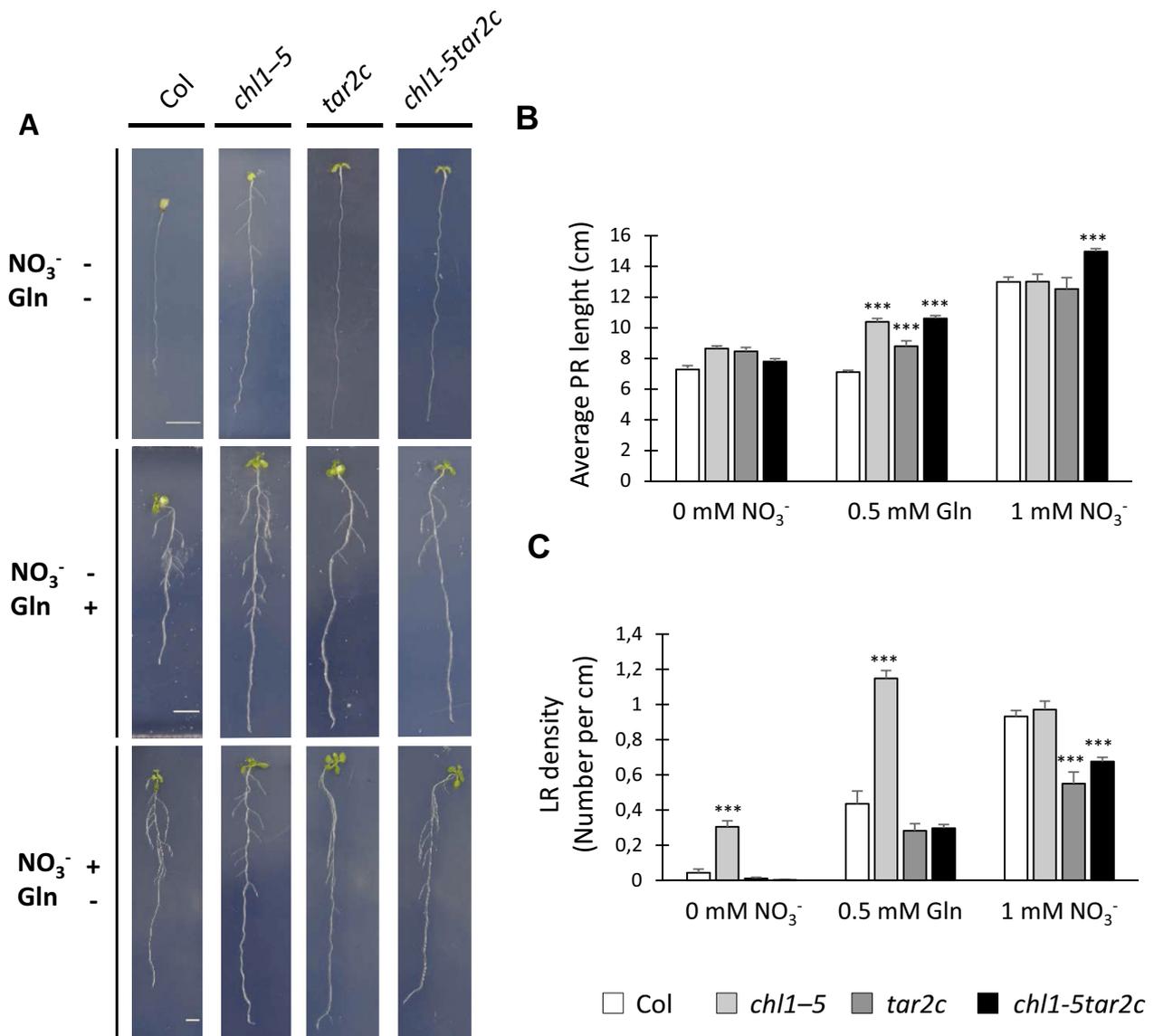
One striking conclusion arising from our work is that, with the noticeable exception of LAX3, NRT1.1 has little effect on the expression of the auxin carriers involved in LRP development. However, as suggested by previous reports on Arabidopsis (Li *et al.*, 2011) and rice (Sun *et al.*, 2017; Naz *et al.*, 2019), our data show that the root expression of key auxin carriers is responsive to N supply in WT plants. Although not dramatic, changes in mRNA levels in the whole root were found in response to  $\text{NO}_3^-$  for 7 out of the 10 auxin carriers investigated (Fig. 1). When considering more precisely the expression at the protein level in or around the LRPs of WT background plants, only two of them (namely, PIN3 and LAX3) displayed a visible increase in the fluorescence from GFP or YFP fusion proteins on 1 mM  $\text{NO}_3^-$  as compared with N-free medium (Figs 2, 3). Most importantly, for PIN3 this effect was not specific of  $\text{NO}_3^-$  since the same increase in fluorescence was observed upon provision of 0.5 mM Gln as a N source (Fig. 2). This suggests that the response to  $\text{NO}_3^-$  of PIN3 is not specifically due to  $\text{NO}_3^-$  signaling, but either to a signaling action of a N metabolite downstream of  $\text{NO}_3^-$  assimilation, or to a more general effect of N nutrition. As a matter of fact, organic forms of N, and in particular amino acids, have been shown to specifically control several mechanisms involved in root growth and development in Arabidopsis (Walch-Liu *et al.*, 2006; Gifford *et al.*, 2008; Vidal *et al.*, 2010). Our data indicate that none of the auxin carriers expressed in LRPs (PIN1–4, PIN7, ABCB1, ABCB4, ABCB19, and AUX1) displays a regulation pattern correlated with that previously reported for *DR5*-driven expression in LRPs (e.g. repression in the absence of  $\text{NO}_3^-$  that is suppressed in the *chl1-5* mutant (see Krouk *et al.*, 2010). This supports the hypothesis that NRT1.1 modulates auxin accumulation in LRP directly through its auxin transport capacity, and not indirectly through modified expression of other auxin carriers. However, it cannot be ruled out that NRT1.1 may act on these carriers



**Fig. 5.** Mutation of *TAR2* represses *DR5::GFP* expression in LRPs and in the stele under  $\text{NO}_3^-$  supply. (A) *DR5::GFP* expression in mature root zone of plants with WT (left panel) or *tar2c* (right panel) genetic background. The seedlings were grown for 12 d on basal medium supplemented with 1 mM  $\text{NO}_3^-$ . Scale bars: 100  $\mu\text{m}$ . (B) *DR5::GFP* expression in lateral root primordia of plants with WT (upper panel) or *tar2c* (lower panel) genetic background. The seedlings were grown for 12 d on basal medium supplemented with 1 mM  $\text{NO}_3^-$ . The images display lateral root primordia at different developmental stages (from stage II to VI). The asterisk indicates the location of the primordium. The images are representative of 10 plants of two independent experiments. Scale bars: 100  $\mu\text{m}$ . (C) Fluorescence quantification in lateral root primordia at different developmental stages of 12-d-old plants expressing *DR5::GFP* in WT or *tar2c* background. Plants were grown on basal medium supplemented with 1 mM of  $\text{NO}_3^-$ . Data represent mean  $\pm$ SE of two independent experiments ( $n=10$ ).  $P$ -values were analysed by Student's  $t$ -test and differences between genotypes are statistically significant at \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ .

at a regulatory level that was not investigated in our study, by triggering post-translational modifications affecting transport activity, for instance. Furthermore, although not predominantly expressed in LRPs, ABCB21 has recently been reported to markedly affect *DR5*-driven expression in these organs (Jenness *et al.*, 2019), but its regulation by  $\text{NO}_3^-$  is unknown. Therefore, further investigation is needed to conclude whether the above listed auxin carriers are regulated by NRT1.1, or not. In contrast, our data on *LAX3* mRNA accumulation and of *LAX3*-YFP fusion protein expression clearly indicate that the expression of this carrier in overlying tissues of the LRPs is under control by NRT1.1-dependent  $\text{NO}_3^-$  signaling. First, the stimulation by  $\text{NO}_3^-$  of *LAX3*-YFP expression in cortical cells cannot be mimicked by Gln supply (Fig. 3). Second, both the increases in *LAX3* gene and *LAX3*-YFP protein expression in response to  $\text{NO}_3^-$  were suppressed in the *chl1-5* mutant (Figs 1, 3). This is further supported by the fact that the gene expression of *LBD29*, the direct positive regulator of *LAX3* (Porco *et al.*, 2016), displays

the same pattern of regulation (Fig. 3). In agreement with what was previously recorded for LR density and for auxin accumulation/signaling in LRP (*DR5*-driven expression), the stimulatory effect of  $\text{NO}_3^-$  was suppressed because *LAX3* and *LBD29* expression were already high in the *chl1-5* mutant in the absence of  $\text{NO}_3^-$ , indicating a negative regulatory role of NRT1.1 under this condition (Figs 1, 3). The mechanisms by which NRT1.1 may lead to repression of *LBD29* and *LAX3* expression are not known. However, the stimulation of both *LBD29* and *LAX3* expression in cells overlying LRPs was proposed to be due to the induction of *LBD29* and *LAX3* genes by the auxin diffusing from the LRP to the overlying tissues (Swarup *et al.*, 2008; Porco *et al.*, 2016). Therefore, it is conceivable that the NRT1.1-mediated repression of auxin accumulation in LRPs in the absence of  $\text{NO}_3^-$  (Krouk *et al.*, 2010; Bouguyon *et al.*, 2015, 2016; Zhang *et al.*, 2019), may lead to a lowered auxin diffusion out of the LRPs, which may in turn limit induction of both *LBD29* and *LAX3* genes.

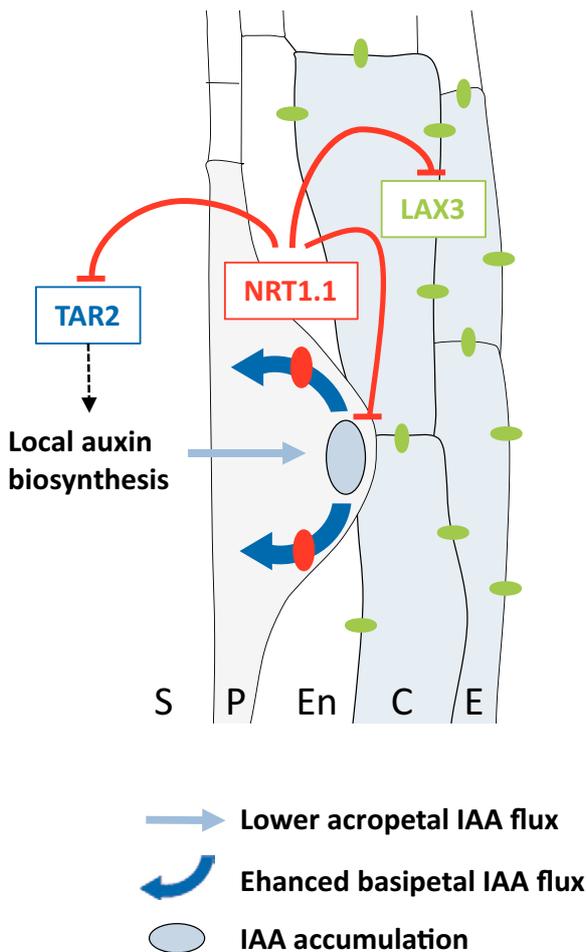


**Fig. 6.** Regulation of lateral root development by NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NRT1.1 relies on the TAR2 auxin biosynthesis enzyme. Root system architecture of Col, *chl1-5*, *tar2c*, and *chl1-5tar2c* plants grown for 12 d in vertical agar plates on a basal nutrient medium deprived of N or supplemented with either 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> or 0.5 mM Gln. (A) Representative images of Col, *chl1-5*, *tar2c*, and *tar2c×chl1-5* plants. Scale bar: 0.5 cm. (B) Mean length the primary root. Results ( $n=100$ ) are representative of five independent experiments.  $P$ -values were analysed by Student's  $t$ -test and differences between mutant and wild-type genotypes are statistically significant at  $***P<0.001$  ( $t$  test). (C) Mean density of visible lateral roots ( $>0.5$  mm). Results ( $n=100$ ) are representative of five independent experiments.  $P$ -values were analysed by Student's  $t$ -test and differences between mutant and wild-type genotypes are statistically significant at  $***P<0.001$ .

#### Auxin biosynthesis is a target of NRT1.1-dependent NO<sub>3</sub><sup>-</sup> signaling in roots

Local auxin biosynthesis for controlling plant development has been recently reconsidered and shown to be important for responses to internal or external signals (ethylene, light, temperature, and pathogens; Ljung *et al.*, 2001; Brumos *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2018). Data concerning RSA responses to nutrients are scarce on this point (Guan, 2017; Olatunji *et al.*, 2017), with the exception of the report by Ma *et al.* (2014), indicating that the *TAR2* auxin biosynthetic gene contributes to the root foraging response triggered by mild N-limitation in Arabidopsis. This response is considered to be due to a

repression exerted by high N supply, which is not specific to NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, and may involve systemic signaling (Forde, 2014; Giehl and von Wirén, 2014). Our data confirm a key role of *TAR2* in the N regulation of LR growth, but in a different context, that is the local stimulation of LRP development by NO<sub>3</sub><sup>-</sup> signaling. Indeed, *TAR2* expression is induced by NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Fig. 4), and *tar2* mutants display a markedly reduced increase in LR density in response to NO<sub>3</sub><sup>-</sup> supply as compared with WT plants (Fig. 6). This is correlated with reduced *DR5*-driven expression in both the stele and LRPs of plants with *tar2* as compared with WT background (Fig. 5). This suggests that the *TAR2* biosynthetic pathway is an important source of auxin for ensuring



**Fig. 7.** Schematic model of the integrated repressive role of NRT1.1 on lateral root development. NRT1.1 coordinately controls three separate auxin-related processes for repressing LRP development at low  $\text{NO}_3^-$  availability. First, NRT1.1 facilitates the basipetal transport of auxin out of the LRP (Krouk *et al.* 2010). Second NRT1.1 represses local auxin biosynthesis by down-regulation of the expression of the *TAR2* auxin biosynthetic gene, which reduces the acropetal flux of auxin to the LRP. These two actions are expected to lower auxin accumulation at the LRP apex that is required for normal LRP development and growth. Third, NRT1.1 maintains a mechanical resistance to the LRP outgrowth by repressing *LAX3* in the tissues overlying the LRP, thereby preventing cell wall remodeling in these tissues. All three repressive effects of NRT1.1 are suppressed by high  $\text{NO}_3^-$  availability ( $>0.5$  mM), leading to the local  $\text{NO}_3^-$ -induced stimulation of LRP development and emergence.

proper accumulation of the hormone in LRPs and for yielding full stimulation of LR development by  $\text{NO}_3^-$ . However, because neither *DR5*-driven expression nor LR emergence is totally suppressed in the *tar2* mutant, it is likely that another auxin source, coming from acropetal transport from the shoot, other biosynthesis, and/or conjugation pathway (Bhalerao *et al.*, 2002; Petrásek and Friml, 2009; Olatunji *et al.*, 2017), also contributes to supply auxin to the LRPs. As is the case for LR density and key factors associated with it (*DR5*-driven expression in LRPs, *LBD29/LAX3* expression), the stimulation of *TAR2* expression by  $\text{NO}_3^-$  in the stele is actually mostly due to the relief of the repression exerted by NRT1.1 in the absence of  $\text{NO}_3^-$ . This is illustrated by the up-regulation of

*TAR2* in the *chl1-5* mutant on N-free medium (Fig. 4). This *TAR2* up-regulation appears to be crucial for the strongly increased LR growth phenotype of the *chl1-5* plants because the double *chl1-5tar2c* mutant did not differ in LR density from the WT in  $\text{NO}_3^-$ -free media (Fig. 4). The mechanism associated with the NRT1.1-dependent repression of *TAR2* expression in the stele in the absence of  $\text{NO}_3^-$  is unclear. One hypothesis is that the stimulation of basipetal auxin transport out of the LRPs by NRT1.1 (Krouk *et al.*, 2010) may locally increase auxin levels in the stele. Because the *TAR2* auxin biosynthetic pathway has been recently reported to be feedback repressed by auxin (Suzuki *et al.*, 2015; Takato *et al.*, 2017), this may explain why *TAR2* expression is reduced in the stele of WT plants deprived of  $\text{NO}_3^-$  (Fig. 4). Alternatively, because NRT1.1 has been shown to be also expressed in the central cylinder of mature portions of the primary root, where it contributes to xylem loading of  $\text{NO}_3^-$  (Léran *et al.*, 2013), it is also possible that NRT1.1 may act on *TAR2* expression directly in the stele when  $\text{NO}_3^-$  is absent from the medium.

Interestingly, *TAR2* was found to be expressed in a N-stimulated manner in young LRPs at stages I–III (Fig. 4C), i.e. at earlier developmental stages than those (IV–V) where NRT1.1 starts to act as a regulator of LRP emergence (Bouguyon *et al.*, 2016). *TAR2* expression in young LRPs is responsive to both Gln and  $\text{NO}_3^-$ , suggesting that N can modulate early LRP development by controlling auxin biosynthesis *in situ* independently of NRT1.1. This is in line with the previous proposal that N can act on various developmental check points of LR development through different mechanisms (Forde, 2014; Giehl and von Wirén, 2014).

#### *A more integrated model for NRT1.1-dependent regulation of LR development by $\text{NO}_3^-$*

Our previous working model for explaining the NRT1.1-dependent repression of LR growth in the absence or at low availability ( $<0.5$  mM) of  $\text{NO}_3^-$  almost entirely relied on the hypothesis that NRT1.1 inhibits LRP outgrowth (more specifically at developmental stage IV) because it facilitates the basipetal auxin transport out of the LRP, thereby preventing the hormone accumulation at the LRP tip (Krouk *et al.*, 2010; Bouguyon *et al.*, 2015). This hypothesis was supported by the auxin transport capacity of NRT1.1 recorded in heterologous systems (Krouk *et al.*, 2010; Bouguyon *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019), and by its largely predominant localization in the outer cell layer of the LRP (Krouk *et al.*, 2010), which corresponds to the basipetal auxin transport route (Benková *et al.*, 2003). Because increasing  $\text{NO}_3^-$  concentrations ( $>0.5$  mM) results both in an inhibition of the NRT1.1-mediated auxin transport facilitation (Krouk *et al.*, 2010) and in a repression of the NRT1.1 protein expression in LRPs (Bouguyon *et al.*, 2016), we proposed that the local stimulation of LR growth by  $\text{NO}_3^-$  is due to a relief of the repression exerted by NRT1.1. The data reported here strengthen our previous conclusions, but show that NRT1.1 affects other processes in addition to auxin distribution within the LRP, such as the biosynthesis of the hormone and the mechanical resistance of the primary root tissues to LRP outgrowth. As summarized

in Fig. 7, the repressive role of NRT1.1 on LRP development can now be extended to three separate but synergistic actions. Indeed, NRT1.1 prevents auxin accumulation in the LRP not only by favoring the basipetal transport of the hormone, but also by triggering the repression of *TAR2* expression in the stele. As a consequence of reduced auxin biosynthesis, it is likely that the acropetal flux channeling the hormone to the LRP tip is also lowered, thereby contributing to slowing down LRP development and emergence. In addition, NRT1.1 acts as a negative regulator of the expression of *LAX3* in the primary root tissues overlying the LRPs. Given the proposed function of *LAX3* in LRP development (Swarup *et al.*, 2008), this is expected to prevent the cell wall relaxation in the LRP overlying tissues that is required to lower the mechanical resistance to LRP emergence (Lucas *et al.*, 2013).

Beyond the repression of LRP development at low  $\text{NO}_3^-$  availability summarized in Fig. 7, NRT1.1 has also been reported to favor LR elongation in  $\text{NO}_3^-$ -rich patches of the external medium (Remans *et al.*, 2006), and to trigger the induction of the *AFB3* auxin receptor gene by  $\text{NO}_3^-$  that results in repressed primary root growth and stimulated LR initiation (Vidal *et al.*, 2010, 2014). By interfering with auxin biosynthesis, transport, signaling, and thus by controlling various key checkpoints of LR development, our studies reveal that NRT1.1 has a much more integrated function in governing the  $\text{NO}_3^-$  regulation of RSA in *Arabidopsis* than previously expected (Vidal *et al.*, 2014; Bouguyon *et al.*, 2015). It may therefore be expected that all aspects and mechanisms of this integrated function are not fully unraveled yet.

## Supplementary data

Supplementary data are available at *JXB* online.

Fig. S1. NRT1.1–GFP accumulation in LRPs is repressed by  $\text{NO}_3^-$ .

Fig. S2. PIN2–YFP is not expressed until emergence in lateral root primordia regardless of the presence of  $\text{NO}_3^-$ .

Fig. S3. PIN1–GFP expression is not regulated by  $\text{NO}_3^-$  in lateral root primordia in WT (Col) or in *chl1-5* genetic background.

Fig. S4. ABCB19–GFP expression is not regulated by  $\text{NO}_3^-$  in lateral root primordia in WT (Col) or in *chl1-10* genetic background.

Fig. S5. AUX1–GFP expression is not regulated by  $\text{NO}_3^-$  in lateral root primordia in WT (Col) or in *chl1-5* genetic background.

Fig. S6. ABCB1–GFP expression is not regulated by  $\text{NO}_3^-$  in lateral root primordia in WT (Col) or in *chl1-5* genetic background.

Table S1. Primers used for qRT-PCR

## Data availability

The data supporting the findings of this study are available from the corresponding author (LB), upon request.

## Acknowledgements

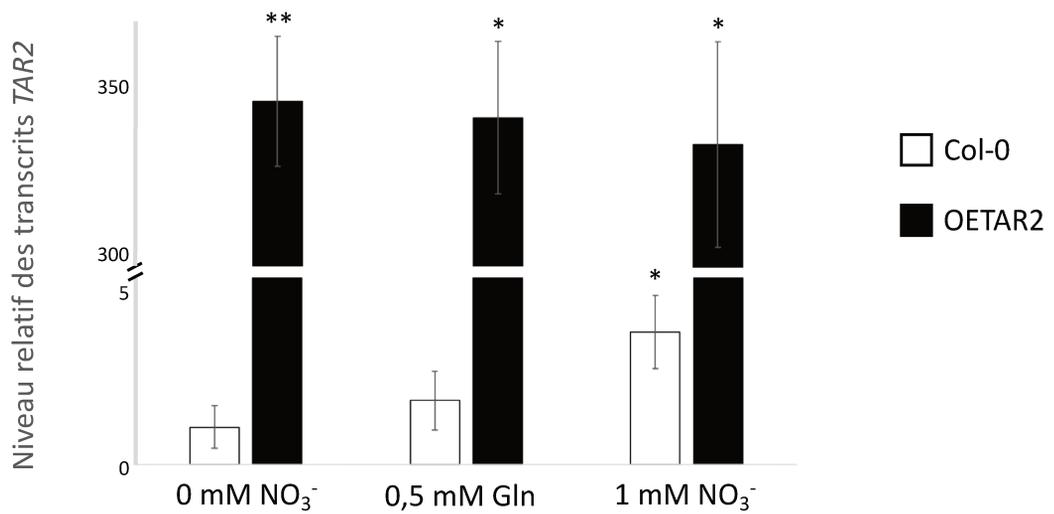
PN, GK, EBa, LB, and AG designed and supervised the experiments; AM, EBo, CCM, FPW, PN, and LB performed experiments; AM and EBo generated plant material; AM, EBo, CCM, GK, PN, EBa, LB, and AG analysed the data; AM, LB, and AG wrote the article with contribution of all the authors. This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche program ‘Programme PCRI ANR-16-CE20-0022’. We would like to thank members of the lab for discussion. We are grateful to Yiping Tong for the gift of *tar2c* (SALK\_143208.56.00.x) and *TAR2pro::GUS* (CS16434) seeds from the Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC). We thank the Montpellier Rio Imaging platform for microscopy observations.

## References

- Bailly A, Sovero V, Vincenzetti V, Santelia D, Bartnik D, Koenig BW, Mancuso S, Martinoia E, Geisler M. 2008. Modulation of P-glycoproteins by auxin transport inhibitors is mediated by interaction with immunophilins. *The Journal of Biological Chemistry* **283**, 21817–21826.
- Bellegarde F, Gojon A, Martin A. 2017. Signals and players in the transcriptional regulation of root responses by local and systemic N signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **68**, 2553–2565.
- Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jürgens G, Friml J. 2003. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115**, 591–602.
- 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.
- Bililou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K, Scheres B. 2005. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* **433**, 39–44.
- Bouguyon E, Brun F, Meynard D, *et al.* 2015. Multiple mechanisms of nitrate sensing by *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.1. *Nature Plants* **1**, 15015.
- Bouguyon E, Perrine-Walker F, Pervent M, *et al.* 2016. Nitrate controls root development through posttranscriptional regulation of the NRT1.1/NPF6.3 transporter/sensor. *Plant Physiology* **172**, 1237–1248.
- Brumos J, Robles LM, Yun J, Vu TC, Jackson S, Alonso JM, Stepanova AN. 2018. Local auxin biosynthesis is a key regulator of plant development. *Developmental Cell* **47**, 306–318.e5.
- Brunoud G, Wells DM, Oliva M, *et al.* 2012. A novel sensor to map auxin response and distribution at high spatio-temporal resolution. *Nature* **482**, 103–106.
- Cho M, Lee SH, Cho HT. 2007. P-glycoprotein4 displays auxin efflux transporter-like action in *Arabidopsis* root hair cells and tobacco cells. *The Plant Cell* **19**, 3930–3943.
- Crawford NM, Glass ADM. 1998. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science* **3**, 389–395.
- Drew MC. 1975. Comparison of the effects of a localised supply of phosphate, nitrate, ammonium and potassium on the growth of the seminal root system, and the shoot in barley. *New Phytologist* **75**, 479–490.
- Dubrovsky JG, Sauer M, Napsucialy-Mendivil S, Ivanchenko MG, Friml J, Shishkova S, Celenza J, Benková E. 2008. Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **105**, 8790–8794.
- Forde BG. 2002. Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 203–224.
- Forde BG. 2014. Nitrogen signalling pathways shaping root system architecture: an update. *Current Opinion in Plant Biology* **21**, 30–36.
- Fukaki H, Okushima Y, Tasaka M. 2007. Auxin-mediated lateral root formation in higher plants. *International Review of Cytology* **256**, 111–137.
- Giehl RF, Lima JE, von Wirén N. 2012. Localized iron supply triggers lateral root elongation in *Arabidopsis* by altering the AUX1-mediated auxin distribution. *The Plant Cell* **24**, 33–49.

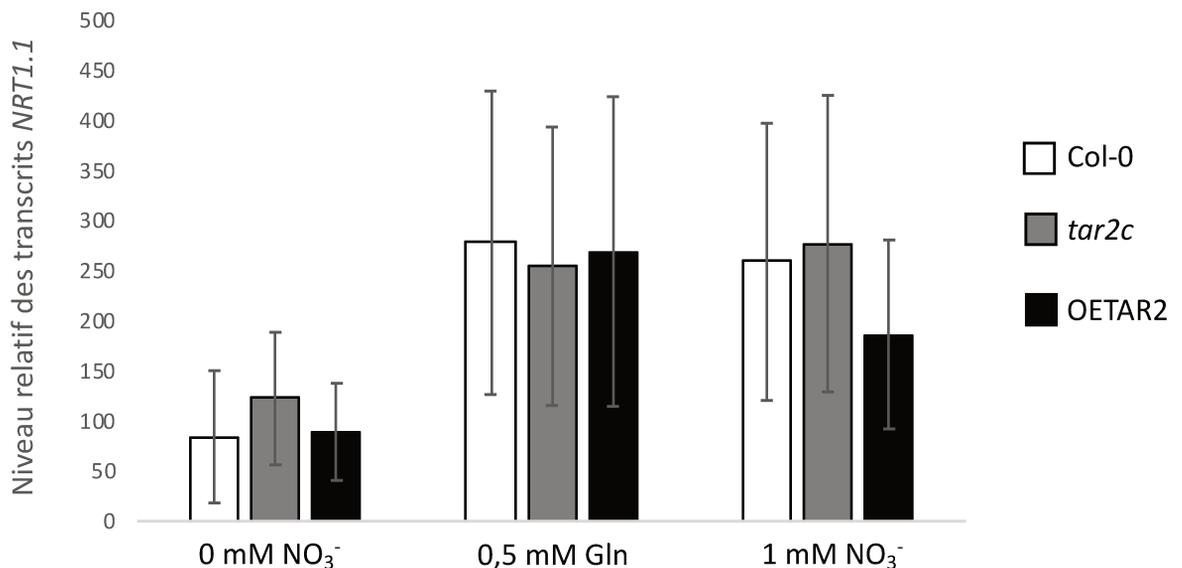
- Giehl RF, von Wirén N.** 2014. Root nutrient foraging. *Plant Physiology* **166**, 509–517.
- Gifford ML, Dean A, Gutierrez RA, Coruzzi GM, Birnbaum KD.** 2008. Cell-specific nitrogen responses mediate developmental plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **105**, 803–808.
- Gojon A, Krouk G, Perrine-Walker F, Laugier E.** 2011. Nitrate transceptor(s) in plants. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2299–2308.
- Gojon A, Nacry P, Davidian JC.** 2009. Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 328–338.
- Guan P.** 2017. Dancing with hormones: a current perspective of nitrate signaling and regulation in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* **8**, 1697.
- Gutiérrez RA, Lejay LV, Dean A, Chiaromonte F, Shasha DE, Coruzzi GM.** 2007. Qualitative network models and genome-wide expression data define carbon/nitrogen-responsive molecular machines in *Arabidopsis*. *Genome Biology* **8**, R7.
- Hermans C, Hammond JP, White PJ, Verbruggen N.** 2006. How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends in Plant Science* **11**, 610–617.
- Ho CH, Lin SH, Hu HC, Tsay YF.** 2009. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell* **138**, 1184–1194.
- Jacquot A, Li Z, Gojon A, Schulze W, Lejay L.** 2017. Post-translational regulation of nitrogen transporters in plants and microorganisms. *Journal of Experimental Botany* **68**, 2567–2580.
- Jenness MK, Carraro N, Pritchard CA, Murphy AS.** 2019. The *Arabidopsis* ATP-BINDING CASSETTE transporter ABCB21 regulates auxin levels in cotyledons, the root pericycle, and leaves. *Frontiers in Plant Science* **10**, 806.
- Kiba T, Krapp A.** 2016. Plant nitrogen acquisition under low availability: regulation of uptake and root architecture. *Plant & Cell Physiology* **57**, 707–714.
- Krouk G, Lacombe B, Bielach A, et al.** 2010. Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Developmental Cell* **18**, 927–937.
- Kubeš M, Yang H, Richter GL, et al.** 2012. The *Arabidopsis* concentration-dependent influx/efflux transporter ABCB4 regulates cellular auxin levels in the root epidermis. *The Plant Journal* **69**, 640–654.
- Léran S, Muños S, Brachet C, Tillard P, Gojon A, Lacombe B.** 2013. *Arabidopsis* NRT1.1 is a bidirectional transporter involved in root-to-shoot nitrate translocation. *Molecular Plant* **6**, 1984–1987.
- Li B, Li Q, Su Y, Chen H, Xiong L, Mi G, Kronzucker HJ, Shi W.** 2011. Shoot-supplied ammonium targets the root auxin influx carrier AUX1 and inhibits lateral root emergence in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* **34**, 933–946.
- Liu KH, Tsay YF.** 2003. Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *The EMBO Journal* **22**, 1005–1013.
- Ljung K, Bhalerao RP, Sandberg G.** 2001. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The Plant Journal* **28**, 465–474.
- Lucas M, Kenobi K, von Wangenheim D, et al.** 2013. Lateral root morphogenesis is dependent on the mechanical properties of the overlaying tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **110**, 5229–5234.
- Ma W, Li J, Qu B, He X, Zhao X, Li B, Fu X, Tong Y.** 2014. Auxin biosynthetic gene *TAR2* is involved in low nitrogen-mediated reprogramming of root architecture in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **78**, 70–79.
- Malamy JE, Benfey PN.** 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**, 33–44.
- Marchant A, Bhalerao R, Casimiro I, Eklöf J, Casero PJ, Bennett M, Sandberg G.** 2002. AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. *The Plant Cell* **14**, 589–597.
- Miller AJ, Fan X, Orsel M, Smith SJ, Wells DM.** 2007. Nitrate transport and signalling. *Journal of Experimental Botany* **58**, 2297–2306.
- Mounier E, Pervent M, Ljung K, Gojon A, Nacry P.** 2014. Auxin-mediated nitrate signalling by NRT1.1 participates in the adaptive response of *Arabidopsis* root architecture to the spatial heterogeneity of nitrate availability. *Plant, Cell & Environment* **37**, 162–174.
- Mravec J, Kubes M, Bielach A, Gaykova V, Petrásek J, Skůpa P, Chand S, Benková E, Zazimalová E, Friml J.** 2008. Interaction of PIN and PGP transport mechanisms in auxin distribution-dependent development. *Development* **135**, 3345–3354.
- Muños S, Cazettes C, Fizames C, Gaymard F, Tillard P, Lepetit M, Lejay L, Gojon A.** 2004. Transcript profiling in the *chl1-5* mutant of *Arabidopsis* reveals a role of the nitrate transporter NRT1.1 in the regulation of another nitrate transporter, NRT2.1. *The Plant Cell* **16**, 2433–2447.
- Nacry P, Bouguyon E, Gojon A.** 2013. Nitrogen acquisition by roots: physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource. *Plant and Soil* **370**, 1–29.
- Naz M, Luo B, Guo X, Li B, Chen J, Fan X.** 2019. Overexpression of nitrate transporter OsNRT2.1 enhances nitrate-dependent root elongation. *Genes* **10**, 290.
- O'Brien JA, Vega A, Bouguyon E, Krouk G, Gojon A, Coruzzi G, Gutiérrez RA.** 2016. Nitrate transport, sensing, and responses in plants. *Molecular Plant* **9**, 837–856.
- Olatunji D, Geelen D, Verstraeten I.** 2017. Control of endogenous auxin levels in plant root development. *International Journal of Molecular Sciences* **18**, 2587.
- Petrásek J, Friml J.** 2009. Auxin transport routes in plant development. *Development* **136**, 2675–2688.
- Porco S, Larrieu A, Du Y, et al.** 2016. Lateral root emergence in *Arabidopsis* is dependent on transcription factor LBD29 regulation of auxin influx carrier LAX3. *Development* **143**, 3340–3349.
- Remans T, Nacry P, Pervent M, Filleur S, Diatloff E, Mounier E, Tillard P, Forde BG, Gojon A.** 2006. The *Arabidopsis* NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **103**, 19206–19211.
- Ruffel S, Krouk G, Ristova D, Shasha D, Birnbaum KD, Coruzzi GM.** 2011. Nitrogen economics of root foraging: transitive closure of the nitrate-cytokinin relay and distinct systemic signaling for N supply vs. demand. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **108**, 18524–18529.
- Santelia D, Vincenzetti V, Azzarello E, Bovet L, Fukao Y, Dühctig P, Mancuso S, Martinoia E, Geisler M.** 2005. MDR-like ABC transporter AtPGP4 is involved in auxin-mediated lateral root and root hair development. *FEBS Letters* **579**, 5399–5406.
- Sun CH, Yu JQ, Hu DG.** 2017. Nitrate: a crucial signal during lateral roots development. *Frontiers in Plant Science* **8**, 485.
- Suzuki M, Yamazaki C, Mitsui M, Kakei Y, Mitani Y, Nakamura A, Ishii T, Soeno K, Shimada Y.** 2015. Transcriptional feedback regulation of YUCCA genes in response to auxin levels in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports* **34**, 1343–1352.
- Swarup K, Benková E, Swarup R, et al.** 2008. The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature Cell Biology* **10**, 946–954.
- Swarup R, Kargul J, Marchant A, et al.** 2004. Structure-function analysis of the presumptive *Arabidopsis* auxin permease AUX1. *The Plant Cell* **16**, 3069–3083.
- Swarup R, Péret B.** 2012. AUX/LAX family of auxin influx carriers—an overview. *Frontiers in Plant Science* **3**, 225.
- Takato S, Kakei Y, Mitsui M, et al.** 2017. Auxin signaling through SCFTIR1/AFBs mediates feedback regulation of IAA biosynthesis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **81**, 1320–1326.
- Tsay YF, Schroeder JI, Feldmann KA, Crawford NM.** 1993. The herbicide sensitivity gene CHL1 of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* **72**, 705–713.
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ.** 1997. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *The Plant Cell* **9**, 1963–1971.
- Vidal EA, Álvarez JM, Gutiérrez RA.** 2014. Nitrate regulation of AFB3 and NAC4 gene expression in *Arabidopsis thaliana* roots depends on NRT1.1 nitrate transport function. *Plant Signaling & Behavior* **9**, e28501.
- Vidal EA, Araus V, Lu C, Parry G, Green PJ, Coruzzi GM, Gutiérrez RA.** 2010. Nitrate-responsive miR393/AFB3 regulatory module controls root system architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **107**, 4477–4482.
- Vieten A, Sauer M, Brewer PB, Friml J.** 2007. Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends in Plant Science* **12**, 160–168.

- Vieten A, Vanneste S, Wisniewska J, Benková E, Benjamins R, Beeckman T, Luschnig C, Friml J.** 2005. Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* **132**, 4521–4531.
- Walch-Liu P, Forde BG.** 2008. Nitrate signalling mediated by the NRT1.1 nitrate transporter antagonises L-glutamate-induced changes in root architecture. *The Plant Journal* **54**, 820–828.
- Walch-Liu P, Liu LH, Remans T, Tester M, Forde BG.** 2006. Evidence that L-glutamate can act as an exogenous signal to modulate root growth and branching in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology* **47**, 1045–1057.
- Wang R, Xing X, Wang Y, Tran A, Crawford NM.** 2009. A genetic screen for nitrate regulatory mutants captures the nitrate transporter gene *NRT1.1*. *Plant Physiology* **151**, 472–478.
- Wei J, Zheng Y, Feng H, Qu H, Fan X, Yamaji N, Ma JF, Xu G.** 2018. OsNRT2.4 encodes a dual-affinity nitrate transporter and functions in nitrate-regulated root growth and nitrate distribution in rice. *Journal of Experimental Botany* **69**, 1095–1107.
- Wu G, Otegui MS, Spalding EP.** 2010. The ER-localized TWD1 immunophilin is necessary for localization of multidrug resistance-like proteins required for polar auxin transport in *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell* **22**, 3295–3304.
- Xu J, Scheres B.** 2005. Dissection of *Arabidopsis* ADP-RIBOSYLATION FACTOR 1 function in epidermal cell polarity. *The Plant Cell* **17**, 525–536.
- Yang H, Murphy SA.** 2009. Functional expression and characterization of *Arabidopsis* ABCB, AUX 1 and PIN auxin transporters in *Schizosaccharomyces Pombe*. *The Plant Journal* **59**, 179–191.
- Zádníková P, Petrásek J, Marhavy P, et al.** 2010. Role of PIN-mediated auxin efflux in apical hook development of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **137**, 607–617.
- Zhang H, Forde BG.** 1998. An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* **279**, 407–409.
- Zhang X, Cui Y, Yu M, Su B, Gong W, Baluška F, Komis G, Šamaj J, Shan X, Lin J.** 2019. Phosphorylation-mediated dynamics of nitrate transceptor NRT1.1 regulate auxin flux and nitrate signaling in lateral root growth. *Plant Physiology* **181**, 480–498.
- Zhao Y.** 2018. Essential roles of local auxin biosynthesis in plant development and in adaptation to environmental changes. *Annual Review of Plant Biology* **69**, 417–435.



**Figure III.3 : Comparaison de l'expression du gène *TAR2* chez la lignée sur-expressive par rapport à une lignée sauvage Col-0 en réponse à l'N.**

Analyse de l'expression du gène *TAR2* chez les plantes sauvages Col-0 et les plantes sur-exprimant le gène *TAR2* (OETAR2). Les plantes ont été cultivées pendant 12 jours en boîtes de Pétri verticales sur un milieu gélosé soit dépourvu de source de N, soit complété avec 0,5 mM Gln ou 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Le niveau des transcrits a été quantifié dans les racines par RT-qPCR et normalisé par le gène de ménage *UBIQUITINE10*. Les résultats d'expression sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Les valeurs P ont été analysées par le test statistique T-Student et les différences entre les génotypes mutants et de type sauvage sont statistiquement significatives à \* P < 0,05 et \*\* P < 0,01.



**Figure III.4 : Expression du gène *NRT1.1* en réponse à l'N chez le mutant *tar2* (*tar2c*) et le sur-expresseur *TAR2* (OETAR2).**

Analyse de l'expression du gène *NRT1.1* chez la plante sauvage Col-0, les plantes mutantes *tar2c* et les plantes exprimant le gène *TAR2* sous le contrôle d'un promoteur constitutif (OETAR2). Les plantes ont été cultivées pendant 12 jours en boîtes de Pétri verticales sur un milieu gélosé soit dépourvu de source de N, soit complété avec 0,5 mM Gln ou 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Le niveau des transcrits a été quantifié dans les racines par RT-qPCR et normalisé par le gène de ménage *UBIQUITINE10*. Les résultats d'expression sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Les valeurs p ont été analysées par le test statistique T-Student.

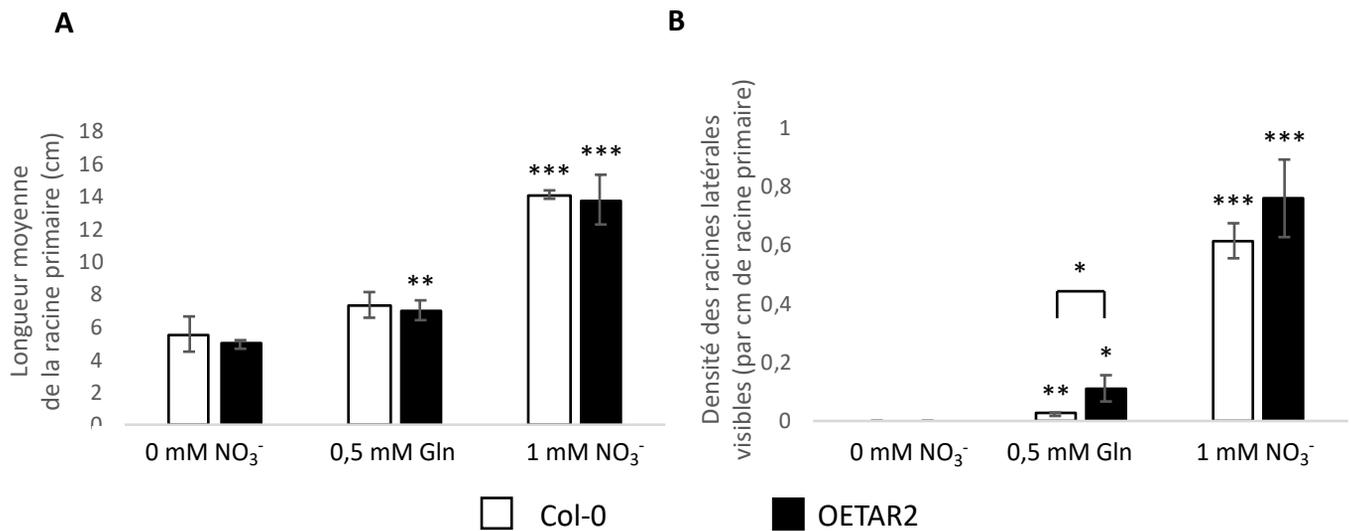
### III. Résultats complémentaires

#### 1) *La répression de l'expression de TAR2 est-elle la cause majeure de l'effet de NRT1.1 sur le développement des PRLs ?*

Les résultats publiés dans notre article (Maghiaoui *et al.*, 2020a) montrent qu'en l'absence de  $\text{NO}_3^-$ , NRT1.1 régule négativement l'expression de *TAR2* dans la stèle et dans une moindre mesure dans les jeunes PRLs, confirmant son rôle dans le développement du PRL non seulement en facilitant le transport de l'auxine hors de cet organe, mais également en modulant la biosynthèse locale de l'auxine (Krouk *et al.*, 2010b ; Maghiaoui *et al.*, 2020a). Par rapport au modèle proposé précédemment par l'équipe (Krouk *et al.*, 2010b), ces résultats amènent donc une question importante : quelle est la cause prédominante de l'effet inhibiteur de NRT1.1 sur le développement des PRLs : (i) le transport basipète d'auxine hors du PRL assuré par NRT1.1 ou (ii) la répression de la biosynthèse d'auxine dépendante de *TAR2* qui alimente le transport acropète d'auxine vers le PRL ? Les deux mécanismes peuvent bien sûr contribuer de manière additive à cet effet. Cependant rien n'exclut à ce stade que l'inhibition de l'expression de *TAR2* suffise à empêcher à elle seule l'accumulation d'auxine dans les PRLs, sans qu'il soit nécessaire d'imaginer que le flux basipète d'auxine médié par NRT1.1 soit également indispensable.

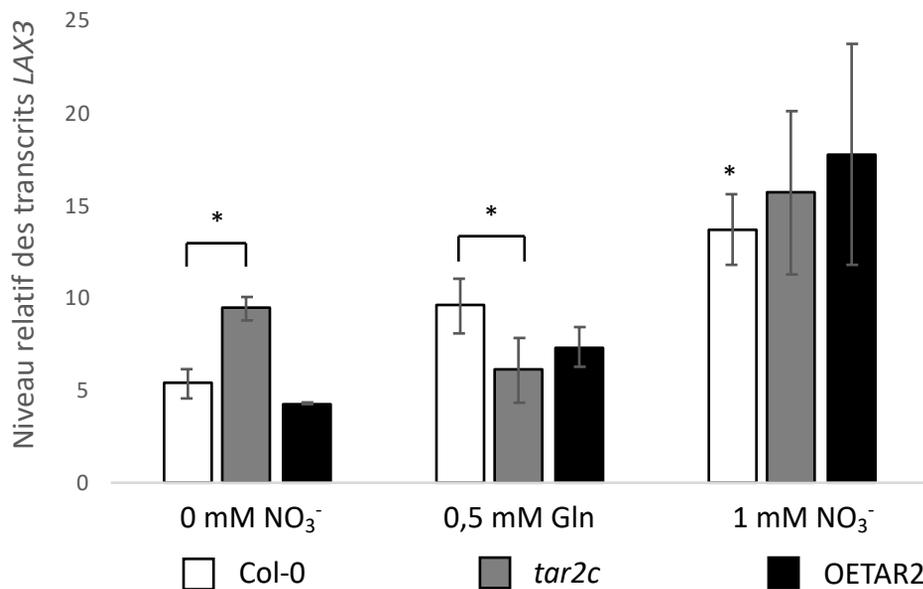
Pour aborder la réponse à cette question, la stratégie expérimentale a consisté à étudier une lignée sur-expressive du gène *TAR2* (OETAR2 dans le fond Col-0). Dans les racines, le niveau de transcrits *TAR2* est considérablement plus élevé chez les plantes OETAR2 que chez les plantes sauvages, et surtout, ce niveau ne dépend plus de l'alimentation en N de la plante (Figure III.3). De manière intéressante, quelles que soient les conditions, ni la surexpression de *TAR2* ni sa mutation KO n'impactent l'accumulation des transcrits *NRT1.1* dans les racines (Figure III.4).

Les résultats publiés dans notre article montrent que la biosynthèse locale d'auxine médiée par *TAR2* permet la stimulation locale du développement des PRLs en réponse au  $\text{NO}_3^-$ . En particulier, nous avons montré que l'expression de *TAR2* est induite par le  $\text{NO}_3^-$  et que le mutant *tar2c* présente une densité de racines latérales réduite en réponse au  $\text{NO}_3^-$ , en parfaite corrélation avec une diminution du signal *DR5*. Nous avons donc étudié l'effet de la surexpression de *TAR2* sur l'architecture racinaire en mesurant la longueur de la racine primaire ainsi que la densité des RLs visibles (> 5mm) chez les plantes OETAR2 en comparaison aux plantes sauvages. De manière générale, sur les différentes conditions testées, la surexpression



**Figure III.5 :** Analyse de l'architecture du système racinaire chez la lignée sur-expressive *TAR2* (OETAR2) en réponse au NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

Architecture du système racine de plantes sauvages Col-0 et des plantes exprimant le gène *TAR2* sous le contrôle d'un promoteur constitutif (OETAR2). Les plantes ont été cultivées pendant 12 jours en boîtes de Pétri verticales sur un milieu gélosé soit dépourvu de source de N, soit complété avec 0,5 mM Gln ou 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. **A.** Longueur moyenne de la racine primaire (cm). **B.** Densité moyenne des racines latérales visibles (> 0,5 mm). Les résultats (n = 50) sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Les valeurs p ont été analysées par le test statistique T-Student et les différences entre les génotypes et conditions sont statistiquement significatifs à \* P < 0,05 ; \*\* P < 0,01 ; \*\*\* P < 0,001.



**Figure III.6 :** Effet de la mutation et de la surexpression de *TAR2* sur l'expression du gène *LAX3*.

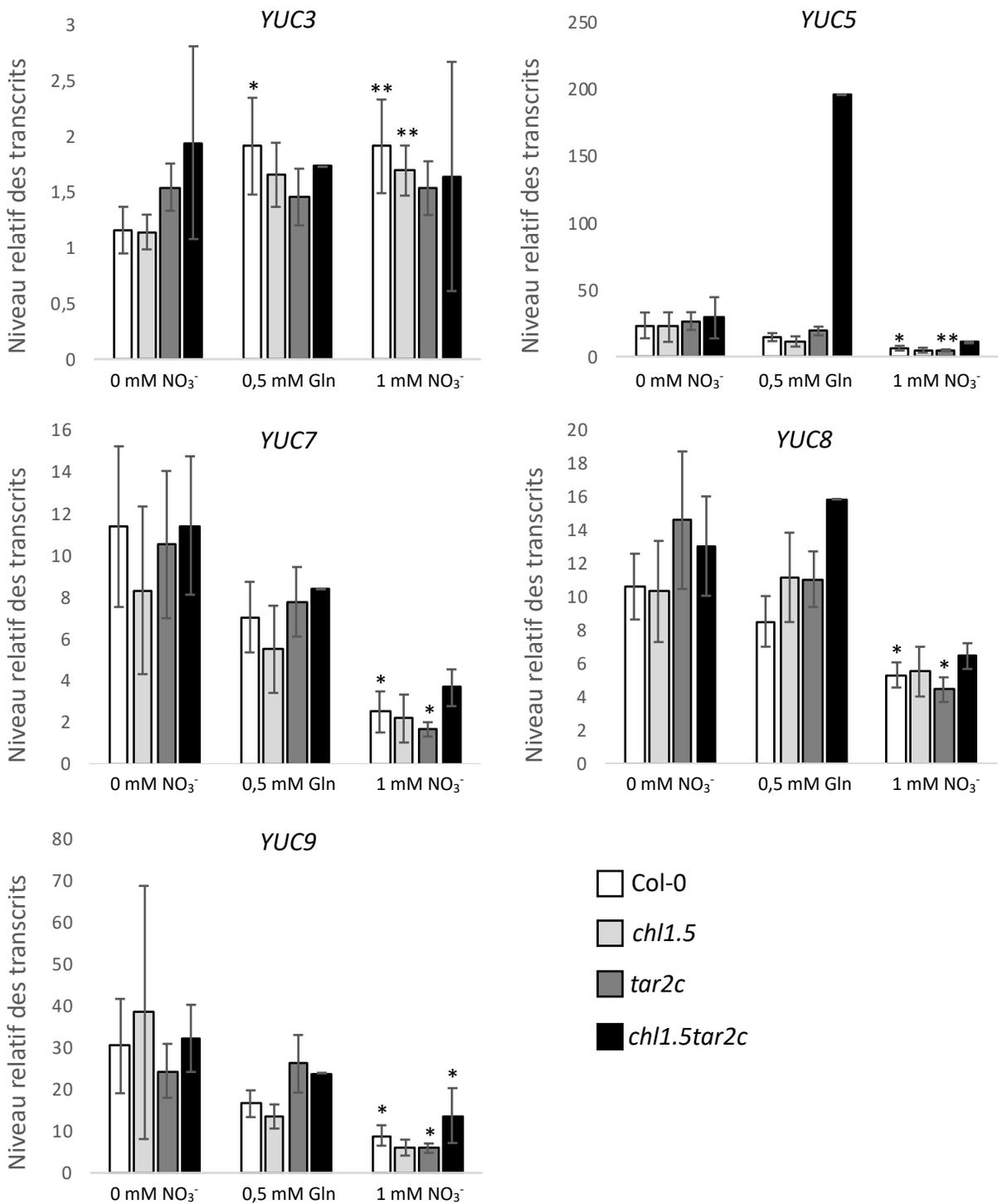
Expression du gène *LAX3* chez les plantes sauvages Col-0, les plantes mutantes *tar2c* et les plantes exprimant le gène *TAR2* sous le contrôle d'un promoteur constitutif (OETAR2). Les plantes ont été cultivées pendant 12 jours en boîtes de Pétri verticales sur un milieu gélosé soit dépourvu de source de N, soit complété avec 0,5 mM Gln ou 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Le niveau des transcrits a été quantifié dans les racines par RT-qPCR et normalisé par le gène de ménage *UBIQUITINE10*. Les résultats d'expression sont représentatifs de deux expériences indépendantes. Les valeurs p ont été analysées par le test statistique T-Student et les différences entre les conditions et les génotypes sont statistiquement significatifs à \* P < 0,05.

### Chapitre III

de *TAR2* n'a pas d'effet majeur sur l'architecture racinaire (Figure III.5). Seule, une légère augmentation de la densité des racines latérales est observée chez la lignée OETAR2 en comparaison aux plantes sauvages en condition 0,5 mM Gln. Ainsi, contrairement à la mutation KO de *TAR2* qui réduit la densité des RLs en présence de 1mM  $\text{NO}_3^-$  (Maghiaoui *et al.*, 2020a), la surexpression de *TAR2* n'augmente pas cette densité dans cette condition. Surtout, cette surexpression ne prévient que peu ou pas du tout la répression du développement des RLs en l'absence de  $\text{NO}_3^-$ . Cette répression est particulièrement marquée dans l'expérience présentée, puisque ni les plantes Col, ni les plantes OETAR2 ne présentent de RLs émergées sur milieu dépourvu de N, alors que de nombreuses RLs sont visibles chez les deux génotypes sur 1 mM  $\text{NO}_3^-$  (Figure III.5).

Un autre marqueur révélateur des modifications de développement des PRLs est *LAX3* (Swarup *et al.*, 2008). Comme c'est le cas pour l'expression de *TAR2* et le développement des PRLs, l'expression de *LAX3* est réprimée par NRT1.1 en l'absence de  $\text{NO}_3^-$  (Maghiaoui *et al.*, 2020a). Nous avons donc voulu savoir si la surexpression de *TAR2* modifie l'expression du gène *LAX3* en réponse à différentes sources d'azote. Les transcrits *LAX3* de racines des plantes Col-0, des plantes mutantes *tar2c* et de la lignée OETAR2, semées sur 0 mM  $\text{NO}_3^-$ , 1 mM  $\text{NO}_3^-$  ou 0,5 mM Gln ont donc été analysés. Comme attendu, le  $\text{NO}_3^-$  induit de manière significative l'expression de *LAX3* (Figure III.6). Cette réponse est totalement conservée chez la lignée OETAR2, qui présente un profil d'expression similaire à Col-0, avec des niveaux de transcrits *LAX3* équivalents. En particulier, la surexpression de *TAR2* n'augmente pas l'expression de *LAX3* en absence de  $\text{NO}_3^-$ . Ceci suggère qu'une biosynthèse d'auxine locale potentiellement accrue ne conduit pas une augmentation de l'expression de *LAX3* pour favoriser l'émergence des PRLs, ce qui est en accord avec l'observation que la surexpression de *TAR2* ne stimule pas cette émergence (Figure III.5). De manière inattendue, les résultats obtenus avec le mutant *tar2c* indiquent que *TAR2* semble être impliquée dans le contrôle de l'expression de *LAX3* en l'absence de  $\text{NO}_3^-$  (Figure III.6). Cependant, l'effet de la mutation de *TAR2* est inverse sur 0 mM  $\text{NO}_3^-$  (stimulation) et sur 0,5 mM Gln (répression).

Collectivement, les résultats ci-dessus, encore préliminaires, suggèrent néanmoins fortement que la répression de l'expression de *TAR2* n'est pas la cause principale de l'inhibition du développement des PRLs par NRT1.1, mais que c'est bien l'activité de transport d'auxine de NRT1.1 dans le PRL qui constitue le mécanisme majeur par lequel ce transcepteur gouverne l'émergence des RLs. En effet, la levée de répression de *TAR2* par NRT1.1 chez les plantes OETAR2 ne réussit à stimuler ni le développement des RLs, ni l'expression de *LAX3*. Pour



**Figure III.7 : Expression des gènes *YUCCA* chez les fonds mutants *ch11-5*, *tar2* et *ch11-5tar2c* en réponse au NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.**

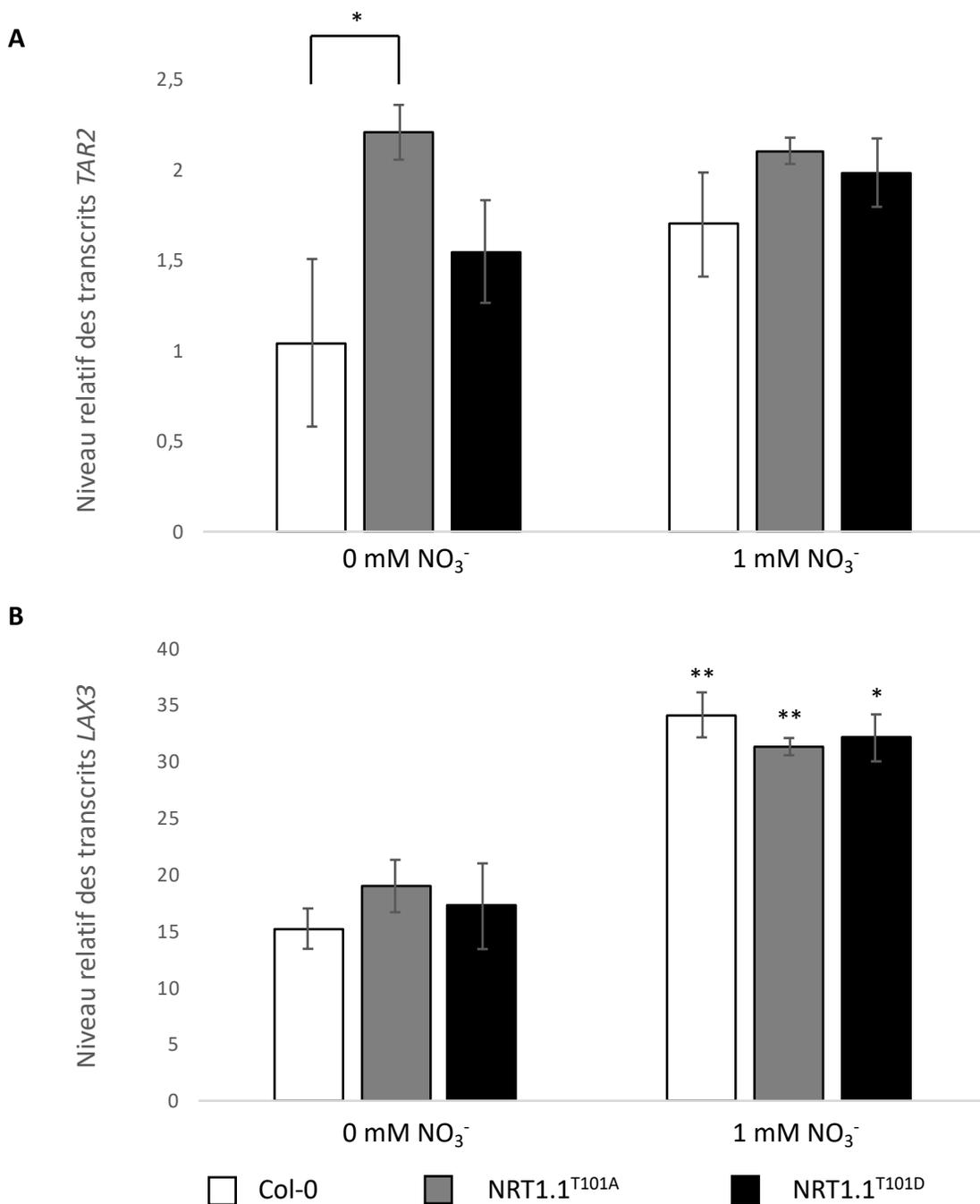
Expression relative des gènes *YUCCA* : *YUC3*, *YUC5*, *YUC7*, *YUC8* et *YUC9* chez la plante sauvage Col-0 et les plantes mutantes *ch11.5*, *tar2c* et le double mutant *ch11.5tar2c*. Les plantes ont été cultivées pendant 12 jours en boîtes de Pétri verticales sur un milieu gélosé soit dépourvu de source de N, soit complété avec 0,5 mM Gln ou 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Le niveau des transcrits a été quantifié dans les racines par RT-qPCR et normalisé par le gène de ménage *UBIQUITINE10*. Les résultats d'expression sont représentatifs de quatre expériences indépendantes, sauf pour le mutant *ch11.5tar2c* qui correspond à une seule expérience. Les valeurs p ont été analysées par le test statistique T-Student et les différences entre les conditions sont statistiquement significatives à \* P < 0,05 ; \*\* P < 0,01.

### Chapitre III

renforcer cette conclusion, plusieurs expériences complémentaires seraient nécessaires. Premièrement, il faudrait s'assurer que la seule surexpression de *TAR2* suffit à stimuler la biosynthèse d'auxine dans la stèle, en étudiant chez les plantes OETAR2 l'activité de rapporteurs d'auxine tels que DR5 ou DII-Venus par exemple. Deuxièmement, il faudrait également s'assurer que cette surexpression n'affecte pas l'accumulation d'auxine dans les PRLs, en cohérence avec le fait qu'elle n'induit pas de stimulation du développement de ces PRLs. Enfin, même si aucun effet n'a été trouvé en ce qui concerne l'expression de *NRT1.1*, il faudrait s'assurer que l'expression de la protéine NRT1.1 n'est pas modifiée dans les PRLs chez les plantes OETAR2 par rapport aux sauvages. Cela permettrait d'écarter l'hypothèse qu'une augmentation éventuelle du flux acropète d'auxine vers le PRL associée à la surexpression de *TAR2* soit en fait compensée par une action accrue de NRT1.1 pour stimuler le transport basipète de l'hormone.

#### 2) Certains gènes *YUC* sont régulés par le $\text{NO}_3^-$

L'hypothèse que NRT1.1 régule la biosynthèse locale d'auxine permettant l'alimentation des PRLs en cette hormone repose essentiellement sur son effet sur l'expression de *TAR2* (Maghiaoui *et al.*, 2020a). Cependant, de nombreuses autres enzymes que *TAR2* sont impliquées dans la voie de biosynthèse (voir introduction, Figure III.2), et leur régulation par le  $\text{NO}_3^-$  ou par NRT1.1 reste encore très peu étudiée. En ce qui concerne les gènes codant les trois tryptophane aminotransférases (*TAA1*, *TAR1* et *TAR2*), il a toutefois été montré que seul *TAR2* répond de manière marquée à l'N dans les racines (Ma *et al.*, 2014). Par contre, rien n'est connu en ce qui concerne les gènes codant les *YUCCAs*. Chez *A.thaliana*, parmi les 11 membres de la famille *YUCCA* étudiés, seuls 5 gènes sont exprimés au niveau de la pointe de la racine primaire. Il s'agit des gènes *YUC3*, *YUC5*, *YUC7*, *YUC8* et *YUC9* (Chen *et al.*, 2014). D'après la littérature, *YUC3* est exprimé au niveau de la zone de maturation de la racine primaire alors que *YUC5*, *YUC8* et *YUC9* sont exprimés au niveau du méristème de la racine primaire. Intervenant en aval des enzymes TAA1 et TARs dans la voie de biosynthèse de l'IPyA, nous avons voulu déterminer si les *YUCCA* sont régulés par le  $\text{NO}_3^-$  et ce, de manière NRT1.1 dépendante. L'accumulation racinaire des transcrits *YUC3*, *YUC5*, *YUC7*, *YUC8* et *YUC9* a donc été mesurée en condition 0 mM  $\text{NO}_3^-$ , 1 mM  $\text{NO}_3^-$  ou 0,5 mM Gln. Dans l'ensemble, une majorité de ces gènes semble spécifiquement régulée par le  $\text{NO}_3^-$  (Figure III.7). Chez Col-0, il induit significativement l'expression de *YUC3* (mais c'est aussi vrai pour la Gln) et réprime celles de *YUC5*, *YUC7*, *YUC8* et *YUC9*, une tendance qui contraste avec ce qui avait été



**Figure III.8 :** Réponse de l'expression des gènes *TAR2* et *LAX3* aux mutations affectant la phosphorylation de NRT1.1.

Les plantes sauvages Col-0, les plantes transgéniques NRT1.1<sup>T101A</sup> et NRT1.1<sup>T101D</sup> ont été cultivées sur milieu gélosé en boîtes de Pétri verticales sur 0 ou 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> pendant 12 jours. **A.** Expression relative du gène *TAR2*. **B.** Expression relative du gène *LAX3*. L'accumulation des transcrits a été analysée par RT-qPCR et normalisée par l'*UBIQUITINE*. Les données sont la moyenne ± SE de celles issues de trois répliques biologiques indépendants. Les valeurs p ont été analysées par le test statistique de T-Student et les différences entre les conditions sont statistiquement significatives à \*P<0,05 et \*\*P<0,01.

### Chapitre III

rapporté en réponse au  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , qui ne semblait pas moduler l'expression des gènes *YUC* (Ma *et al.*, 2014) (Figure III.7). Cette régulation par le  $\text{NO}_3^-$ , inverse de celle observée pour *TAR2*, ne semble pas dépendre de *NRT1.1* puisque les profils d'expression des gènes *YUC* chez le mutant *chl1-5* ne diffèrent pas de ceux de la plante sauvage. De même, la mutation du gène *TAR2* n'engendre pas de modification de l'expression des gènes *YUC*, même lorsqu'elle s'ajoute à celle de *NRT1.1* (Figure III.7), à l'exception possible de la réponse de *YUC5* sur milieu Gln, qui semble toutefois très suspecte et qui mériterait d'être confirmée dans d'autres expériences. De manière intéressante, il semble que l'induction ou la répression par le  $\text{NO}_3^-$  des gènes *YUC* soit en relation avec leur localisation le long de la racine primaire. Dans la racine, les gènes *YUC* ont des profils d'expression distincts mais qui se chevauchent et qui sous-entendent donc une redondance fonctionnelle (Cheng *et al.*, 2006 ; Zhao *et al.*, 2001) De plus, le  $\text{NO}_3^-$  favorise l'accumulation de l'auxine, qui elle-même réprime l'expression des *YUCCA*. Ainsi, l'effet différentiel du  $\text{NO}_3^-$  sur l'expression des gènes *YUCCA* suggère que *YUC3* n'est pas impliqué dans la même voie de signalisation auxinique en réponse au  $\text{NO}_3^-$  que *YUC5*, *YUC7*, *YUC8* et *YUC9*.

#### **3) Impact des mutations du résidu T101 de *NRT1.1* sur la régulation de l'expression de *TAR2* et *LAX3***

Un dernier point de cohérence entre nos résultats et ceux acquis précédemment dans l'équipe restait à vérifier. Le mutant *NRT1.1*<sup>T101D</sup>, qui mime la forme phosphorylée de *NRT1.1*, demeurait capable de transporter l'auxine et était capable de compléter le phénotype de développement des PRLs du mutant *chl1-5*. A l'inverse, le mutant *NRT1.1*<sup>T101A</sup>, qui ne peut pas être phosphorylé, avait perdu ces capacités (Bouguyon *et al.*, 2015). Ceci a suggéré que c'était uniquement la forme phosphorylée de *NRT1.1* qui intervient dans la régulation de l'architecture racinaire. En toute logique, on devrait s'attendre à ce que ceci soit également vrai pour la régulation de l'expression de *TAR2* et *LAX3*. Pour vérifier ce point, l'expression des deux gènes a été étudiée chez les lignées exprimant *NRT1.1*<sup>T101D</sup> ou *NRT1.1*<sup>T101A</sup> dans le fond mutant *chl1-5* (Figure III.8). Conformément à ce qui était attendu sur un milieu dépourvu en N, *NRT1.1*<sup>T101A</sup> ne restaure pas la répression de l'expression de *TAR2*, alors que *NRT1.1*<sup>T101D</sup> réduit cette expression à un niveau non statistiquement différent de celui observé chez Col. Ceci confirme bien que c'est probablement la forme phosphorylée de *NRT1.1* qui intervient spécifiquement dans la régulation de la biosynthèse locale d'auxine dans la stèle. Par contre, ce patron d'expression n'est pas retrouvé pour *LAX3*, dont les niveaux de transcrits sont similaires



### Chapitre III

entre les plantes NRT1.1<sup>T101A</sup>, NRT1.1<sup>T101D</sup> et Col, et ceci indépendamment de la présence de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> dans le milieu (Figure III.8). Cette observation devra être confirmée par d'autres expériences indépendantes, mais si c'était le cas, elle signifierait que la phosphorylation de NRT1.1 n'a pas d'effet sur le contrôle de *LAX3* par NRT1.1, suggérant un autre mécanisme de signalisation que celui basé sur la capacité de transport d'auxine de NRT1.1.

#### 4) Conclusion

Les résultats présentés dans ce chapitre confirment la forte interaction mise en évidence par l'équipe entre la signalisation NO<sub>3</sub><sup>-</sup> médiée par NRT1.1 et la signalisation auxinique pour le contrôle des processus développementaux (Krouk *et al.*, 2010b ; Mounier *et al.*, 2014 ; Bouguyon *et al.*, 2015 ; Bouguyon *et al.*, 2016). Par rapport aux études précédentes, ces résultats révèlent un rôle bien plus étendu de NRT1.1, qui contrôle également l'expression d'autres transporteurs d'auxine (notamment *LAX3*) et celle du gène codant l'enzyme *TAR2*. C'est la première fois que la biosynthèse d'auxine est montrée comme étant dépendante de la signalisation NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Cependant, la répression de *TAR2* par NRT1.1 ne semble pas être déterminante dans l'inhibition du développement des PRLs sur milieu dépourvu de N (c'est apparemment le transport d'auxine médié par NRT1.1 dans les PRLs qui l'est). Par contre, l'induction de *TAR2* par le NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, qui correspond à la levée de la répression exercée par NRT1.1, contribue visiblement à l'effet stimulateur du NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sur le développement des PRLs. En effet, la mutation de *TAR2* atténue significativement l'augmentation de la densité de RLs sur milieu 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> par rapport à celui dépourvu de N (Maghiaoui *et al.*, 2020a). Au bilan, le nouveau modèle proposé (Maghiaoui *et al.*, 2020a) est parfaitement cohérent avec le précédent (Krouk *et al.*, 2010b) et démontre le rôle pivot de NRT1.1 dans la coordination des différents processus impliqués dans la réponse du développement des RLs au NO<sub>3</sub><sup>-</sup> chez *A. thaliana*.

Au-delà de NRT1.1, un autre mécanisme de contrôle mis en avant par nos résultats concerne la régulation par le NO<sub>3</sub><sup>-</sup> de l'expression des gènes codant des transporteurs d'auxine ou des enzymes appartenant à la famille YUCCA. En effet, ces gènes répondent dans leur majorité au NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, mais cette réponse ne semble pas dépendre de NRT1.1. Ainsi, nos observations confirment que le NO<sub>3</sub><sup>-</sup> est un facteur environnemental majeur qui module l'action de l'auxine dans les mécanismes développementaux, mais elles indiquent aussi que cette modulation met en jeu d'autres voies de signalisation, en plus de celle impliquant NRT1.1.



## CHAPITRE IV :

# Étude de la régulation post-transcriptionnelle de NRT1.1



### I. Introduction

#### 1) Contexte

Le modèle de développement des PRLs établi par notre équipe (voir chapitre d'introduction bibliographique, Figure I.13) postule qu'en absence de  $\text{NO}_3^-$ , la protéine NRT1.1 se comporte comme un transporteur d'auxine qui exporte l'hormone hors du primordium, empêchant son accumulation à l'apex de cet organe et inhibant ainsi son développement. Lorsque le  $\text{NO}_3^-$  est localement abondant, il réprime le transport d'auxine médié par NRT1.1, ce qui a pour conséquence de favoriser l'accumulation d'auxine dans les PRLs, et donc de stimuler la croissance de ces derniers (Krouk *et al.*, 2010b). Ce modèle a été étayé par des études d'expression de protéines de fusion NRT1.1-GFP (sous le contrôle du promoteur *NRT1.1*) et NRT1.1-mcherry (sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'oestradiol), qui ont révélé que dans le PRL, le  $\text{NO}_3^-$  n'agit pas qu'en réprimant l'activité de transport d'auxine de NRT1.1, mais également en inhibant l'expression de la protéine elle-même au niveau post-transcriptionnel (Bouguyon *et al.*, 2016). Par contre, au niveau de l'épiderme et du cortex de la racine primaire, le contrôle post-transcriptionnel exercé par le  $\text{NO}_3^-$  a l'effet inverse, et stimule l'expression de la protéine NRT1.1 (Bouguyon *et al.*, 2016). L'ensemble de ces résultats suggère l'hypothèse d'une régulation post-transcriptionnelle différentielle (répression ou stimulation) de la protéine NRT1.1 par le  $\text{NO}_3^-$  en fonction des tissus racinaires. Cette régulation serait cruciale pour coordonner la présence de la protéine NRT1.1 avec sa fonction de signalisation selon le contexte tissulaire. La protéine NRT1.1 joue un rôle dans le contrôle de la croissance des PRLs uniquement en l'absence ou à une faible concentration de  $\text{NO}_3^-$  en tant que transporteur d'auxine, alors que dans d'autres tissus racinaires (tels que l'épiderme et le cortex), elle agit uniquement en présence de  $\text{NO}_3^-$ , comme un acteur majeur des voies de signalisation activées par la fourniture de  $\text{NO}_3^-$  (voir chapitre d'introduction bibliographique, Figure I.15).

#### 2) Objectifs du travail

Le travail présenté dans ce chapitre a eu deux objectifs : (i) étendre l'étude de la régulation post-transcriptionnelle de NRT1.1 à d'autres tissus et organes de la plante (parties aériennes notamment), dans le but d'obtenir des informations sur la fonction potentielle de NRT1.1 dans ces tissus ou organes (rôle de NRT1.1 en absence ou en présence de  $\text{NO}_3^-$ ), et (ii) rechercher



## Chapitre IV

les mécanismes de la régulation post-transcriptionnelle de NRT1.1 par le  $\text{NO}_3^-$ , dans au moins une des deux situations où l'effet du  $\text{NO}_3^-$  est positif ou au contraire négatif (rien à ce stade ne permet de penser que les mécanismes en jeu sont les mêmes dans les deux cas).

Ainsi, par rapport aux études conduites précédemment dans l'équipe, une première nouveauté est que les analyses décrites dans ce chapitre ne se cantonnent pas seulement aux parties racinaires mais également aux parties aériennes et à la plante entière. Pendant longtemps, la majeure partie des études menées sur les transporteurs de  $\text{NO}_3^-$  se sont focalisées sur les parties racinaires, en liaison avec le postulat que les étapes de transport du  $\text{NO}_3^-$  cruciales pour la nutrition azotée de la plante concernaient surtout l'absorption racinaire et le chargement du  $\text{NO}_3^-$  dans les vaisseaux du xylème pour son exportation vers les parties aériennes (pour les espèces chez qui le  $\text{NO}_3^-$  est assimilé dans les feuilles). Or, une série d'études récentes a remis en cause ce postulat, en démontrant le rôle-clé de plusieurs transporteurs de  $\text{NO}_3^-$  de la famille NRT1/NPF dans le contrôle de la croissance des parties aériennes, ou de leur réponse à une limitation en azote (voir O'Brien *et al.*, 2016 pour revue). En ce qui concerne spécifiquement la fonction de NRT1.1 dans les parties aériennes, les données sont peu abondantes et assez disparates. Les transcrits et la protéine sont détectés dans les parties aériennes, et l'expression du gène y est rapidement régulée à la hausse en réponse au  $\text{NO}_3^-$  (Guo *et al.*, 2001). Il a été notamment montré que *NRT1.1* était exprimé dans les cellules de garde pour assurer l'ouverture des stomates (Guo *et al.*, 2003). Il a également été montré que NRT1.1 était, comme pour les racines, un déterminant important de la croissance des parties aériennes même en l'absence de  $\text{NO}_3^-$  (Guo *et al.*, 2001). En particulier, NRT1.1 pénalise la croissance des parties aériennes lorsque  $\text{NH}_4^+$  est présent comme seule source de N à une concentration élevée dans le milieu (Hachiya *et al.*, 2011). Les mécanismes moléculaires impliqués dans ces fonctions de NRT1.1 dans les parties aériennes sont toutefois inconnus, tout comme l'existence d'une éventuelle régulation post-traductionnelle de ce transcepteur dans ces organes.

La deuxième particularité du travail de ce chapitre est que la stratégie expérimentale choisie combine des approches d'imagerie, comme cela avait déjà été réalisé sur les racines (observations microscopiques sur lignées pNRT1.1::NRT1.1-GFP et/ou pEstradiol::NRT1.1-mCherry) (Bouguyon *et al.*, 2016 ; Krouk *et al.*, 2010b), et des analyses biochimiques sur la protéine NRT1.1 native et la protéine reportrice NRT1.1-GFP (Western-blot et immunoprécipitation). Le développement de l'approche biochimique avait pour but de consolider les conclusions du travail en validant par une autre méthode les résultats obtenus par



## Chapitre IV

imagerie. De plus, l'analyse de la protéine native permet de lever les limitations associées à l'analyse exclusive de protéines chimériques. Enfin, nous avons également développé une approche de pharmacologie, dont le but a été de tester l'hypothèse que la dynamique cellulaire de NRT1.1 (endocytose, recyclage, dégradation) est affectée par le  $\text{NO}_3^-$ , pour comprendre l'effet de cet ion sur l'accumulation de la protéine à la membrane plasmique. La dynamique cellulaire des protéines membranaires met en jeu des mécanismes complexes et spécifiques, qu'il convient de détailler avant de présenter les résultats obtenus à ce sujet sur NRT1.1. Ainsi, la suite de cette introduction concerne une synthèse des connaissances sur ces mécanismes.

### ***3) Mécanismes impliqués dans la dynamique des protéines membranaires***

Lors des réponses aux variations environnementales telles que le manque de disponibilité en nutriments ou l'excès de molécules toxiques, les plantes ont développé des mécanismes de régulation qui contrôlent directement la localisation de protéines membranaires telles que des canaux ou des transporteurs. Parce que la localisation subcellulaire de ces protéines influence directement leur activité, la modulation de la quantité et de la localisation de ces protéines constitue un moyen puissant de contrôler l'absorption et l'homéostasie des nutriments (Korbei and Luschnig, 2013 ; Otegui and Spitzer, 2008 ; Robinson *et al.*, 2012). Ce contrôle implique la régulation des étapes de sécrétion de protéines membranaires nouvellement synthétisées par le réticulum endoplasmique (RE) ainsi que des étapes de recyclage et de dégradation de ces protéines. Les mécanismes de régulation du trafic des protéines membranaires ont été largement caractérisés ces dernières décennies et il a été notamment montré que certaines modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation ou l'ubiquitination contribuent au trafic de ces protéines. Dans ce qui suit, nous détaillons les mécanismes cellulaires permettant la sécrétion et l'endocytose des protéines membranaires et nous donnons quelques exemples de protéines membranaires dont la dynamique est affectée en réponse à différentes conditions environnementales.

#### *a) Le réticulum endoplasmique (RE), comme point de départ*

Le RE constitue la première étape de la voie de sécrétion où la synthèse, le repliement et les premières modifications post-traductionnelles ont lieu. Dans le cas où les protéines sont mal repliées, elles sont rétrotransloquées vers le cytosol via une machinerie de dégradation associée au RE (ERAD) pour être dégradées vers le protéasome (Meusser *et al.*, 2005). Dans le cas



## Chapitre IV

contraire, les protéines fonctionnelles sont exportées du RE vers l'appareil de Golgi par des vésicules recouvertes du complexe protéique COPII (coat protein complex II) et nécessitant des facteurs comme les ARF-GEF (GTPases ADP-ribosylation factor-GTPase guanine-nucleotide exchange factor) (Du *et al.*, 2013). Parallèlement à cette voie antérograde opérée par COPII, une voie rétrograde médiée par COPI, permet un recyclage continu des protéines et des lipides du Golgi vers le RE afin de maintenir un équilibre (Zelazny and Vert, 2014). Les protéines passent séquentiellement à travers les trois parties de l'appareil de Golgi (cis-, médian-, trans-Golgi) où de nombreuses modifications post-traductionnelles ont lieu. Chez les plantes par exemple, l'appareil de Golgi est impliqué dans la synthèse et l'assemblage de polysaccharides complexes de la paroi cellulaire. Ces protéines membranaires atteignent finalement le réseau trans-golgien (TGN). Les vésicules provenant du TGN fusionnent ensuite avec la membrane plasmique pour délivrer les protéines membranaires.

### *b) Endocytose pour un recycling à la membrane ou pour une dégradation à la vacuole*

À la membrane plasmique, les protéines membranaires peuvent être internalisées en utilisant des voies dépendante (CME : Clathrin-Mediated Endocytosis) ou indépendante de la clathrine (CIE : Clathrin-Independent Endocytosis), ce qui permet de diriger les protéines membranaires vers le réseau Trans Golgien/Endosome Précoce (TGN/EE). Une étape cruciale de la voie CME est la sélection des protéines membranaires dans les vésicules de clathrine via la reconnaissance de signaux de tri spécifiques. Les sous-unités du complexe AP2 (Adapter Protein 2) sélectionnent des protéines cargo en fonction de certains motifs d'acides aminés. Certaines modifications post-traductionnelles (comme la phosphorylation ou l'ubiquitination) sont également reconnues par la voie CME.

À partir du TGN/EE, les protéines membranaires peuvent être recyclées vers la membrane plasmique, c'est ce que l'on appelle le recycling à la membrane. Cette étape implique des régulateurs de bourgeonnement de vésicules appelés ARF-GEF (ADP ribosylation factor-guanine nucleotide exchange factor) qui sont notamment sensibles à la toxine brefeldine A (BFA) (Geldner *et al.*, 2003). En inhibant l'activité de ces ARF-GEF, la BFA déclenche l'accumulation de protéines endocytées dans des vésicules qui fusionnent en compartiments géants appelés « corps BFA ». L'utilisation de cette toxine représente donc un outil intéressant pour étudier le trafic d'une protéine et son éventuel recyclage à la membrane. Cependant, des études récentes démontrent le rôle de certaines ARF-GEF sensibles à la BFA dans la formation



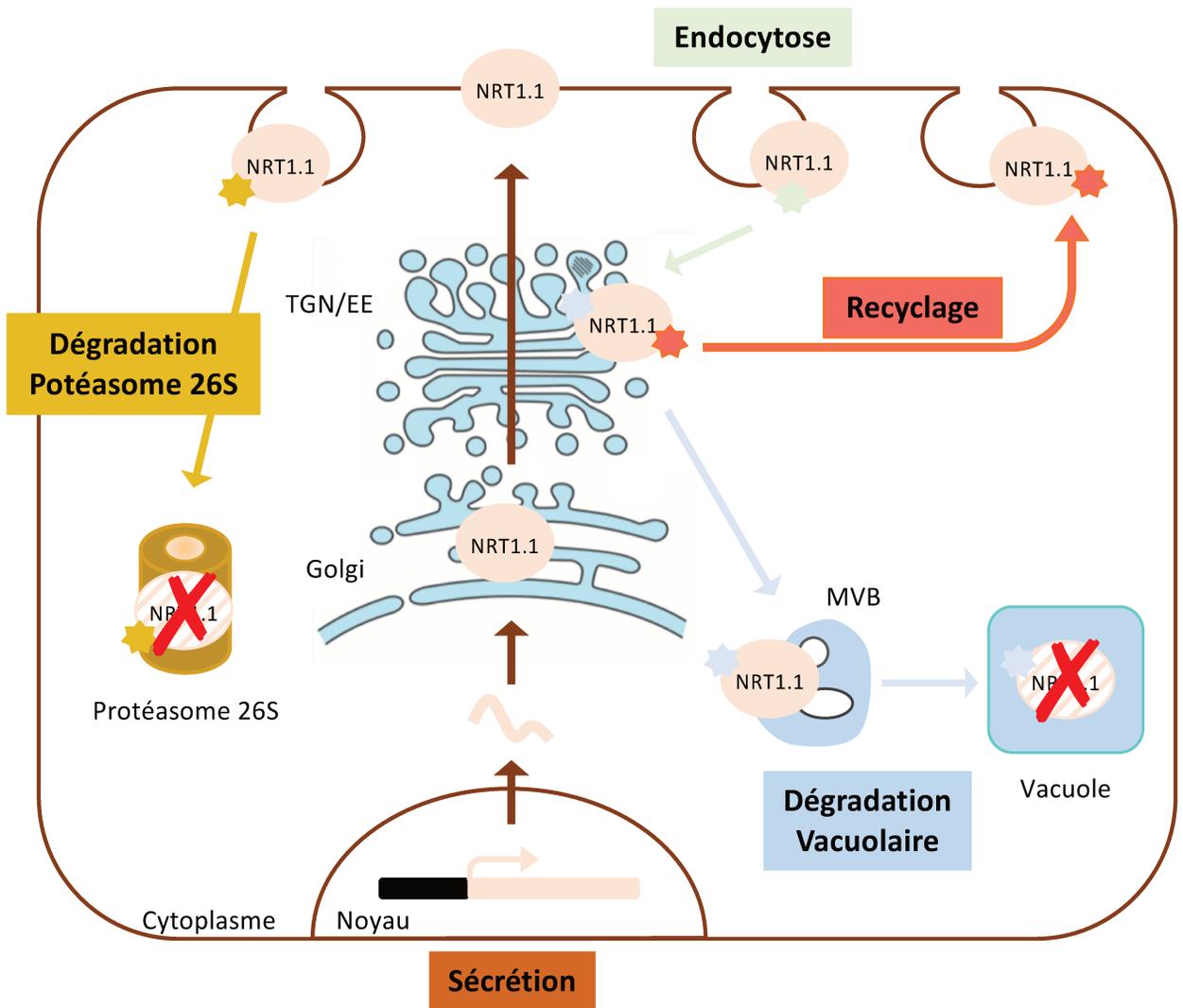
## Chapitre IV

de vésicules de sécrétions (Naramoto *et al.*, 2014). Il est alors difficile dans ces conditions de déterminer l'origine exacte des « corps BFA » que l'on visualise. L'utilisation de la cycloheximide (un inhibiteur de la biosynthèse des protéines) couplé à la BFA permet de s'affranchir de ces difficultés d'interprétation.

De manière alternative, les protéines membranaires endocytées peuvent être internalisés dans des endosomes tardifs appelés corps multivésiculaires (MVB : multivesicular body) qui constituent un compartiment intermédiaire avant la dégradation à la vacuole. Ici aussi, l'ubiquitination est connue pour jouer un rôle dans ce tri MVB en permettant la reconnaissance de protéines membranaires ubiquitinées par le complexe de tri endosomique (ESCRT). Chez les plantes, l'observation des corps autophagiques tels que la vacuole est facilitée par l'utilisation de drogues capables de bloquer la dégradation de protéines. La concanamycine A inhibe les ATPases vacuolaires conduisant à une augmentation du pH vacuolaire. Les protéases n'étant plus actives, les protéines à dégrader s'accumulent ; elles deviennent de ce fait plus facilement observables (Guiboileau and Masclaux-Daubresse, 2012).

### *c) Endocytose médiée par l'ubiquitination*

Le trafic des protéines membranaires peut être médié par des motifs post-traductionnels portés par ces protéines et apparaissent comme des « étiquettes d'adressage ». L'ubiquitination consiste à lier de manière covalente une ou plusieurs molécules d'ubiquitine (polypeptide de 76 acides aminés) sur la lysine d'une protéine cible. Ce mécanisme se fait par l'action séquentielle de trois enzymes : une enzyme E1 activatrice de l'ubiquitine, l'enzyme de conjugaison E2 et une E3 ligase. L'ubiquitination sous la forme d'une chaîne de polyubiquitination est un signal bien connu conduisant à la dégradation de protéines par le protéasome 26S, et les facteurs de transcription sont généralement la cible de ce mécanisme. Cependant, le traitement avec un inhibiteur du protéasome appelé le MG132 a permis de stabiliser le pool de protéines PIN2 ubiquitinées, et a été initialement interprété comme une preuve de dégradation médiée par le protéasome (Abas *et al.*, 2006). En fonction du type de chaînes polyubiquitinées, les protéines peuvent avoir alors différents devenir : les protéines peuvent être modifiées soit par une seule ubiquitine (mono-ubiquitination) ou soit par des chaînes de poly-ubiquitine (poly-ubiquitination), sur un ou plusieurs résidus du substrat (Komander and Rape, 2012). Alors que la mono-ubiquitylation d'une seule lysine est suffisante pour provoquer l'endocytose du transporteur IRT1, la formation de chaînes de poly-ubiquitine



☆ Motif d'Ubquitination

**Figure IV.1 : Représentation schématique de la dynamique subcellulaire des protéines membranaires.**

Le trafic des protéines membranaires permet la sécrétion des protéines nouvellement synthétisées à la membrane plasmique en établissant des points de contrôle le long de la voie sécrétoire. Une fois à la membrane plasmique, les protéines peuvent être internalisées par endocytose et être dirigées vers divers compartiments. Elles peuvent être soumises à un recyclage entre le réseau TGN/EE et la membrane plasmique ou elles peuvent être dégradées par deux systèmes : une dégradation dépendante du protéasome 26S ou une dégradation vacuolaire. Dans ce dernier cas, une étape d'internalisation des protéines dans des corps multi-vésiculaires (MVB) est nécessaire avant d'être dégradée par la vacuole. L'ensemble de ces mécanismes de recyclage et de dégradation sont dépendants de motifs tels que l'ubiquitination, représenté ici.

## Chapitre IV

liées à la lysine K63 provoque sa dégradation vacuolaire (Barberon *et al.*, 2011 ; Dubeaux *et al.*, 2018).

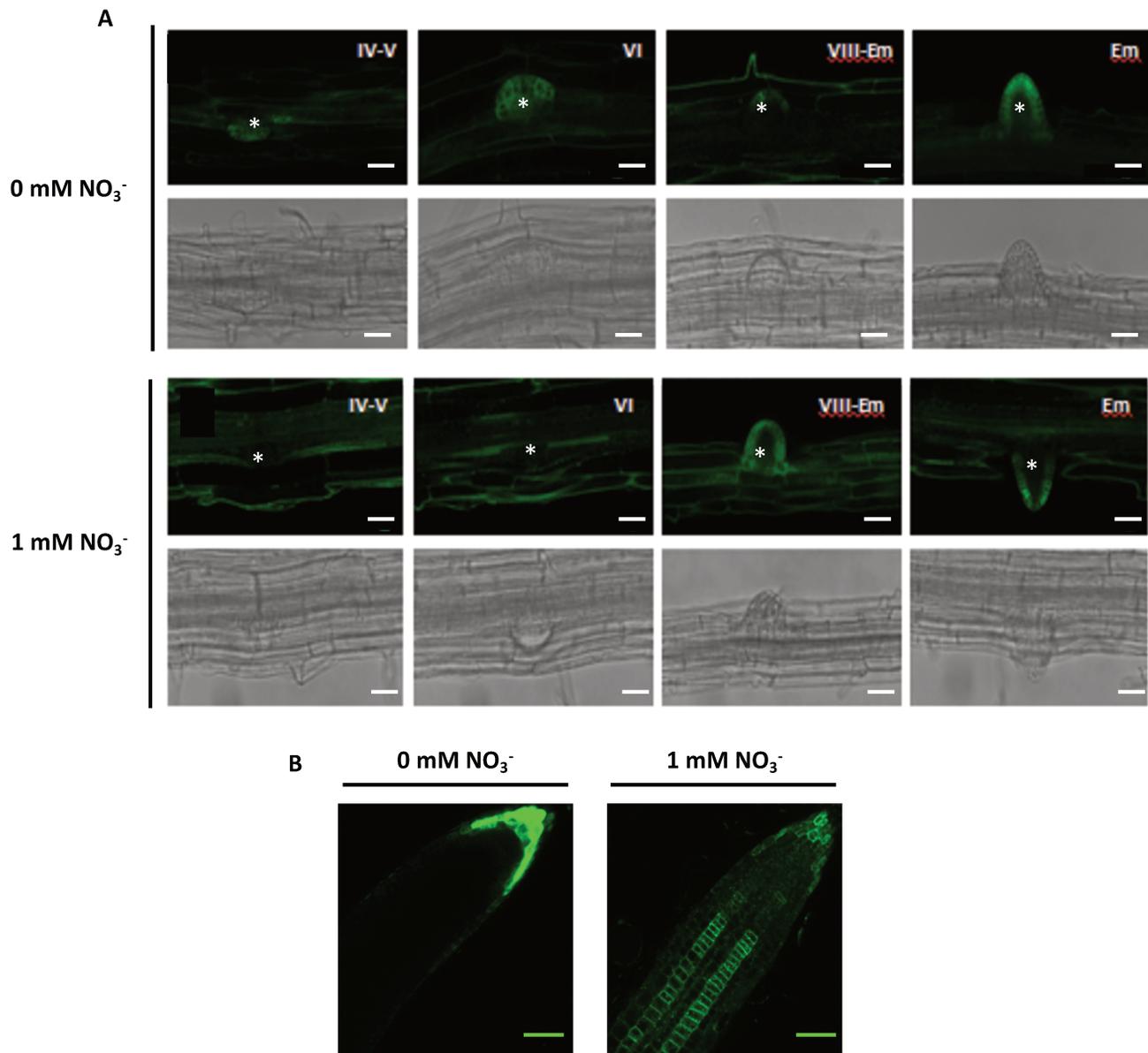
### **4) *NRT1.1* est-il régulé de manière post-traductionnelle par un mécanisme d'ubiquitination en réponse à des fluctuations de $\text{NO}_3^-$ ?**

NRT1.1 est fortement régulé au niveau post-transcriptionnel par des mécanismes qui pourraient être spécifiques aux différents tissus. Ces mécanismes se sont avérés être cruciaux pour contrôler la large palette de réponses adaptatives au  $\text{NO}_3^-$  médiées par NRT1.1, car ils garantissent la présence de la protéine dans le tissu approprié et dans les conditions spécifiques où elle joue un rôle de signalisation. Le but du travail était d'aborder l'étude des mécanismes de cette régulation post-transcriptionnelle. L'approche a consisté à tester l'hypothèse que la dynamique cellulaire de NRT1.1 (endocytose, recyclage, dégradation) soit affectée par le  $\text{NO}_3^-$ , et expliquer ainsi l'effet de cet ion sur l'accumulation de la protéine à la membrane plasmique. Des données protéomiques prédisent que la protéine NRT1.1 possède au moins six sites potentiels d'ubiquitination sur des lysines cytosoliques. Au travers d'une étude couplant des approches d'imagerie, de biologie cellulaire et de biochimie, j'ai eu pour objectifs : (i) d'analyser le « trafficking » vésiculaire de la protéine NRT1.1 entre la membrane plasmique et le réseau TGN/EE, (ii) de caractériser le mode de dégradation (vacuolaire ou au protéasome 26S) de NRT1.1, et (iii) de déterminer si NRT1.1 est ubiquitinée *in vivo* (Figure IV.1).

## **II. Résultats**

### **1) *Le $\text{NO}_3^-$ réprime l'expression de la protéine NRT1.1 dans les PRLs et à l'apex de la racine primaire***

En premier lieu, nous avons voulu confirmer les résultats préalablement obtenus dans l'équipe sur la régulation de la protéine NRT1.1 dans les différents tissus de la racine (Bouguyon *et al.*, 2016). Pour cela, le profil d'expression de la protéine de fusion NRT1.1-GFP sous le contrôle de son promoteur endogène (*pNRT1.1::NRT1.1-GFP*) a été étudié à différents stades des PRLs, au niveau de l'épiderme/cortex de la racine primaire ainsi qu'au niveau de l'apex de la racine primaire. Chez des plantes cultivées sur 0 mM  $\text{NO}_3^-$ , la protéine NRT1.1-GFP est visible dans les PRLs dès les stades précoces (stade IV) du développement (Figure IV.2A). En revanche, le signal GFP des plantes cultivées sur 1mM  $\text{NO}_3^-$  reste absent des PRLs



**Figure IV.2 :** Effet du NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sur la localisation tissulaire de la protéine de fusion NRT1.1-GFP dans les primordia de racines latérales (PRLs) et dans la racine primaire.

Des plantes *pNRT1.1::NRT1.1-GFP/chl1-5* âgées de 10 jours ont été observées au microscope Confocal. **A.** Localisation de la protéine de fusion NRT1.1-GFP à différents stades de développement des PRLs (IV-V, VI, VIII et émergé (Em)) sur 0 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. **B.** Localisation de la protéine NRT1.1-GFP au niveau de l'épiderme/cortex et de la coiffe de la racine primaire de plantes cultivées sur 0 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Echelle **A** : 30 μm, échelle **B** : 45 μm.

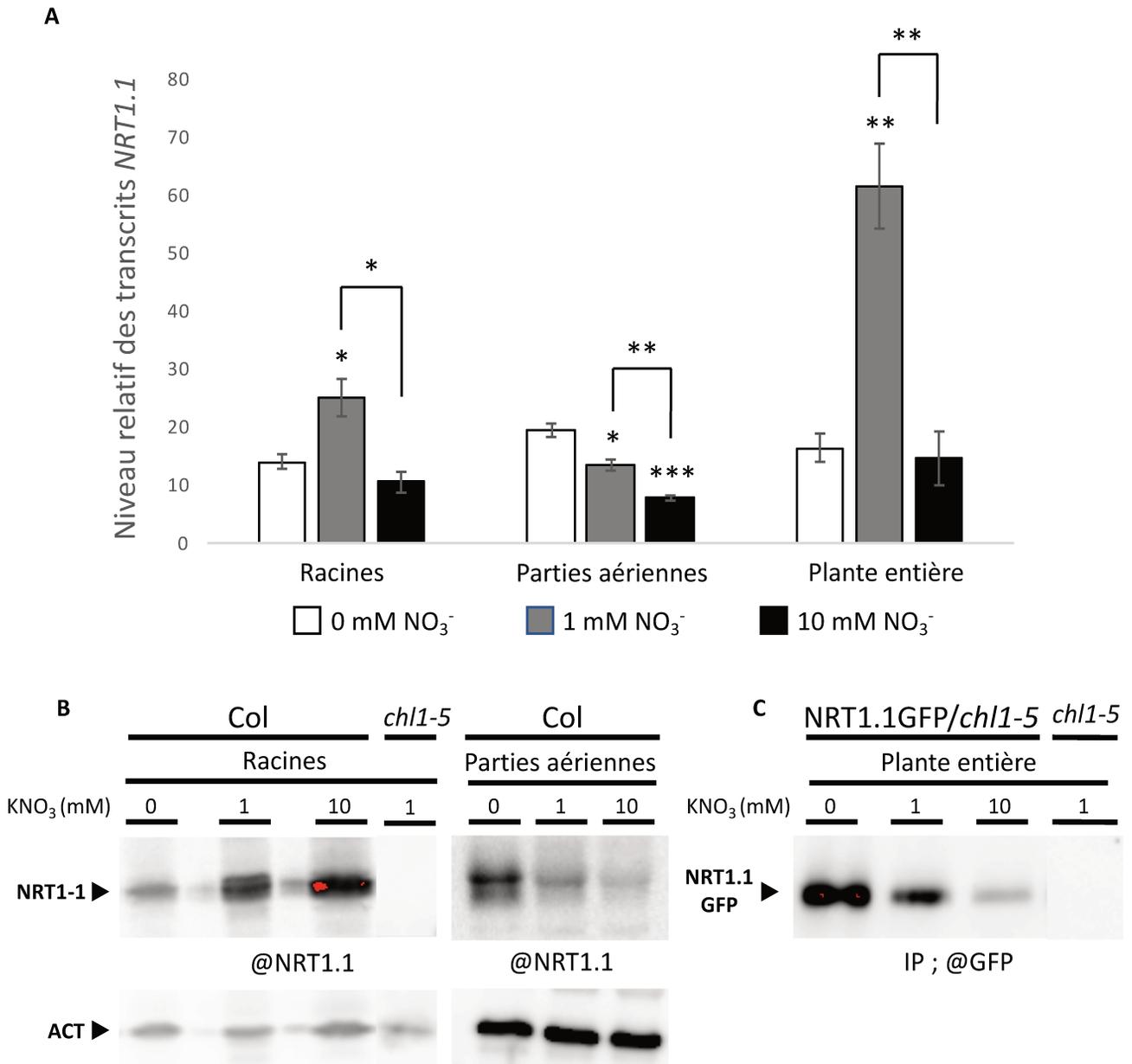
## Chapitre IV

et ne devient visible qu'au moment de leur émergence (Stade VIII et Em). Lorsque ce signal est visible, il apparaît localisé au niveau de la membrane plasmique des cellules épidermiques de la racine latérale. Ces observations confirment l'effet répresseur du  $\text{NO}_3^-$  sur NRT1.1 dans les PRLs. Cet effet répresseur est également observé au niveau de l'apex de la racine primaire, suggérant ainsi un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle similaire à celui observé dans les PRLs. En revanche, lorsque les plantes sont cultivées sur un milieu contenant 1mM  $\text{NO}_3^-$ , le signal GFP est plus intense au niveau de l'épiderme/cortex de la racine primaire en comparaison avec des plantes cultivées sur un milieu dépourvu de  $\text{NO}_3^-$  (Figure IV.2B). Ceci confirme l'effet stimulateur du  $\text{NO}_3^-$  sur la protéine NRT1.1 dans l'épiderme et le cortex, et donc l'effet différentiel du  $\text{NO}_3^-$  sur l'expression de cette protéine en fonction des tissus racinaires, tel que décrit précédemment (Bouguyon *et al.*, 2016).

### ***2) Effet du $\text{NO}_3^-$ sur l'expression du gène et de la protéine NRT1.1 native dans les racines et les parties aériennes***

Afin de confirmer la régulation post-transcriptionnelle de NRT1.1 par le  $\text{NO}_3^-$  dans les racines, et d'étendre l'étude de cette régulation à d'autres organes, l'accumulation des transcrits et celle de la protéine native ont été mesurées dans les racines et les parties aériennes de plantes sauvages Col-0 cultivées sur 0 mM, 1 mM ou 10 mM  $\text{NO}_3^-$ . Comme attendu, l'accumulation des ARNm de *NRT1.1* dans les racines est induite par le  $\text{NO}_3^-$  à moyenne concentration (1mM). Par contre, cette accumulation est réprimée sur fort  $\text{NO}_3^-$  (10 mM) (Figure IV.3A). De façon surprenante pour un gène jusque-là décrit comme inductible par le  $\text{NO}_3^-$  (Tsay *et al.*, 1993 ; Nacry *et al.*, 2013), l'analyse des transcrits de NRT1.1 dans les parties aériennes indique au contraire que la présence de  $\text{NO}_3^-$  dans le milieu inhibe l'expression de *NRT1.1* de manière concentration-dépendante (Figure IV.3A). Dans les échantillons de plantes entières, le profil d'expression correspond à celui observé dans les racines (Figure IV.3A), ce qui est en accord avec le fait que ces organes sont de loin le site préférentiel d'accumulation des transcrits NRT1.1 dans la plante (Tsay *et al.*, 1993).

Les analyses protéiques ont été réalisées à partir d'extraits de protéines totales issus des différentes parties de plantes Col-0 (immunoblots, Figure IV.3B) ou de la lignée transgénique pNRT1::*NRT1.1-GFP/chl1-5* (immunoprécipitation, Figure IV.3C) cultivées sur 0, 1 ou 10 mM de  $\text{NO}_3^-$  durant 12 jours. Une bande de taille d'environ 55 kDa, correspondant à la taille attendue de la protéine NRT1.1, est observée dans toutes les conditions testées (0, 1 et 10 mM



**Figure IV.3 :** Etude de l'expression du gène *NRT1.1* et de la protéine NRT1.1 en réponse au NO<sub>3</sub><sup>-</sup> dans différents organes de la plante.

Les plantes sauvages Col-0, les plantes mutantes *chl1-5* et les plantes transgéniques *pNRT1.1::NRT1.1-GFP/chl1-5* ont été cultivées sur milieu gélosé en boîtes de Pétri verticales sur 0, 1 ou 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> pendant 12 jours. **A.** Expression relative du gène *NRT1.1* dans les racines, les parties aériennes et dans la plante entière de plantes sauvages Col-0 analysée par RT-qPCR et normalisée par l'*UBIQUITINE*. Les données sont la moyenne ± SE de celles issues de deux répliques biologiques indépendants. Les valeurs p ont été analysées par le test statistique de T-Student et les différences entre les conditions sont statistiquement significatives à \*P<0,05, \*\*P<0,01 et \*\*\*P<0,001. **B.** Analyse par Western Blot de l'accumulation de la protéine NRT1.1 dans les protéines totales des racines et des parties aériennes, révélée à l'aide de l'anticorps anti-NRT1.1 (@NRT1.1). L'anticorps anti-ACTINE (@ACT) a été utilisé comme contrôle de charge. **C.** Western Blot de la protéine NRT1.1-GFP révélée par l'anticorps anti-GFP JL-8 Takara (@GFP) dans l'immunoprécipitat obtenu à partir d'extraits de protéines totales de plantes entières *pNRT1.1::NRT1.1-GFP/chl1-5*.

## Chapitre IV

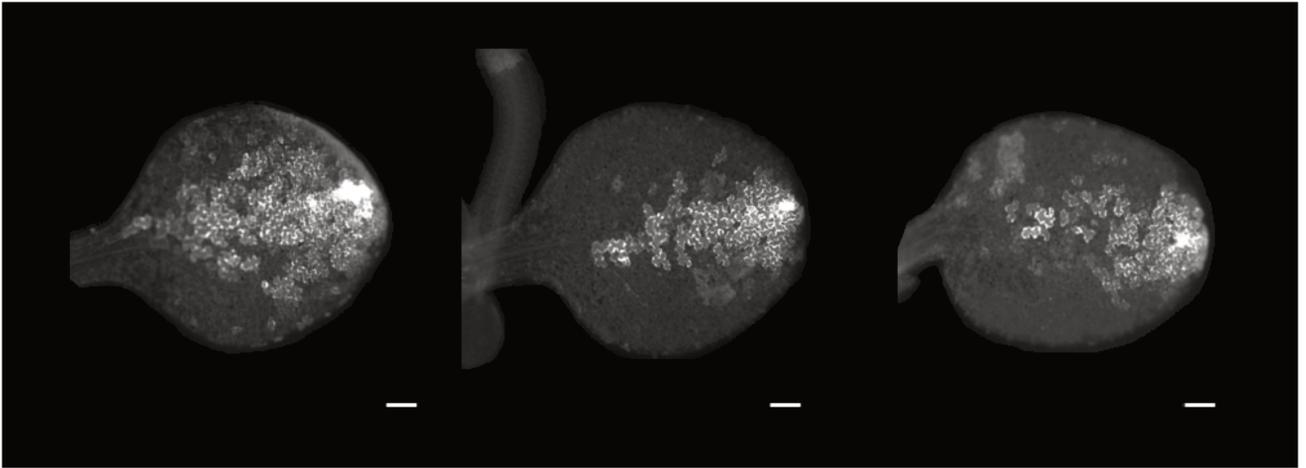
$\text{NO}_3^-$ ) chez les plantes sauvages, mais pas chez le mutant *chl1-5* (Figure IV.3B). Dans les racines, le  $\text{NO}_3^-$  stimule l'accumulation de la protéine NRT1.1 de manière très marquée. À l'inverse, dans les parties aériennes, l'accumulation de la protéine NRT1.1 est nettement plus importante chez les plantes cultivées sur 0 mM  $\text{NO}_3^-$  que chez celles cultivées sur 1 ou 10 mM  $\text{NO}_3^-$  (Figure IV.3B). Des résultats similaires ont été obtenus lors de l'analyse de l'immunoprécipitation à partir d'échantillons de protéines totales de plantes entières pNRT1.1::NRT1.1-GFP/*chl1-5* (Figure IV.3C). Bien qu'il soit difficile de tirer des conclusions quantitatives de Western Blots réalisés sur immunoprécipitat, une bande de taille approximative de 80 kDa correspondant à la protéine de fusion NRT1.1-GFP semble être présente en plus grande quantité lorsque les plantes ont été cultivées sur 0 mM  $\text{NO}_3^-$  par rapport à celles cultivées sur 1 ou 10 mM  $\text{NO}_3^-$  (Figure IV.3C). Cette similitude entre profils protéiques des parties aériennes et des plantes entières pourrait suggérer que, contrairement aux transcrits, la protéine NRT1.1 est nettement plus abondante dans les feuilles que dans les racines.

Si l'on compare les traitements 0 et 1 mM  $\text{NO}_3^-$ , on observe que l'expression de *NRT1.1* est induite par le  $\text{NO}_3^-$  dans les racines, alors qu'elle est à l'inverse réprimée dans les parties aériennes. De la même façon, l'accumulation de la protéine NRT1.1 est augmentée dans les racines alors qu'elle est diminuée dans les parties aériennes. Dans les deux organes, la réponse des transcrits est directement corrélée avec celle de la protéine, mais ces régulations semblent opposées entre racines et parties aériennes. L'effet stimulateur du  $\text{NO}_3^-$  sur l'accumulation de la protéine NRT1.1 mesurée dans les échantillons de racines entières correspond à ce qui a été observé par imagerie dans l'épiderme et le cortex (Figure IV.2), ce qui est cohérent avec le fait que ces tissus sont très largement majoritaires par rapport à ceux où le  $\text{NO}_3^-$  a un effet répressur (PRLs, apex de la racine primaire). Une observation intéressante est que dans les racines uniquement, les fortes concentrations en  $\text{NO}_3^-$  (10 mM) semblent supprimer la corrélation observée entre les régulations transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de NRT1.1, puisqu'en comparaison avec 1 mM  $\text{NO}_3^-$ , le niveau d'ARNm diminue alors que la protéine continue à s'accumuler davantage.

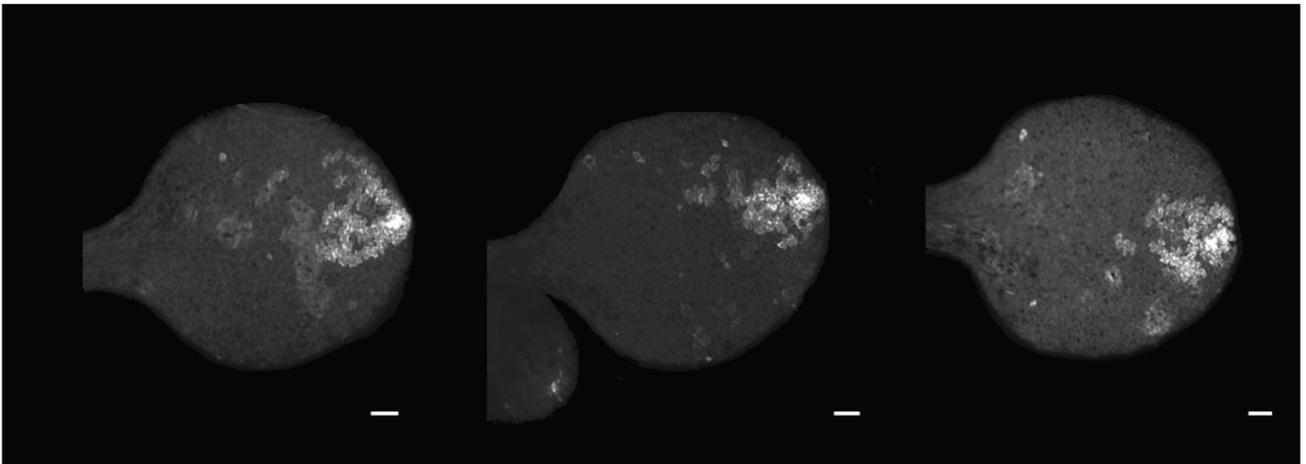
Les résultats obtenus sur les parties aériennes suggèrent que c'est la régulation post-transcriptionnelle négative exercée par le  $\text{NO}_3^-$  qui y est active, comme c'est le cas dans les PRLs et l'apex de la racine primaire. Néanmoins, il n'est à ce stade pas possible d'affirmer que la répression de la protéine NRT1.1 par le  $\text{NO}_3^-$  dans les parties aériennes soit due à une régulation post-transcriptionnelle, puisque le  $\text{NO}_3^-$  réprime également l'accumulation des



0 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

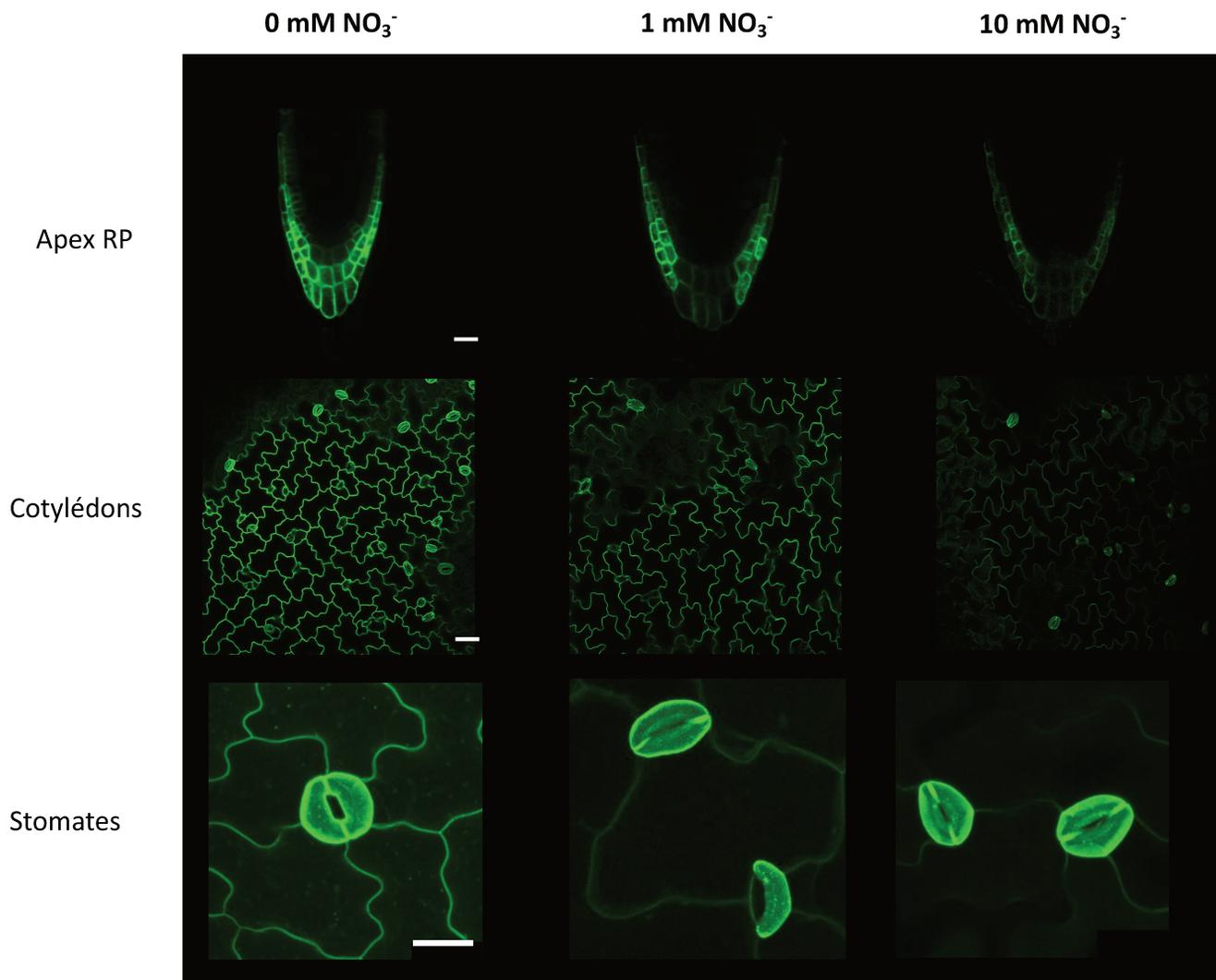


1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>



**Figure IV.4 : Effet du NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sur la localisation tissulaire de la protéine de fusion NRT1.1mCherry dans les cotylédons.**

Localisation de NRT1.1-mCherry des lignées transgéniques exprimant NRT1.1-mCherry sous le contrôle du promoteur inducible à la  $\beta$ -œstradiol. Les plantes *pEstradiol::NRT1.1\_mCherry/chl1-5* âgées de 10 jours, ont été cultivées sur un milieu contenant 0 ou 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, puis imbibées d'une solution 0 ou 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> supplémentée de 5  $\mu$ M  $\beta$ -œstradiol durant 24 h. Les plantes NRT1.1-mCherry ont été observées au microscope à épifluorescence. Les images présentées sont représentatives de 20 cotylédons de 10 plantes issues de deux expériences indépendantes. Echelle blanche : 160  $\mu$ m.



**Figure IV.5 : Expression de la protéine NRT1.1-GFP en réponse au NO<sub>3</sub><sup>-</sup> dans l'apex de la racine primaire, l'épiderme des cotylédons et les cellules de garde des stomates.**

L'apex de la racine primaire (RP) et les cotylédons des plantes *pNRT1.1::NRT1.1-GFP/chl1-5* âgées de 12 jours ont été observées au microscope Confocal après culture sur milieu 0, 1 ou 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Les plantes ont été cultivées sur milieu gélosé en boîtes de Pétri verticales. Les images présentées sont représentatives de 10 plantes issues de deux expériences indépendantes. Echelle blanche : 20 μm.

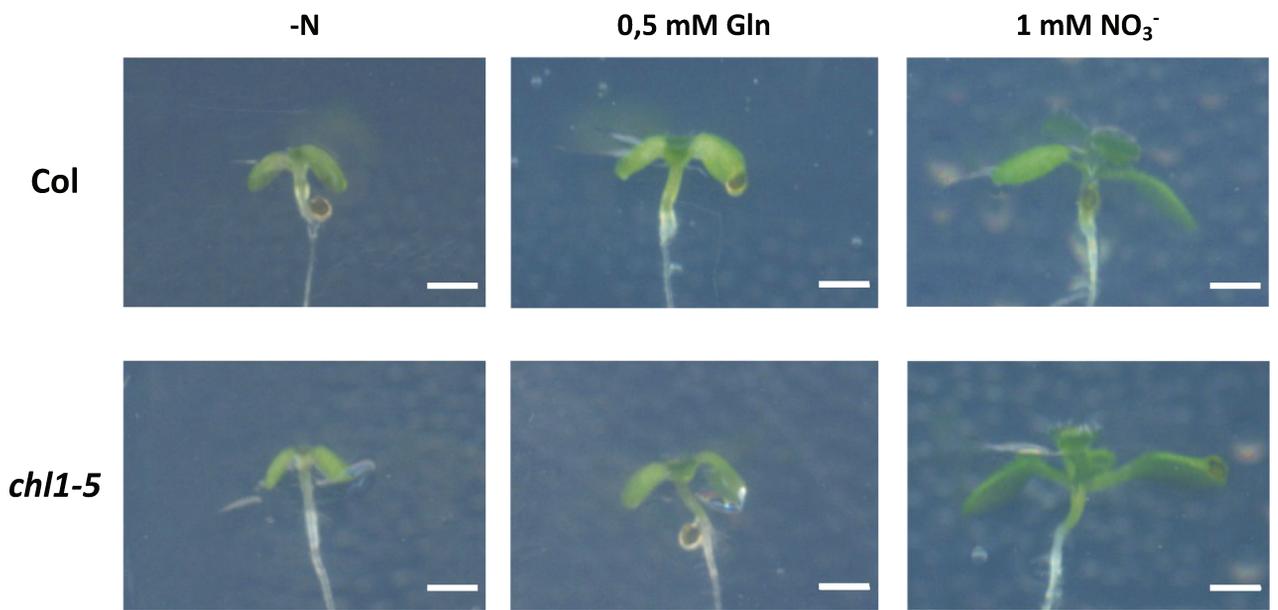
## Chapitre IV

transcrits. De plus, rien n'indique que la réponse de la protéine soit homogène dans tous les tissus des parties aériennes. Ces incertitudes ont donc motivé la poursuite du travail par une approche d'imagerie similaire à celle conduite sur les racines.

### **3) Régulation post-transcriptionnelle de *NRT1.1* dans les cotylédons en réponse au $\text{NO}_3^-$**

Pour déterminer l'existence d'une régulation post-transcriptionnelle négative de *NRT1.1* dans les parties aériennes, des observations par microscopie à épifluorescence ont été réalisées sur les cotylédons de la lignée transgénique exprimant *NRT1.1-mCherry* sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'œstradiol (*pEstradiol::NRT1.1-mCherry*) en présence ou non de  $\text{NO}_3^-$ . Cette construction génétique permet de s'affranchir de toute régulation transcriptionnelle par le  $\text{NO}_3^-$ . En absence de  $\text{NO}_3^-$ , le signal de fluorescence de la protéine de fusion *NRT1.1-mCherry* se visualise sur une surface plus grande que celle observée en présence de  $\text{NO}_3^-$  (Figure IV.4). Ceci démontre que, dans une partie au moins de la surface des cotylédons, l'expression de la protéine est éteinte au niveau post-transcriptionnel par la fourniture de  $\text{NO}_3^-$ . De plus, les résultats obtenus avec la protéine de fusion *NRT1.1-GFP* confirment la répression de son expression par le  $\text{NO}_3^-$  dans l'épiderme des cotylédons, comme c'est le cas à l'apex de la racine primaire, pris comme témoin positif (Figure IV.5). Cependant, ces observations révèlent également un signal GFP intense dans les cellules de garde des stomates, qui ne semble pas affecté par le  $\text{NO}_3^-$  (Figure IV.5). L'ensemble de ces résultats confirme que le  $\text{NO}_3^-$  a bien des effets distincts sur la protéine *NRT1.1* en fonction des tissus considérés : (i) effet inhibiteur dans l'épiderme des cotylédons, les PRLs et l'apex de la racine primaire, (ii) effet stimulateur dans l'épiderme et le cortex racinaires, et (iii) sans effet dans les stomates.

À ce stade du travail, deux modèles d'étude intéressants émergeaient donc : l'épiderme et le cortex racinaires d'une part, et l'épiderme des cotylédons d'autre part. Dans les deux cas, les résultats obtenus avec la lignée *pEstradiol::NRT1.1-mCherry* confirment une action du  $\text{NO}_3^-$  au niveau post-transcriptionnel sur *NRT1.1*, qui toutefois allait dans le même sens que la régulation de l'expression du gène, en amplifiant sans doute les effets : stimulateur dans le cas de l'épiderme/cortex racinaires, et répresseur dans le cas de l'épiderme des cotylédons. La suite du travail prévoyait d'étudier en parallèle ces deux modèles, car il est possible que ces effets opposés du  $\text{NO}_3^-$  fassent appel à des mécanismes totalement différents. Cependant, deux types de difficultés nous ont poussé à abandonner le modèle cotylédons. Premièrement, la fonction



**Figure IV.6 : Phénotype aérien du mutant *chl1-5* en comparaison à une plante sauvage Col.**

Images représentatives des parties aériennes de plantes Col ou mutantes *chl1-5* âgées de 12 jours et cultivées sur milieu dépourvu de N (panneaux de gauche), 0,5 mM Gln (panneaux du milieu) ou 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (panneaux de droite). Echelle : 0,5 cm.

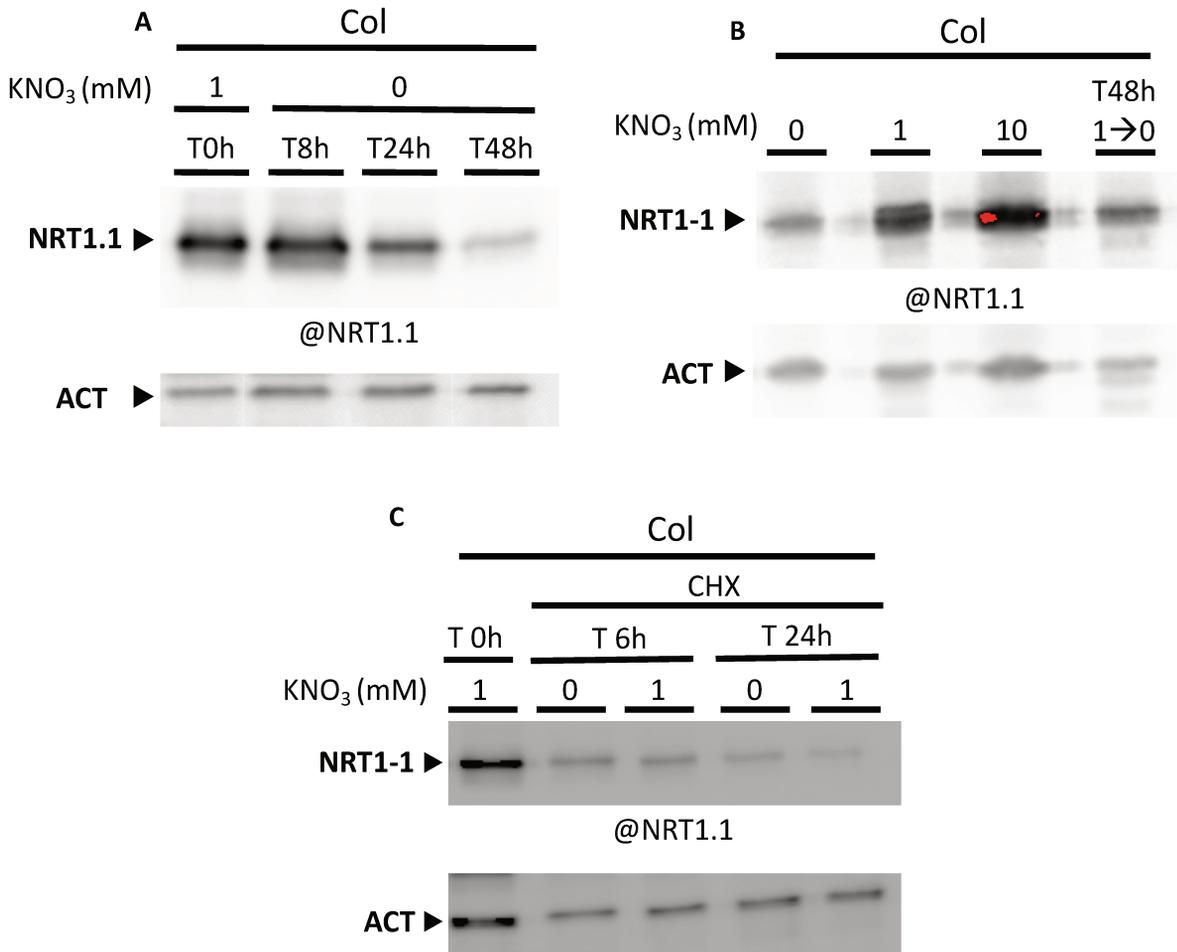
## Chapitre IV

physiologique de NRT1.1 dans les parties aériennes est encore mal connue, hormis la situation de toxicité ammoniacale (Hachiya *et al.*, 2011), non pertinente ici. De plus, les observations visuelles des mutants *chl1* réalisées pour les expériences du chapitre précédent (voir Maghiaoui *et al.*, 2020a) n'ont pas révélé de phénotype apparent dans les parties aériennes (Figure IV.6), suggérant que contrairement au cas des racines latérales, NRT1.1 ne semble pas être un régulateur majeur de la croissance foliaire dans nos conditions. Approfondir l'étude des mécanismes de régulation d'une fonction mal caractérisée présentait donc un risque de ne pas être capable de préciser le rôle biologique de cette régulation. Deuxièmement, comme décrit plus bas, une approche pharmacologique a été mise en œuvre pour identifier les mécanismes de la régulation post-transcriptionnelle de NRT1.1, en caractérisant la dynamique du trafic subcellulaire de la protéine (endocytose, recyclage entre la membrane plasmique et réseau TGN/EE, dégradation à la vacuole). Or, contrairement aux racines, nous nous sommes heurtés à des difficultés méthodologiques avec les cotylédons, chez qui il est apparemment très difficile de faire pénétrer les drogues nécessaires. En conséquence, la suite du travail de la thèse s'est logiquement recentrée sur les racines et l'effet stimulateur du  $\text{NO}_3^-$  sur la protéine NRT1.1.

### **4) Dynamique de la protéine NRT1.1 en réponse à une carence en $\text{NO}_3^-$**

Afin d'approfondir l'étude de la régulation post-transcriptionnelle affectant la quantité de protéine NRT1.1 dans la racine, des expériences ont été réalisées pour soumettre les plantes à une carence en  $\text{NO}_3^-$  après une période de nutrition normale. Si l'on considère les résultats obtenus sur des échantillons de systèmes racinaires entiers récoltés sur des plantes en régime nutritif stationnaire, le  $\text{NO}_3^-$  induit l'expression du gène ainsi que celle de la protéine NRT1.1 (Figures IV.3A et IV.3B). Cette régulation de la protéine NRT1.1 reflète essentiellement celle qui est observée dans l'épiderme et le cortex de la racine (Figure IV.2B). Il n'est donc pas déraisonnable de penser qu'un retrait de  $\text{NO}_3^-$  conduise de manière dynamique à une diminution de la quantité de protéine NRT1.1 dans les racines, comme cela a été démontré pour les transcrits (Lejay *et al.*, 1999).

Pour tester l'effet d'un retrait de  $\text{NO}_3^-$  sur l'accumulation de NRT1.1 à la membrane, la protéine a été révélée dans les fractions microsomales de plantes Col-0 cultivées sur milieu 1mM  $\text{NO}_3^-$  durant 5 semaines, puis transférées sur un milieu dépourvu de  $\text{NO}_3^-$  pendant 8h, 24h et 48h (Figure IV.7A). Les analyses montrent une diminution de l'accumulation de NRT1.1 à la membrane 24h après le retrait du  $\text{NO}_3^-$  dans le milieu. Cette diminution est largement



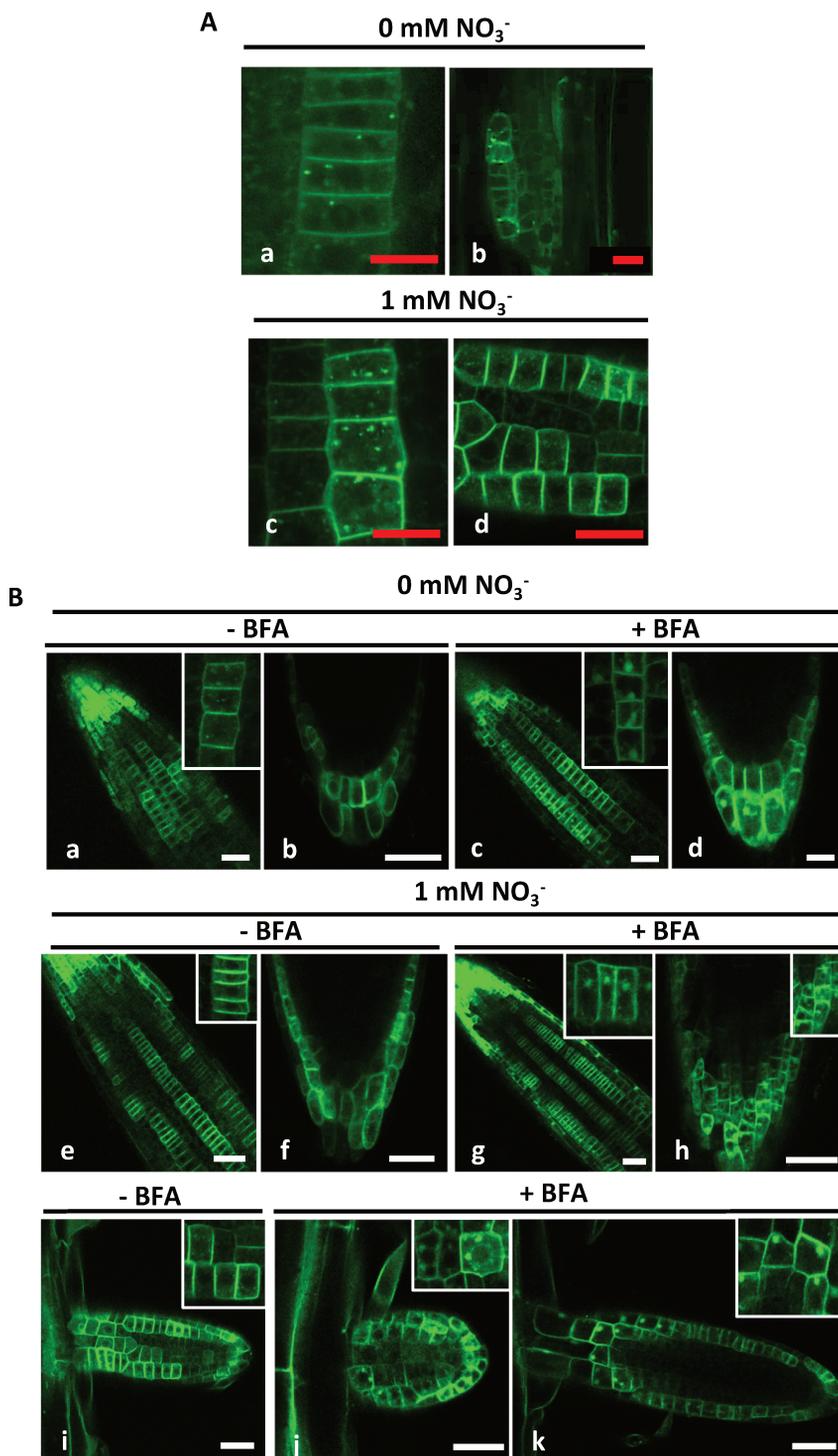
**Figure IV.7 : Analyse de l'expression de la protéine NRT1.1 en réponse au NO<sub>3</sub><sup>-</sup> dans les racines.**

**A.** Analyse en Western Blot de NRT1.1 dans les fractions microsomales issues de racines de plantes sauvages cultivées sur 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en milieu hydroponique durant 5 semaines puis transférées sur milieu 0 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> durant 8h, 24h et 48h. La protéine NRT1.1 a été détectée avec l'anticorps commercial dirigé contre NRT1.1 (@NRT1.1). L'anticorps anti-ACTINE (@ACT) a été utilisé comme contrôle de charge. **B.** Analyse en Western Blot de NRT1.1 dans les protéines totales issues de racines de plantes sauvages cultivées pendant 12 jours sur milieu gélosé en boîtes de Pétri verticales, soit en permanence sur 0, 1 ou 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> pendant 12 jours, soit transférées sur un milieu 0 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> durant 48h après culture sur 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. **C.** Analyse en Western Blot de NRT1.1 dans les fractions microsomales de racines de plantes sauvages cultivées durant 5 semaines sur milieu hydroponique contenant 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, puis transférées ou non sur milieu 0 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en présence de Cycloheximide (CHX ; 100 µM) durant 6h ou 24h.

## Chapitre IV

accentuée au bout de 48h de carence (Figure IV.7A). Ce résultat, attendu, soulève néanmoins plusieurs questions. La diminution de la quantité de protéine NRT1.1 à la membrane est-elle due : (i) à une diminution de la traduction des transcrits ou de l'adressage de la protéine à la membrane, ou (ii) à une stimulation du recyclage de la protéine de la membrane vers d'autres compartiments intracellulaires et de sa dégradation, ou (iii) au deux ?

Pour apporter un premier élément de réponse, des analyses par western blot ont été effectuées sur des extraits de protéines totales de racines. Les résultats confirment la diminution de la quantité de protéine NRT1.1 observée dans les fractions microsomales (Figure IV.7B). Ainsi, la protéine NRT1.1 subit bien une diminution drastique de son abondance dans les racines en réponse en une carence en  $\text{NO}_3^-$ . Cependant, ces résultats ne permettent pas de déterminer si cette réponse est due à l'inhibition de la synthèse de cette protéine et/ou la stimulation de sa dégradation. Pour tester ces hypothèses, nous avons réitéré nos expériences de réponse à la carence en traitant les plantes avec de la cycloheximide (CHX) au moment du transfert sur milieu dépourvu de  $\text{NO}_3^-$ . L'utilisation de cette molécule permet d'inhiber la néosynthèse protéique, et ainsi de caractériser spécifiquement le devenir de la protéine NRT1.1 déjà présente à la membrane plasmique. Chez les plantes carencées en  $\text{NO}_3^-$  en présence de CHX, les western blots réalisés à partir des fractions microsomales montrent une baisse de la quantité de protéine NRT1.1 dès 6 h après le début du traitement (Figure IV.7C), ce qui est nettement plus précoce que chez les plantes non traitées à la CHX (Figure IV.7A). Ce résultat indique un retrait rapide de NRT1.1 de la membrane, probablement suivi d'une dégradation. Cependant, cette disparition de la protéine NRT1.1 n'est pas due au traitement de carence, puisqu'elle s'observe également chez les plantes témoin maintenues sur 1 mM  $\text{NO}_3^-$  (Figure IV.7C). Puisque ces données concernent la protéine préalablement intégrée aux membranes, l'ensemble de ces résultats suggère donc que la régulation post-traductionnelle de la protéine NRT1.1 déjà présente est indépendante des conditions externes en  $\text{NO}_3^-$ , et que la diminution de la quantité de NRT1.1 en réponse à la carence en  $\text{NO}_3^-$  s'explique plutôt par une diminution de la néosynthèse de la protéine. Cette interprétation reste toutefois sujette à caution. En effet, la CHX est un inhibiteur général de la synthèse protéique, et il est possible que l'absence apparente d'effet du  $\text{NO}_3^-$  sur la disparition de NRT1.1 des fractions microsomales soit due au blocage de la synthèse d'une protéine régulatrice qui pourrait justement contrôler le devenir de NRT1.1 lors d'une carence en  $\text{NO}_3^-$ .



**Figure IV.8 :** Effet du NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sur la dynamique de la protéine NRT1.1 entre la membrane plasmique et le TGN/EE dans les racines de plantes *pNRT1.1::NRT1.1-GFP/ch11-5*.

**A.** Localisation de NRT1.1-GFP dans les plantes cultivées pendant 10 jours sur 0 mM ou 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> : racine primaire (**a et c**) ; racines latérales émergées (**b et d**). **B.** Localisation de NRT1.1-GFP dans les plantes cultivées sur milieu 0 mM ou 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> durant 10 jours puis traitées ou non avec BFA (5 μM, 1h) : épiderme/cortex et coiffe de la racine primaire sur 0 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (**a-d**) et sur 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (**e-h**) ; racines latérales émergées sur 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (**i-k**). Echelle rouge : 30 μm, échelle blanche : 45 μm.

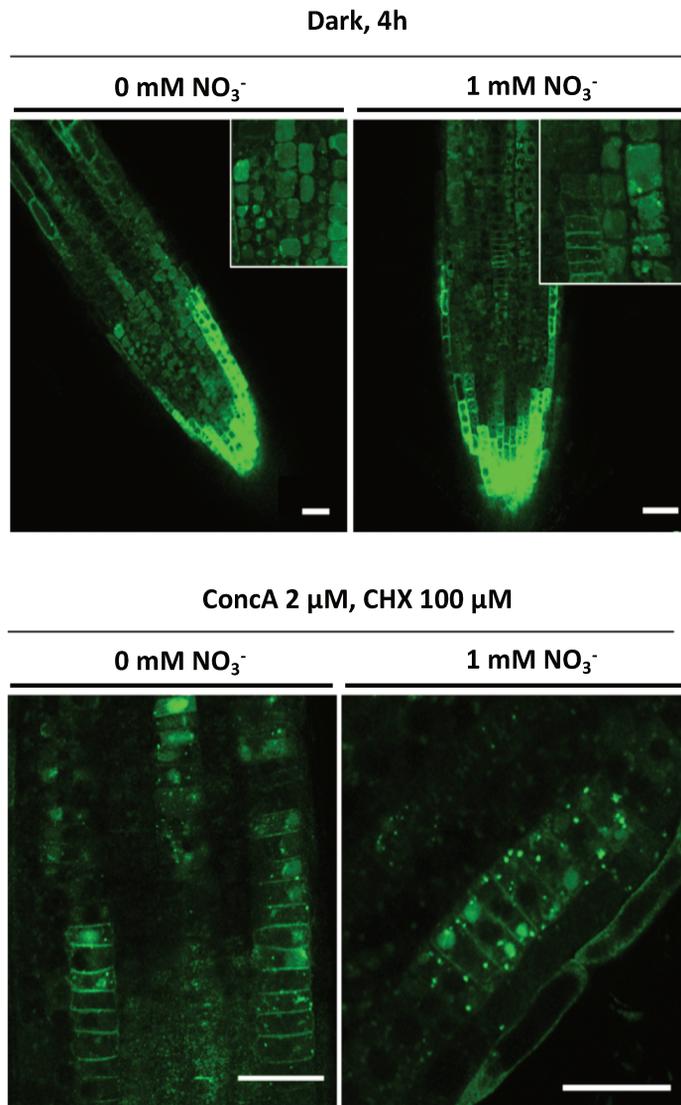
## Chapitre IV

### 5) *Dynamique intracellulaire de NRT1.1 en réponse au NO<sub>3</sub><sup>-</sup>*

Afin de confirmer les résultats précédents, le trafic intracellulaire de la protéine NRT1.1 a été étudié en fonction des conditions d'alimentation en NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, en couplant une approche pharmacologique à des observations microscopiques. Dans les cellules épidermiques et corticales de la racine primaire et des racines latérales émergées, la protéine de fusion NRT1.1-GFP est essentiellement localisée au niveau de la membrane plasmique, mais se retrouve aussi à l'intérieur de petites vésicules intracellulaires (Figure IV.8A). Si le signal GFP est plus fort en présence qu'en l'absence de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, cette distribution intracellulaire de NRT1.1 ne semble pas affectée de manière significative par les conditions de disponibilité en NO<sub>3</sub><sup>-</sup> externe (Figure IV.8A). Dans l'objectif d'identifier la nature des vésicules intracellulaires contenant la protéine de fusion NRT1.1-GFP, un traitement en temps court (1 h) à la toxine fongique BFA a été réalisé. Dans l'épiderme et la coiffe de la racine primaire ainsi que dans l'épiderme des jeunes racines latérales émergées, le traitement BFA aboutit à une accumulation de la protéine de fusion NRT1.1-GFP dans de larges compartiments, classiquement dénommés « grands corps BFA ou compartiments BFA » (Figure IV.8B). A nouveau, aucune différence majeure n'est observée entre les plantes alimentées avec ou sans NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figure IV.8B). Les compartiments BFA résultent de la fusion de nombreux endosomes précoces, et la présence du signal GFP dans ces compartiments est habituellement interprétée comme le reflet d'un recyclage continu de la protéine-fusion entre la membrane plasmique et le réseau TGN/EE. Ces observations indiquent donc que NRT1.1 semble soumise à un recyclage rapide entre le réseau TGN/EE et la membrane plasmique, qui semble indépendant de l'alimentation en NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

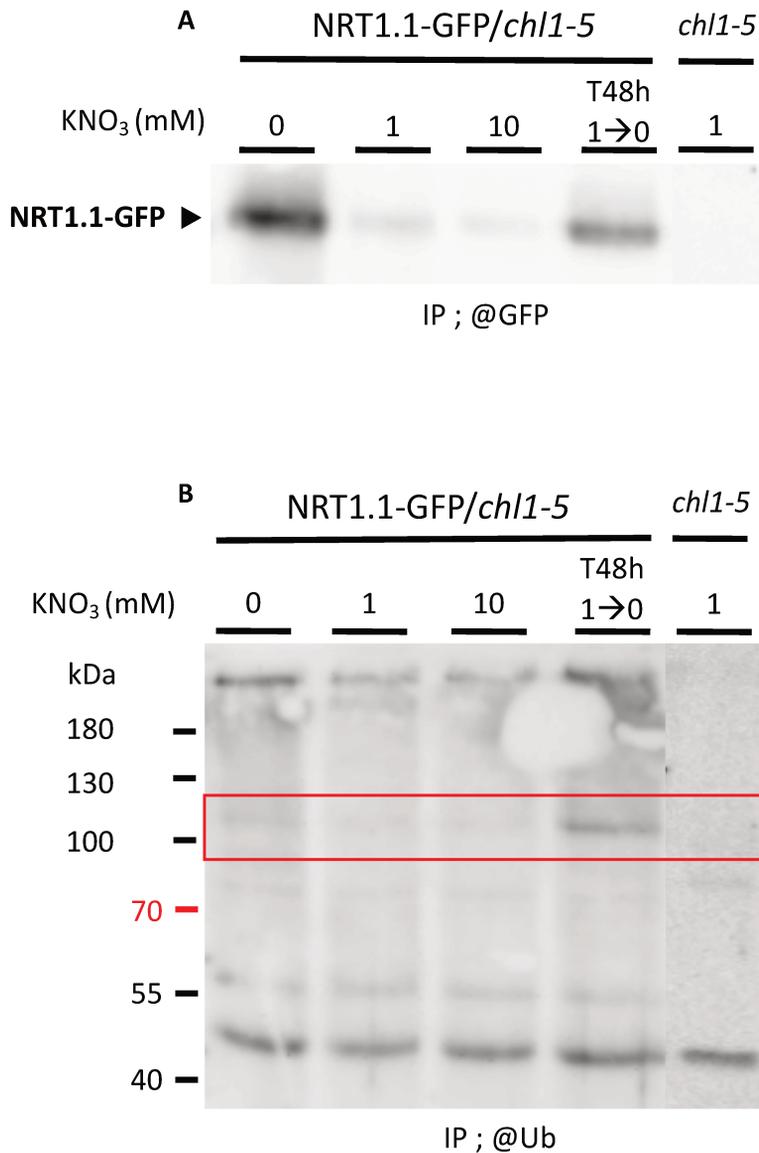
Par ailleurs, et afin de déterminer si la protéine de fusion NRT1.1-GFP est dégradée à la vacuole, un inhibiteur de la v-ATPase, la ConcA, a été utilisé en présence de CHX. En parallèle, des plantes ont été transférées dans des conditions d'obscurité qui permettent aussi une inhibition de l'activité lytique de la vacuole. L'effet d'un traitement à la ConcA (2 μM) et à la CHX (100 μM) durant 1h, ou du transfert à l'obscurité pendant 4h, a été testé sur des plantes entières âgées de 10 jours et cultivées sur 0 ou 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, puis l'épiderme et le cortex des racines primaires ont été observés au microscope confocal. Les deux traitements (ConcA+CHX ou obscurité) provoquent une accumulation rapide du signal GFP à l'intérieur de larges compartiments qui, visualisés en lumière blanche, correspondent à des vacuoles (Figure IV.9). Cette accumulation du signal GFP au sein de la vacuole s'observe de manière indifférenciée





**Figure IV.9 : Visualisation de la dégradation de la protéine NRT1.1 médiée par la vacuole.**

Les observations microscopiques de l'épiderme et du cortex de la racine primaire ont été réalisées sur plantes *pNRT1.1::NRT1.1-GFP/chl1-5* de 10 jours, cultivées sur 0 mM ou 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et traitées à la Concanamycine (ConcA ; 2 μM) et à la Cycloheximide (CHX ; 100 μM) durant 1h ou à l'obscurité (dark) durant 4h. Echelle blanche : 30 μm.



**Figure IV.10 : Profil d'ubiquitination de la protéine NRT1.1 en réponse au NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.**

Les analyses d'immunoprécipitation de la protéine NRT1.1 ont été réalisées sur des extraits de protéines totales de plantes entières *pNRT1.1::NRT1.1-GFP/chl1-5* soit cultivées en permanence pendant 12 jours sur 0 mM, 1 mM ou 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, soit transférées sur milieu sans NO<sub>3</sub><sup>-</sup> pendant 48h après culture sur 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. **A.** Analyse par Western Blot de NRT1.1-GFP avec l'anticorps anti-GFP JL-8 Takara (Myltenyi Biotech μMACS GFP Tagged Protein Isolation ; @GFP). **B.** Visualisation de formes potentiellement ubiquitinées de NRT1.1-GFP à l'aide d'anticorps anti-Ubiquitination P4D1 (@Ub).

## Chapitre IV

chez les plantes cultivées sur 0 ou 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figure IV.9). Ainsi, l'ensemble des résultats présentés dans les Figures IV.8 et IV.9 suggère plutôt que la protéine NRT1.1 présente dans la membrane plasmique est soumise à un turn-over rapide, provoqué d'une part par son recyclage dans le réseau TGN/EE, et d'autre part par son adressage à la vacuole pour sa dégradation. Dans les deux cas, il ne semble pas que l'absence du NO<sub>3</sub><sup>-</sup> dans le milieu extérieur entraîne une accélération de ce turn-over, qui pourrait expliquer la disparition de la protéine des racines carencées en NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Cependant, les analyses effectuées sont d'ordre qualitatif et non quantitatif. Elles ne nous permettent donc pas de conclure de manière définitive sur l'absence d'effet du NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sur les mécanismes du turn-over de NRT1.1.

### **6) La dégradation de la protéine NRT1.1 pourrait mettre en jeu son ubiquitination**

Chez les plantes, il existe deux systèmes de dégradation des protéines membranaires : une autophagie dite sélective effectuée par la vacuole et une protéolyse ciblée par le protéasome 26. Dans les deux cas, l'ubiquitination de la protéine est une modification post-traductionnelle associée à l'activation des mécanismes de dégradation. Pour révéler l'existence potentielle de formes ubiquitinées de NRT1.1, des échantillons de protéines totales de plantes entières pNRT1.1::NRT1.1-GFP/*chl1-5* cultivées en continu sur milieu 0, 1 ou 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, ou transférées sur milieu dépourvu de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> durant 48h après culture sur 1 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, ont subi une immunoprécipitation avant Western blot sur l'immunoprécipitat. La membrane révélée avec l'anticorps anti-GFP montre la présence de la protéine fusion NRT1.1-GFP à environ 80 kDa (Figure IV.10A). Cette protéine est essentiellement détectable dans les échantillons issus des plantes entières cultivées en l'absence de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou transférées pendant 48 h sur milieu dépourvu de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Ce patron est cohérent avec les résultats obtenus précédemment sur plantes entières (Figure IV.3C), et illustre la réponse au NO<sub>3</sub><sup>-</sup> observée dans les parties aériennes (Figure IV.3B). Le traitement de la même membrane avec l'anticorps anti-polyUbiquitination (qui possède la particularité de reconnaître des formes mono- ainsi que poly-ubiquitinées) fait apparaître une bande de poids moléculaire proche de 110 kDa, absente de l'échantillon du témoin négatif (mutant *chl1-5*), et qui pourrait donc correspondre à une forme ubiquitinée de NRT1.1-GFP avec 4 motifs d'ubiquitine (Figure IV.10B). Cette bande apparaît plus intense pour les plantes cultivées en l'absence de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, ou transférées pendant 48 h sur milieu sans NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, ce qui est corrélé aux variations d'intensité observées pour la protéine NRT1.1-GFP elle-même (Figure IV.10A). Ces résultats, encore très préliminaires, suggèrent donc que NRT1.1



## Chapitre IV

pourrait être ubiquitinée, mais que la proportion de protéine ubiquitinée par rapport à la protéine totale ne semble pas dépendre des conditions d'alimentation en  $\text{NO}_3^-$  de la plante. Ceci serait donc cohérent avec les observations précédentes, suggérant que le  $\text{NO}_3^-$  n'affecte pas la dégradation de NRT1.1 (Figures IV.7C et IV.9).

### III. Discussion

#### 1) Régulation post-transcriptionnelle de NRT1.1 dans les parties aériennes

Un de nos objectifs dans ce travail de thèse a été d'obtenir des informations sur la fonction potentielle de NRT1.1 dans d'autres tissus que ceux précédemment étudiés dans les racines. Nous avons pour cela étudié la régulation post-transcriptionnelle de NRT1.1 en réponse au  $\text{NO}_3^-$  dans les parties aériennes : nos résultats montrent que c'est la régulation négative qui est principalement active dans les parties aériennes, de la même manière que dans les PRLs et l'apex de la racine primaire. Cependant, ces résultats indiquent également que dans les parties aériennes, cet effet négatif du  $\text{NO}_3^-$  se retrouve aussi sur l'accumulation des transcrits de NRT1.1, à la différence des racines où l'expression de NRT1.1 ne semble pénalisée que pour des concentrations élevées en  $\text{NO}_3^-$ . D'autres études ont montré que *NRT1.1* est fortement exprimé dans de nombreux organes aériens tels que les graines, les jeunes feuilles, les bourgeons floraux, les sépales et à l'extrémité des cotylédons (Guo *et al.*, 2001 ; Guo *et al.*, 2002). Dans ces organes, l'auxine active rapidement la transcription de *NRT1.1*, démontrant que l'auxine est aussi un signal essentiel pour réguler l'expression de *NRT1.1* (Guo *et al.*, 2002). Malgré une forte présence dans ces organes, la fonction précise de NRT1.1 ainsi que les mécanismes moléculaires sous-jacents à la régulation de son expression ne sont pas élucidés. Cependant, l'ensemble des données évoquées ci-dessus plaide plutôt pour une fonction de NRT1.1 associée à la régulation du développement, potentiellement en tant que transporteur d'auxine, comme c'est le cas dans les PRLs. Cependant, et contrairement aux racines, aucun phénotype apparent de développement n'a été identifié dans les parties aériennes du mutant *chl1-5*. Une hypothèse envisageable serait que NRT1.1 joue un rôle important dans les premiers stades de développement des jeunes organes aériens (Guo *et al.*, 2001), comme c'est aussi le cas dans les PRLs. Cet effet initial pourrait s'estomper par la suite, ce qui rendrait difficile la mise en évidence de phénotypes si on se limite à l'examen d'organes suffisamment développés, comme nous l'avons fait pour les cotylédons. A terme, il serait donc intéressant d'étudier les phases initiales de développement des jeunes feuilles, et de caractériser le profil d'accumulation



## Chapitre IV

d'auxine dans les cotylédons ainsi que dans les jeunes feuilles en utilisant des lignées exprimant la construction *DR5::GFP* ou *DR5::GUS* dans un fond WT ou *chl1-5* en présence ou absence de  $\text{NO}_3^-$ .

Nous avons aussi étudié la localisation tissulaire de NRT1.1 dans les parties aériennes, en utilisant la lignée transgénique NRT1.1::mCherry sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'œstradiol en présence ou non de  $\text{NO}_3^-$ . Cette construction génétique nous permettant de nous affranchir de la régulation transcriptionnelle par le  $\text{NO}_3^-$ , nous avons pu montrer que le  $\text{NO}_3^-$  agit bien aussi au niveau post-transcriptionnel, et a un effet répresseur sur la protéine NRT1.1 au niveau de l'épiderme des cotylédons (comme au niveau des PRLs et de l'apex de la RP). Dans la continuité de cette analyse, nous souhaitons quantifier le signal *DR5::GFP* ou *DR5::GUS* dans ce tissu afin de compléter nos résultats. De même l'étude de la dynamique du trafic de NRT1.1 au niveau des parties aériennes serait très intéressante et nous permettrait de préciser les mécanismes de régulation de NRT1.1 dans les cotylédons.

Dans le passé, une étude similaire a été réalisée pour mettre en évidence la dynamique du trafic cellulaire d'un récepteur membranaire, FLS2 (Flagellin Sensing 2) dans les feuilles. L'application de BFA ainsi qu'un traitement à la ConcA montrent que les récepteurs FLS2 sont ciblés par les endosomes tardifs (LE)/MVB avant d'être dégradés à la vacuole (Beck *et al.*, 2012 ; Robatzek *et al.*, 2006). Nos premières tentatives d'études de dynamique du trafic cellulaire de NRT1.1 dans les cotylédons n'ont pas été concluantes mais elles méritent sans aucun doute une amélioration des protocoles de pénétration de différents traitements pharmacologiques dans les parties aériennes.

### **2) Régulation post-transcriptionnelle de NRT1.1 dans les racines**

Lorsque l'on s'intéresse au système racinaire entier (où les tissus épidermiques et corticaux prédominent largement par rapport aux PRLs), le  $\text{NO}_3^-$  induit l'expression du gène ainsi que de la protéine NRT1.1. Pour pouvoir étudier, au niveau des systèmes racinaires entiers, l'existence d'une régulation post-translationnelle par le  $\text{NO}_3^-$  affectant la quantité de protéine NRT1.1, nous sommes partis du postulat qu'un retrait de  $\text{NO}_3^-$  conduit à une diminution dynamique de la quantité de protéine NRT1.1 à la membrane plasmique. Nos analyses par western blot sur des plantes traitées au CHX suggèrent que la diminution de la quantité de protéine NRT1.1 au



## Chapitre IV

niveau de la membrane plasmique en situation de carence en  $\text{NO}_3^-$  est essentiellement due à une diminution de néosynthèse de la protéine NRT1.1, et pas à l'augmentation de sa dégradation.

Notre étude du trafic intracellulaire de la protéine de fusion NRT1.1-GFP révèle bien l'existence d'une régulation post-traductionnelle de la protéine au niveau de la membrane plasmique (dynamique de la protéine NRT1.1-GFP de la membrane à la vacuole), mais celle-ci semble indépendante des conditions externes en  $\text{NO}_3^-$ , et pourrait refléter un mécanisme de turn-over plus ou moins constitutif de la protéine. Néanmoins, nos expériences sur le trafic intracellulaire de NRT1.1 devront être poursuivies en quantifiant le plus précisément possible l'accumulation de la protéine NRT1.1-GFP en fonction des conditions externes en  $\text{NO}_3^-$ .

Une étude récente a également étudié le trafic intracellulaire de NRT1.1 mais en prenant en compte les différentes formes phosphorylées de NRT1.1, NRT1.1<sup>T101A</sup> (mutant non phosphorylable) et NRT1.1<sup>T101D</sup> (mutant phosphomimétique) au niveau des PRLs (Zhang *et al.*, 2019). Les résultats de cette étude montrent que les protéines NRT1.1<sup>T101A</sup> sont soumises à une endocytose significativement plus importante que les protéines NRT1.1<sup>T101D</sup>. Dans nos expériences, le fait que nous ayons utilisé la protéine NRT1.1-GFP sans distinguer la forme phosphorylée de la forme non phosphorylée pourrait expliquer les raisons pour lesquelles nous n'observons pas de différence de dynamique de la protéine en réponse au  $\text{NO}_3^-$ . Un mécanisme similaire a été mis en évidence pour le transporteur IRT1, pour lequel il a été démontré qu'il est dégradé de manière constitutive à la vacuole quelle que soit la condition en fer, mais que sa dégradation à la vacuole est régulée d'autres types de substrats (Zinc, Manganèse ou Cobalt) (Barberon *et al.*, 2014 ; Barberon *et al.*, 2011). Des études similaires seront donc intéressantes à tester avec différents substrats du transporteur NRT1.1 et en particulier avec l'auxine.

Une analyse protéomique menée au sein de notre laboratoire (V. Santoni ; communication personnelle) ainsi que l'utilisation de sites de prédiction suggèrent que la protéine NRT1.1 possède au moins six lysines potentiellement ubiquitinables. Ces modifications post-traductionnelles étant connues pour agir comme des étiquettes d'adressage à la vacuole ou au protéasome, nous avons voulu déterminer si le trafic intracellulaire de la protéine NRT1.1 de la membrane plasmique à la vacuole est médié par une ubiquitination de la protéine. Nos résultats de biochimie encore très préliminaires suggèrent que la protéine NRT1.1 pourrait être ubiquitinée, mais que cette ubiquitination ne semble pas dépendre des conditions externes en  $\text{NO}_3^-$ . Il serait intéressant également dans de futures analyses de faire la distinction entre les



## Chapitre IV

formes phosphorylée ou non phosphorylée de NRT1.1. En effet, de nombreuses études montrent que l'ubiquitination et la phosphorylation peuvent souvent être requises de manière concomitante pour permettre une dégradation ciblée à la vacuole (Otegui *et al.*, 2011). Pour compléter ces études, nous avons également initié différentes constructions génétiques contenant des versions mutées sur les lysines ubiquitinables de NRT1.1. Ces versions mutées de NRT1.1 seront fusionnées à la mCitrine et nous permettront de réitérer nos expériences de trafic cellulaire en regardant l'impact de l'ubiquitination de la protéine NRT1.1 sur ces mécanismes.



# CHAPITRE V :

## **Conclusion générale et perspectives**



## Chapitre V

Mon travail de thèse a porté sur l'étude du rôle de la protéine NRT1.1 dans la régulation du développement racinaire chez *Arabidopsis thaliana*. Ce travail s'est articulé autour de deux axes majeurs. D'une part, mon premier objectif a été de déterminer si l'activité de transport d'auxine par NRT1.1 est l'unique cause du contrôle de cette protéine sur le développement des PRLs. En particulier, nous avons cherché à déterminer si, en réponse au  $\text{NO}_3^-$ , NRT1.1 agit également de manière indirecte sur d'autres transporteurs d'auxine ou sur des enzymes de biosynthèse d'auxine. D'autre part, nous avons entrepris d'étendre nos études sur la régulation post-transcriptionnelle de l'expression de NRT1.1 à d'autres organes que les parties racinaires et d'en caractériser les mécanismes sous-jacents.

### **I. NRT1.1 : chef d'orchestre dans le contrôle du développement des PRLs en réponse au $\text{NO}_3^-$**

L'objectif de ce travail était d'approfondir le modèle du contrôle du développement des PRLs par NRT1.1 proposé par Krouk *et al.*, (2010b). Ce modèle postulait qu'en condition d'absence ou de faible teneur en  $\text{NO}_3^-$ , la fonction de NRT1.1 est de réprimer le développement des PRLs en favorisant le transport basipète d'auxine hors de ces PRLs. Les résultats obtenus lors de ma thèse ont permis d'étendre le modèle initial, en montrant que l'action répressive de NRT1.1 implique également l'inhibition de l'expression d'un autre transporteur d'auxine (LAX3) ainsi que celle d'une enzyme-clé de la voie de biosynthèse d'auxine (TAR2).

Ainsi, nos résultats mettent en lumière le rôle déterminant joué par NRT1.1 dans la coordination des différents processus impliqués dans la réponse du développement des RLs au  $\text{NO}_3^-$ :

- (i) NRT1.1 réprime l'accumulation de l'hormone dans le PRL par son activité de transport en facilitant le transport basipète de l'hormone hors de celui-ci,
- (ii) NRT1.1 inhibe l'alimentation en auxine dans les PRLs en réprimant la synthèse de l'hormone médiée par TAR2 dans la stèle,
- (iii) NRT1.1 inhibe l'émergence des PRLs hors de la racine primaire en réprimant *LBD29* et *LAX3*, et en maintenant ainsi une résistance mécanique à cette émergence.

Plusieurs questions se posent pour la suite de ce travail. Premièrement, une observation fine de la chronologie de ces événements pourrait être abordée pour caractériser la séquence des actions de NRT1.1. Ceci permettrait de déterminer si c'est son effet sur le transport basipète de



## Chapitre V

l'auxine dans le PRL qui est la cause initiale de ses effets sur TAR2 et sur LAX3. Deuxièmement, il serait indispensable de vérifier que la répression de *TAR2* par NRT1.1 s'accompagne bien d'une diminution de la biosynthèse d'auxine. Enfin, si cette diminution est confirmée, il serait intéressant d'identifier les mécanismes par lesquels NRT1.1 réprime l'expression de *TAR2*. Cela pourrait être fait en recherchant, parmi les facteurs de transcription exprimés dans la stèle racinaire, ceux régulés par NRT1.1 et susceptibles de réguler *TAR2*.

### II. Les régulations post-transcriptionnelles de NRT1.1

Dans cette partie, les travaux antérieurs de l'équipe montraient que le  $\text{NO}_3^-$  stimule l'activité du promoteur de *NRT1.1* dans les racines, mais affecte différemment l'accumulation de la protéine NRT1.1 en fonction des tissus : d'une part, le  $\text{NO}_3^-$  réprime l'expression de la protéine NRT1.1 dans les PRLs et d'autre part, il stimule l'accumulation de la protéine NRT1.1 dans l'épiderme et le cortex de la racine (Bouguyon *et al.*, 2016). Ceci a révélé l'existence d'une régulation post-transcriptionnelle négative de NRT1.1 en réponse au  $\text{NO}_3^-$  dans les PRLs, qui a probablement une forte signification physiologique. En effet, elle implique que la stimulation locale du développement des RLs par le  $\text{NO}_3^-$  s'explique par l'effet inhibiteur de cet ion à la fois sur l'activité de transport d'auxine de NRT1.1 (Krouk *et al.*, 2010b) et sur l'expression de cette protéine.

Ces observations nous ont suggéré une grille d'analyse pour caractériser plus largement les fonctions de NRT1.1 dans la plante, en étudiant la réponse de la protéine au  $\text{NO}_3^-$  dans d'autres tissus ou organes que ceux étudiés précédemment. L'hypothèse est que la répression de l'expression de la protéine par le  $\text{NO}_3^-$  est révélatrice d'une fonction physiologique de NRT1.1 en l'absence de  $\text{NO}_3^-$ . Le point marquant de ce travail est l'observation que la régulation post-transcriptionnelle négative de NRT1.1 par le  $\text{NO}_3^-$  est sans doute largement majoritaire dans les parties aériennes. Par analogie à ce qui a été caractérisé dans les PRLs, cela pourrait indiquer un rôle de NRT1.1 dans le développement des parties aériennes en l'absence de  $\text{NO}_3^-$ . Nos expériences préliminaires n'ont pas permis d'identifier un phénotype chez le mutant *chl1-5* dans ces conditions. Cependant, un effet de NRT1.1 sur la croissance des organes aériens de plantes privées de  $\text{NO}_3^-$  a été rapporté par d'autres (Guo *et al.*, 2001 ; Hachiya *et al.*, 2011). Cela mériterait donc une analyse phénotypique plus approfondie des mutants *chl1*, pour identifier les conditions dans lesquelles NRT1.1 pourrait contrôler le développement des parties aériennes.



## Chapitre V

Parallèlement, un autre objectif de cette partie du travail a été de caractériser les mécanismes de la régulation post-traductionnelle de NRT1.1. La stratégie, ambitieuse, a été de coupler une approche de biochimie (analyse de la protéine native et de ses modifications post-traductionnelles) à celle d'imagerie (analyse de protéines taggées et pharmacologie). Ce couplage a induit des difficultés dans l'étude de la répression post-transcriptionnelle de NRT1.1 par le  $\text{NO}_3^-$ . En effet, il a été impossible de le réaliser pour les tissus ou organes où cette répression se manifeste (PRLs et parties aériennes). D'une part, les PRLs représentent une infime fraction des tissus de la racine, ce qui y rend l'approche biochimique très ardue. D'autre part, l'approche pharmacologique s'est révélée difficile à mettre en œuvre dans les parties aériennes. En conséquence, cette partie du travail s'est focalisée sur la régulation post-transcriptionnelle positive, qui est prédominante dans les racines. Les résultats obtenus nous ont permis de confirmer l'effet positif du  $\text{NO}_3^-$  sur l'expression de la protéine native dans les racines, et de montrer la nature dynamique de cet effet. De fait, une carence en  $\text{NO}_3^-$  entraîne une disparition rapide de NRT1.1 de la membrane plasmique des cellules racinaires. L'hypothèse qui a été privilégiée a été de considérer que cette disparition résultait d'un recyclage rapide et/ou d'une dégradation de NRT1.1 induite par l'absence de  $\text{NO}_3^-$ . Cette hypothèse n'a pas été étayée par les résultats. NRT1.1 est bien soumis à un recyclage entre la membrane plasmique et le réseau TGN/EE, mais ce recyclage est indépendant des conditions d'alimentation en  $\text{NO}_3^-$ . De même, nous avons montré que NRT1.1 est rapidement dégradé en réponse à la carence en  $\text{NO}_3^-$ , à priori dans la vacuole, mais sans trouver d'effet du  $\text{NO}_3^-$  sur cette dégradation. Ceci semble indiquer que l'action du  $\text{NO}_3^-$  se fait plutôt au niveau traductionnel. Récemment, l'hypothèse d'un recyclage et d'une dégradation de NRT1.1 stimulée par le  $\text{NO}_3^-$  dans les RLs a été néanmoins étayée par d'autres (Zhang *et al.*, 2019). Cependant, ces mécanismes semblent prioritairement concerner la forme non-phosphorylée de NRT1.1, qui n'est probablement pas celle majoritaire en l'absence de  $\text{NO}_3^-$ . Ceci pourrait éventuellement expliquer pourquoi nous n'aboutissons pas aux mêmes conclusions.

Ces travaux mériteraient d'être poursuivis à la lumière de ces informations récentes. En particulier, nos résultats préliminaires révélant une potentielle forme ubiquitinée de NRT1.1 sont encourageants. Ils pourraient donner une certaine originalité à l'étude de l'impact des modifications post-traductionnelles de NRT1.1 sur sa régulation par le  $\text{NO}_3^-$ . Cela nous a incité à entreprendre l'obtention de lignées exprimant des formes mutées de NRT1.1-mCitrine sur les lysines potentiellement ubiquitinables. Chez NRT1.1, six lysines sont concernées et correspondent aux résidus K7, K181, K267, K291, K293 et K307.



### III. Recherche de nouveaux acteurs moléculaires impliqués dans la régulation du développement des PRLs par NRT1.1

Un autre axe intéressant de perspectives découle des progrès rapides réalisés dans la communauté internationale sur les mécanismes associés aux autres fonctions de signalisation de NRT1.1, comme par exemple son rôle pivot dans la PNR et la SNR (voir Maghiaoui *et al.*, 2020b pour revue). En effet, de nombreux régulateurs moléculaires impliqués en aval de NRT1.1 ont été identifiés, dont beaucoup de facteurs de transcription. Bien que les voies de signalisation activées par NRT1.1 soient probablement largement indépendantes (Bouguyon *et al.*, 2015), il est possible qu'elles possèdent des modules en partie communs. Par exemple, l'induction d'*AFB3* par NRT1.1 est dépendante de la PNR, mais affecte le développement racinaire (Vidal *et al.*, 2010 ; Vidal *et al.*, 2014). Le phénotype de régulation des PRLs par NRT1.1 est relativement aisé à étudier (augmentation de la densité des RLs chez les mutants *chl1* en l'absence de  $\text{NO}_3^-$ ). Il est donc envisageable de conduire une approche de phénotypage sur un grand nombre de mutants des gènes identifiés comme impliqués dans les autres fonctions de signalisation de NRT1.1. Cela permettrait de déterminer si ces gènes jouent aussi un rôle, ou non, dans la régulation du développement racinaire, et d'aborder ainsi l'étude des interactions existantes entre les différents modules de signalisation activés par NRT1.1.



REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES



## Références Bibliographiques

- Abas L, Benjamins R, Malenica N, Paciorek T, Wiśniewska J, Moulinier–Anzola JC, Sieberer T, Friml J, Luschnig C.** 2006. Intracellular trafficking and proteolysis of the Arabidopsis auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nature Cell Biology* **8**, 249-256.
- Alboresi A, Gestin C, Leydecker MT, Bedu M, Meyer C, Truong HN.** 2005. Nitrate, a signal relieving seed dormancy in Arabidopsis. *Plant Cell Environ* **28**, 500-512.
- Almagro A, Lin SH, Tsay YF.** 2008. Characterization of the Arabidopsis nitrate transporter NRT1.6 reveals a role of nitrate in early embryo development. *Plant Cell* **20**, 3289-3299.
- Alvarez JM, Riveras E, Vidal EA, Gras DE, Contreras-Lopez O, Tamayo KP, Aceituno F, Gomez I, Ruffel S, Lejay L, Jordana X, Gutierrez RA.** 2014. Systems approach identifies TGA1 and TGA4 transcription factors as important regulatory components of the nitrate response of Arabidopsis thaliana roots. *Plant J* **80**, 1-13.
- Alvarez JM, Schinke AL, Brooks MD, Pasquino A, Leonelli L, Varala K, Safi A, Krouk G, Krapp A, Coruzzi GM.** 2020. Transient genome-wide interactions of the master transcription factor NLP7 initiate a rapid nitrogen-response cascade. *Nat Commun* **11**, 1157.
- Araya T, Miyamoto M, Wibowo J, Suzuki A, Kojima S, Tsuchiya YN, Sawa S, Fukuda H, von Wirén N, Takahashi H.** 2014. CLE-CLAVATA1 peptide-receptor signaling module regulates the expansion of plant root systems in a nitrogen-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 2029.
- Barberon M, Dubeaux G, Kolb C, Isono E, Zelazny E, Vert G.** 2014. Polarization of IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1) to the plant-soil interface plays crucial role in metal homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 8293.
- Barberon M, Zelazny E, Robert S, Conéjéro G, Curie C, Friml J, Vert G.** 2011. Monoubiquitin-dependent endocytosis of the iron-regulated transporter 1 (IRT1) transporter controls iron uptake in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, E450-E458.
- Beck M, Zhou J, Faulkner C, MacLean D, Robatzek S.** 2012. Spatio-Temporal Cellular Dynamics of the Arabidopsis Flagellin Receptor Reveal Activation Status-Dependent Endosomal Sorting. *The Plant Cell* **24**, 4205.
- Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jürgens G, Friml J.** 2003. Local, Efflux-Dependent Auxin Gradients as a Common Module for Plant Organ Formation. *Cell* **115**, 591-602.
- Bouguyon E, Brun F, Meynard D, Kubes M, Pervent M, Leran S, Lacombe B, Krouk G, Guiderdoni E, Zazimalova E, Hoyerova K, Nacry P, Gojon A.** 2015. Multiple mechanisms of nitrate sensing by Arabidopsis nitrate transporter NRT1.1. *Nat Plants* **1**, 15015.
- Bouguyon E, Perrine-Walker F, Pervent M, Rochette J, Cuesta C, Benkova E, Martinière A, Bach L, Krouk G, Gojon A, Nacry P.** 2016. Nitrate Controls Root Development through Posttranscriptional Regulation of the NRT1.1/NPF6.3 Transporter/Sensor. *Plant Physiology* **172**, 1237-1248.



## Références Bibliographiques

- Brumos J, Robles LM, Yun J, Vu TC, Jackson S, Alonso JM, Stepanova AN.** 2018. Local Auxin Biosynthesis Is a Key Regulator of Plant Development. *Dev Cell* **47**, 306-318.e305.
- Casimiro I, Beeckman 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.
- Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, Beeckman T, Dhooge S, Swarup R, Graham N, Inzé D, Sandberg G, Casero PJ, Bennett M.** 2001. Auxin Transport Promotes Arabidopsis Lateral Root Initiation. *The Plant Cell* **13**, 843.
- Castaings L, Camargo A, Pocholle D, Gaudon V, Texier Y, Boutet-Mercey S, Taconnat L, Renou JP, Daniel-Vedele F, Fernandez E, Meyer C, Krapp A.** 2009. The nodule inception-like protein 7 modulates nitrate sensing and metabolism in Arabidopsis. *Plant J* **57**, 426-435.
- Cerezo M, Tillard P, Filleur S, Muños S, Daniel-Vedele F, Gojon A.** 2001. Major alterations of the regulation of root NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake are associated with the mutation of Nrt2.1 and Nrt2.2 genes in Arabidopsis. *Plant Physiol* **127**, 262-271.
- Chen MK, Wilson RL, Palme K, Ditengou FA, Shpak ED.** 2013. ERECTA family genes regulate auxin transport in the shoot apical meristem and forming leaf primordia. *Plant Physiol* **162**, 1978-1991.
- Chen X, Qu Y, Sheng L, Liu J, Huang H, Xu L.** 2014. A simple method suitable to study de novo root organogenesis. *Frontiers in plant science* **5**, 208-208.
- Cheng Y, Dai X, Zhao Y.** 2006. Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in Arabidopsis. *Genes Dev* **20**, 1790-1799.
- Chiu CC, Lin CS, Hsia AP, Su RC, Lin HL, Tsay YF.** 2004. Mutation of a nitrate transporter, AtNRT1:4, results in a reduced petiole nitrate content and altered leaf development. *Plant Cell Physiol* **45**, 1139-1148.
- Chopin F, Orsel M, Dorbe MF, Chardon F, Truong HN, Miller AJ, Krapp A, Daniel-Vedele F.** 2007. The Arabidopsis ATNRT2.7 nitrate transporter controls nitrate content in seeds. *Plant Cell* **19**, 1590-1602.
- Crawford NM.** 1995. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *The Plant Cell* **7**, 859.
- Crawford NM, Forde BG.** 2002. Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition. *The arabidopsis book* **1**, e0011-e0011.
- Dechorgnat J, Nguyen CT, Armengaud P, Jossier M, Diatloff E, Filleur S, Daniel-Vedele F.** 2011. From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. *J Exp Bot* **62**, 1349-1359.
- Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B.** 1993. Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. *Development* **119**, 71-84.



## Références Bibliographiques

- Du Y, Tejos R, Beck M, Himschoot E, Li H, Robatzek S, Vanneste S, Friml J.** 2013. Salicylic acid interferes with clathrin-mediated endocytic protein trafficking. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 7946-7951.
- Dubeaux G, Neveu J, Zelazny E, Vert G.** 2018. Metal sensing by the IRT1 transporter-receptor orchestrates its own degradation and plant metal nutrition. *Molecular cell* **69**, 953-964. e955.
- Fan SC, Lin CS, Hsu PK, Lin SH, Tsay YF.** 2009. The Arabidopsis nitrate transporter NRT1.7, expressed in phloem, is responsible for source-to-sink remobilization of nitrate. *Plant Cell* **21**, 2750-2761.
- Filleur S, Daniel-Vedele F.** 1999. Expression analysis of a high-affinity nitrate transporter isolated from Arabidopsis thaliana by differential display. *Planta* **207**, 461-469.
- Forde BG.** 2014. Nitrogen signalling pathways shaping root system architecture: an update. *Curr Opin Plant Biol* **21**, 30-36.
- Friml J.** 2003. Auxin transport — shaping the plant. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 7-12.
- Gansel X, Muños S, Tillard P, Gojon A.** 2001. Differential regulation of the NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transporter genes AtNrt2.1 and AtAmt1.1 in Arabidopsis: relation with long-distance and local controls by N status of the plant. *Plant J* **26**, 143-155.
- Geldner N, Anders N, Wolters H, Keicher J, Kornberger W, Muller P, Delbarre A, Ueda T, Nakano A, Jürgens G.** 2003. The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* **112**, 219-230.
- Giehl RF, Lima JE, von Wirén N.** 2012. Localized iron supply triggers lateral root elongation in Arabidopsis by altering the AUX1-mediated auxin distribution. *The Plant Cell* **24**, 33-49.
- Glass ADM, Kotur Z.** 2013. A reevaluation of the role of Arabidopsis NRT1.1 in high-affinity nitrate transport. *Plant Physiology* **163**, 1103-1106.
- Goh T, Toyokura K, Wells DM, Swarup K, Yamamoto M, Mimura T, Weijers D, Fukaki H, Laplaze L, Bennett MJ, Guyomarc, h S.** 2016. Quiescent center initiation in the Arabidopsis lateral root primordia is dependent on the SCARECROW transcription factor. *Development* **143**, 3363.
- Gojon A, Krouk G, Perrine-Walker F, Laugier E.** 2011. Nitrate transceptor(s) in plants. *J Exp Bot* **62**, 2299-2308.
- Gordon A, Lea P, Rosenberg C, Trinchant J-C.** 2001. Nodule Formation and Function. *Plant Nitrogen*, 101-146.
- Grieneisen VA, Xu J, Marée AF, Hogeweg P, Scheres B.** 2007. Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* **449**, 1008-1013.
- Gruber BD, Giehl RFH, Friedel S, von Wirén N.** 2013. Plasticity of the Arabidopsis Root System under Nutrient Deficiencies. *Plant Physiology* **163**, 161.



## Références Bibliographiques

- Guan P, Ripoll JJ, Wang R, Vuong L, Bailey-Steinitz LJ, Ye D, Crawford NM.** 2017. Interacting TCP and NLP transcription factors control plant responses to nitrate availability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 2419-2424.
- Guan P, Wang R, Nacry P, Breton G, Kay SA, Pruneda-Paz JL, Davani A, Crawford NM.** 2014. Nitrate foraging by Arabidopsis roots is mediated by the transcription factor TCP20 through the systemic signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 15267-15272.
- Guiboileau A, Masclaux-Daubresse C.** 2012. L'autophagie chez les plantes: mécanismes, régulations et fonctions. *Comptes Rendus Biologies* **335**, 375-388.
- Guo FQ, Wang R, Chen M, Crawford NM.** 2001. The Arabidopsis dual-affinity nitrate transporter gene AtNRT1.1 (CHL1) is activated and functions in nascent organ development during vegetative and reproductive growth. *Plant Cell* **13**, 1761-1777.
- Guo FQ, Wang R, Crawford NM.** 2002. The Arabidopsis dual-affinity nitrate transporter gene AtNRT1.1 (CHL1) is regulated by auxin in both shoots and roots. *J Exp Bot* **53**, 835-844.
- Guo FQ, Young J, Crawford NM.** 2003. The nitrate transporter AtNRT1.1 (CHL1) functions in stomatal opening and contributes to drought susceptibility in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**, 107-117.
- Hachiya T, Mizokami Y, Miyata K, Tholen D, Watanabe CK, Noguchi K.** 2011. Evidence for a nitrate-independent function of the nitrate sensor NRT1.1 in Arabidopsis thaliana. *J Plant Res* **124**, 425-430.
- Hirel B, Krapp A.** 2020. Nitrogen Utilization in Plants I Biological and Agronomic Importance.
- Ho CH, Lin SH, Hu HC, Tsay YF.** 2009. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell* **138**, 1184-1194.
- Holsbeeks I, Lagatie O, Van Nuland A, Van de Velde S, Thevelein JM.** 2004. The eukaryotic plasma membrane as a nutrient-sensing device. *Trends in biochemical sciences* **29**, 556-564.
- Hsu P-K, Tsay Y-F.** 2013. Two Phloem Nitrate Transporters, NRT1.11 and NRT1.12, Are Important for Redistributing Xylem-Borne Nitrate to Enhance Plant Growth. *Plant Physiology* **163**, 844.
- Hu B, Jiang Z, Wang W, Qiu Y, Zhang Z, Liu Y, Li A, Gao X, Liu L, Qian Y, Huang X, Yu F, Kang S, Wang Y, Xie J, Cao S, Zhang L, Wang Y, Xie Q, Kopriva S, Chu C.** 2019. Nitrate-NRT1.1B-SPX4 cascade integrates nitrogen and phosphorus signalling networks in plants. *Nature Plants* **5**, 401-413.
- Huang NC, Chiang CS, Crawford NM, Tsay YF.** 1996. CHL1 encodes a component of the low-affinity nitrate uptake system in Arabidopsis and shows cell type-specific expression in roots. *Plant Cell* **8**, 2183-2191.



## Références Bibliographiques

- Huang NC, Liu KH, Lo HJ, Tsay YF.** 1999. Cloning and functional characterization of an Arabidopsis nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *Plant Cell* **11**, 1381-1392.
- Iqbal A, Qiang D, Alamzeb M, Xiangru W, Huiping G, Hengheng Z, Nianchang P, Xiling Z, Meizhen S.** 2020. Untangling the molecular mechanisms and functions of nitrate to improve nitrogen use efficiency. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **100**, 904-914.
- Kiba T, Feria-Bourrellier A-B, Lafouge F, Lezhneva L, Boutet-Mercey S, Orsel M, Bréhaut V, Miller A, Daniel-Vedele F, Sakakibara H, Krapp A.** 2012. The Arabidopsis Nitrate Transporter NRT2.4 Plays a Double Role in Roots and Shoots of Nitrogen-Starved Plants. *The Plant Cell* **24**, 245.
- Kiba T, Inaba J, Kudo T, Ueda N, Konishi M, Mitsuda N, Takiguchi Y, Kondou Y, Yoshizumi T, Ohme-Takagi M, Matsui M, Yano K, Yanagisawa S, Sakakibara H.** 2018. Repression of Nitrogen Starvation Responses by Members of the Arabidopsis GARP-Type Transcription Factor NIGT1/HRS1 Subfamily. *The Plant Cell* **30**, 925.
- Komander D, Rape M.** 2012. The ubiquitin code. *Annual review of biochemistry* **81**, 203-229.
- Konishi M, Yanagisawa S.** 2013. Arabidopsis NIN-like transcription factors have a central role in nitrate signalling. *Nat Commun* **4**, 1617.
- Korbei B, Luschig C.** 2013. Plasma membrane protein ubiquitylation and degradation as determinants of positional growth in plants. *J Integr Plant Biol* **55**, 809-823.
- Kotur Z, Glass AD.** 2015. A 150 kDa plasma membrane complex of AtNRT2.5 and AtNAR2.1 is the major contributor to constitutive high-affinity nitrate influx in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Environ* **38**, 1490-1502.
- Kotur Z, Mackenzie N, Ramesh S, Tyerman SD, Kaiser BN, Glass AD.** 2012. Nitrate transport capacity of the Arabidopsis thaliana NRT2 family members and their interactions with AtNAR2.1. *New Phytol* **194**, 724-731.
- Kramer EM, Bennett MJ.** 2006. Auxin transport: a field in flux. *Trends Plant Sci* **11**, 382-386.
- Krapp A.** 2015. Plant nitrogen assimilation and its regulation: A complex puzzle with missing pieces. *Current Opinion in Plant Biology* **25**.
- Krouk G, Crawford NM, Coruzzi GM, Tsay YF.** 2010a. Nitrate signaling: adaptation to fluctuating environments. *Curr Opin Plant Biol* **13**, 266-273.
- Krouk G, Lacombe B, Bielach A, Perrine-Walker F, Malinska K, Mounier E, Hoyerova K, Tillard P, Leon S, Ljung K, Zazimalova E, Benkova E, Nacry P, Gojon A.** 2010b. Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Dev Cell* **18**, 927-937.



## Références Bibliographiques

- Krouk G, Tillard P, Gojon A.** 2006. Regulation of the high-affinity NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake system by NRT1.1-mediated NO<sub>3</sub><sup>-</sup> demand signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol* **142**, 1075-1086.
- Lejay L, Tillard P, Lepetit M, Olive F, Filleur S, Daniel-Vedele F, Gojon A.** 1999. Molecular and functional regulation of two NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake systems by N- and C-status of Arabidopsis plants. *Plant J* **18**, 509-519.
- Léran S, Garg B, Boursiac Y, Corratgé-Faillie C, Brachet C, Tillard P, Gojon A, Lacombe B.** 2015. AtNPF5.5, a nitrate transporter affecting nitrogen accumulation in Arabidopsis embryo. *Sci Rep* **5**, 7962.
- Leran S, Munos S, Brachet C, Tillard P, Gojon A, Lacombe B.** 2013. Arabidopsis NRT1.1 is a bidirectional transporter involved in root-to-shoot nitrate translocation. *Mol Plant* **6**, 1984-1987.
- Leran S, Varala K, Boyer JC, Chiurazzi M, Crawford N, Daniel-Vedele F, David L, Dickstein R, Fernandez E, Forde B, Gassmann W, Geiger D, Gojon A, Gong JM, Halkier BA, Harris JM, Hedrich R, Limami AM, Rentsch D, Seo M, Tsay YF, Zhang M, Coruzzi G, Lacombe B.** 2014. A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. *Trends Plant Sci* **19**, 5-9.
- Lezhneva L, Kiba T, Feria-Bourrellier A-B, Lafouge F, Boutet-Mercey S, Zoufan P, Sakakibara H, Daniel-Vedele F, Krapp A.** 2014. The Arabidopsis nitrate transporter NRT2.5 plays a role in nitrate acquisition and remobilization in nitrogen-starved plants. *The Plant Journal* **80**, 230-241.
- Li J-Y, Fu Y-L, Pike SM, Bao J, Tian W, Zhang Y, Chen C-Z, Zhang Y, Li H-M, Huang J, Li L-G, Schroeder JI, Gassmann W, Gong J-M.** 2010. The Arabidopsis nitrate transporter NRT1.8 functions in nitrate removal from the xylem sap and mediates cadmium tolerance. *The Plant Cell* **22**, 1633-1646.
- Li W, Wang Y, Okamoto M, Crawford NM, Siddiqi MY, Glass ADM.** 2007. Dissection of the AtNRT2.1:AtNRT2.2 Inducible High-Affinity Nitrate Transporter Gene Cluster. *Plant Physiology* **143**, 425.
- Lin S-H, Kuo H-F, Canivenc G, Lin C-S, Lepetit M, Hsu P-K, Tillard P, Lin H-L, Wang Y-Y, Tsai C-B, Gojon A, Tsay Y-F.** 2008. Mutation of the Arabidopsis NRT1.5 nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. *The Plant Cell* **20**, 2514-2528.
- Little DY, Rao H, Oliva S, Daniel-Vedele F, Krapp A, Malamy JE.** 2005. The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13693-13698.
- Liu KH, Huang CY, Tsay YF.** 1999. CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of Arabidopsis involved in multiple phases of nitrate uptake. *Plant Cell* **11**, 865-874.
- Liu KH, Niu Y, Konishi M, Wu Y, Du H, Sun Chung H, Li L, Boudsocq M, McCormack M, Maekawa S, Ishida T, Zhang C, Shokat K, Yanagisawa S, Sheen J.** 2017. Discovery of nitrate-CPK-NLP signalling in central nutrient-growth networks. *Nature* **545**, 311-316.



## Références Bibliographiques

**Liu KH, Tsay YF.** 2003. Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *EMBO J* **22**, 1005-1013.

**Lucas M, Kenobi K, von Wangenheim D, Voß U, Swarup K, De Smet I, Van Damme D, Lawrence T, Péret B, Moscardi E, Barbeau D, Godin C, Salt D, Guyomarc'h S, Stelzer EH, Maizel A, Laplaze L, Bennett MJ.** 2013. Lateral root morphogenesis is dependent on the mechanical properties of the overlaying tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 5229-5234.

**Luschnig C.** 2002. Auxin transport: ABC proteins join the club. *Trends in Plant Science* **7**, 329-332.

**Ma W, Li J, Qu B, He X, Zhao X, Li B, Fu X, Tong Y.** 2014. Auxin biosynthetic gene TAR2 is involved in low nitrogen-mediated reprogramming of root architecture in Arabidopsis. *Plant J* **78**, 70-79.

**Maeda Y, Konishi M, Kiba T, Sakuraba Y, Sawaki N, Kurai T, Ueda Y, Sakakibara H, Yanagisawa S.** 2018. A NIGT1-centred transcriptional cascade regulates nitrate signalling and incorporates phosphorus starvation signals in Arabidopsis. *Nature Communications* **9**, 1376.

**Maghiaoui A, Bouguyon E, Cuesta C, Perrine-Walker F, Alcon C, Krouk G, Benková E, Nacry P, Gojon A, Bach L.** 2020a. The Arabidopsis NRT1.1 transceptor coordinately controls auxin biosynthesis and transport to regulate root branching in response to nitrate. *J Exp Bot* **71**, 4480-4494.

**Maghiaoui A, Gojon A, Bach L.** 2020b. NRT1.1-centered nitrate signaling in plants. *Journal of Experimental Botany*.

**Malamy JE, Benfey PN.** 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana. *Development* **124**, 33.

**Marchant A, Bhalerao R, Casimiro I, Eklöf J, Casero PJ, Bennett M, Sandberg G.** 2002. AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the Arabidopsis seedling. *The Plant Cell* **14**, 589-597.

**Marchise C, Roudier F, Castaings L, Bréhaut V, Blondet E, Colot V, Meyer C, Krapp A.** 2013. Nuclear retention of the transcription factor NLP7 orchestrates the early response to nitrate in plants. *Nature Communications* **4**, 1713.

**Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A.** 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of botany* **105**, 1141-1157.

**Mashiguchi K, Tanaka K, Sakai T, Sugawara S, Kawaide H, Natsume M, Hanada A, Yaeno T, Shirasu K, Yao H, McSteen P, Zhao Y, Hayashi K-i, Kamiya Y, Kasahara H.** 2011. The main auxin biosynthesis pathway in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 18512.

**Medici A, Krouk G.** 2014. The primary nitrate response: a multifaceted signalling pathway. *J Exp Bot* **65**, 5567-5576.



## Références Bibliographiques

- Medici A, Marshall-Colon A, Ronzier E, Szponarski W, Wang R, Gojon A, Crawford NM, Ruffel S, Coruzzi GM, Krouk G.** 2015. AtNIGT1/HRS1 integrates nitrate and phosphate signals at the Arabidopsis root tip. *Nature Communications* **6**, 6274.
- Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, Sommer T.** 2005. ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol* **7**, 766-772.
- Miller A, Cramer M.** 2004. Root Nitrogen Acquisition and Assimilation. *Plant and Soil* **274**, 1.
- Miller AJ, Fan X, Orsel M, Smith SJ, Wells DM.** 2007. Nitrate transport and signalling. *J Exp Bot* **58**, 2297-2306.
- Morot-Gaudry J-F.** 1997. *Assimilation de l'azote chez les plantes: aspects physiologique, biochimique et moléculaire*: Editions Quae.
- Motte H, Vanneste S, Beeckman T.** 2019. Molecular and Environmental Regulation of Root Development. *Annual Review of Plant Biology* **70**, 465-488.
- Mounier E, Pervent M, Ljung K, Gojon A, Nacry P.** 2014. Auxin-mediated nitrate signalling by NRT1.1 participates in the adaptive response of Arabidopsis root architecture to the spatial heterogeneity of nitrate availability. *Plant Cell Environ* **37**, 162-174.
- Munos S, Cazettes C, Fizames C, Gaymard F, Tillard P, Lepetit M, Lejay L, Gojon A.** 2004. Transcript profiling in the chl1-5 mutant of Arabidopsis reveals a role of the nitrate transporter NRT1.1 in the regulation of another nitrate transporter, NRT2.1. *Plant Cell* **16**, 2433-2447.
- Nacry P, Bouguyon E, Gojon A.** 2013. Nitrogen acquisition by roots: physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource. *Plant and Soil* **370**, 1-29.
- Naramoto S, Otegui MS, Kutsuna N, de Rycke R, Dainobu T, Karampelias M, Fujimoto M, Feraru E, Miki D, Fukuda H, Nakano A, Friml J.** 2014. Insights into the localization and function of the membrane trafficking regulator GNOM ARF-GEF at the Golgi apparatus in Arabidopsis. *Plant Cell* **26**, 3062-3076.
- Normanly J.** 2010. Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**, a001594-a001594.
- O'Brien JA, Vega A, Bouguyon E, Krouk G, Gojon A, Coruzzi G, Gutiérrez RA.** 2016. Nitrate Transport, Sensing, and Responses in Plants. *Mol Plant* **9**, 837-856.
- Ohkubo Y, Tanaka M, Tabata R, Ogawa-Ohnishi M, Matsubayashi Y.** 2017. Shoot-to-root mobile polypeptides involved in systemic regulation of nitrogen acquisition. *Nature Plants* **3**, 17029.
- Orsel M, Filleur S, Fraissier V, Daniel-Vedele F.** 2002. Nitrate transport in plants: which gene and which control? *J Exp Bot* **53**, 825-833.



## Références Bibliographiques

- Otegui MS, Spitzer C.** 2008. Endosomal functions in plants. *Traffic* **9**, 1589-1598.
- Parizot B, Laplaze L, Ricaud L, Boucheron-Dubuisson E, Bayle V, Bonke M, De Smet I, Poethig SR, Helariutta Y, Haseloff J.** 2008. Diarch symmetry of the vascular bundle in Arabidopsis root encompasses the pericycle and is reflected in distich lateral root initiation. *Plant Physiology* **146**, 140-148.
- Parker JL, Newstead S.** 2014. Molecular basis of nitrate uptake by the plant nitrate transporter NRT1.1. *Nature* **507**, 68-72.
- Remans T, Nacry P, Pervent M, Filleur S, Diatloff E, Mounier E, Tillard P, Forde BG, Gojon A.** 2006. The Arabidopsis NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 19206-19211.
- Riveras E, Alvarez JM, Vidal EA, Oses C, Vega A, Gutierrez RA.** 2015. The Calcium Ion Is a Second Messenger in the Nitrate Signaling Pathway of Arabidopsis. *Plant Physiol* **169**, 1397-1404.
- Robatzek S, Chinchilla D, Boller T.** 2006. Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in Arabidopsis. *Genes & Development* **20**, 537-542.
- Robinson DG, Pimpl P, Scheuring D, Stierhof YD, Sturm S, Viotti C.** 2012. Trying to make sense of retromer. *Trends Plant Sci* **17**, 431-439.
- Rubin G, Tohge T, Matsuda F, Saito K, Scheible WR.** 2009. Members of the LBD family of transcription factors repress anthocyanin synthesis and affect additional nitrogen responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**, 3567-3584.
- Ruffel S, Krouk G, Ristova D, Shasha D, Birnbaum KD, Coruzzi GM.** 2011. Nitrogen economics of root foraging: transitive closure of the nitrate-cytokinin relay and distinct systemic signaling for N supply vs. demand. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 18524-18529.
- Segonzac C, Boyer J-C, Ipotesi E, Szponarski W, Tillard P, Touraine B, Sommerer N, Rossignol M, Gibrat R.** 2007. Nitrate Efflux at the Root Plasma Membrane: Identification of an Arabidopsis Excretion Transporter. *The Plant Cell* **19**, 3760.
- Stepanova AN, Robertson-Hoyt J, Yun J, Benavente LM, Xie DY, Dolezal K, Schlereth A, Jürgens G, Alonso JM.** 2008. TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* **133**, 177-191.
- Stepanova AN, Yun J, Robles LM, Novak O, He W, Guo H, Ljung K, Alonso JM.** 2011. The Arabidopsis YUCCA1 flavin monooxygenase functions in the indole-3-pyruvic acid branch of auxin biosynthesis. *Plant Cell* **23**, 3961-3973.
- Swarup K, Benková E, Swarup R, Casimiro I, Péret B, Yang Y, Parry G, Nielsen E, De Smet I, Vanneste S, Levesque MP, Carrier D, James N, Calvo V, Ljung K, Kramer E, Roberts R, Graham N, Marillonnet S, Patel K, Jones JD, Taylor CG, Schachtman DP, May S, Sandberg G, Benfey P, Friml J, Kerr I, Beeckman T, Laplaze L, Bennett MJ.** 2008. The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nat Cell Biol* **10**, 946-954.



## Références Bibliographiques

**Swarup R, Peret B.** 2012. AUX/LAX family of auxin influx carriers-an overview. *Front Plant Sci* **3**, 225.

**Tabata R, Sumida K, Yoshii T, Ohyama K, Shinohara H, Matsubayashi Y.** 2014. Perception of root-derived peptides by shoot LRR-RKs mediates systemic N-demand signaling. *Science* **346**, 343.

**Tao Y, Ferrer JL, Ljung K, Pojer F, Hong F, Long JA, Li L, Moreno JE, Bowman ME, Ivans LJ, Cheng Y, Lim J, Zhao Y, Ballaré CL, Sandberg G, Noel JP, Chory J.** 2008. Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* **133**, 164-176.

**Taochy C, Gaillard I, Ipotesi E, Oomen R, Leonhardt N, Zimmermann S, Peltier JB, Szponarski W, Simonneau T, Sentenac H, Gibrat R, Boyer JC.** 2015. The Arabidopsis root stele transporter NPF2.3 contributes to nitrate translocation to shoots under salt stress. *Plant J* **83**, 466-479.

**Teng Y, Liang Y, Wang M, Mai H, Ke L.** 2019. Nitrate Transporter 1.1 is involved in regulating flowering time via transcriptional regulation of FLOWERING LOCUS C in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* **284**, 30-36.

**Tilman D, Cassman KG, Matson PA, Naylor R, Polasky S.** 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* **418**, 671-677.

**Tsay Y-F, Chiu C-C, Tsai C-B, Ho C-H, Hsu P-K.** 2007. Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Letters* **581**, 2290-2300.

**Tsay YF, Schroeder JI, Feldmann KA, Crawford NM.** 1993. The herbicide sensitivity gene CHL1 of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* **72**, 705-713.

**Unkles SE, Hawker KL, Grieve C, Campbell EI, Montague P, Kinghorn JR.** 1991. crnA encodes a nitrate transporter in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 204-208.

**Vanneste S, Friml J.** 2009. Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* **136**, 1005-1016.

**Verbelen J-P, De Cnodder T, Le J, Vissenberg K, Baluska F.** 2006. The Root Apex of *Arabidopsis thaliana* Consists of Four Distinct Zones of Growth Activities: Meristematic Zone, Transition Zone, Fast Elongation Zone and Growth Terminating Zone. *Plant Signal Behav* **1**, 296-304.

**Vidal EA, Araus V, Lu C, Parry G, Green PJ, Coruzzi GM, Gutierrez RA.** 2010. Nitrate-responsive miR393/AFB3 regulatory module controls root system architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 4477-4482.

**Vidal EA, Moyano TC, Riveras E, Contreras-López O, Gutiérrez RA.** 2013. Systems approaches map regulatory networks downstream of the auxin receptor AFB3 in the nitrate response of *Arabidopsis thaliana* roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 12840.



## Références Bibliographiques

- von Wittgenstein NJJB, Le CH, Hawkins BJ, Ehlting J.** 2014. Evolutionary classification of ammonium, nitrate, and peptide transporters in land plants. *BMC evolutionary biology* **14**, 11-11.
- Walch-Liu P, Forde BG.** 2008. Nitrate signalling mediated by the NRT1.1 nitrate transporter antagonises L-glutamate-induced changes in root architecture. *Plant J* **54**, 820-828.
- Wang R, Liu D, Crawford NM.** 1998. The Arabidopsis CHL1 protein plays a major role in high-affinity nitrate uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15134-15139.
- Wang R, Tischner R, Gutierrez RA, Hoffman M, Xing X, Chen M, Coruzzi G, Crawford NM.** 2004. Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of Arabidopsis. *Plant Physiol* **136**, 2512-2522.
- Wang R, Xing X, Wang Y, Tran A, Crawford NM.** 2009. A Genetic Screen for Nitrate Regulatory Mutants Captures the Nitrate Transporter Gene NRT1.1. *Plant Physiology* **151**, 472.
- Wang W, Hu B, Li A, Chu C.** 2020. NRT1.1s in plants: functions beyond nitrate transport. *Journal of Experimental Botany* **71**, 4373-4379.
- Wang Y-Y, Tsay Y-F.** 2011. Arabidopsis Nitrate Transporter NRT1.9 Is Important in Phloem Nitrate Transport. *The Plant Cell* **23**, 1945.
- Wang YY, Hsu PK, Tsay YF.** 2012. Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends Plant Sci* **17**, 458-467.
- Wei J, Zheng Y, Feng H, Qu H, Fan X, Yamaji N, Ma JF, Xu G.** 2018. OsNRT2.4 encodes a dual-affinity nitrate transporter and functions in nitrate-regulated root growth and nitrate distribution in rice. *J Exp Bot* **69**, 1095-1107.
- Wen Z, Kaiser BN.** 2018. Unraveling the Functional Role of NPF6 Transporters. *Frontiers in plant science* **9**, 973-973.
- Wirth J, Chopin F, Santoni V, Viennois G, Tillard P, Krapp A, Lejay L, Daniel-Vedele F, Gojon A.** 2007. Regulation of root nitrate uptake at the NRT2.1 protein level in Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem* **282**, 23541-23552.
- Won C, Shen X, Mashiguchi K, Zheng Z, Dai X, Cheng Y, Kasahara H, Kamiya Y, Chory J, Zhao Y.** 2011. Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASES OF ARABIDOPSIS and YUCCAs in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 18518.
- Wu G, Lewis DR, Spalding EP.** 2007. Mutations in Arabidopsis multidrug resistance-like ABC transporters separate the roles of acropetal and basipetal auxin transport in lateral root development. *Plant Cell* **19**, 1826-1837.
- Xu P, Cai W.** 2019. Nitrate-responsive OBP4-XTH9 regulatory module controls lateral root development in Arabidopsis thaliana. *PLoS genetics* **15**, e1008465-e1008465.



## Références Bibliographiques

**Yamada M, Greenham K, Prigge MJ, Jensen PJ, Estelle M.** 2009. The TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE2 Gene Is Required for Auxin Synthesis and Diverse Aspects of Plant Development. *Plant Physiology* **151**, 168.

**Yan Y, Wang H, Hamera S, Chen X, Fang R.** 2014. miR444a has multiple functions in the rice nitrate-signaling pathway. *The Plant Journal* **78**, 44-55.

**Yu LH, Miao ZQ, Qi GF, Wu J, Cai XT, Mao JL, Xiang CB.** 2014. MADS-box transcription factor AGL21 regulates lateral root development and responds to multiple external and physiological signals. *Mol Plant* **7**, 1653-1669.

**Yu P, Eggert K, von Wirén N, Li C, Hochholdinger F.** 2015. Cell type-specific gene expression analyses by RNA sequencing reveal local high nitrate-triggered lateral root initiation in shoot-borne roots of maize by modulating auxin-related cell cycle regulation. *Plant Physiology* **169**, 690-704.

**Zelazny E, Vert G.** 2014. Plant Nutrition: Root Transporters on the Move. *Plant Physiology* **166**, 500.

**Zhang H, Jennings A, Barlow PW, Forde BG.** 1999. Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6529-6534.

**Zhang X, Cui Y, Yu M, Su B, Gong W, Baluška F, Komis G, Šamaj J, Shan X, Lin J.** 2019. Phosphorylation-Mediated Dynamics of Nitrate Transceptor NRT1.1 Regulate Auxin Flux and Nitrate Signaling in Lateral Root Growth. *Plant Physiology* **181**, 480.

**Zhao Y, Christensen SK, Fankhauser C, Cashman JR, Cohen JD, Weigel D, Chory J.** 2001. A Role for Flavin Monooxygenase-Like Enzymes in Auxin Biosynthesis. *Science* **291**, 306.

**Zhuo D, Okamoto M, Vidmar JJ, Glass AD.** 1999. Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (Nrt2;1At) in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **17**, 563-568.

## **Résumé :**

Dans les zones tempérées, le nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) est la principale source d'azote pour une majorité de plantes supérieures. Cependant sa disponibilité dans le sol varie de manière importante à la fois dans le temps et l'espace. Pour faire face à ces conditions fluctuantes, les plantes mettent en œuvre des mécanismes d'adaptation très élaborés. En particulier, elles sont capables de modifier leur développement post-embryonnaire en favorisant la croissance de leur système racinaire en réponse à une disponibilité locale élevée en  $\text{NO}_3^-$ . Initialement caractérisé comme un transporteur et un senseur de  $\text{NO}_3^-$  chez *Arabidopsis thaliana*, des études menées au sein de notre équipe ont montré que NRT1.1 (NFP6.3/CHL1) est également un transporteur d'auxine au niveau des primordia de racines latérales, contrôlant ainsi la croissance du système racinaire en réponse au  $\text{NO}_3^-$ . Une première partie de notre travail a permis d'étendre le rôle de NRT1.1 dans la régulation du développement racinaire, en démontrant que son action ne se limite pas au transport d'auxine à l'intérieur des primordia de racines latérales, mais qu'il orchestre divers processus clés du trafic général d'auxine dans les racines. En particulier, nos résultats mettent en lumière que NRT1.1 contrôle la voie de biosynthèse d'auxine qui alimente le transport acropète de l'hormone vers les primordia de racines latérales, et la signalisation auxinique qui gouverne le remodelage des tissus de la racine primaire pour permettre l'émergence de ces primordia. Une seconde partie de notre travail a eu pour objectif d'étudier la régulation post-transcriptionnelle de NRT1.1 par le  $\text{NO}_3^-$ . Nos résultats démontrent que le  $\text{NO}_3^-$  régule l'expression de la protéine NRT1.1 de manière radicalement différente suivant les tissus considérés, et suggèrent que cette protéine est soumise à un recyclage intracellulaire et à une dégradation dans la vacuole, qui semblent cependant ne pas être affectés par le  $\text{NO}_3^-$ . Nos travaux ont donc enrichi la compréhension du mécanisme du contrôle de l'émergence des racines latérales par NRT1.1, et mis en avant une régulation post-transcriptionnelle de NRT1.1 dans les parties aériennes.

**Mots clés :** NRT1.1,  $\text{NO}_3^-$ , Auxine, Trafic Cellulaire, Développement racinaire

## **Abstract :**

In temperate area, nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) is the main source of nitrogen for most higher plants. However, its availability greatly varies both in time and space. Plants use sophisticated adaptive mechanisms to cope with these fluctuating condition. In particular, plants are able to modify their post-embryonic development to promote root system growth in response to high local  $\text{NO}_3^-$  availability. Initially characterized as a  $\text{NO}_3^-$  carrier and sensor in *Arabidopsis thaliana*, studies carried out by our team showed that NRT1.1 (NFP6.3/CHL1) is also an auxin transporter in lateral root primordia thereby controlling root system growth in response to  $\text{NO}_3^-$ . A first part of our work extends the NRT1.1's role in the regulation of root development by demonstrating that its action is not limited to the auxin transport in lateral roots primordia, but also orchestrates many key processes of general root auxin trafficking. In particular, our results shed light on the fact that NRT1.1 controls the auxin biosynthesis pathway which drives the hormone acropetal transport toward lateral roots primordia. Moreover, we showed that NRT1.1 also controls the auxin signaling that governs the primary root tissues remodeling to allow primordia emergence. A second part of our work aimed to study the post-transcriptional regulations of NRT1.1 by  $\text{NO}_3^-$ . Our results demonstrate that  $\text{NO}_3^-$  regulates NRT1.1 protein expression in a radically different way depending on the tissues considered. We also find that this protein is subject to an intracellular recycling and vacuolar degradation, that however does not appear to be affected by  $\text{NO}_3^-$ . Our work has therefore enriched our understanding of how NRT1.1 controls lateral root emergence, and highlighted a post-transcriptional regulation of NRT1.1 in aerial parts.

**Keywords :** NRT1.1,  $\text{NO}_3^-$ , Auxin, Cellular Traffic, Root development