



**HAL**  
open science

# Caractérisation du rôle de gènes PTR d'Arabidopsis thaliana dans le transport de NO<sub>3</sub>-

Geneviève Canivenc

► **To cite this version:**

Geneviève Canivenc. Caractérisation du rôle de gènes PTR d'Arabidopsis thaliana dans le transport de NO<sub>3</sub>-. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Montpellier 2 (Sciences et Techniques), 2005. Français. NNT: . tel-02833592

**HAL Id: tel-02833592**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02833592v1>**

Submitted on 7 Jun 2020

**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.

Université Montpellier II  
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

T H E S E  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Physiologie végétale et biologie moléculaire  
Formation Doctorale : Développement et adaptation des plantes  
Ecole Doctorale : Biologie Intégrative

présentée et soutenue publiquement par  
Geneviève Canivenc  
le  
12 juillet 2005

Titre :  
Caractérisation du rôle de gènes *PTR* d'*Arabidopsis thaliana*  
dans le transport de  $\text{NO}_3^-$

JURY

M. Alain Gojon, Directeur de Recherche, INRA  
M. Bertrand Hirel, Directeur de Recherche, CNRS  
M. Marc Lepetit, Chargé de Recherche, INRA  
M. Anis Limami, Professeur, Université d'Angers  
M. Bruno Touraine, Professeur, Université Montpellier II

Directeur de thèse  
Rapporteur  
Examineur  
Rapporteur  
Président du jury

## Remerciements

Voici maintenant presque 5 ans que je suis à B&PMP. Allons-y pour un bon gros lieu commun, pas trop cuit s'il vous plaît, non çui d'à coté plutôt. 5 ans c'est long et c'est court en même temps. 5 ans c'est 1 sixième de ma vie, un peu plus même.

Qu'ai je donc fait de ce 1 sixième. Rien à voir avec ce dont j'avais rêvé petite pour moi quand je serais grande. A la place, j'ai plutôt fait une thèse. Oui, mais encore ?

J'ai observé, beaucoup. Et j'ai appris, beaucoup.

J'ai observé et appris sur les plantes, sur l'azote, sur la recherche. Ca, c'est un point de vue.

J'ai passé des nuit à dormir par tranches de 2h pour regarder des mauvaises herbes transpirer. J'ai supplié un vendeur héberlué à l'heure de la fermeture de me vendre ses vieilles ampoules de Noël vertes parce que ma vie en dépendait. J'ai croisé les doigts et les orteils en regardant des galettes de sucre pleines de produits cancérigènes. J'ai secoué des tubes en espérant qu'il se produise des trucs un peu improbables à l'intérieur. J'ai veillé amoureusement des ptites bêtes que normalement on trouve dans les intestins sauf que là je leur donnai du distillat irradié de carcasse de bête morte à manger. C'est un autre point de vue, auquel j'adhère tout autant qu'au premier.

J'ai observé et appris sur les autres, moi avec les autres quand ça se passe bien, moi avec les autres quand ça se passe moins bien, moi toute seule... et puis un jour j'ai compris ce que je suis venue faire là. Sans doute l'enseignement le plus précieux de ma thèse.

Je souhaite remercier les personnes de qui j'ai aimé être accompagnée, sans qui toutes ces expériences n'auraient jamais eu lieu, ou auraient été tellement moins riches.

Tout d'abord ma Grand-Mère. J'aurais voulu écrire de très belles phrases pour dire ma gratitude de tout ce qu'elle m'a offert, mais très sincèrement je sèche. Plutôt que

me résoudre à un verbiage pathétique de platitude, je choisis du simple et direct :  
Merci Mamie, de tout cœur.

Il y a eu tant de gens pendant le temps du DEA et de la thèse. Certains juste croisés, d'autres rencontrés, d'autres encore que je garde précieusement de mes vies antérieures. Les gens-de-pas-du-labo qui m'ont apporté un bol d'air frais incroyable, vital même. Merci à eux et je confirme qu'elle est bonne c'te bière, surtout quand on est bien accompagnés. Il y a eu Ségolène et Jordane. Merci les Miss de votre soutien, de votre confiance et vos encouragements. Merci de tous les moments partagés avec chacune de vous.

Il y a eu les gens-du-labo. J'ai le sentiment que B&PMP est un labo à part... peut être est-ce simplement parce que je n'en ai pas encore connu assez pour me rendre compte. Peut être est-ce parce que le labo où l'on fait sa thèse est unique entre tous. Des gens géniaux, Yves, et Fabienne, et Nico. Les potes de promo, certains perdus de vue, d'autres pas et c'est cool. Seb, Greg et Alex que j'ai eu beaucoup de plaisir à connaître. Sans oublier tous ceux qui font tourner la boutique et cèdent avec bienveillance aux caprices tourmentés des thésards, Sophie, Franck, Hughes, Michèle, Chantal, Didier, Françoise, Gillou.

Il y a eu Claude Grignon, que je souhaite remercier pour-m'avoir-accueillie-dans-son-unité, oui... mais surtout d'avoir su trouver les quelques mots dont j'ai eu besoin pour reprendre courage en plusieurs occasions, et d'en avoir trouvé d'autres quand ils se sont imposés.

Il y a eu la « Intégration team ». J'ai aimé travailler dans cette équipe. Je l'ai vue beaucoup évoluer au cours de ma thèse, d'une petite unité quasi familiale, l'époque Stéphane, Céline, Hélène... jusqu'à aujourd'hui où Philippe et Patrick, ex-Développement comme moi nous on rejoint en passant par les arrivées progressives de Thomas, Gabriel, Laurence. Aujourd'hui une grosse équipe donc, mais pas formatée, ni industrielle, chacun y apportant sa touche personnelle, créant ainsi un climat que je considère comme unique. Je ne résiste pas à l'envie d'écrire quelques mots pour ceux qui m'ont le plus marqués.

Il y a eu Pascalou, qui doit tenir j'imagine la tête du top 50 des thésards azotés depuis des plombes. C'est parce qu'il le vaut bien. Il y a eu Judith, ma super colloc de bureau qui va beaucoup me manquer. Je remercie également ses parents, un charcutier allemand auteur de 3 douzaines de saucisses et l'effet papillon. Il y a eu

Marjorie, absolument adorable... trop peut être ? Je ne doute pas qu'elle apprenne vite, quelle que soit la voie qu'elle prenne. Il y a eu Houneida, très peu de temps pourtant, mais tellement attachante de part sa simplicité et sa gentillesse.

Il y a eu bien évidemment mes « Boss ». Bon, dire que tout s'est toujours passé sous les meilleurs auspices, faut pas pousser. C'est comme le choix des gènes candidats. On peut toujours essayer de convaincre qu'on les sort de la macro array mais ça n'est pas crédible. Bien sûr que nous ne vivons pas dans un monde merveilleux rempli de gentils lutins qui viennent faire les clonages pendant la nuit. Et pourtant je n'ai jamais cessé de penser que j'ai fait un des meilleurs choix possibles. J'ai eu beaucoup de difficultés. Beaucoup auraient laissé tomber mais pas Marc ni Alain. Quoiqu'ils en disent, ça n'est pas « normal ». Par contre, ça révèle de belles qualités humaines... qui viennent en plus de belles qualités scientifiques. Alors merci à vous deux, beaucoup.

Je finirais en remerciant deux femmes qui ont beaucoup compté pour moi. Je suis arrivée à B&PMP avec la ferme intention de faire une thèse. Mais ça ne m'est pas tombé du ciel. Avant, il y a eu Lolotte, à Toulouse, qui a attendu de m'avoir donné envie de continuer pour s'arrêter. Et avant encore, il y a eu Cathy qui m'a donné envie de commencer. Merci à elles.

Cher ami lecteur qui a pris le temps de te plonger dans mes remerciements avant de t'adonner à la lecture Ô combien passionnante de la « Caractérisation du rôle de gènes PTR d'*Arabidopsis thaliana* dans le transport de  $\text{NO}_3^-$  », je ne retiendrais pas plus longtemps : place à la science :o)

## -ABREVIATIONS-

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADNg : ADN génomique

AMT : ammonium transporter (transporteur d'ammonium)

ANR : activité nitrate réductase

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ATP : adénosine triphosphate

ATPase : adenosine triphosphatase

B : bruit de fond local

BET : bromure d'éthyldium

cHATS : HATS constitutif

cLATS : LATS constitutif

Col : Ecotype Columbia

DNase : desoxyribonucléase

dNTP : désoxyribonucléotide triphosphate (A, adénosine, T : thymine, G : guanine, C : cytosine)

EDTA : éthylène diamine tétracétate

ES : exsudation spontanée

EST : expressed sequence tag (séquence marqueur expérimental de l'expression d'un gène)

Fd : ferredoxine

Fl : fleur

GFP : green fluorescent protein (protéine à fluorescence verte)

GOGAT : glutamate synthase

GS : glutamine synthetase

GSNO : S-nitrosoglutathione

GST : gene sequence tag (portion de transcrit spécifique d'un gène)

H : hampe florale

HATS : high affinity transport system (système de transport à haute affinité)

HR : humidité relative

HY : hydroponie

iHATS : HATS inductible

iLATS : LATS inductible

KO : knock out (interrompu)

LATS : low affinity transport system (système de transport à basse affinité)

MES : acide 2-(N-morpholino)ethane sulfonique

MF : matière fraîche

MOPS : acide 3-(N-morpholino)-propane sulfonique

MS : matière sèche

MSO : L-méthionine sulfoximine

NiR : nitrite réductase

NNEDD : N-naphtyl ethylène diamine dichlorure

NNP : nitrate nitrite porter (perméase à  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{NO}_2^-$ )

NR : nitrate réductase

P : pressurisation

PA : partie aérienne

pb : paire de bases

PCR : polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)

PTFE : polytetrafluoroethylene

PTIO : nitronyl nitroxyde

PTR : peptide transporter (transporteur de peptide)

qté : quantité

R : racine

RT-PCR : reverse transcription-PCR (PCR réalisée sur une matrice issue d'une transcription inverse)

Sb : signal brut

SDS : sodium dodecyl sulfate

Sn : signal net normalisé

SNP : nitroprusside de sodium

Sr : Signal réel

SSC : standard saline citrate

StT2 : signal théorique d'une cible T2

TAE : solution contenant 40mM de Tris-HCl, 20mM d'acétate de sodium et 1mM d'EDTA pH 7,8

TE : solution contenant 10mM de Tris-HCl pH8 et 1mM d'EDTA

T-test : test de student

Tris : tris-(hydroxyméthyl)-aminoéthane

vs : versus

WS : Ecotype Wassilewskija



## -TABLE DES MATIERES-

<b>1</b>	<b>CHAPITRE I : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Les sources de N des plantes.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Prélèvement de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> .....</b>	<b>2</b>
1.2.1	Aspects thermodynamiques et electrophysiologiques.....	2
1.2.2	Aspects cinétiques .....	3
1.2.3	Aspects moléculaires.....	5
<b>1.3</b>	<b>Le devenir de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> dans la plante.....</b>	<b>9</b>
1.3.1	Compartimentation.....	9
1.3.2	Translocation vers les parties aériennes .....	10
1.3.3	Assimilation .....	12
<b>1.4</b>	<b>La régulation de l'acquisition de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> .....</b>	<b>15</b>
1.4.1	Régulation et Intégration.....	15
1.4.2	Induction de l'absorption et de l'assimilation par NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .....	16
1.4.3	Répression par les produits de l'assimilation de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .....	18
1.4.4	Régulation par la lumière et les sucres.....	20
<b>1.5</b>	<b>Objectifs du travail.....</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>Techniques en biologie moléculaire.....</b>	<b>23</b>
2.1.1	Extraction d'ADN génomique de plante.....	23
2.1.2	Extraction et purification de l'ADN plasmidique de E.coli .....	23
2.1.3	Amplification de fragment d'ADN par PCR.....	24
2.1.4	Electrophorèse de l'ADN en gel d'agarose.....	24
2.1.5	Purification de fragments d'ADN en gel d'agarose.....	25
2.1.6	Synthèse d'ADN complémentaire.....	25
<b>2.2</b>	<b>Matériel et techniques de clonage.....</b>	<b>25</b>
2.2.1	Plasmides.....	25
2.2.2	Matériel bactérien.....	26
2.2.3	Construction de molécules d'ADN recombinantes.....	26
2.2.4	Transformation bactérienne par choc thermique et sélection des transformants	27

<b>2.3</b>	<b>Extraction et analyse des ARN de plantes .....</b>	<b>27</b>
2.3.1	Extraction des ARN totaux .....	27
2.3.2	Caractérisation des ARN par hybridation moléculaire .....	28
<b>2.4</b>	<b>Matériel végétal et techniques de cultures .....</b>	<b>32</b>
2.4.1	Matériel végétal.....	32
2.4.2	Culture en serre .....	32
2.4.3	Culture hydroponique.....	33
<b>2.5</b>	<b>Mesure de paramètres physiologiques .....</b>	<b>33</b>
2.5.1	Dosage d'ions.....	33
2.5.2	Absorption de $^{15}\text{NO}_3^-$ .....	34
2.5.3	Absorption de $^{35}\text{S}$ et $^{33}\text{P}$ .....	37
2.5.4	Mesure de transpiration.....	37
2.5.5	Récolte de sève.....	38
<b>3</b>	<b>CHAPITRE III : ETUDE TRANSCRIPTOMIQUE DE L'EXPRESSION DES GENES DE LA FAMILLE PTR .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>39</b>
<b>3.2</b>	<b>Identification <i>in silico</i> des membres de la famille PTR chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....</b>	<b>41</b>
<b>3.3</b>	<b>Identification <i>in silico</i> des membres de la famille PTR chez tous les êtres vivants .....</b>	<b>42</b>
<b>3.4</b>	<b>Définition et production des GST des gènes PTR d'<i>Arabidopsis</i>.....</b>	<b>43</b>
<b>3.5</b>	<b>Composition et structure de la membrane thématique .....</b>	<b>45</b>
<b>3.6</b>	<b>Elaboration de la procédure de normalisation des données.....</b>	<b>46</b>
3.6.1	Calcul du signal d'hybridation .....	46
3.6.2	Variation du signal d'hybridation en fonction de la distance de la GST à l'extrémité 3' du transcrit.....	47
3.6.3	Méthode de normalisation destinée à corriger les variations d'efficacité de transcription inverse.....	47
3.6.4	Test de la méthode de normalisation.....	49
<b>3.7</b>	<b>Profils d'expression des gènes de la famille PTR.....</b>	<b>50</b>
3.7.1	Données générales.....	50
3.7.2	Localisation de l'expression dans la plante.....	50
3.7.3	Réponse à la carence en N et à la levée de carence.....	50
3.7.4	Réponse à la lumière et au saccharose .....	52
<b>4</b>	<b>CHAPITRE IV ANALYSE COMPAREE DE L'EXPRESSION DES GENES <i>AtNRT1.1</i>, <i>AtNRT1.2</i> ET <i>AtNRT1.5</i> .....</b>	<b>54</b>
<b>4.1</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>54</b>
<b>4.2</b>	<b>Territoires d'expression.....</b>	<b>55</b>

<b>4.3</b>	<b>Alternance jour /nuit.....</b>	<b>56</b>
<b>4.4</b>	<b>Effet de la source de N .....</b>	<b>57</b>
4.4.1	Effet de $\text{NO}_3^-$ .....	57
4.4.2	Effet de $\text{NH}_4^+$ .....	58
4.4.3	Effet de $\text{NO}_2^-$ .....	59
4.4.4	Effet du pH externe et de la disponibilité de $\text{K}^+$ .....	60
<b>4.5</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>61</b>
<b>5</b>	<b>CHAPITRE V : ETUDE DE MUTANTS ADN-T .....</b>	<b>66</b>
<b>5.1</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>66</b>
<b>5.2</b>	<b><i>atnrt1.5 ::T</i>.....</b>	<b>68</b>
5.2.1	Morphologie .....	68
5.2.2	Absorption des anions ( $\text{NO}_3^-$ , $\text{SO}_4^{2-}$ , $\text{PO}_4^{3-}$ ) .....	68
5.2.3	Translocation des anions .....	69
5.2.4	Analyse par membrane basse densité du transcriptome d' <i>atnrt1.5 ::T</i> .....	73
<b>5.3</b>	<b>Caractérisation des activités HATS et LATS de <math>\text{NO}_3^-</math> chez le mutant <i>atnrt1.2 :: T</i> .....</b>	<b>75</b>
<b>5.4</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>76</b>
	<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>82</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>86</b>

# 1 Chapitre I

## INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

### 1.1 Les sources de N des plantes

L'azote est un des macroéléments majeurs des végétaux. Chez *Arabidopsis thaliana* il représente environ 5% de la biomasse sèche.

La forme la plus abondante de N dans la biosphère est  $N_2$  (80% de l'air). Seuls des bactéries ou des champignons disposent de la machinerie cellulaire permettant d'assimiler directement  $N_2$ . Certaines plantes, en particulier les légumineuses, peuvent former des symbioses avec des organismes fixateurs de  $N_2$  (Limpens et Bisseling, 2003). La base du partenariat est la fourniture à la plante d'une source de N réduit par son symbiote qui bénéficie en retour d'assimilats carbonés. Un cas encore plus particulier de nutrition azotée dans le règne végétal est celui des plantes carnivores. Ces espèces ont des organes spécialisés qui permettent la capture d'animaux dont la digestion libère une source de N pour la plante (Trinchant *et al.*, 1997). La plupart des espèces se nourrissent essentiellement à partir de N minéral prélevé du sol (Tischner, 2000).

Les formes minérales de N de la solution du sol les plus disponibles pour les plantes sont  $NH_4^+$  et  $NO_3^-$ .  $NH_4^+$  est généralement présent dans les sols à de très faibles concentrations et n'atteint l'ordre du mM qu'après apport de fertilisants azotés (Marschner, 1995).  $NH_4^+$  est une forme plus réduite de N que  $NO_3^-$ . Son assimilation est en théorie énergétiquement moins coûteuse en équivalent ATP que celle de  $NO_3^-$  (Salsac *et al.*, 1987, Bloom *et al.*, 1992). Cependant beaucoup d'espèces végétales et en particulier les herbacées et les plantes cultivées supportent mal une nutrition azotée exclusivement à base de  $NH_4^+$  qui provoque un syndrome ammoniacal (arrêts de la croissance, chloroses, mort, Chaillou et Lamaze, 1997). Il faut noter l'exception notable de ligneux qui ne souffrent pas de sensibilité au  $NH_4^+$ , grâce à une organisation métabolique différente des herbacées (Salsac *et al.*, 1987).  $NO_3^-$  est généralement plus abondant dans les sols que  $NH_4^+$  (Marschner, 1995). C'est

Concentration de $\text{NO}_3^-$ externe ( $C_e$ en mM)	10	1	0,1
Concentration de $\text{NO}_3^-$ interne ( $C_i$ en mM)	4,5	4,3	3,6
R.T.ln( $C_i/C_e$ ) (en $\text{kJ.mol}^{-1}$ )	-2	3,6	8,9
z.F.E (en $\text{kJ.mol}^{-1}$ )	11	11	11
$\mu_i - \mu_e$ (en $\text{kJ.mol}^{-1}$ )	9	14,6	18,9

Tableau 1.1 : **Variation de la différence de potentiel électrochimique pour différentes concentrations de  $\text{NO}_3^-$ .**

Potentiel chimique:  $\mu = \text{Cste} + R.T.\ln(C) + z.F.E$ . Constante des gaz parfaits:  $R = 8,31 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ . Faraday:  $F = 96500 \text{ Cb}$ . Température de mesure:  $T = 298 \text{ K}$ . Valence de  $\text{NO}_3^-$ :  $z = -1$ . Le potentiel électrique a été fixé à  $-110 \text{ mV}$ , valeur couramment mesurée au niveau de la racine d'*Arabidopsis* (Maathuis et Sanders, 1993). Les concentrations en  $\text{NO}_3^-$  sont tirées de Miller et Smith (1996).

cependant une ressource très fluctuante car l'anion n'est pas retenu par les colloïdes du sol et est fortement lessivable.  $\text{NO}_3^-$ , en tant que ressource exclusive ne pose pas les mêmes problèmes que  $\text{NH}_4^+$  et permet une croissance normale des plantes (Cox et Reisenauer, 1973, Chaillou *et al.*, 1986, Rideout *et al.*, 1994). En dehors de conditions environnementales particulières (anaérobiose, sols très acides), la plupart du temps les plantes ont une nutrition mixte  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ , les ressources en N étant soumises à de fortes variations dans l'espace et dans le temps. En présence de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  est absorbé sans que cela induise de syndrome ammoniacal (Chaillou et Lamaze, 1997)

Au bilan, compte tenu des ressources des différentes sources de N disponibles dans les sols, la plupart des plantes, en particulier celles d'intérêt agronomique, ont une nutrition azotée mixte au moins partiellement voire majoritairement nitrrique.

## 1.2 Prélèvement de $\text{NO}_3^-$

### 1.2.1 Aspects thermodynamiques et électrophysiologiques

L'absorption nette de  $\text{NO}_3^-$  est le bilan d'influx et d'efflux unidirectionnels. La concentration de  $\text{NO}_3^-$  dans la solution du sol est extrêmement fluctuante. Elle peut varier de quelques micromoles par litre à près d'une centaine de millimoles par litre (Marschner, 1995). La mesure directe de la concentration cytoplasmique et vacuolaire de  $\text{NO}_3^-$  dans les cellules corticales de la racine a été réalisée grâce à l'utilisation de microélectrodes spécifiques (Miller et Smith, 1996). Ces données permettent de prédire que l'ion est absorbé contre le gradient de potentiel électrochimique (Tableau 1.1). Une absorption passive de  $\text{NO}_3^-$  dans ces conditions nécessiterait une concentration externe de 400mM. Il est donc admis que l'entrée de  $\text{NO}_3^-$  dans la racine est un phénomène « actif » tandis que la sortie est un phénomène « passif ».

La nature du mécanisme de transport actif reste hypothétique. L'utilisation d'inhibiteurs métaboliques a permis de montrer que l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  est dépendante plus ou moins directement de la fourniture d'ATP (Bloom *et al.*, 1992). Plusieurs hypothèses basées sur l'existence d'un couplage chimio-osmotique ont été proposées. L'hypothèse la plus couramment admise est celle d'un co-transport avec des ions  $\text{H}^+$ . Un des arguments suggérant ce couplage est la dépolarisation des cellules de la racine lorsqu'elles sont mises en contact avec  $\text{NO}_3^-$ , l'entrée de  $\text{NO}_3^-$  étant associé a un flux entrant de  $\text{H}^+$  (Glass *et al.*, 1992). Le nombre de  $\text{H}^+$  accompagnant l'entrée d'une molécule de  $\text{NO}_3^-$  a été évalué à 2 (Glass *et al.*, 1992, Meharg et Blatt, 1995, Miller et Smith, 1996). L'influx de  $\text{NO}_3^-$  est donc associé à une

alcalinisation transitoire du milieu externe, due à un influx de protons, qui est suivie d'une acidification due à la stimulation de l'activité  $H^+$ -ATPase (Glass *et al.*, 1992). La caractérisation électrophysiologique d'AtNRT1.1, le premier transporteur de  $NO_3^-$  identifié chez les plantes, a renforcé l'hypothèse du co-transport avec des ions  $H^+$ . En effet lorsque ce transporteur est exprimé dans l'ovocyte de Xénope un courant entrant est observé en présence de  $NO_3^-$ , ce qui est interprété comme la résultante du transport simultané de  $NO_3^-$  et de  $H^+$ . Il n'existe cependant pour l'instant aucune donnée directe permettant de confirmer définitivement cette hypothèse. En effet, l'entrée d'1  $H^+$  et la sortie d'1  $OH^-$  sont deux phénomènes équivalents tant au niveau électrique qu'en terme de pH. La sortie d'un  $OH^-$  d'une cellule peut également se faire sous la forme d'un carbonate. Il a été proposé que l'énergisation du transport de  $NO_3^-$  se fasse par un antiport avec des ions  $OH^-$  ou  $HCO_3^-$  plutôt qu'un symport avec des ions  $H^+$  (Grignon *et al.*, 1997). Cette hypothèse est relativement délaissée même si elle n'a jamais été écartée. Seule la caractérisation moléculaire et électrophysiologique fine de l'activité des transporteurs permettrait de valider ces modèles.

Les mécanismes qui contrôlent la sortie de  $NO_3^-$  de la cellule sont très mal connus. D'un point de vue thermodynamique le flux est passif et théoriquement peut avoir lieu à travers des canaux plus ou moins sélectifs. L'exploration électrophysiologique des différents types cellulaires de la plante a montré qu'il existe sur les membranes de nombreuses conductances anioniques capable d'exporter  $NO_3^-$  vers l'extérieur de la cellule. Dans les cellules de garde, il existe des canaux anioniques sortants qui sont impliqués dans l'ouverture du stomate (Schroeder et Keller, 1992, Roelfsema *et al.*, 2004). Dans la stèle d'orge et de maïs, plusieurs conductances, dont l'activité est contrôlée par le potentiel membranaire, sont susceptibles d'être impliquées dans la sécrétion de  $NO_3^-$  vers la sève du xylème (Wegner et Raschke, 1994, Kohler et Raschke, 2000, Kohler *et al.*, 2002, Gilliam et Tester, 2005). Aucun transporteur d'efflux de  $NO_3^-$  n'ayant été identifié au niveau moléculaire chez les plantes supérieures, la nature des mécanismes contrôlant l'efflux de  $NO_3^-$  reste hypothétique.

## 1.2.2 Aspects cinétiques

Le prélèvement de  $NO_3^-$  par la racine a été intensivement étudié depuis le début des années 70, notamment grâce à des isotopes radioactif ( $^{13}N$ ) ou lourd ( $^{15}N$ ). Les études utilisant le  $^{13}N$  se heurtent à la difficulté posée par la demie vie très courte de cet élément (environ 10 minutes) qui oblige à réaliser les expériences sur le site de synthèse du  $^{13}N$ . Le développement dans les années 80 des techniques de spectrométrie de masse a permis une plus grande

souplesse des expériences et une avancée très rapide de la caractérisation des cinétiques d'absorption de  $\text{NO}_3^-$ . L'utilisation de ces isotopes permet non seulement de mesurer le prélèvement de  $\text{NO}_3^-$  mais aussi de discriminer l'influx et l'efflux de l'ion. La mesure d'influx est réalisée en temps court (ordre de grandeur 5 minutes). Dans les premières minutes de marquage, l'isotope lourd se dilue dans le pool cytosolique racinaire de  $\text{NO}_3^-$  et l'efflux de  $\text{NO}_3^-$  marqué reste négligeable. En temps long (plus de 30 minutes) la proportion relative de  $\text{NO}_3^-$  marqué devient plus importante et l'efflux de  $\text{NO}_3^-$  marqué de la racine devient non négligeable. La mesure d'absorption est le bilan net entre l'influx et l'efflux. Les données disponibles dans la littérature concernent presque exclusivement l'influx. Bien que des variations d'efflux de  $\text{NO}_3^-$  puissent être mises en évidence (Deane-Drummond et Glass, 1983, Lee et Clarkson, 1986), dans la plupart des cas décrits, les variations d'absorption nette de  $\text{NO}_3^-$  s'expliquent par des modifications de l'influx (Lee, 1993, Clarkson et Lüttge, 1991). De ce fait, l'opinion générale est que le contrôle de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  dans la plante est assuré par la régulation de l'influx.

Par analogie avec les enzymes on peut caractériser l'activité d'un transporteur d'ion par une analyse cinétique qui décrit la vitesse de transport en fonction de la concentration du substrat transporté (Epstein et Hagen, 1952, Epstein *et al.*, 1963, Epstein, 1966). L'étude de l'influx racinaire de  $\text{NO}_3^-$  en fonction de sa disponibilité dans le milieu extérieur a été réalisée chez de nombreuses espèces (Siddiqi et Glass, 1993). Dans la plupart des cas, la cinétique observée est biphasique. Cette cinétique est généralement modélisée comme la somme de deux composantes élémentaires correspondant à des mécanismes de transport à haute et basse affinité. Le mécanisme de haute affinité (High Affinity Transport System), responsable de l'essentiel de l'absorption dans les basses concentrations de  $\text{NO}_3^-$  (<0.5 mM), présente une cinétique saturable ajustable à un modèle de Michaelis-Menten ( $K_M$  de l'ordre la dizaine de micromolaires). Le mécanisme de basse affinité (Low Affinity Transport System) a une cinétique non saturable qui peut être modélisée par une fonction linéaire. Ces deux types de mécanismes correspondraient à des types de transporteurs différents. Il est probable que chaque mécanisme résulte de l'activité de plusieurs types de transporteurs différents.



## 1.2.3 Aspects moléculaires

### 1.2.3.1 Transporteurs de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

Depuis une dizaine d'années des transporteurs de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ont été identifiés chez plusieurs espèces végétales (Forde, 2000). Les gènes codant ces protéines sont trouvés dans 2 familles multigéniques : la famille *PTR* aussi appelée *NRT1* ou *POT* et la famille *NRT2* aussi appelée *NNP*. C'est chez *Arabidopsis* que la caractérisation de ces gènes est la plus avancée grâce aux travaux réalisés sur les gènes *AtNRT1.1* (*CHL1*) et *AtNRT2.1*, dont l'expression et le rôle dans le transport de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ont été caractérisés en détail. Le séquençage intégral du génome d'*Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) a permis d'identifier les membres de la famille *NRT2* par homologie de séquence. Chez cette espèce, il existe 7 gènes *NRT2* (*AtNRT2.1* à *AtNRT2.7*, Orsel *et al.*, 2002b, Okamoto *et al.*, 2003). Au début de la thèse, l'effectif de la famille *PTR* d'*Arabidopsis* n'était pas précisément connu. Il est admis aujourd'hui qu'elle compte 51 membres. Les 51 gènes ne codent pas tous des transporteurs de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> comme *AtNRT1.1*, certains membres ayant été caractérisés comme des transporteurs de peptides (Rentsch *et al.*, 1995, Chiang *et al.*, 2004, Dietrich *et al.*, 2004). Il a été proposé de regrouper ces deux familles au sein du vaste ensemble MFS (Major Facilitator Family, Pao *et al.*, 1998). La superfamille MFS regroupe des transporteurs, des symporteurs, des antiporteurs, qui ont en commun une topologie prédite avec 12 (ou 14 dans certains cas) segments transmembranaires. En dehors de cette structure générale il n'y a pas de similarité de séquence entre les membres de la famille *PTR* et ceux de la famille *NRT2* (Orsel *et al.*, 2002a). Il n'est pas possible d'identifier de motif conservé commun.

### 1.2.3.2 Famille NRT2

Le premier transporteur de type NRT2 identifié est CRNA chez *Aspergillus nidulans*. Il a été identifié grâce à un mutant résistant au chlorate présentant un défaut de prélèvement de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Brownlee et Arst, 1983). Le profil d'hydrophobicité de CRNA suggère que la protéine est membranaire (Unkles *et al.*, 1991). Il a été montré par expression en ovocyte de Xénope que la protéine transporte NO<sub>3</sub><sup>-</sup> avec une forte affinité pour l'ion (Zhou *et al.*, 2000b). Deux résidus arginines situés dans les hélices transmembranaires 2 et 8 ont un rôle essentiel dans la fixation de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sur CRNA. Le remplacement d'un de ces résidus par une lysine augmente le

$K_m$  du transport d'un facteur 30 à 300 (Unkles *et al.*, 2004). Des transporteurs homologues à CRNA ont été identifiés chez *Clamydomonas rhenardtii*, CrNRT2.1 (NAR3) et CrNRT2.2 (NAR4) (Quesada *et al.*, 1994). Il a été montré que la fonction de transport de  $\text{NO}_3^-$  nécessite l'expression de *NAR2* en plus des gènes *NRT2*, suggérant que le transporteur de  $\text{NO}_3^-$  est un système à deux composantes chez cette espèce (Quesada *et al.*, 1994). Cette hypothèse a été validée par des expériences de co-expression en ovocyte de Xénope (Zhou *et al.*, 2000a). La caractérisation des transporteurs de type NRT2 chez *Aspergillus nidulans* et *Clamydomonas rhenardtii* a ouvert la voie à la recherche de gènes homologues chez les plantes supérieures. Des gènes NRT2 ont été identifiés chez plusieurs espèces : *Arabidopsis thaliana* (Filleur et Daniel-Vedele, 1999, Zhuo *et al.*, 1999, Orsel *et al.*, 2002b) *Nicotiana plumbaginifolia* (Quesada *et al.*, 1997, Krapp *et al.*, 1998), le tabac (Krapp *et al.*, 1998), l'orge (Trueman *et al.*, 1996, Vidmar *et al.*, 2000), le soja (Amarasinghe *et al.*, 1998), le colza (Faure-Rabasse *et al.*, 2002), la tomate (Ono *et al.*, 2000, Hildebrandt *et al.*, 2002) et le maïs (Quaggiotti *et al.*, 2003, Santi *et al.*, 2003) Chez *Arabidopsis*, l'expression des 7 gènes de la famille a pu être mise en évidence dans différents organes (Orsel *et al.*, 2002b, Okamoto *et al.*, 2003). La caractérisation de l'activité de transport de  $\text{NO}_3^-$  des protéines NRT2 de plantes supérieures par expression dans des levures pouvant utiliser  $\text{NO}_3^-$  comme source de N, ou chez l'ovocyte de Xénope s'est heurtée à des difficultés importantes (Forde, 2000). Ces difficultés s'expliquent par l'existence d'un système de transport à deux composantes comme chez *Chlamydomonas*. Il existe en effet des gènes homologues à *NAR2* chez les plantes supérieures. Chez l'orge la co-expression dans l'ovocyte de Xénope des gènes *HvNRT2.1* et *HvNAR2.3* a permis de mettre en évidence une activité de transport de  $\text{NO}_3^-$  (Tong *et al.*, 2005). Le partenariat semble relativement spécifique, le transport de  $\text{NO}_3^-$  n'ayant été obtenu que pour une combinaison particulière de protéines NAR2/NRT2. D'autres preuves expérimentales ont suggéré l'implication des protéines NRT2 de plantes dans le prélèvement de  $\text{NO}_3^-$  à haute affinité. Les nombreux travaux concernant *AtNRT2.1* d'*Arabidopsis* ou *NpNRT2.1* de *Nicotiana plumbaginifolia* publiés à ce jour montrent que l'expression de ces gènes est trouvée dans les cellules de la zone corticale de la racine mature et qu'elle est très bien corrélée avec l'activité du HATS de  $\text{NO}_3^-$  (Lejay *et al.*, 1999, Zhuo *et al.*, 1999, Cerezo *et al.*, 2001, Okamoto *et al.*, 2003, Nazon *et al.*, 2003). Par ailleurs, le mutant d'*Arabidopsis atnrt2a*, chez lequel les gènes *AtNRT2.1* et *AtNRT2.2* sont inactivés par délétion, présente un déficit de prélèvement de  $\text{NO}_3^-$  dans les basses concentrations (Filleur *et al.*, 2001, Cerezo *et al.*, 2001). L'inactivation d'*AtNRT2.1* est supposée jouer un rôle essentiel dans ce phénotype,

puisque la capacité d'absorption de  $\text{NO}_3^-$  à haute affinité est restaurée chez le mutant complémenté avec *NpNRT2.1* exprimé de manière constitutive (Filleur *et al.*, 2001).

### 1.2.3.3 Famille PTR

Le premier transporteur de la famille identifié chez les plantes supérieures est le gène *AtNRT1.1* d'*Arabidopsis* (Tsay *et al.*, 1993). Le gène correspond au locus de résistance au chlorate *CHL1*. Le chlorate ( $\text{ClO}_3^-$ ) est un analogue imparfait de  $\text{NO}_3^-$ . Il peut être prélevé par les plantes puis réduit en chlorite, toxique pour la vie cellulaire. Il a été fréquemment utilisé par les généticiens des microorganismes et des plantes pour sélectionner des mutants affectés sur les gènes codant la nitrate réductase (NR) qui est l'enzyme qui catalyse la première étape de réduction de  $\text{NO}_3^-$ . Chez les mutants *chl1*, la résistance est due une réduction de l'absorption du chlorate dont la cause est l'inactivation du gène *AtNRT1.1*. Le gène a été cloné grâce à un mutant d'insertion ADN-T *chl1* (Tsay *et al.*, 1993). Le gène code une protéine hydrophobe à 12 domaines transmembranaires potentiels. L'expression d'*AtNRT1.1* dans l'ovocyte de Xénope s'accompagne d'un transport de  $\text{NO}_3^-$ . Il est possible que  $\text{NO}_3^-$  ne soit pas le seul substrat de ce transporteur. Les études d'expression dans l'ovocyte de Xenope d'un homologue d'*AtNRT1.1* chez le colza a montré que la protéine est capable de transporter de l'histidine, de l'arginine ou de la lysine en plus du  $\text{NO}_3^-$  (Zhou *et al.*, 1998). L'inactivation d'*AtNRT1.1* chez *Arabidopsis*, provoque une diminution de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  dans le domaine des fortes concentrations, ce qui a suggéré que ce transporteur contribuait exclusivement au LATS (Huang *et al.*, 1996, Touraine et Glass, 1997). Cependant, le gène contribue aussi au HATS dans certaines conditions et doit être considéré comme un transporteur à affinité duale (Wang *et al.*, 1998, Liu *et al.*, 1999, Munos *et al.*, 2004). Des travaux récents montrent qu'*AtNRT1.1* existe dans 2 états de phosphorylation différents qui permettent la transition entre les 2 gammes d'affinité (Liu *et al.*, 1999). Si l'impact de l'inactivation d'*AtNRT1.1* sur l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  a été mis en évidence par plusieurs groupes, en revanche aucune modification du transport des acides aminés ou de peptides n'a jamais été décrit chez un mutant *chl1*. *AtNRT1.2* et *AtNRT1.4*, 2 autres gènes appartenant à la famille *PTR* chez *Arabidopsis* ont été caractérisés en tant que transporteurs d'influx de  $\text{NO}_3^-$  en ovocyte de Xénope (Huang *et al.*, 1999, Chiu *et al.*, 2004). *AtNRT1.2* est exprimé dans les racines et des lignées anti-sens montrent un déficit de prélèvement de  $\text{NO}_3^-$  (Huang *et al.*, 1999). *AtNRT1.4* est exprimé majoritairement dans le pétiole (Chiu *et al.*, 2004). L'étude d'un mutant d'insertion chez lequel le gène est inactivé a montré qu'il participe à l'accumulation

de  $\text{NO}_3^-$  dans les feuilles. Par ailleurs le mutant présente également un développement foliaire perturbé ce qui suggère que la mutation a un effet pleiotrope.

D'autres transporteurs de la famille *PTR* sont identifiés pour d'autres fonctions que le transport de  $\text{NO}_3^-$ . AtPTR1 et AtPTR2 (NTR1, PTR2B) ont été caractérisés comme des transporteurs de peptides. Lorsqu'ils sont exprimés dans la levure, ces deux transporteurs sont capables de compléter des mutants déficients dans le transport de plusieurs types d'oligopeptides (Steiner *et al.*, 1994, Frommer *et al.*, 1994, Dietrich *et al.*, 2004). Des homologues de ces gènes ont été identifiés chez l'orge (West *et al.*, 1998) et la fève (Miranda *et al.*, 2003). L'activité des deux transporteurs d'*Arabidopsis* a été confirmée par expression en ovocyte de Xénope (Dietrich *et al.*, 2004, Chiang *et al.*, 2004). Ces transporteurs ne transportent pas  $\text{NO}_3^-$  (Chiang *et al.*, 2004, Dietrich *et al.*, 2004) malgré leur homologie de séquence avec AtNRT1.1, AtNRT1.2 et AtNRT1.4. Ils peuvent utiliser comme substrats plusieurs types de di- ou tri-peptides, mais pas des peptides plus longs ou portants des extensions d'acides gras. AtPTR1 et AtPTR2B sont exprimés respectivement dans les tissus vasculaires et les jeunes embryons, qui sont deux zones connues pour des échanges intenses de peptides (Rentsch *et al.*, 1995, Dietrich *et al.*, 2004). Des lignées anti-sens chez lesquelles le gène *AtPTR2* est partiellement inactivé ont une floraison précoce et un développement embryonnaire retardé probablement à cause d'un déficit de transport de peptides (Song *et al.*, 1997). Un autre transporteur de type PTR (*AgDCAT1*), impliqué dans l'efflux d'acides dicarboxyliques (malate, succinate, fumarate, oxaloacetate) a été isolé chez l'aulne glutineux (Jeong *et al.*, 2004). L'arbre est capable d'établir une symbiose fixatrice de  $\text{N}_2$  avec l'actinomycète *Frankia* et l'expression d'*AgDCAT1* est spécifique des nodules. L'activité de transport a été montrée par expression hétérologue dans l'ovocyte de Xénope et ainsi que par complémentation fonctionnelle d'un mutant d'*Escherichia Coli* affecté dans le transport de dicarboxylates. Ce transporteur pourrait avoir un rôle essentiel dans la fourniture d'assimilats carbonnés aux symbiotes, une fonction fondamentale pour que la symbiose puisse exister. A notre connaissance, c'est le seul transporteur PTR de ce type identifié. L'existence d'autres membres de la famille PTR impliqués dans le transport de dicarboxylates, chez des espèces capables de former des symbioses ou non, reste à démontrer.

Les données disponibles sur la famille PTR indiquent que cette famille regroupe des transporteurs dont les activités de transport sont diverses. Cependant nos connaissances sur le sujet restent extrêmement partielles. Chez *Arabidopsis*, moins de 10% des gènes ont une activité caractérisée. Aucun travail de caractérisation n'a été rapporté pour la plupart des gènes *PTR* et leurs fonctions restent inconnues.

## 1.3 Le devenir de $\text{NO}_3^-$ dans la plante

### 1.3.1 Compartimentation

Lorsqu'il est dans le cytosol, s'il n'est pas assimilé,  $\text{NO}_3^-$  peut être stocké dans les vacuoles. Des mesures avec des micro-électrodes spécifiques de  $\text{NO}_3^-$  ont montré que la concentration de l'ion dans le cytosol est maintenue relativement constante alors que celle de la vacuole peut varier fortement (van der Leij *et al.*, 1998). La compartimentation de l'ion entre cytoplasme et vacuole détermine probablement les importances relatives des fonctions d'assimilation et de mise en réserve de cet ion (Chiu *et al.*, 2004). La vacuole est une réserve d'ions qui peut être mobilisée par la cellule, notamment en situation de carence. Les analyses des flux de  $\text{NO}_3^-$  qui traversent la racine montrent que la fraction « circulante », en particulier celle correspondant au  $\text{NO}_3^-$  transporté de manière radiale jusqu'au xylème, est relativement indépendante de la fraction de  $\text{NO}_3^-$  séquestrée dans les vacuoles. Il n'y aurait que peu d'échange entre ces deux fractions de  $\text{NO}_3^-$  (MacKown *et al.*, 1981), exception faite des situations particulières de carence où les réserves de  $\text{NO}_3^-$  sont remobilisées (van der Leij *et al.*, 1998), et d'alimentation excédentaire où des réserves sont constituées (Forde et Clarkson, 1999).

Des préparations purifiées de vacuoles ont la capacité d'accumuler  $\text{NO}_3^-$  (Martinoia *et al.*, 1986, Kaestner et Sze, 1987). Compte tenu de l'importance relative des volumes du cytosol et de la vacuole, la quasi totalité du  $\text{NO}_3^-$  cellulaire peut être stockée dans ce compartiment (Salsac *et al.*, 1987). Le stockage dans la vacuole permet aux cellules de disposer d'une réserve de  $\text{NO}_3^-$  qui participe au maintien de leur turgescence (Salsac *et al.*, 1987). La différence de potentiel électrique à travers la vacuole (20 à 50 mV, face vacuolaire positive) favorise le transport des anions dans la vacuole (Martinoia *et al.*, 2000). Cependant, le gradient de concentration de  $\text{NO}_3^-$  entre cytoplasme et vacuole peut être suffisamment important pour qu'on admette l'existence d'un transport actif de  $\text{NO}_3^-$  vers la vacuole. Des expériences d'addition de  $\text{NO}_3^-$  dans des préparations de vésicules de tonoplaste purifié provoquent l'effondrement du gradient de pH, ce qui laisse présumer l'existence d'une activité d'antiport  $\text{H}^+/\text{NO}_3^-$  sur ces membranes (Martinoia *et al.*, 2000, Schumaker et Sze, 1987). De plus, le transfert de  $\text{NO}_3^-$  du cytoplasme à la vacuole correspond à une différence de potentiel deux à trois fois plus faible que celle libérée par le transfert de  $\text{H}^+$  vers le cytoplasme, ce qui indique qu'un tel échange est thermodynamiquement possible (Kaestner et Sze, 1987, Pope et

Leigh, 1987). Un tel transport serait très électrogène puisque son bilan net minimum est le transfert de 2 charges négatives (l'entrée de  $\text{NO}_3^-$  et la sortie de  $\text{H}^+$ ) vers la vacuole. La stimulation de l'entrée de  $\text{NO}_3^-$  dans la vacuole par l'ATP est en accord avec ce modèle qui suggère que les pompes à protons du tonoplaste ( $\text{H}^+$ -ATPase et pyrophosphatase) sont nécessaires à ce transport. Si l'entrée de  $\text{NO}_3^-$  dans la vacuole se fait contre le gradient de potentiels électrochimiques, la sortie de l'ion par contre est passive. Il est probable qu'elle ait lieu à travers des canaux anioniques plus ou moins spécifiques (Martinoia *et al.*, 2000). L'implication d'un symport  $\text{H}^+/\text{NO}_3^-$  a été suggéré (Blumwald et Poole, 1985).

Bien qu'il existe des modèles mécanistiques capables d'expliquer le stockage et la sortie de  $\text{NO}_3^-$  de la vacuole, les données disponibles restent extrêmement parcellaires et les interprétations très spéculatives. L'absence totale d'identification des transporteurs impliqués limite fortement les progrès des connaissances dans ce domaine.

### 1.3.2 Translocation vers les parties aériennes

Pour que  $\text{NO}_3^-$  soit acheminé du milieu extérieur vers la stèle et les vaisseaux du xylème, l'ion doit transiter par l'apoplasme et le symplasme de la zone corticale de la racine. L'épiderme et le cortex délimitent un espace où les ions peuvent diffuser librement dans l'apoplasme. La surface membranaire de ces deux couches cellulaires constitue la surface d'échange effective entre le symplasme de la racine et la solution du sol. Au niveau de l'endoderme, la bande de Caspari est un obstacle à la diffusion libre des ions à travers l'apoplasme. L'altération mécanique de l'endoderme chez la racine mature de maïs modifie ses propriétés de perméabilité aux ions (Steudle *et al.*, 1993). Pour progresser vers les zones plus internes de la racine leur trajet doit donc être au moins partiellement symplasmique. On suppose que la sécrétion de  $\text{NO}_3^-$  dans le xylème est probablement assurée par des transporteurs membranaires (Hanson, 1978, Morgan *et al.*, 1985, Jackson *et al.*, 1986) dont le fonctionnement dépend du métabolisme énergétique (Ezeta et Jackson, 1975).  $\text{K}^+$ , le cation majeur des cellules végétales est généralement considéré comme l'ion accompagnateur de  $\text{NO}_3^-$  qui permet d'assurer l'électroneutralité du transport de l'ion. De fait les flux de  $\text{K}^+$  et de  $\text{NO}_3^-$  sont fortement corrélés, en particulier lors de l'étape de translocation vers les parties aériennes (Minotti *et al.*, 1968, Frost *et al.*, 1978, Rufty *et al.*, 1981).

La principale limite à l'étude des transports d'ions dans les zones profondes de la racines est l'inaccessibilité des tissus. L'analyse des cellules de la stèle, la collecte de sève du xylème nécessitent l'utilisation de méthodes destructives qui déstructurent l'organe et

rompent sa cohérence fonctionnelle. Les analyses menées avec ces méthodes destructives sont délicates à interpréter car il ne peut être exclu que la destruction au moins partielle des tissus puissent modifier les conditions physico-chimiques qui y règnent (Schurr et Schulze, 1995). Dans ces conditions, les teneurs en  $\text{NO}_3^-$  des différentes zones de la stèle, les différences de potentiel électrochimique pour  $\text{NO}_3^-$  entre les différents compartiments et le symplasme ne sont pas connus avec certitude (Miller et Smith, 1996, Siddiqi et Glass, 2002). De ce fait, il est difficile de déterminer avec précision les conditions thermodynamiques dans lesquelles opèrent les systèmes de transports qui permettent les flux de  $\text{NO}_3^-$ . Malgré ces difficultés, les données disponibles indiquent que l'entrée de  $\text{NO}_3^-$  dans le symplasme est un phénomène actif, et réciproquement sa sortie vers l'apoplasme et les vaisseaux du xylème est un phénomène qui se situe dans le sens du gradient de potentiel électrochimique de l'ion. Ceci est également vrai pour les autres macro éléments majeurs  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  pour lesquels la sécrétion vers la sève a lieu dans le sens du gradient de potentiel électrochimique de l'ion. Des canaux ioniques d'efflux perméables à  $\text{NO}_3^-$  ont été mis en évidence sur des protoplastes de parenchyme du xylème par des approches électrophysiologiques (Wegner et Raschke, 1994, Kohler et Raschke, 2000, Kohler *et al.*, 2002).

Pour l'instant aucun transporteur de  $\text{NO}_3^-$  impliqué dans l'étape de translocation n'est identifié au niveau moléculaire. Quelques données concernant des transporteurs impliqués dans la translocation d'autres macro éléments que  $\text{NO}_3^-$  ont été obtenues. L'étude d'un mutant d'*Arabidopsis* chez lequel le gène *SKOR* est interrompu par une insertion ADN-T a montré que ce gène qui code un canal potassique d'efflux joue un rôle important dans la sécrétion de  $\text{K}^+$  vers le xylème (Gaymard *et al.*, 1998). Il est probable que ce gène est impliqué dans la sortie de l'ion du symplasme au niveau de la stèle. Une forte diminution de la translocation de  $\text{PO}_4^{3-}$  des racines vers les parties aériennes a été décrit chez le mutant *pho1* d'*Arabidopsis* (Poirier *et al.*, 1991, Hamburger *et al.*, 2002). La protéine prédite PHO1 a 6 segments transmembranaires potentiels, mais son activité de transport n'a pour l'instant été ni démontrée, ni caractérisée. L'inactivation du gène *SOS1* d'*Arabidopsis* qui code un antiport  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  probablement impliqué dans la sortie de  $\text{Na}^+$  du symplasme est accompagné également d'un défaut de translocation de l'ion des racines vers les parties aériennes (Shi *et al.*, 2002). Le même mécanisme a été mis en évidence pour le transporteur de  $\text{BO}_4^{3-}$  BOR1 dont l'inactivation s'accompagne d'un déficit de translocation de l'ion (Takano *et al.*, 2002). Le gène *SULTR3.5* qui code un transporteur de  $\text{SO}_4^{2-}$  chez *Arabidopsis* est impliqué dans la translocation de cet ion. Ce transporteur est caractérisé dans la levure comme un transporteur d'influx ce qui suggère que la translocation de  $\text{SO}_4^{2-}$  des racines vers les parties aériennes est

le résultat d'activités de transport d'efflux mais aussi de transport d'influx. Il a été proposé que SULTR3.5 permet la réabsorption des ions présents dans l'apoplasme des cellules du cylindre central (Kataoka *et al.*, 2004). En limitant la fuite de  $\text{SO}_4^{2-}$  du symplasme, ce transporteur favoriserait sa sécrétion préférentielle dans la sève *via* les transporteurs d'efflux. Une fois dans le xylème,  $\text{NO}_3^-$  est exporté vers les parties aériennes. Le transfert des ions du xylème vers l'apoplasme des parties aériennes est très peu caractérisé.

### 1.3.3 Assimilation

Chez les herbacées l'essentiel de la réduction et de l'assimilation de  $\text{NO}_3^-$  a lieu dans les parties aériennes. Par exemple, chez *Arabidopsis*, 80% de l'assimilation de l'ion a lieu dans les feuilles (Lejay *et al.*, 1997). La réduction du  $\text{NO}_3^-$  en  $\text{NH}_4^+$  se fait en deux étapes successives (Beevers et Hageman, 1980). La première, cytosolique, est la réduction du  $\text{NO}_3^-$  en  $\text{NO}_2^-$  par la Nitrate Reductase (NR). La deuxième, plastidiale, est la réduction du  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{NH}_4^+$  par la Nitrite Reductase (NiR). La NR est une enzyme dimérique dont chaque sous unité est d'environ 110 kDa. Elle a 3 domaines fonctionnels associés à trois types de cofacteurs: le cofacteur à molybdène ou MoCo, l'hème et la flavine. Ces domaines forment un centre rédox qui permet le transfert de 2 électrons du NAD(P)H au  $\text{NO}_3^-$  (Crawford, 1995). Chez *Arabidopsis thaliana*, l'apoenzyme de la NR est codée par 2 gènes : *AtNIA1* et *AtNIA2*. *AtNIA2* est considérée comme l'isoforme majoritaire car l'inactivation du gène s'accompagne d'une baisse environ 50% de l'Activité Nitrate Réductase (ANR) du sauvage dans les racines et 30% dans les parties aériennes (Wilkinson et Crawford, 1991, Loqué *et al.*, 2003). Il est probable que ces valeurs sous estiment le rôle de cette isoforme car l'inactivation du gène s'accompagne de la sur expression du gène *AtNIA1* notamment dans les racines (Wilkinson et Crawford, 1993).

La NiR est une enzyme localisée dans les chloroplastes des feuilles et les plastes des racines (Crawford, 1995). C'est une enzyme monomérique de 60-64 kDa avec un groupement prosthétique de type sirohème (tétrahydroporphyrine à fer ferreux) et un groupement 4Fe-4S comme centre actif. Dans les tissus photosynthétiques le donneur d'électrons est la ferredoxine réduite par la photosynthèse. Dans les racines c'est le NADPH issu de la voie des pentoses phosphates, dont le pouvoir réducteur est transféré à la ferredoxine, qui sert de source de pouvoir réducteur à la NiR. Des gènes du génome nucléaire codant pour la NiR ont été isolés chez de nombreuses espèces (Faure *et al.*, 1997). A ce jour un seul gène codant pour la NiR a été identifié chez *Arabidopsis* (Tanaka *et al.*, 1994). La protéine est synthétisée sous



forme d'un précurseur protéique qui contient une séquence d'une trentaine d'acides aminés du côté N terminal (peptide de transit). Cette séquence permet l'adressage de la protéine vers le chloroplaste. Il est généralement admis que  $\text{NO}_2^-$  n'est quasiment pas accumulé dans les tissus et que l'activité NiR est en large excès dans les tissus par rapport au substrat (Beevers et Hageman, 1980). L'idée que l'étape de réduction de  $\text{NO}_2^-$  ne puisse pas être limitante semble cependant devoir être remise en cause. En effet, des études récentes montrent que la sur-expression de la NiR d'épinard chez *Arabidopsis* augmente significativement la vitesse d'assimilation du  $\text{NO}_2^-$  *in planta* (Takahashi *et al.*, 2001).

L'assimilation de  $\text{NH}_4^+$  est essentiellement réalisée dans les plastes par la Glutamine Synthétase (GS) et la Glutamate Synthase (GOGAT) (Miflin et Lea, 1980).  $\text{NH}_4^+$  est d'abord incorporé au squelette carboné d'une molécule de glutamate pour former de la glutamine (GS), qui cède ensuite son groupe amide à une molécule d' $\alpha$ -cétooglutarate, pour aboutir à la formation de deux nouvelles molécules de glutamate (GOGAT). Un des glutamates est recyclé pour accepter une nouvelle molécule de  $\text{NH}_4^+$  (cycle GS/GOGAT), alors que le second constitue le précurseur de la synthèse des autres acides aminés. La GS est une enzyme octamérique de 350-400 kDa qui catalyse la synthèse de glutamine à partir de glutamate et de  $\text{NH}_4^+$  en présence d'ATP. Le  $\text{NH}_4^+$  peut avoir différentes origines : le milieu de culture, l'assimilation de  $\text{NO}_3^-$ , le métabolisme (catabolisme de composés azotés lors de remobilisation de réserves, photorespiration) ou encore la fixation symbiotique de N atmosphérique. Deux types d'isoformes, GS1 et GS2, respectivement cytoplasmiques et plastidiales, existent chez les plantes (Brugière *et al.*, 1997). Les isoformes plastidiales sont trouvées dans les racines mais prédominent dans les feuilles exposées à la lumière. Les isoformes cytosoliques sont préférentiellement trouvées dans les racines mais sont également présentes dans les feuilles, les fleurs. Ces dernières s'accumulent également dans les nodules chez les légumineuses avec le démarrage de l'activité fixatrice de N des bactéries. Chez *Arabidopsis thaliana*, la GS1 est codée par 5 gènes (*GLN1-x*), tandis que la GS2 est codée par le gène *GLN2* (Peterman et Goodman, 1991). A ce jour les rôles respectifs des différentes isoenzymes ne sont pas entièrement compris (Hirel *et al.*, 1992, Hirel *et al.*, 1992, Marsolier et Hirel, 1993). Il est généralement proposé que la GS plastidiale serait responsable de l'assimilation de  $\text{NH}_4^+$  produit par la réduction de  $\text{NO}_3^-$  ou la photorespiration dans les feuilles tandis que les formes cytosoliques seraient impliqués dans l'assimilation de  $\text{NH}_4^+$  (absorbé ou issu de la fixation symbiotique) dans les racines. Il est probable que la diversité des gènes

codant les isoformes cytosoliques soit liée à des fonctions différentes (Marsolier et Hirel, 1993)

L'activité GOGAT est assurée par deux enzymes différentes, la NADH-GOGAT, qui utilise le NADH comme donneur d'électrons et la Fd-GOGAT qui utilise une ferredoxine comme donneur d'électrons. La Fd-GOGAT est principalement localisée dans les chloroplastes des tissus photosynthétiques et la NADH-GOGAT dans les plastes des autres tissus (Lam et al., 1996). La Fd-GOGAT prédomine chez les plantes matures. Chez *Arabidopsis thaliana*, la Fd-GOGAT est responsable de plus de 95% de l'activité GOGAT dans les parties aériennes et de près de 70% de celle des racines (Suzuki et Rothstein, 1997). Chez *Arabidopsis* la Fd-GOGAT est codée par deux gènes, *AtGLU1* et *AtGLU2*. *AtGLU1* est préférentiellement trouvé dans les feuilles tandis qu'*AtGLU2* est majoritairement racinaire (Coschigano *et al.*, 1998). La NADH-GOGAT est codée en revanche par un seul gène, *AtGLT1* (Lam *et al.*, 1995). Ce gène est préférentiellement exprimé dans les racines (Lancien *et al.*, 2002). Le rôle de ces gènes dans la physiologie de la plante a été étudié chez des mutants de perte de fonction (Somerville et Ogren, 1980, Coschigano *et al.*, 1998, Lancien *et al.*, 2002). La Fd-GOGAT serait impliquée dans l'assimilation de  $\text{NH}_4^+$  quelque soit sa provenance (Coschigano *et al.*, 1998) alors que la NADH-GOGAT contribuerait plus spécifiquement à l'assimilation de  $\text{NH}_4^+$  non photorespiratoire (Lancien *et al.*, 2002).

La glutamine et le glutamate sont donc les premiers acides aminés synthétisés après assimilation de l'ion  $\text{NH}_4^+$ . Le N est ensuite transféré par transamination à d'autres substrats carbonés (acides  $\alpha$ -cétoniques) pour former aspartate, alanine et glycine, eux-même précurseurs des autres acides aminés. Ces étapes sont des interconnexions majeures des voies d'assimilation de N et du métabolisme carbonné. On comprend la nécessité d'une coordination cohérente des deux voies pour que la synthèse des acides aminés puisse être réalisée. Les acides aminés qui sont produits, dans les feuilles ou les racines, sont utilisés *in situ* ou exportés vers d'autres tissus ou organes via le xylème ou le phloème. Certains acides aminés peuvent constituer des formes préférentielles de stockage et de transport de N. La synthèse d'asparagine est très active dans les nodosités de certaines légumineuses qui transportent une grande partie de N sous cette forme dans le xylème. Chez d'autres plantes non fixatrices, l'arginine ou la glutamine peuvent jouer ce rôle. En nutrition nitrique, alors que l'essentiel de l'assimilation a lieu dans les feuilles, l'azote organique est exporté vers les racines sous forme d'acides aminés *via* le phloème.

## 1.4 La régulation de l'acquisition de $\text{NO}_3^-$

### 1.4.1 Régulation et Intégration

L'acquisition de  $\text{NO}_3^-$  par les racines est un processus complexe. Cette complexité est rencontrée à plusieurs niveaux : dans la structure des systèmes d'absorption (coexistence d'influx et d'efflux, systèmes de transport d'affinité différentes, multiplicité de transporteurs), dans son énergisation (différence de potentiel électrique, gradient de pH), dans les multiples étapes à franchir pour arriver aux sites d'assimilation (absorption, compartimentation, translocation), dans la voie d'assimilation même qui fait intervenir de multiples étapes et une nécessaire coordination avec le métabolisme carboné. Une conséquence majeure de cette complexité est que le prélèvement racinaire de  $\text{NO}_3^-$  dépend d'une multitude de facteurs externes à la racine. Par exemple, l'énergisation du prélèvement implique qu'il est fortement affecté par le pH extracellulaire. Ou encore l'existence de plusieurs systèmes de transport d'affinité différente a pour conséquence une grande dépendance de l'influx vis à vis de la concentration de l'ion. Si notre compréhension de l'acquisition de N se limitait à ces considérations il serait aisé de conclure que l'alimentation azotée des plantes ne peut être optimale que dans une gamme très étroite de conditions environnementales. Or, il n'en est rien et les très nombreuses données agronomiques, physiologiques, ou moléculaires montrent que ce système très complexe s'adapte en fonction des incessantes fluctuations de l'environnement physique de la plante afin d'ajuster son activité à la demande nutritionnelle de l'organisme entier.

De nombreuses études physiologiques et moléculaires ont clairement démontré l'existence de mécanismes régulateurs de l'acquisition de N. Bien que les cibles moléculaires de certaines de ces régulations soient caractérisées (enzymes, transporteurs), les mécanismes et les gènes régulateurs mis en jeu sont complètement inconnus. Un aspect important de ces mécanismes est que beaucoup obligent à positionner l'étude à un niveau intégré, entre les différentes voies métaboliques et/ou entre les différents organes d'une plante. Beaucoup de ces mécanismes font appel à des échanges de signaux entre organes (principalement feuilles et racines), qui permettent de maintenir un dialogue capable d'informer les cellules de la racine de besoins en N de la plante. Ces mécanismes contribuent souvent à la coordination des différentes étapes métaboliques (absorption et assimilation) voire des différentes fonctions qui

Famille	Espèce	Gène	Inductibilité	Référence
PTR	<i>A. thaliana</i>	<i>AtNRT1.1 (CHL1)</i>	+	Tsay <i>et al.</i> , 1993
		<i>AtNRT1.2 (NTL1)</i>	0	Huang <i>et al.</i> , 1999
		<i>AtNRT1.3 (NTP3)</i>	+ dans les feuilles - dans les racines	Okamoto <i>et al.</i> , 2003
		<i>AtNRT1.4 (NTP2)</i>	0	Chiu <i>et al.</i> , 2004
		<i>AtPTR1</i>	nd	Dietrich <i>et al.</i> , 2004
				Steiner <i>et al.</i> , 1994
		<i>AtPTR2</i>	nd	Rentsch <i>et al.</i> , 1995 Song <i>et al.</i> , 1996
	<i>B. napus</i>	<i>BnNRT1.1</i>	+	Faure-Rabasse <i>et al.</i> , 2002
		<i>BnNRT1.2</i>	+	Zhou <i>et al.</i> 1998
	Tomate	<i>LeNRT1.1</i>	0	Lauter <i>et al.</i> , 1996
		<i>LeNRT1.2</i>	+	Lauter <i>et al.</i> , 1996
	<i>N. plumbaginifolia</i>	<i>NpNRT1.1</i>	0	Fraisier <i>et al.</i> , 2001
		<i>NpNRT1.2</i>	+	Fraisier <i>et al.</i> , 2001
	Soja	<i>GmNRT1.1</i>	nd	Yokoyama <i>et al.</i> , 2001
		<i>GmNRT1.2</i>	+	Yokoyama <i>et al.</i> , 2001
		<i>GmNRT1.3</i>	0	Yokoyama <i>et al.</i> , 2001
		<i>GmNRT1.4</i>	nd	Yokoyama <i>et al.</i> , 2001
		<i>GmNRT1.5</i>	nd	Yokoyama <i>et al.</i> , 2001
	Maïs	<i>ZmNRT1.1</i>	nd	Quaggiotti <i>et al.</i> , 2004
	Riz	<i>OsNRT1.1</i>	0	Lin <i>et al.</i> , 2000
	Orge	<i>HvPTR1</i>	nd	West <i>et al.</i> , 1998
	<i>N. alata</i>	<i>NaNTR1</i>	nd	Schulze <i>et al.</i> , 1999
	<i>V. faba</i>	<i>VfPTR1</i>	0	Miranda <i>et al.</i> , 2003
<i>VfPTR2</i>		nd	Miranda <i>et al.</i> , 2003	
NRT2	<i>A. thaliana</i>	<i>AtNRT2.1</i>	+	Filleur et Daniele-Vedele, 1999
		<i>AtNRT2.2</i>	+	Okamoto <i>et al.</i> , 2003
		<i>AtNRT2.3</i>	+ dans les feuilles	Okamoto <i>et al.</i> , 2003
		<i>AtNRT2.4</i>	+ dans les feuilles	Okamoto <i>et al.</i> , 2003
		<i>AtNRT2.5</i>	-	Okamoto <i>et al.</i> , 2003
		<i>AtNRT2.6</i>	0	Okamoto <i>et al.</i> , 2003
		<i>AtNRT2.7</i>	0	Okamoto <i>et al.</i> , 2003
	<i>B. napus</i>	<i>BnNRT2</i>	+	Faure-Rabasse <i>et al.</i> , 2002
	Tomate	<i>LeNRT2.1</i>	+	Ono <i>et al.</i> , 2000
		<i>LeNRT2.2</i>	+	Ono <i>et al.</i> , 2000
		<i>LeNRT2.3</i>	nd	Hildebrandt <i>et al.</i> , 2002
	<i>N. tabacum</i>	<i>NtNRT2</i>	nd	Krapp <i>et al.</i> , 1998
	<i>N. plumbaginifolia</i>	<i>NpNRT2.1</i>	+	Quesada <i>et al.</i> , 1997
		<i>NpNRT2.2</i>	+	Krapp <i>et al.</i> , 1998 Krapp <i>et al.</i> , 1998
	Soja	<i>GmNRT2</i>	+	Amarasinghe <i>et al.</i> , 1998
	Orge	<i>HvNRT2.1 (BCH1)</i>	+	Trueman <i>et al.</i> , 1996 Vidmar <i>et al.</i> , 2000
		<i>HvNRT2.2 (BCH2)</i>	+	Trueman <i>et al.</i> , 1996 Vidmar <i>et al.</i> , 2000
		<i>HvNRT2.3</i>	+	Vidmar <i>et al.</i> , 2000
		<i>HvNRT2.4</i>	+	Vidmar <i>et al.</i> , 2000
	Maïs	<i>ZmNRT2.1</i>	+	Santi <i>et al.</i> , 2003 Quaggiotti <i>et al.</i> , 2003

Tableau 1.2 : Effet de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sur la transcription de membres des familles PTR et NRT2. + pour inductible, 0 pour constitutif, - pour répressible, nd pour non déterminé.

déterminent le statut nutritionnel de la plante (absorption, assimilation, métabolisme carbonné, photosynthèse).

#### 1.4.2 Induction de l'absorption et de l'assimilation par $\text{NO}_3^-$

Le prélèvement de  $\text{NO}_3^-$  s'accélère fortement au cours des premières heures suivant un premier apport de  $\text{NO}_3^-$  à la plante (Jackson *et al.*, 1973, Clarkson et Lüttge, 1991). La stimulation touche surtout l'absorption à forte affinité de  $\text{NO}_3^-$  (Glass *et al.*, 1990). Ceci a conduit à distinguer les composantes « inductible » iHATS et « constitutive » cHATS du HATS de  $\text{NO}_3^-$ . Des expériences réalisées avec des inhibiteurs de transcription indiquent que l'induction du prélèvement est probablement due à une synthèse *de novo* de transporteurs (Jackson *et al.*, 1973, Hole *et al.*, 1990). L'apport de  $\text{NO}_3^-$  s'accompagne également d'une stimulation de l'activité de réduction et d'assimilation de  $\text{NO}_3^-$  (Hageman et Flesher, 1960, Warner et Kleinhofs, 1992, Crawford, 1995). L'induction par  $\text{NO}_3^-$  peut être réalisée par des traitements très courts avec de très faibles concentrations de  $\text{NO}_3^-$  (Tischner *et al.*, 1993). L'utilisation de mutants présentant une activité NR déficiente a montré que la stimulation de l'acquisition de  $\text{NO}_3^-$  est due à l'ion lui-même et non pas à son assimilation (Ingemarsson *et al.*, 1987, Lejay *et al.*, 1999).

L'identification des gènes impliqués dans l'acquisition de l'ion a montré que l'expression de beaucoup de ces gènes est stimulée par  $\text{NO}_3^-$ . Ceci concerne de nombreux transporteurs des familles *PTR* et *NRT2* (Tableau 1.2). Chez *Arabidopsis thaliana*, plusieurs gènes contribuent à la composante iHATS de l'absorption. L'inactivation du gène *AtNRT2.1* s'accompagne d'une forte inhibition de cette composante suggérant que le gène a une contribution essentielle au iHATS (Cerezo *et al.*, 2001). L'inactivation d'*AtNRT1.1* provoque aussi une inhibition du iHATS, mais nettement plus réduite que celle observée pour *AtNRT2.1* (Liu *et al.*, 1999). Les composantes iHATS et cHATS ne sont probablement pas codées par les mêmes gènes. Le mutant *chl8* qui ne présente plus de composante cHATS montre cependant une composante iHATS normale (Wang et Crawford, 1996).

L'induction par  $\text{NO}_3^-$  concerne également de nombreux gènes codant NR, NiR, GS ou Fd-GOGAT (Warner et Kleinhofs, 1992, Crawford et Arst, 1993, Redinbaugh et Campbell, 1993, Crawford, 1995, Scheible *et al.*, 1997).  $\text{NO}_3^-$  stimule les activités des enzymes et l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme carbonné. C'est le cas d'enzymes impliquées dans la synthèse de l' $\alpha$ -cétoglutarate qui est le squelette carbonné accepteur de  $\text{NH}_4^+$  dans le cycle GS-GOGAT (Scheible *et al.*, 1997, Stitt, 1999). Cette stimulation de la

synthèse d'acides organiques s'accompagne d'un détournement du carbone utilisé pour la synthèse de l'amidon. En effet  $\text{NO}_3^-$  réprime l'ADP-glucose pyrophosphorylase une enzyme clef dans cette synthèse (Scheible *et al.*, 1997). Des études de transcriptomique menées à l'échelle génomique chez *Arabidopsis* et la tomate ont montré que  $\text{NO}_3^-$  provoque un remodelage important du transcriptome, concernant l'expression de plusieurs centaines de gènes, parmi lesquels un grand nombre impliqués directement ou indirectement dans l'acquisition de l'ion et dans le métabolisme du carbone (Wang *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 2001). Les mécanismes impliqués dans la cascade d'évènements conduisant à l'induction de ces gènes par  $\text{NO}_3^-$  reste inconnue. Une étude portant sur différentes souches mutantes de *Chlamydomonas reinhardtii* suggère que chez cette algue unicellulaire le signal provient des concentrations intracellulaire de  $\text{NO}_3^-$  (Rexach *et al.*, 2002). Des expériences de run-on réalisées sur noyaux isolés ont montré que l'induction des gènes codant pour la NR par  $\text{NO}_3^-$  est due pour l'essentiel à une stimulation de la transcription (Faure *et al.*, 1997). L'étude des promoteurs des gènes *AtNIA1* et *AtNIA2* d'*Arabidopsis* indique que le motif 5'-A(G/C)TCA-3' présent dans ces promoteurs pourrait être un éléments cis responsable de activation de ces gène en présence de l'ion (Hwang *et al.*, 1997). Une étude du promoteur du gène codant la NiR d'épinard suggère que des motifs de type GATA sont impliqués (Rastogi *et al.*, 1997).

Si l'apport de  $\text{NO}_3^-$  a un effet stimulateur à court terme sur le prélèvement de  $\text{NO}_3^-$ , la culture en présence de fortes concentrations de l'ion s'accompagne d'un retour à un état réprimé. Lorsque des plantes d'*Arabidopsis* préalablement cultivées sans source de N sont mises en présence de  $\text{NO}_3^-$ , on observe une forte stimulation de l'absorption durant les 24 premières heures suivie d'une réduction progressive de l'absorption (Zhuo *et al.*, 1999). Cette réponse complexe est interprétée comme la superposition de 2 régulations distinctes qui se mettent en place avec des cinétiques différentes: stimulation par l'ion lui-même et répression par les produits de son assimilation (Gojon et Touraine, 1997). L'utilisation de mutants NR chez *Nicotiana plumbaginifolia* et *Arabidopsis* a permis de clairement découpler ces 2 régulations. Chez ces mutants cultivés avec  $\text{NO}_3^-$  comme seule source de N, la répression par les métabolites N est supprimée mais l'induction par  $\text{NO}_3^-$  s'exerce toujours (Gojon *et al.*, 1998, Lejay *et al.*, 1999, Gansel *et al.*, 2001).

### 1.4.3 Répression par les produits de l'assimilation de $\text{NO}_3^-$

#### 1.4.3.1 Contrôle par la disponibilité des assimilats azotés

En présence de  $\text{NO}_3^-$ , la capacité de prélèvement de l'ion est ajustée aux besoins de la plante. Réciproquement, en dehors de situations extrêmes (carence en N, concentration très élevées) la forte plasticité de la fonction d'absorption de  $\text{NO}_3^-$  permet à la plante d'adapter sa capacité d'absorption à la disponibilité fluctuante de l'ion. Lorsque des plantes de *Lolium perenne* sont cultivées sur des solutions nutritives où la concentration de  $\text{NO}_3^-$  varie d'un facteur 1000 (de  $14\mu\text{M}$  à  $14\text{mM}$ ), ni la quantité de N prélevée, ni la teneur en N des plantes, ni la croissance des plantes ne varient significativement (Clément *et al.*, 1978b). Les plantes cultivées sur un milieu contenant  $14\mu\text{M}$  de  $\text{NO}_3^-$  ont été en mesure de prélever la même quantité de  $\text{NO}_3^-$  que celles cultivées sur un milieu qui en contient  $14\text{mM}$ . Cette invariance de l'absorption est possible grâce à l'adaptation des capacités de prélèvement des plantes à la disponibilité externe de l'ion. Réciproquement, à disponibilité externe de  $\text{NO}_3^-$  constante, la vitesse d'absorption de l'anion est directement corrélée à la vitesse de croissance de la plante (Pitman, 1988). Les variations du prélèvement de N suivent celles de la biomasse ou de la fixation nette de carbone (Gastal et Saugier, 1989). C'est donc la demande en N générée par la croissance de la plante qui détermine l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  des racines. En présence de  $\text{NO}_3^-$  dans le milieu extérieur, le prélèvement de l'ion est plus sensible aux signaux endogènes de la plante (demande ou « satiété ») qu'à la concentration externe de l'ion (Imsande et Touraine, 1994). Contrairement à l'induction par  $\text{NO}_3^-$ , qui s'exerce localement (§1.3.2 ci-dessus), le contrôle de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  par la demande en N s'exerce à l'échelle la plante entière. Le système « split root » permet de générer une déficience nutritionnelle à l'échelle de la plante entière en alimentant seulement une fraction du système racinaire. Chez les plantes cultivées dans ce système, la capacité d'absorption de  $\text{NO}_3^-$  est augmentée dans la fraction du système racinaire à laquelle est fourni une source de  $\text{NO}_3^-$  localement non limitante afin de compenser le déficit nutritionnel de la plante entière. Dans ces conditions, les capacités locales de prélèvement de  $\text{NO}_3^-$  sont déterminées par le statut N de l'organisme entier et non le statut N local (Touraine et Gojon, 1997, Tillard *et al.*, 1998, Gansel *et al.*, 2001). Cela démontre l'existence d'un signal généré au niveau des parties aériennes et envoyé aux racines, probablement *via* le phloème (Müller et Touraine, 1992, Gansel *et al.*, 2001).

Les produits de l'assimilation de  $\text{NO}_3^-$  sont des effecteurs négatifs de l'absorption de l'ion, ce qui suggère que le niveau de métabolites N participe à l'établissement d'un signal de demande. L'addition de ces métabolites dans le milieu de culture permet d'accroître la disponibilité en assimilats azotés sans modifier la concentration en  $\text{NO}_3^-$  du milieu. L'ajout de  $\text{NH}_4^+$  dans un milieu contenant  $\text{NO}_3^-$  provoque une diminution de la vitesse d'absorption et d'assimilation de  $\text{NO}_3^-$  (MacKown *et al.*, 1982, Munos *et al.*, 2004). Deux types d'effets de  $\text{NH}_4^+$  sur l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  sont décrits (Kronzucker *et al.*, 1999). A l'échelle de la minute, une inhibition transitoire interprétée comme la conséquence de l'effet dépolarisateur de  $\text{NH}_4^+$ , qui réduisant la force proton-motrice nécessaire au prélèvement du  $\text{NO}_3^-$ , réduirait l'activité de prélèvement des transporteurs. A plus long terme, l'effet inhibiteur de  $\text{NH}_4^+$ , qui touche essentiellement l'influx et le iHATS, serait lié au rétrocontrôle négatif exercé par les métabolites azotés issu de son assimilation. L'ajout d'acides aminés provoque une répression très rapide de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$ , qui est corrélée positivement avec la teneur en acides aminés des parties aériennes, des racines et de la sève phloémienne (Müller et Touraine, 1992, Müller *et al.*, 1995, Lainé *et al.*, 1995, Naza *et al.*, 2003). Il est proposé que certains acides aminés circulant dans la sève du phloème jouent le rôle de signaux répresseurs. Des expériences basées sur l'utilisation d'inhibiteurs de la GOGAT ou de l'aspartate amino transférase sont cohérentes avec ce modèle (Lee *et al.*, 1992). Cependant des résultats obtenus chez des plantes de ricin en système split-root vont à l'encontre de cette hypothèse (Tillard *et al.*, 1998). Les acides aminés constituant une source de N pour la plante. Il est difficile de séparer un effet répresseur de type « signal » strict, de leur effet sur le statut N qui pourrait entraîner un signal répresseur secondaire.

Cette faculté d'adaptation des racines à la demande en N est très probablement due à des changements dans la nature et l'abondance des transporteurs de  $\text{NO}_3^-$  au niveau de la membrane plasmique (Clarkson et Lüttge, 1991). Les systèmes de transport sont probablement sujet à des processus de répression/dé-répression. De fait, des gènes codant pour des transporteurs de  $\text{NO}_3^-$  dont l'expression est régulé par le statut azoté de la plante ont été identifiés. Pour l'instant, ce type de régulation n'a été mis en évidence que pour des transporteurs la famille *NRT2* (Glass *et al.*, 2001, Orsel *et al.*, 2002a). Chez *Arabidopsis* il a été montré qu'*AtNRT2.1* qui code un transporteur à haute affinité est une cible essentielle de cette régulation. Comme la capacité d'absorption de  $\text{NO}_3^-$ , l'expression d'*AtNRT2.1* est fortement stimulée par une carence en métabolites azotés (Filleur et Daniel-Vedele, 1999, Zhuo *et al.*, 1999, Lejay *et al.*, 1999, Cerezo *et al.*, 2001). L'inactivation de la NR provoque une forte dé-répression de l'expression du gène (Filleur et Daniel-Vedele, 1999) même en



présence de fortes quantités de  $\text{NO}_3^-$ , ce qui indique qu'il est réprimé par les assimilats azotés (Lejay *et al.*, 1999). Le gène est fortement réprimé par l'ajout de  $\text{NH}_4^+$  ou d'acides aminés dans le milieu (Zhuo *et al.*, 1999, Nazon *et al.*, 2003). Des expériences de split root, chez *Arabidopsis* on montré que l'expression du gène suit les régulations de l'influx de  $\text{NO}_3^-$  via une signalétique feuilles-racines (Gansel *et al.*, 2001). La réponse adaptative de la plante aux variations de disponibilité des assimilats azoté (carence, ajout de  $\text{NH}_4^+$ ) est fortement affectée chez un mutant de délétion de ce gène, indiquant que ce gène est une cible essentielle de cette régulation (Cerezo *et al.*, 2001).

#### **1.4.3.2 Régulation par la nitrate réductase et $\text{NO}_2^-$**

Un autre mécanisme de répression de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  par le produit de son assimilation a été mis en évidence récemment chez *Arabidopsis* (Loqué *et al.*, 2003). Bien que cette régulation dépende de l'activité de réduction de  $\text{NO}_3^-$  de la plante, ce mécanisme n'est pas lié à la disponibilité en assimilats azoté « terminaux ». L'activité NR réprime dans les racines le gène *AtNRT1.1* dont l'expression est inductible par  $\text{NO}_3^-$  mais pas stimulée transitoirement en situation de privation de N ni réprimée par le statut N (Tsay *et al.*, 1993, Lejay *et al.*, 1999, Liu *et al.*, 1999, Filleur et Daniel-Vedele, 1999). La répression s'exerce aussi sur le gène *AtNIA1* qui code l'isoforme minoritaire de l'apoenzyme de la NR chez *Arabidopsis* ce qui suggère un mécanisme d'autorégulation. Il est très probable que la répression est liée à la réduction de  $\text{NO}_3^-$  par la NR en  $\text{NO}_2^-$  (ou NO).  $\text{NO}_2^-$  est capable de réprimer très fortement les deux gènes en quelques heures lorsqu'il est ajouté au milieu de culture. Cette répression se traduit par une baisse importante du prélèvement de  $\text{NO}_3^-$  dans ces conditions (Loqué *et al.*, 2003). Bien que la signification biologique de ce mécanisme reste incertaine, il est proposé qu'il permette à la plante de limiter l'accumulation toxique de  $\text{NO}_2^-$ . Les racines peuvent être exposées à ce type de situations lors d'épisodes d'hypoxie (au cours d'inondations par exemple).

#### **1.4.4 Régulation par la lumière et les sucres**

Chez les plantes photosynthétiquement actives, le prélèvement de  $\text{NO}_3^-$  par les racines est régulé par l'éclairement. Le rythme jour/nuit de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  a été montrée chez plusieurs espèces (*Arabidopsis thaliana*, Lejay *et al.*, 1999, le soja, Delhon *et al.*, 1996, la tomate, Cardenas-Navarro *et al.*, 1998, Le Bot et Kirkby, 1992, *Lolium perenne*, Ourry *et al.*,

1996). La rythmicité n'est pas liée à un rythme circadien mais dépend de la photosynthèse (Lejay *et al.*, 1999, Lejay *et al.*, 2003). Des plantes illuminées mais privées de CO<sub>2</sub>, ont une l'absorption de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> réduite (Delhon *et al.*, 1996). Réciproquement l'ajout de saccharose ou de glucose dans le milieu chez de plantes à l'obscurité provoque une stimulation du prélèvement de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Lejay *et al.*, 1999, Lejay *et al.*, 2003). La rythmicité jour/nuit du prélèvement n'est pas spécifique de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et concerne également le prélèvement d'autres ions (Clément *et al.*, 1978a, Smith et Cheema, 1985, Hatch *et al.*, 1986, Le Bot et Kirkby, 1992, Delhon *et al.*, 1996).

La régulation par l'alternance jour/nuit est interprétée comme un mécanisme qui permet de coordonner l'acquisition de N avec la production des squelettes carbonés nécessaires à la synthèse des acides aminés (Delhon *et al.*, 1996). L'expression de plusieurs transporteurs de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (*AtNRT1.1*, *AtNRT2.1*) est stimulée par la lumière et les sucres. Cette régulation concerne également les transporteurs d'autres ions (Lejay *et al.*, 2003). L'emploi de mutants d'*Arabidopsis* affectés dans leur sensibilité aux sucres (sugar sensing), d'intermédiaires métaboliques, ou d'inhibiteurs d'enzymes, suggère que le signal régulateur est généré au niveau de la glycolyse probablement en aval de l'héxokinase (Lejay *et al.*, 2003).

La réduction et l'assimilation de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sont également régulés par la lumière (Faure *et al.*, 1997, Brugière *et al.*, 1997). Chez le tabac et *Arabidopsis* l'expression des gènes codant la NR décroît lors d'un passage à l'obscurité mais est stimulé lorsque des sucres sont rajoutés au milieu de culture (Cheng *et al.*, 1992, Matt *et al.*, 1998). Un contrôle par le rythme circadien sur cette enzyme a également été mis en évidence (Vincentz *et al.*, 1993, Pilgrim *et al.*, 1993). Les niveaux de contrôle de l'expression des gènes codant la NR sont multiples : transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel. Dans ce dernier cas l'intervention de protéines 14-3-3 a été démontrée et caractérisée en détails (Kaiser et Huber, 2001).

## 1.5 Objectifs du travail

Le séquençage intégral du génome d'*Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2001) a rendu possible pour la première fois chez une plante supérieure l'identification par homologie de séquence de l'effectif complet des familles multigéniques. Nous avons décidé de tirer parti de cette avancée pour étudier de manière plus exhaustive l'implication de la famille *PTR* dans le transport de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> chez *Arabidopsis thaliana*.

La première étape du travail a consisté à caractériser *in silico* les membres de la famille *PTR*. Nous nous sommes appuyés sur cette caractérisation pour concevoir et construire une membrane basse densité dédiée aux gènes impliqués dans le transport de N chez *Arabidopsis* (familles *PTR*, *NRT2* et *AMT*). Les contraintes techniques liées à ce type d'approche nous ont ensuite amenés à développer une méthode originale de normalisation des données d'hybridation. La membrane a permis de générer une base de données des régulations transcriptionnelles affectant les gènes codant pour des transporteurs de N dans des situations connues pour moduler les capacités de prélèvement de  $\text{NO}_3^-$ .

A l'issue de cette première étape, deux gènes de la famille *PTR* ont été sélectionnés pour une analyse plus détaillée de leur expression, (*AtNRT1.2* et *At1g32450* que nous avons nommé *AtNRT1.5*). Deux autres gènes *AtNRT1.1* et *AtNRT2.1* codant des transporteurs de  $\text{NO}_3^-$  d'*Arabidopsis* ont servi de référence au cours de cette étude.

La dernière partie du travail a permis de confirmer la fonction *in planta* d'*AtNRT1.2* et identifier le premier transporteur de  $\text{NO}_3^-$  impliqué dans la translocation de l'ion des racines vers les parties aériennes (*AtNRT1.5*). L'étude a porté sur des mutants chez lesquels chacun des gènes est inactivé par insertion d'un ADN-T.

## 2 Chapitre II

### MATERIEL ET METHODES

#### 2.1 Techniques en biologie moléculaire

##### 2.1.1 Extraction d'ADN génomique de plante

Les extractions d'ADN génomique sont faites à partir d'un échantillon de feuilles fraîches (environ 10 mg) broyé à la perceuse dans un microtube de polypropylène après ajout de sable de fontainebleau dans 500µl de tampon d'extraction (Tris-HCl 100mM pH8, EDTA 50mM pH8, NaCl 500mM) et 35µl de SDS 20% p/v. Après une incubation de 10 minutes à 65°C, de l'acétate de sodium (1M final) est ajouté puis le tout est incubé sur glace pendant 10 minutes et centrifugé 15 minutes à 13000 rpm. Le surnageant est ensuite précipité une nuit à – 20°C en présence de 1 volume d'isopropanol et l'ADN est collecté par une centrifugation de 5 minutes à 13000 rpm. Après dissolution du culot dans de l'eau, la concentration est mesurée par spectrophotométrie à 260nm.

##### 2.1.2 Extraction et purification de l'ADN plasmidique de E.coli

Les extractions d'ADN plasmidique d'*Escherishia Coli* sont réalisées avec les kit QIAfilter Plasmid Midi ou (Qiagen) QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) en fonction des rendements désirés (respectivement 100µg et 20µg) selon les protocoles conseillés par le fournisseur. Les deux kits fonctionnent sur le même principe : l'ADN plasmidique est libéré par lyse alcaline, les débris des cellules éliminés par centrifugation, puis L'ADN est fixé sur une colonne d'affinité, lavé et enfin élué. La concentration est mesurée par spectrophotométrie à 260nm.

Nom usuel	n° AGI	Amorces sens	Amorce anti-sens
<i>AtNRT1.1</i>	At1g12110	AAACACCCCCAAAACTGCAA	CCGAGGAAATTGGTAACGGTGT
<i>At1g18880</i>	At1g18880	GTGGCAGTCCCATTACAGC	AGAATAAGGCGGCCGAGAGC
<i>At1g22540</i>	At1g22540	GCGGCTGTAAAGAACTGGAGTG	GACTGGAGGGTAGCCGGAGAG
<i>At1g22550</i>	At1g22550	AAAAACGCCAAGAACCCAAGG	TTCTCACTAGTGGGGACACAAGA
<i>At1g22570</i>	At1g22570	CCCAAAGGGACATCATGAGGAG	ACCAAAGCCTTCGCGTCATC
<i>AtNRT1.5</i>	At1g32450	GGGGAAC TTTGTTAGTAGCTTGTGG	AAACCAAAACACACATTTGTTAGCC
<i>At1g33440</i>	At1g33440	CACGTGCGGAGGAATCATTGG	TCGATGACGCCAAAAACGAG
<i>At1g52190</i>	At1g52190	CAAAGCTCCAAGTCAAAGTTGAGG	CTTGAACCATGGCGGCTCAG
<i>At1g59740</i>	At1g59740	TCTCTGATCTCCCTGGCACAAC	CCATGCTTGTAGGGTTGGAAGG
<i>At1g62200</i>	At1g62200	AAGCTACCTGAGCTCGTTGATCC	GAGTATACCATGAATATGATGAACCAAAAC
<i>At1g68570</i>	At1g68570	CGATTCGATCGGAACTATGTGAG	CAACGCCAAGACTCATTCACTCAAC
<i>AtNRT1.2</i>	At1g69850	GGGAAGGCTACGCCGATTG	GAAAGCGTCGGAGAGGAAACC
<i>At1g69860</i>	At1g69860	CTCTTGTTGGAAAGCGATGC	GCCCAACAACCTCAGCGATGG
<i>At1g69870</i>	At1g69870	TGTCTGTATGTTGTGCCACTCTC	CGGCGAACTTATCCGCTTG
<i>At1g72140</i>	At1g72140	CGCATGAAATCACCGCTCTG	CGGCATATTGACCACTCGTCTG
<i>At2g02020</i>	At2g02020	GACGGTGCATGAAACGAACC	TGAGGGATTGCCCCAAAGATG
<i>AtPTR2B</i>	At2g02040	CTTGAGCTCGTTGATCCTCACG	AATTGAAAGGAAAAGTACACAGCAATG
<i>At2g37900</i>	At2g37900	CTTTGCGGACGCTTTCACAC	GGCAGCGATAACACCAGCAAG
<i>At2g40460</i>	At2g40460	GGCTTTGGCCTCCATTTGAAC	TGCAGAGCCTTGGAACAACG
<i>At3g16180</i>	At3g16180	GATCGCATAACTCAAACCTCTCAC	AATAATCCATAGCTCGCCACTTTTC
<i>AtNRT1.3</i>	At3g21670	TGCCCATTTGAATCGTATCTCC	ATTAACCGGCGCCTAACCATC
<i>At3g25260</i>	At3g25260	GACACATCAACCAACTTGAAAACCAC	GCTCGGTTCTTGTGGAGTTG
<i>At3g25280</i>	At3g25280	AGAAGAAATCCAAGACTGATCTCAAG	TTCTTGCGGCAGAAATAATCAC
<i>At3g45650</i>	At3g45650	GTTACTGGCGATGCAGAAACAGC	CAGATGCAATGGCTGCAACAG
<i>At3g45660</i>	At3g45660	CGAAGAGTACAACATGAAGAGCATCG	CCCACCTGCTCCCACACAG
<i>At3g45700</i>	At3g4570	GCATCGCTCTAGCAAGCATGG	TCCAAAGATGCAATAAGAGTCAAGAGC
<i>At3g45710</i>	At3g45710	GACACGGAAGTAGCGCATCG	TCCAGCCAGAGAAATGAAAGTGG
<i>At3g47960</i>	At3g47960	CATGGCTTACTTCTTGTGATGG	ACATGTCTACAAAGATGAAGTGATTTTC
<i>At3g53960</i>	At3g53960	GCCGCTTGACCGCTTTTAC	CGTTTCTAAAGGCTAACGCCACAC
<i>At3g54140</i>	At3g54140	AGAACGGTAAACCGGGTTGG	ACAAACCTAACACACCAACAACAAC
<i>At4g21680</i>	At4g21680	CCAGTTTATATCACAGAACAAGCTCAG	TGATGTGCATGGCTGGATTC
<i>At5g01180</i>	At5g01180	CGTGATTGCAGCCATCGTTATG	AGTCTCTGCTCGGCTTTGTCC
<i>At5g11570</i>	At5g11570	AGCGGCCAACATCCTTTTCC	GGTCGGCAGCGAAGGCTAAG

Tableau 2.1 (1<sup>ère</sup> partie) : **Séquence des amorces PCR utilisées dans la thèse.**

AGI : Arabidopsis Genome Initiative.

### 2.1.3 Amplification de fragment d'ADN par PCR

L'enzyme utilisée est l'Extrapol (Eurobio). Les réactions de PCR sont menées dans le tampon réactionnel commercial de l'enzyme, en présence de  $MgCl_2$  2,5mM, 200 $\mu$ M de chaque nucléotide (dATP, dTTP, dCTP et dGTP), 200nM de chaque amorce,  $4 \times 10^{-3}$  U. $\mu$ l<sup>-1</sup> d'enzyme à partir de matrices d'ADN de natures diverses (10-0,01 ng) ou de bactéries fraîches. Une première rampe de 5 cycles est réalisée selon les spécifications suivantes :

30 s à 94°C

60 s à 65°C -1°C à chaque cycle

60 s à 72°C

puis 25 à 32 des cycles de température suivants sont appliqués :

30 s à 94°C

60 s à 60°C

60 s à 72°C

Lorsque les fragments d'ADN sont amplifiés en vue du clonage dans le vecteur pCR 2.1-TOPO, la dernière étape d'élongation est prolongée de 10 minutes afin de permettre l'induction de l'activité terminal-transferase de l'enzyme (ajout d'un résidu A aux extrémités des séquences, induit par une durée d'élongation supérieure à 3 minutes).

Les amorces utilisées au cours de cette thèse (Tableau 2.1) ont été définies grâce à une version en ligne du logiciel Primer 3 au Whitehead Institute for Biomedical Research (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3-www.cgi#disclaimer>).

### 2.1.4 Electrophorèse de l'ADN en gel d'agarose

Des gels d'agarose horizontaux sont utilisés de manière analytique ou préparative pour séparer des fragments d'ADN. Le gel est préparé dans le tampon d'électrophorèse TAE (Tris-HCl 40mM, acétate de sodium 20mM, EDTA 1mM pH 7,8). Le pourcentage d'agarose utilisé (p/v) varie de 1 à 2% en fonction de la taille des fragments à séparer. Le gel est coloré au bromure d'éthydiu (BET) qui fluoresce à 360 nm lorsqu'il est intercalé dans un brin d'ADN et exposé aux UV.

Nom usuel	N° AGI	Amorces sens	Amorce anti-sens
<i>At5g13400</i>	At5g13400	TGCGCTGACCAAAGGAACAC	TTCATCGGAATCGCAGAGG
<i>At5g14570</i>	At5g14940	TTTGAATCCCAACCGCTTC	GGTTTCAAGCCCCGAAAAACC
<i>At5g28470</i>	At5g28470	CGTCGAATCTTCATCACCATCG	GGAGGCGATGGAACCGAGTAG
<i>At5g46040</i>	At5g46040	TGCTGATTGCGTAACATCAGCTC	GGGTTTGGCAGATGCTTTCATAG
<i>At5g46050</i>	At5g46050	CAGAGCTTCACTCAAAACAGGAAC	TGGAATAAGCATTGAGAGTGTGAC
<i>At5g62680</i>	At5g62680	CCACAATGATAGAAAGAAAGAGATGTG	GGAATCCTGGCAGTTAATTTTGC
<i>At5g62730</i>	At5g62730	CGAGCTCGGAAACACCACTG	GACAGCAACCCAAGTCCCAAG
<i>Tubuline <math>\alpha</math></i>	At1g64740	GCGAAAACAGAGAGAAAGAGG	GAATGCATCATGACATGCACC
<i>Histone H4</i>	At5g59690	CATCCATGGCGGTACAGTC	GGTTCGTGAAAGGGAGGAA
<i>AtLHCP</i>	At1g29930	GGTAATTGCCAGATAATTTGA	GCCGATCCAGTTAACAACAACG
<i>AtAKT1</i>	At2g26650	TGGAACCCCGGTGAGAGTGA	CTCTGCATTGTTGTCTTTGTT
<i>AtAMT1.1</i>	At4g13510	GCCGGTATGGATATGACCAG	TTATCATCACAACCCCATGAAAC
<i>AtAMT1.2</i>	At1g64780	TGACGGTAACTATGGGACCGTTG	TTTGGTTGCCGAACCTTTGTC
<i>AtAMT1.3</i>	At3g24300	GATCTCCTTTCCCTCGATCAGC	GGTCACTTAAACAAACCAAAACATCC
<i>AtAMT2</i>	At3g28290	GTTTGCACACCCTGATCTCTGC	TCAAACCTGTTGCATGCCTTG
<i>At3g24290</i>	At3g24290	CTCCTATCAGGCCACTGGAACG	CGCCATAAATAGCCCGTAGTG
<i>AtNRT2.2</i>	At1g08100	TGTTACCTTAATCCACTTTCCTCAGTG	AAGCAAATGATGAAAGAAATGGTTC
<i>AtNRT2.3</i>	At5g60780	GCTGAGGGACTCTCATTGATGG	CAAACATGACTTGGAGTTCCGTTG
<i>AtNRT2.5</i>	At1g12940	GCAATGTAGGCGCGGTCTTAAC	GTTTGGGGATGAGTCGTTGTGG
<i>AtNRT2.7</i>	At5g14570	ACGCGATCGTTAGGAGTGGTG	CCAGCAGTTCAAATGCGACATC
<i>AtNIA1</i>	At1g77760	GAAGGTTTGAAGGCGAATC	TCATTTATCATCATCATCAACAAC
<i>AtEF1<math>\alpha</math></i>	At1g07940	GCCACACCTCTCACATTGCAG	TGGCTCCAGTTGGGTCTTTC
Séquence n'appartenant pas à <i>Arabidopsis</i>			
		Amorce sens	Amorce anti-sens
	T1	TGTTGGCGAAATCACATCGTC	TGACATGCTTGTTCATCAGGTG
	T1.1	TGTCTTCTGCCTCCAGTTCG	TGACATGCTTGTTCATCAGGTG
	T1.2	TGCCACTGTTGCCAATGACC	GTTTGGAGGCAGGGAAGCAC
	T1.3	TGTTGGCGAAATCACATCGTC	TGGCTTGGGCTAAAAATTCTCG
	T2	GGCTCAAGAGGGTGTGTCCGT	GGCTACGAAGTCCGTGGCTATC
	T2.1	TTATTTGGCGGAACACAGG	GGCTACGAAGTCCGTGGCTATC
	T2.2	GCTGGCAGCATTCTTGAGTCC	TGCTTTTATCGGGCGGAATG
	T2.3	GGCTCAAGAGGGTGTGTCCGT	CGCAGTCCGTTGATTCAGAGC

Tableau 2.1 (2<sup>ème</sup> partie) : **Séquences des amorces PCR utilisées dans la thèse.**  
AGI : *Arabidopsis* Genome Initiative.

### 2.1.5 Purification de fragments d'ADN en gel d'agarose

Les fragments d'ADN séparés par électrophorèse en gel d'agarose dans un but préparatif en sont extraits avec le kit Jetsorb (Genomed) selon le protocole conseillé par le fournisseur. L'ADN est fractionné sur gel d'agarose, puis les lamelles qui contiennent un fragment d'intérêt sont découpées et fondues à 55°C en présence de NaI. L'ADN est adsorbé sur des microbilles, les microbilles lavées plusieurs fois dans des solutions salines (fournies dans le kit), puis l'ADN élué dans du TE (Tris-HCl 10mM pH8, EDTA 1mM) par incubation à 55°C. La quantification de l'ADN est réalisée en spectrophotométrie à 260nm.

### 2.1.6 Synthèse d'ADN complémentaire

Les contaminations ADN sont éliminées des préparations d'ARN par un traitement par la DNase I (Proméga). A l'issue de la digestion, l'enzyme est éliminée par une extraction au mélange phénol / chloroforme / alcool isoamylique (24/24/1, v/v/v) suivit d'un lavage par un mélange chloroforme / alcool isoamylique (24/1, v/v). Les ARN sont précipités 2h à -20°C en présence d'acétate de sodium 0,3 M pH 5,2 et 2 volumes d'éthanol absolu. Le culot d'ARN est récupéré après 30 minutes de centrifugation à 16000g à 4°C, lavé avec de l'éthanol 70% et repris dans du TE. La transcription inverse est menée 1 heure à 42°C à partir de 0,4µg.µl<sup>-1</sup> d'ARN totaux, en présence de 13 U.µl<sup>-1</sup> de reverse transcriptase MMLV (Promega), 1mM de chaque nucléotide, 1µM d'amorces oligo dT<sub>18</sub> (Eurobio) dans le tampon commercial de l'enzyme. La réaction est ensuite arrêtée en diluant 10 fois le mélange réactionnel dans de l'eau.

## 2.2 Matériel et techniques de clonage

### 2.2.1 Plasmides

Les plasmides utilisés lors des différentes expériences sont :

Le vecteur pCR-Blunt (Invitrogen), Figure 2.1. Ce vecteur confère la résistance à la zeocyne et la kanamycine. La sélection des plasmides ayant intégré un insert avec ce vecteur se fait grâce à la disruption d'un gène léthal (gène de fusion *lacZα-ccdB*) pour les bactéries.



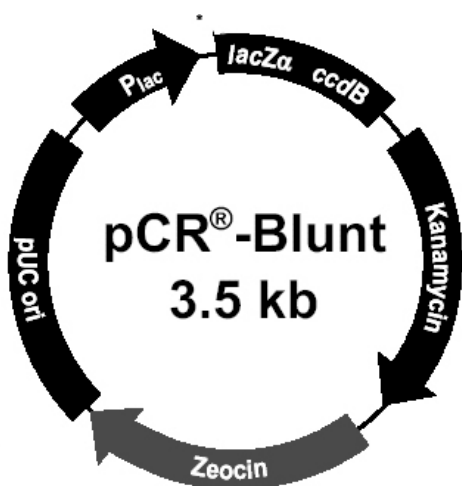


Figure 2.1 : Carte du plasmide pCR-Blunt.

Le plasmide est fourni linéarisé au niveau du site d'insertion et les extrémités sont franches. *D'après un schéma du manuel du fournisseur.*

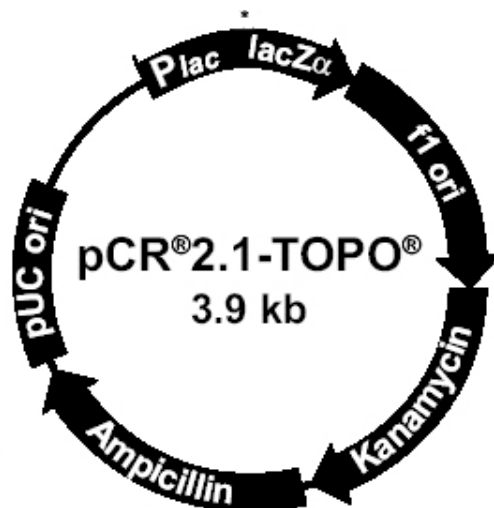


Figure 2.2 : Carte du plasmide pCR-2.1-TOPO.

Le plasmide est fourni linéarisé au niveau du site d'insertion. Les extrémités cohésives T du vecteur sont liées de façon covalente à une Topoisomérase I qui catalyse la réaction de ligation. *D'après un schéma du manuel du fournisseur.*

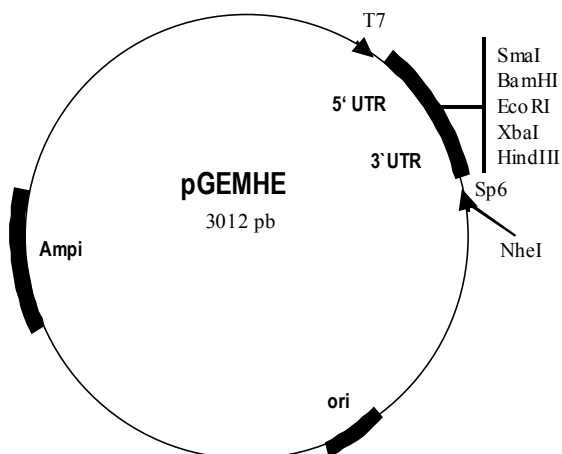


Figure 2.3 : Carte du plasmide pGEMHE.

Le site multiple de clonage de ce plasmide est flanqué des séquences 3'UTR et 5'UTR du gène de la  $\beta$ -GLOBINE de Xénope. La séquence 3' UTR est suivie par une séquence polyT servant à la rétro-transcription d'une extension polyA au transcrit.

Le vecteur pCR 2.1-TOPO (Invitrogen), Figure 2.2. Ce vecteur confère la résistance à l'ampicilline et la kanamycine.

pGEMHE (Liman et al, 1992), Figure 2.3. Ce vecteur confère la résistance à l'ampicilline. Le site multiple de clonage du plasmide est bordé par les régions non traduites 5' et 3' (5' UTR et 3' UTR) du gène de la  $\beta$ -GLOBINE de Xénope.

## 2.2.2 Matériel bactérien

Les transformations ont été réalisées sur des lots d'*Escherichia Coli* thermocompétentes TOP10 (Invitrogen). Le génotype de ces bactéries est *F- mcra Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 Δlacx74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG*.

## 2.2.3 Construction de molécules d'ADN recombinantes

Les fragments d'ADN d'intérêt sont amplifiés par PCR. Les références des différentes séquences clonées au cours de la thèse sont indiquées dans les Tableaux 2.2 et 2.3.

Les réactions de PCR conduites en vue de l'amplification des GST (Gene Sequence Tag) sont réalisées à partir soit d'ADN complémentaire (divers tissus et traitements), soit d'ADN génomique en cas d'échecs répétés sur les matrices précédentes. L'amplification par PCR des fragments T1 et T2 a été réalisée à partir de 1ng du marqueur de poids moléculaire 1Kb+ (Life Technologies).

Les amplifiats sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose avant d'en être extraits.

Les clonages ont été réalisés dans les vecteurs pCR 2.1-TOPO ou pCR Blunt selon les protocoles recommandés par le fournisseur. Dans le cas du vecteur pCR Blunt, 250ng des produits PCR purifiés sont incubés 1 heure à 16°C en présence de 25ng du vecteur, 4U de ligase dans le tampon de ligation contenant de l'ATP. Dans le cas du vecteur pCR 2.1-TOPO, 1μl de la solution du vecteur activé (lié de façon covalente à une topoisomérase) fournie est

Famille	gène	Longueur du transcrit	Position de la séquence clonée sur le transcrit, en pb à partir du 5'
	<i>At1g18880</i>	1764	720-1019
	<i>At1g22540</i>	1713	821-1131
	<i>At1g22550</i>	1695	1475-1728
	<i>At1g22570</i>	1698	732-983
	<i>At1g32450</i>	2180	1644-2023
	<i>At1g33440</i>	1791	48-359
	<i>At1g52190</i>	1293	6-266
	<i>At1g59740</i>	1942	80-284
	<i>At1g62200</i>	1909	1605-1854
	<i>At1g68570</i>	2058	1525-1823
	<i>At1g69860</i>	1668	56-309
	<i>At1g69870</i>	2161	32-295
	<i>At1g72140</i>	1668	550-863
	<i>At2g02020</i>	1638	1026-1335
	<i>At2g37900</i>	1728	1404-1653
	<i>At2g40460</i>	1752	1552-1841
	<i>At3g16180</i>	2005	16-316
	<i>AtNRT1.3</i>	2082	14-313
	<i>At3g25260</i>	1548	1474-1763
<i>PTR</i>	<i>At3g25280</i>	1566	450-771
	<i>At3g45650</i>	1677	13-262
	<i>At3g45660</i>	1674	2-304
	<i>At3g45700</i>	1647	33-335
	<i>At3g45710</i>	1671	22-306
	<i>At3g47960</i>	2060	1760-2061
	<i>At3g53960</i>	2538	2171-2468
	<i>AtPTR1</i>	2022	1687-1956
	<i>At4g21680</i>	2146	1783-2058
	<i>At5g01180</i>	1713	1528-1811
	<i>At5g11570</i>	1446	165-463
	<i>At5g13400</i>	1875	1680-1967
	<i>At5g28470</i>	1686	6-297
	<i>At5g46040</i>	1761	1479-1797
	<i>At5g46050</i>	1749	910-1165
	<i>At5g62680</i>	1851	1708-1851
	<i>At5g62730</i>	1770	120-374
	<i>AtNRT1.1</i>	2130	31-320
	<i>AtNRT1.2</i>	1974	40-290
	<i>AtPTR2B</i>	2000	1703-1985

Tableau 2.2 (1<sup>ère</sup> partie) : **Séquences d'*Arabidopsis thaliana* clonées dans les vecteurs pCR Blunt ou pCR 2.1-TOPO.**

incubée 5 minutes à température ambiante avec 1 à 5µl des produits PCR purifiés (quantités non précisées dans le protocole du fournisseur).

La séquence T2 a été sous clonée à partir du vecteur pCR 2.1-TOPO dans le vecteur pGEMHE entre les sites Xba1 et BamH1.

## **2.2.4 Transformation bactérienne par choc thermique et sélection des transformants**

Les bactéries compétentes TOP10 (Invitrogen) sont conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les lots de bactéries (50µl) sont décongelés et placés à  $0^{\circ}\text{C}$ , puis l'ADN plasmidique ou le produit de ligation est ajouté. Un choc thermique de  $42^{\circ}\text{C}$  pendant 30 secondes suivit de 2 minutes à  $0^{\circ}\text{C}$  est effectué.

Les bactéries sont ramenées à température ambiante par ajout de 1ml de milieu nutritif SOC (2% p/v Bacto tryptone, 0,5% p/v extrait de levure, NaCl 10mM, KCl 2,5mM,  $\text{MgCl}_2$  10mM,  $\text{MgSO}_4$  10mM, glucose 20mM) puis cultivées 1h à  $37^{\circ}\text{C}$  sous agitation. Les bactéries sont étalées sur des boîtes de pétri rondes (9cm de diamètre) contenant un milieu nutritif LB (Bacto tryptone  $10\text{g.l}^{-1}$ , extrait de levure  $5\text{g.l}^{-1}$ , NaCl  $85\text{mM}$ , agar  $20\text{g.l}^{-1}$ ) additionné de kanamycine ou d'ampicilline ( $50\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) et cultivées 24h à  $37^{\circ}\text{C}$ .

Dans le cas d'une sélection basée sur l'activité  $\beta$ -Galactosidase, 1,6g d'X-Gal sont étalés à la surface du milieu de culture dans les boîtes de pétri pour permettre de sélectionner les clones bactériens transformés ne présentant pas la faculté de métaboliser le X-Gal.

## **2.3 Extraction et analyse des ARN de plantes**

### **2.3.1 Extraction des ARN totaux**

La méthode d'extraction utilisée est dérivée de celle décrite par Lobréaux *et al.* (1992). L'extraction est faite à partir de tissus congelés dans de l'azote liquide au moment de la récolte et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

De 0,5 à 1g de matière fraîche sont broyés au polytron dans 5ml de tampon d'extraction (guanidine HCl 8M,  $\beta$ -mercaptoethanol 50 mM, EDTA 20mM et MES 20mM pH7) et 5ml de mélange phénol/chloroforme/alcool isoamilique (24/24/1 ; v/v/v). Après 5min

Famille	gène	Longueur du transcrit	Position de la séquence clonée sur le transcrit, en pb à partir du 5'
<i>NIA</i>	<i>AtNIA1</i>	3032	2709-3017
<i>NRT2</i>	<i>AtNRT2.7</i>	1513	1180-1502
	<i>AtNRT2.2</i>	1709	1401-1308
	<i>AtNRT2.5</i>	1762	1203-1506
	<i>AtNRT2.3</i>	1620	1336-1619
<i>AMT</i>	<i>AtAMt1.1</i>	1706	1401-1683
	<i>AtAMt1.2</i>	1780	1332-1631
	<i>AtAMt1.3</i>	1651	1466-1602
	<i>At3g24290</i>	1491	925-1237
	<i>AtAMt2</i>	1710	1154-1450
Divers	<i>AtAKT1</i>	3389	2492-2652
	<i>AtLHCP</i>	1014	811-1016
	<i>AtEF1<math>\alpha</math></i>	1704	1153-1393
	<i>Histone H4</i>	592	103-357

Tableau 2.2 (2<sup>ème</sup> partie) : **Séquences d'*Arabidopsis thaliana* clonées dans les vecteurs pCR Blunt ou pCR 2.1-TOPO.**

Séquence	
T2	2096pb (25207-27303)
T2.3	1-318
T2.2	938-1197
T2.1	1803-2097
T1	1775pb (23352-25107)
T1.3	1-361
T1.2	981-1401
T1.1	1453-1775

Tableau 2.3 : **Séquences de bactériophage Lambda clonées dans les vecteurs pCR Blunt ou pCR 2.1-TOPO.** Les séquences TX.3, TX.2 et TX.1 sont situées sur les séquences T2 et T1 dont les positions sur le génome du bactériophage Lambda (n° accession Gene Bank NC\_001416) sont indiquées entre parenthèses.

d'agitation, les phases aqueuses et organiques sont séparées par une centrifugation de 4000g à 4°C pendant 10min. Le surnageant contenant les acides nucléiques est prélevé et soumis à deux séries d'extraction et de centrifugation (9000g à 4°C pendant 10min), d'abord en présence de 4ml de mélange phénol/chloroforme/alcool isoamilique (24/24/1 ; v/v/v) pour éliminer les protéines résiduelles, puis en présence de 4ml de chloroforme/alcool isoamilique (24/1 ; v/v) pour éliminer les traces de phénol. Les acides nucléiques contenus dans le surnageant sont précipités 2h à -20°C en présence d'acétate de sodium 0,3M pH5,2 par addition d'un volume d'isopropanol pendant 2h à -20°C. Le culot d'acides nucléiques est récupéré par une centrifugation à 9000g et 4°C pendant 30min, lavé à l'éthanol 70%, et solubilisé dans 1ml de TE. Les ARN sont précipités différenciellement à partir des acides nucléiques en solution en présence de LiCl 2,5M à 4°C durant une nuit. Les ARN sont collectés par une centrifugation de 30 minutes à 16000g et 4°C. Le culot est repris dans 50 µl d'eau avant dosage par spectrophotométrie à 260nm puis visualisation sur gel d'agarose 1%.

### **2.3.2 Caractérisation des ARN par hybridation moléculaire**

La convention concernant les dénominations dans les expériences d'hybridations moléculaires adoptée dans la thèse est « sonde » pour les acides nucléiques radiomarqués et « cible » pour les acides nucléiques fixés sur les différents types de membrane.

#### **2.3.2.1 Northern-blot**

Les ARN sont séparés par électrophorèse en condition dénaturante sur un gel d'agarose 1% contenant 18% de formaldéhyde (v/v), dans un tampon contenant acétate de sodium 8mM, MOPS 20mM, EDTA 1mM pH8. Les échantillons (20µg d'ARN totaux) sont dénaturés avant dépôt sur gel par une incubation de 10min à 65°C dans le tampon d'électrophorèse en présence de 50% formamide (v/v), 17,5% de formaldéhyde (v/v), 0,5% glycérol, EDTA 0,1mM, 0,025% bleu de bromophénol, 0,025% Xylène Cyanol, BET 0,025mg.ml<sup>-1</sup>. Les ARN sont ensuite transférés par capillarité sur une membrane nylon Biotrans(+) chargée positivement (ICN) en présence de SSC concentré 10 fois (NaCl 1,5M, citrate trisodique 0,15M pH 7, Sambrook *et al.*, 1989). Après un lavage de 5 minutes des membranes dans du SSC concentré 2 fois adjoint de SDS (0,1% p/v), les ARN sont fixés à la membrane sèche par une exposition de 1 minute à la lumière UV (254nm). La membrane est préhybridée 3 heures à 42°C dans le tampon d'hybridation (formamide désionisée 50%, SSC

concentré 5 fois, Sarkosyl 1% p/v, Dextran sulfate 10% p/v) additionné de 100 $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> d'ADN de sperme de saumon traité aux ultrasons et préalablement dénaturé 5 minutes à 100°C. Après dénaturation de 5min à 100°C, la sonde ADN radioactive est diluée dans le tampon d'hybridation afin d'obtenir une activité spécifique de 10<sup>6</sup>cpm.ml<sup>-1</sup>. L'hybridation est réalisée durant 16h à 42°C sous agitation. L'excès de sonde et les hybridations aspécifiques sont éliminées par 2 lavages successifs de 30min à 42°C d'abord dans un tampon SSC concentré 2 fois adjoint de SDS (0,1% p/v), puis dans un tampon SSC dilué 10 fois adjoint de SDS (0,1% p/v). Les signaux radioactifs sont quantifiés au phosphoimageur. Les membranes sont exposées 12 à 24h contre un écran BAS-MS (Fujifilm). L'écran est lu par un scanner FLA 5000 (Fujifilm). Les images sont analysées avec le logiciel Image Gauge version 4.0 (Fujifilm). Les membranes sont réutilisables jusqu'à 8 fois après avoir été régénérées par un traitement de 10 minutes à 100°C dans du SDS 0,1% p/v.

Les sondes d'ADN radioactives sont obtenues à partir de fragment d'ADN matrice par élongation d'amorces aléatoires avec le fragment Klenow de l'ADN polymérase I en présence de  $\alpha$ dAT<sup>32</sup>P et  $\alpha$ dCTP<sup>32</sup> selon la méthode de Feinberg et Vogelstein (1983).

Le fragment d'ADN utilisé comme sonde est dénaturé 5 minutes à 94°C, dilué à une concentration de 500 ng.ml<sup>-1</sup>, puis incubé 60 minutes en présence de dGTP 20 $\mu$ M, dTTP 20 $\mu$ M, Tris 50mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, DTT 2mM, HEPES pH 6,6 200mM, 172  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> d'un mélange d'hexamère aléatoire, 400 $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> de BSA,  $\alpha$ dCTP<sup>32</sup> (3000Ci/mmol) 166 nM,  $\alpha$ dATP<sup>32</sup> (3000Ci/mmol) 166 nM, 500 U/ml d'ADN polymérase I (Proméga). Les nucléotides radioactifs non incorporés sont éliminés par filtration sur colonne sephadex G50 (Nick columns Pharmacia), le tampon TE étant utilisé comme tampon d'élution. L'activité spécifique de la sonde radioactive est mesurée en présence de 3ml de scintillant liquide (Ultima Gold, Perkin Elmer) à l'aide d'un compteur à scintillation (Tri Carb 2100 TR, Packard Bioscience). Les différentes sondes utilisées sont (i) une séquence partielle de l'ADNc du gène *AtNIA1* (n° accession Gene Bank T46039) (ii) une séquence partielle (nucléotides 898 à 2509) de l'ADNc du gène *AtNIA2* (Wilkinson et Crawford, 1993) (iii) l'ADNc complet d'*AtNRT2.1* (Filleur et Daniel-Vedele, 1999) (iv) les GST des gènes *AtNRT1.1*, *AtNRT1.2* et *AtNRT1.5* présentées Tableau 2.2, (v) un fragment d'ADN de tournesol correspondant à l'ARN ribosomique 25S (Choumane et Heizman, 1988).

### 2.3.2.2 Puces à ADN à basse densité

#### 2.3.2.2.1 Dépôt sur membrane

Les cibles sont générées par PCR à partir des GST clonées, à l'aide d'amorces spécifiques des bordures du site d'insertion des vecteurs de clonage (amorce gauche : TAGTAACGGCCGCCAGTGTG et amorce droite : CGCCAGTGTGATGGATATCT). Les amplifiats sont ensuite purifiés sur colonne Minelute (Qiagen) selon les spécifications du fournisseur.

Un aliquote est dosé par spectrophotométrie avec un lecteur de microplaque Victor<sup>2</sup> (Perkin Elmer) en présence de picogreen (intercalant fluorescent de l'ADN double brin, Molecular probe) et la concentration des amplifiats est ajustée à  $0,4\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ .

Les amplifiats sont ensuite ordonnés en plaque 384 puits pour dépôt sur membrane Nylon N+ (Amersham) avec le robot Biogrid (Biorobotics) au laboratoire TAGC (Université de Luminy, Marseille). La densité des membranes est de 65 dépôt par  $\text{cm}^2$ , et les dépôts sont ordonnés en matrice 3x3. Dans chaque matrice sont représentées 4 amplifiats différents (A,B,C,D) déposés en double suivant le schéma suivant :

B	A	C
A	B	C
D	D	vide

Après dépôt, les membranes sont soumises à des traitements dénaturants (2 fois dix minutes dans NaOH 0,5M, NaCl 1,5M) et neutralisants (2 fois 10 minutes dans NaCl 1,5M, Tris-HCl 0,5M pH8, EDTA 0,5mM). Les traitements sont réalisés en déposant les membranes sur du papier Whatmann en veillant à ce que les déplacements de liquide ne se fasse que par capillarité pour éviter de faire « baver » les sondes qui ne sont pas encore fixées à ce stade. L'ADN est fixé de manière covalente aux membranes nylon par un traitement thermique de 2h à 80°C suivi d'un traitement aux UV de 5 minutes à 264 nm.

Les cibles déposées sur la membrane sont les fragments d'ADN répertoriés dans les Tableaux 2.2 et 2.3 à l'exception des séquences T1 et T2.



#### 2.3.2.2.2 Hybridation

Les membranes sont préhybridées 3h sous agitation à 65°C dans du tampon Church (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5M, SDS 7% p/v, EDTA 1mM pH 7,2) additionné de 100µg.ml<sup>-1</sup> d'ADN de sperme de saumon traité aux ultrasons et préalablement dénaturé 5 minutes à 100°C. La sonde complexe radioactive est ajoutée dans le tampon (2,5x10<sup>6</sup> cpm.ml<sup>-1</sup> de tampon) après dénaturation 5 minutes à 100°C et hybridée sur les membranes durant 16h à 65°C sous agitation.

Les membranes sont ensuite lavées à 65°C sous agitation 2 fois 5 minutes dans du tampon de lavage 1 (SSC concentré 2 fois, SDS 0,1% p/v) et une fois 5 minutes dans du tampon de lavage 2 (SSC dilué 10 fois, SDS 0,1% p/v). La quantification du signal radioactif est faite au phosphoimageur. Les membranes sont exposées 12 à 24h contre un écran BAS-MS (Fujifilm). L'écran est lu par un scanner FLA 5000 (Fujifilm). Les images sont analysées avec le logiciel Image Gauge version 4.0 (Fujifilm).

Les membranes sont réutilisables jusqu'à 8 fois après avoir été régénérées par un traitement de 10 minutes à 100°C dans un tampon SDS (0,1% p/v).

Les sondes complexes sont générées par transcription inverse en présence d'un nucléotide radiomarqué. La transcription inverse est menée 1 heure à 42°C à partir de 0,3µg.µl<sup>-1</sup> d'ARN totaux auxquels sont ajoutés 0,03ng.µl<sup>-1</sup> de transcrit synthétique T2 (voir §2.3.2.2.3), en présence de 13 U.µl<sup>-1</sup> de reverse transcriptase (Superscript III, Invitrogen), 1mM de dATP, dTTP et dGTP, 5µM de dCTP non radiomarqué, 30µCi de α-<sup>33</sup>PdCTP (3000Ci.mmol<sup>-1</sup>), 1µM d'amorces oligo dT<sub>18</sub> (Eurobio) dans le tampon de l'enzyme concentré 1 fois. La réaction est ensuite arrêtée par lyse alcaline des ARN en présence de NaOH 0,25M, SDS (0,03% p/v) et EDTA 15mM, durant 30 minutes à 65°C suivie d'une neutralisation de 5 minutes à température ambiante dans Tris-HCl 0,22M et HCl 0,13N. Les nucléotides radioactifs non incorporés sont éliminés par filtration sur colonne sephadex G50 (Nick columns Pharmacia), le tampon TE étant utilisé comme tampon d'élution. L'activité spécifique de la sonde radioactive est mesurée en présence de 3ml de scintillant liquide (Ultima Gold, Perkin Elmer) à l'aide d'un compteur à scintillation (Tri Carb 2100 TR, Packard Bioscience).

### 2.3.2.2.3 Transcription *in vitro*

Les fragments destinés à être transcrits *in vitro* sont clonés dans le vecteur d'expression en ovocyte de Xénope pGEMHE.

Le plasmide pGEMHE contenant le fragment d'intérêt est purifié avec le kit QIAfilter Plasmid Midi puis linéarisé avec une enzyme située en aval de la séquence à transcrire avant d'être utilisé comme matrice pour une synthèse d'ARN polyadénylé avec le kit mMESSAGING MACHINES (Ambion). Ce kit utilise une polymérase en présence d'amorces T7 (TAATACGACTCACTATAGGGAGA) et d'un analogue de coiffe.

## 2.4 Matériel végétal et techniques de cultures

### 2.4.1 Matériel végétal

Ecotypes sauvages Columbia (Col) et Wassilewskija (WS)

Mutant *atnrt1.2* : :T

Mutant d'insertion du gène *AtNRT1.2* isolé dans la banque FLAG db++ (Versailles), dérivé de l'écotype sauvage WS. L'insertion se situe dans le 3<sup>ème</sup> intron, à 1938pb de l'ATG.

Mutant *atnrt1.5* : :T

Mutant d'insertion du gène *AtNRT1.5* (*At1g32450*) dérivé de l'écotype sauvage Columbia.

### 2.4.2 Culture en serre

L'amplification des lots de graines utilisés en culture hydroponique est faite en serre. Les graines sont semées en barquettes plastiques sur du terreau humide et arrosées par la suite avec de l'eau du robinet de manière à ne pas laisser le substrat se dessécher (soit environ une fois par semaine, variable en fonction des saisons). Lorsque les plantes ont développé une rosette d'environ 3cm de diamètre, les barquettes sont entourées d'un film plastique haut d'environ 30 cm et non fermé sur le dessus de manière à empêcher les contaminations entre génotypes.

L'arrosage est stoppé lorsque les plantes ont développé un grand nombre de siliques sur les hampes florales et la récolte réalisée après dessèchement complet des tissus.

Elément	Concentration
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1mM
MgSO <sub>4</sub>	1mM
CaCl <sub>2</sub>	0,25mM
KCl	50µM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	30µM
MnSO <sub>4</sub>	5µM
ZnSO <sub>4</sub>	1µM
CuSO <sub>4</sub>	1µM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0,1µM
Na-Fe-EDTA	2,5mM
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1mM ou 5mM
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,25mM

Tableau 2.4 : **Milieu HY NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>**. Le pH final est ajusté à 5,8 avec KOH 2M.

Elément	Concentration
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1mM
MgSO <sub>4</sub>	1mM
CaCl <sub>2</sub>	0,25mM
KCl	50µM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	30µM
MnSO <sub>4</sub>	5µM
ZnSO <sub>4</sub>	1µM
CuSO <sub>4</sub>	1µM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0,1µM
Na-Fe-EDTA	2,5mM
KNO <sub>3</sub>	1mM ou 5mM ou 0mM

Tableau 2.5 : **Milieu HY NO<sub>3</sub><sup>-</sup>**. Le pH final est ajusté à 5,8 avec KOH 2M.

Elément	Concentration
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1mM
MgSO <sub>4</sub>	1mM
CaCl <sub>2</sub>	0,25mM
NaCl	50µM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	30µM
MnSO <sub>4</sub>	5µM
ZnSO <sub>4</sub>	1µM
CuSO <sub>4</sub>	1µM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0,1µM
Na-Fe-EDTA	2,5mM
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1mM ou 5mM
NaSO <sub>4</sub>	0,25mM

Tableau 2.6 : **Milieu HY NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>/-K**. Le pH final est ajusté à 5,8 avec NaOH 2M.

### 2.4.3 Culture hydroponique

Le matériel végétal est cultivé en hydroponie selon la méthode décrite par Lejay *et al.* (1999). Le support de culture est un microtube de 1,5ml en polypropylène rempli de sable (préalablement lavé puis stérilisé 12h à 150°C dans un four pasteur) dont le fond a été coupé et remplacé par une grille inox (maille 300µm). Les microtubes sont insérés sur des disques en PVC, eux mêmes posés sur des plaques en polystyrène qui flottent à la surface de bassines de 10l remplies de milieu de culture. La taille des différents éléments est telle que la grille affleure à la surface du milieu de culture afin que le sable soit humidifié par capillarité. Les graines sont mises en suspension dans de l'eau avant d'être semées à la pipette sur le sable. Lorsque 5cm de racine a traversé la grille inox, les plaques en polystyrène sont remplacées par des plaques en PVC rigides disposées à 1cm au dessus de la surface du milieu de culture et reposant sur le rebord des bassines. Les plantes sont cultivées en chambre de culture sous les conditions suivantes : jour/nuit, 8h/16h, 21°C/23°C, 250µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> d'intensité lumineuse, 70% d'humidité relative. Les plantes sont cultivées sur de l'eau du robinet la première semaine puis sur solution nutritive. La solution est remplacée 1 fois par semaine puis tous les deux jours une semaine avant expérience. La composition des solutions nutritives est indiquée dans les Tableaux 2.4, 2.5 et 2.6.

## 2.5 Mesure de paramètres physiologiques

### 2.5.1 Dosage d'ions

#### 2.5.1.1 Dosage de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

Lors de la récolte les racines sont rincées 1 minute dans CaSO<sub>4</sub> 0,1mM avant d'être mises à sécher pendant 48h dans une étuve à 60°C. Les ions sont extraits en présence d'eau 24h à température ambiante (0,1ml.mg<sup>-1</sup>MS).

La concentration en NO<sub>3</sub><sup>-</sup> des solutions est mesurée à l'aide d'une chaîne analytique à flux continu (Bran et Lübbe). Le NO<sub>3</sub><sup>-</sup> de l'échantillon est réduit en NO<sub>2</sub><sup>-</sup> sur une colonne de cadmium. Le NO<sub>2</sub><sup>-</sup> formé est ensuite transformé en un complexe coloré, en présence de sulfanilamide et de NNEDD (N-Naphtyl Ethylène Diamine Dichlorure). La mesure de l'absorbance à 540nm de ce composé permet de doser la teneur en NO<sub>3</sub><sup>-</sup> initiale de l'échantillon par comparaison avec une gamme étalon.

### 2.5.1.2 Dosage multi-anionique

L'analyse est effectuée par chromatographie anionique grâce au chromatographe Dionex ICS-2500 piloté par un ordinateur équipé du logiciel Chroméléon (Dionex version 6.50). L'appareil permet de séparer les anions organiques et minéraux d'un extrait liquide sur la base de leur temps de rétention différentiel sur une colonne échangeuse d'anions traversée par un gradient de NaOH, puis de les doser individuellement en mesurant la conductance des fractions résultantes de la purification.

Les extraits sont purifiés sur une membrane d'acétate de cellulose (filtres Nalgene, porosité 0,45µm) afin d'éliminer les débris puis sur une pré-colonne échangeuse d'anions (ATC-3, Dionex) afin d'y fixer les contaminants. Les anions de 25µl de chaque échantillon sont concentrés sur une colonne échangeuse d'anions (AG11, Dionex). Les anions sont ensuite séparés sur une colonne échangeuse d'anions (AS11, Dionex) en présence d'un gradient de soude. Chaque anion est caractérisé par un temps de rétention spécifique sur la colonne. Après séparation, les anions passent par un suppresseur (SRS, Dionex) dont la fonction est d'éliminer les ions OH<sup>-</sup> du gradient de soude qui interféreraient lors du dosage par conductimétrie. Les concentrations des différents éléments sont ensuite calculées par comparaison avec une courbe étalon.

## 2.5.2 Absorption de <sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

### 2.5.2.1 Marquages <sup>15</sup>N

Les mesures sont réalisées sur des plantes cultivées en hydroponie. Les racines de plantes intactes sont successivement rincées 1 minute dans CaSO<sub>4</sub> 0,1mM, placées 5 minutes sur une solution nutritive complète dont le NO<sub>3</sub><sup>-</sup> est enrichi en <sup>15</sup>N, puis lavée 1 minute dans CaSO<sub>4</sub> 0,1mM. Les racines et les feuilles sont récoltées séparément et séchées 48h à 60°C pour analyse. L'excès isotopique de la source (<sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> de la solution) varie en fonction du temps de marquage : 20% pour les marquages « long » (de 20 à 180 minutes), et 99% pour les marquages « courts » (5 minutes). Lors de marquages de 5 minutes, la quantité totale de <sup>15</sup>N incorporée dans la plante est représentative de l'influx unidirectionnel de <sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, l'efflux étant négligeable (Clarkson, 1986). Lorsque le marquage est effectué en temps long, la quantité de

$^{15}\text{N}$  incorporée est représentative de l'absorption nette de  $\text{NO}_3^-$ , qui est le bilan des flux unidirectionnels entrant et sortant.

### 2.5.2.2 Mesure de l'abondance isotopique d'un échantillon

#### 2.5.2.2.1 $^{15}\text{N}$ total

L'azote a deux isotopes stables : le  $^{14}\text{N}$ , le plus abondant qui a 7 neutrons, et le  $^{15}\text{N}$  qui représente environ 0,3% de l'azote terrestre et qui a 8 neutrons.

La teneur en N total des échantillons et son abondance isotopique en  $^{15}\text{N}$  sont mesurées simultanément par spectrométrie de masse à flux continu. Une masse connue de matière sèche est déposée dans une cupule en étain, et injectée dans un analyseur C/N (Roboprep CN, Europa Scientific). Après combustion à  $1000^\circ\text{C}$  en présence de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  et  $\text{CuO}$ , les molécules de gaz issues de l'échantillon (principalement  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$  et  $\text{NO}_x$ ) sont transportés par un flux de d'hélium vers un four de réduction où les oxydes d'azote sont réduits en  $\text{N}_2$  en présence de  $\text{Cu}$  à  $570^\circ\text{C}$  (réaction de Dumas).  $\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{CO}_2$  sont ensuite respectivement piégés par des colonnes de perchlorate de magnésium et de Carbosorb en série. Une partie du flux d'hélium contenant le  $\text{N}_2$  provenant de l'échantillon est alors injectée dans un spectromètre de masse (Tracermass, Europa Scientific) dans lequel les différentes molécules  $^{14}\text{N}-^{14}\text{N}$ ,  $^{14}\text{N}-^{15}\text{N}$  et  $^{15}\text{N}-^{15}\text{N}$ , de rapport de masse/charge ( $m/z$ ) respectifs 28, 29, 30, sont séparées et les quantités analysées. La quantité de N total de l'échantillon est donnée par la somme des quantités des 3 formes isotopiques. L'abondance isotopique en  $^{15}\text{N}$  (A%) est calculée selon la formule :

$$A\% = \frac{[^{15}\text{N}] \times 100}{[^{14}\text{N}] + [^{15}\text{N}]} = \frac{S30 + (S29/2)}{S28 + S29 + S30} \times 100$$

où S28, S29 et S30 sont les intensités des signaux respectivement recueillis aux  $m/z$  28, 29 et 30.

L'enrichissement isotopique en  $^{15}\text{N}$  est caractérisé par un excès isotopique (E%), calculé par la différence entre l'abondance isotopique de l'échantillon (A%) et l'abondance isotopique naturelle (A% nat). L'abondance naturelle (voisine de 0,367%) est mesurée sur des tissus végétaux récoltés avant l'apport de l'isotope lourd.

#### 2.5.2.2.2 $^{15}\text{NO}_3^-$

##### *Abondance isotopique de $^{15}\text{N}$ :*

L'abondance isotopique en  $^{15}\text{N}$  de  $\text{NO}_3^-$  est déterminée après transformation en NO suivant la méthode décrite par Prosser *et al.*, (1993). Après mesure de la teneur en  $\text{NO}_3^-$  des échantillons, un aliquote de solution contenant  $60\mu\text{g}$  de  $\text{NO}_3^-$  est évaporé puis mis en présence de  $1\text{ml}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  18N et  $0,1\text{ml}$  Hg dans un tube à vis de  $13\text{ml}$ . Le tube est ensuite fermé par un bouchon à septum caoutchouté, et l'air éliminé par un balayage à l'hélium. La réaction de volatilisation du  $\text{NO}_3^-$  en NO est réalisée en plongeant le tube dans une cuve à ultra sons Branson 3200 pendant 90 à 120 minutes. Dans ces conditions, la réaction est spécifique de  $\text{NO}_3^-$ , les formes réduites de N n'étant pas volatilisées (Volk *et al.*, 1979, Prosser *et al.*, 1993). Les tubes sont positionnés dans un passeur d'échantillons (Gilson 222) pour l'injection automatique du NO formé dans le flux de He traversant le spectrophotomètre de masse. Les molécules  $^{14}\text{N}-^{16}\text{O}$ ,  $^{15}\text{N}-^{16}\text{O}$  et  $^{14}\text{N}-^{17}\text{O}$  sont analysées aux  $m/z$  30 et 31, et l'abondance isotopique en  $^{15}\text{N}$  est calculée par la formule :

$$A\% = \frac{S31}{S30+S31} \times 100 - A_{\text{nat}^{17}\text{O}}$$

où  $A_{\text{nat}^{17}\text{O}}$  est l'abondance isotopique naturelle de  $^{17}\text{O}$ .

##### *Dilution isotopique de $^{15}\text{NO}_3^-$ :*

Les quantités de  $\text{NO}_3^-$  de nos échantillons étaient très faibles, aussi nous avons effectué des dilutions isotopiques avant de mesurer l'abondance isotopique. Cela consiste à ajouter une quantité connue de  $\text{NO}_3^-$  non marqué ( $Q_{\text{exogène}}$ ). L'abondance isotopique en  $\text{NO}_3^-$  de l'échantillon est calculée à partir de l'abondance isotopique mesurée suivant la formule suivante :

$$A\% = \frac{(Q_{\text{échantillon}} + Q_{\text{exogène}}) \times A\% - (A_{\text{nat}} \times Q_{\text{exogène}})}{Q_{\text{échantillon}}}$$

avec  $Q_{\text{échantillon}}$  la quantité de  $\text{NO}_3^-$  contenue dans l'aliquote dosé de l'échantillon.

### 2.5.3 Absorption de $^{35}\text{S}$ et $^{33}\text{P}$

Les expériences d'absorption de sulfate et phosphate radiomarqués ( $^{35}\text{S}$  et  $^{33}\text{P}$ ) ont été réalisées sur le même principe que celles destinées à mesurer les absorptions de  $\text{NO}_3^-$  marqué (§2.5.2.1) avec des précautions de confinement et de protection adaptées. Les racines de plantes intactes sont successivement rincées 1 fois dans  $\text{CaSO}_4$  0,1mM, incubées 5 minutes dans le milieu de marquage (HY 5mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3^-$  dont le  $\text{PO}_4^-$  ou le  $\text{SO}_4^-$  est marqué à hauteur de  $2,11 \times 10^{11}$  dpm.mol<sup>-1</sup> ou  $7,24 \times 10^{11}$  dpm.mol<sup>-1</sup> respectivement), puis rincées deux fois dans  $\text{CaSO}_4$  0,1mM. Racines et parties aériennes sont ensuite récoltées, séchées à l'étuve et les ions libres extraits.

La radioactivité (A) en dpm d'un aliquote des extraits d'ions libres est comptée en présence de 3ml de liquide scintillant (Ultima Gold, Perkin Elmer) dans des pilluliers de 6ml (Pico Prias Vial, Packard Bioscience) avec un compteur à scintillation (Tri Carb 2100 TR, Packard). La quantité (Q) en nmol de  $\text{PO}_4^{2-}$  ou  $\text{SO}_4^{2-}$  absorbée au cours de l'expérience est ensuite calculée suivant la formule :

$$Q = \left( A \times \frac{V_a}{V_e} \right) \times \frac{1}{2,22 \times 10^6} \times \frac{1}{M}$$

avec M l'activité de la source de  $\text{PO}_4^{2-}$  ou  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $V_a$  le volume de l'aliquote compté,  $V_e$  le volume d'extraction des ions libres, pour  $1\mu\text{Ci} = 2,22 \times 10^6$  dpm.

### 2.5.4 Mesure de transpiration

Les mesures sont faites sur des plantes de 6 semaines cultivées en hydroponie. La méthode (dite du « potomètre ») consiste à mesurer la perte de poids d'un système contenant une plante alimentée par du milieu de culture. Un microtube de culture contenant une plante est inséré dans le couvercle d'un pot à urine préalablement percé à l'emporte pièce. L'étanchéité avec le couvercle est assurée grâce à une bande de mastic silicone. Les couvercles sont vissés sur un pot à urine contenant du milieu de culture. L'étanchéité entre le pot et le couvercle est assurée avec une bande de parafilm. Chaque système est pesé toutes les deux heures. Les pertes de poids résultent essentiellement de la quantité d'eau transpirée par la



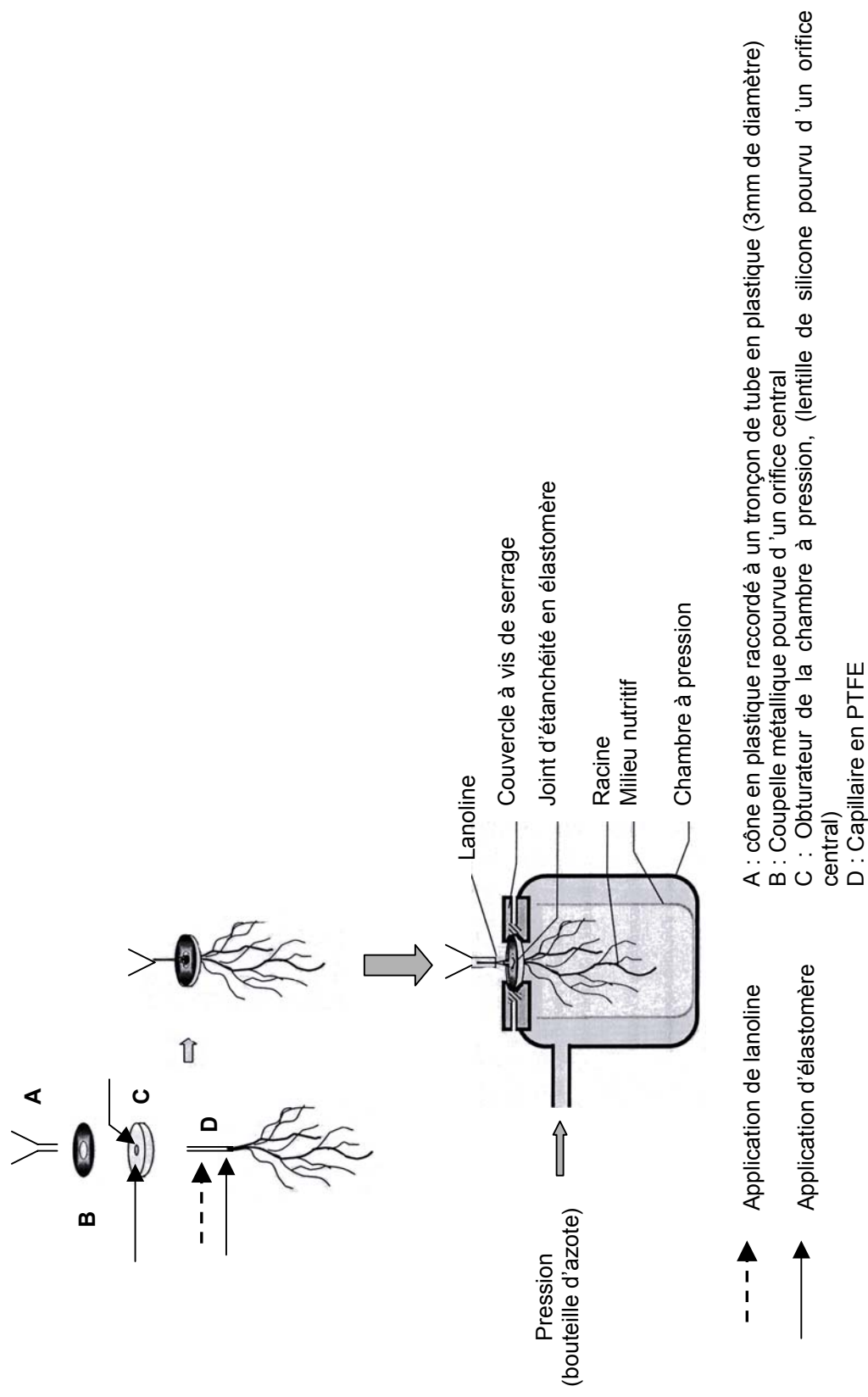


Figure 2.4 : Schéma du montage des racines pour le prélèvement de sève du xylème sous pression. D'après un schéma d'Hélène Javot (thèse de doctorat, p41).

plante, les pertes dues à l'évaporation (mesurée avec des dispositifs sans plante) étant négligeable.

Après chaque mesure, les rosettes sont récoltées, les feuilles individualisées et les surfaces mesurées par analyse d'image avec les logiciels PhotoshopPro version 6.0 et Optimas version 6.1. Les flux de transpiration sont rapportés à la surface des parties aériennes des plantes sur lesquels ils ont été mesurés.

### **2.5.5 Récolte de sève**

Les plantes cultivées en hydroponie sont sorties du dispositif de culture de culture 1 semaine avant expérience et maintenues à la surface du milieu de culture sur un flotteur de polystyrène.

Les racines sont maintenues dans du milieu de culture tout au long des différentes étapes.

La plante est décapitée, l'extrémité de la racine insérée dans un capillaire en PTFE.

Dans le cas d'une exsudation sous pression, l'assemblage racine-capillaire est passé à travers l'obturateur de la chambre à pression (Figure 2.4), et un joint d'étanchéité est réalisé par injection de polyvinylsiloxane (élastomère de basse viscosité, President Light, Coltene). Ce système est surmonté d'une rondelle de métal dont l'adhérence est assurée par l'élastomère. Lorsque l'élastomère est devenu solide mais non rigide, le tout est inséré dans la chambre à pression et maintenu par un écrou au centre du couvercle de la bombe à pression. Un tube rempli de milieu de culture est installé dans la chambre afin de maintenir la racine immergée. Après serrage des différents éléments de la chambre afin d'assurer l'étanchéité du dispositif, le capillaire est enduit de lanoline puis raccordé à un cône plastique modifié qui sert de réceptacle à la sève. L'exsudation forcée est provoquée en imposant une pression de 3,5 Atm à l'intérieur de la chambre pendant 40 minutes environ.

Dans le cas de la récolte par exsudation spontanée, la zone de jonction racine-capillaire en PTFE est insérée dans une section de tube en plastique de 1 cm de diamètre, qui est rempli d'élastomère afin de rendre la jonction étanche. Le capillaire de PTFE est raccordé à un cône plastique modifié qui sert de réceptacle à la sève. Le temps d'exsudation est d'environ 3 heures.

La racine est récoltée et son poids de matière sèche est mesuré. Si un marquage  $^{15}\text{N}$  ou un dosage de  $\text{NO}_3^-$  est réalisé parallèlement à la récolte de sève, la racine est rincée dans du  $\text{CaSO}_4$  0,1mM pendant 1 minute.

## 3 Chapitre III

### ETUDE TRANSCRIPTOMIQUE DE L'EXPRESSION DES GENES DE LA FAMILLE *PTR*

#### 3.1 Introduction

La famille *PTR* d'*A. thaliana* regroupe un grand nombre de transporteurs putatifs, dont seulement 5 ont été caractérisés du point de vue fonctionnel (voir Chapitre 1). Trois d'entre eux (AtNRT1.1, AtNRT1.2 et AtNRT1.4) sont considérés comme des transporteurs de  $\text{NO}_3^-$  sur la base (i) d'une activité de transport observée en ovocyte de Xénope (Tsay *et al.*, 1993, Huang *et al.*, 1999, Chiu *et al.*, 2004) et (ii) d'un phénotype *in planta*, associé à une altération d'un transport de  $\text{NO}_3^-$  chez un mutant KO (Tsay *et al.*, 1993, Chiu *et al.*, 2004) ou des lignées antisens (Huang *et al.*, 1999). Aucune donnée fonctionnelle n'a encore été publiée sur la grande majorité des gènes *PTR* d'*Arabidopsis*, laissant ouverte l'hypothèse qu'un certain nombre d'entre eux puisse coder des transporteurs de  $\text{NO}_3^-$ , non encore identifiés.

Le but du travail décrit dans ce chapitre a tout d'abord été de développer un outil de type membrane basse densité dédiée, permettant de conduire des études d'expression sur l'ensemble des gènes *PTR* d'*Arabidopsis*. Cet outil a ensuite été utilisé pour caractériser la localisation de l'expression de ces gènes dans la plante, et la régulation de l'accumulation de leurs transcrits par différents traitements déjà connus pour gouverner l'expression de transporteurs de  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  (carence en N, ré-alimentation avec  $\text{NO}_3^-$ , lumière/obscurité, apport exogène de sucres).

La réalisation de ce travail a largement fait appel à l'analyse bioinformatique. En effet, le contour exact de la famille *PTR* d'*Arabidopsis* était loin d'être clair au début de ce projet. Il a donc fallu procéder à une identification de ses différents membres à partir des données disponibles dans les banques de données. La détermination de la structure de la famille *PTR* chez *Arabidopsis*, qui regroupe 51 gènes, sera donc présentée dans la première partie de ce chapitre. Un tel effectif justifiait pleinement l'élaboration d'une membrane de type basse densité pour aborder les études d'expression systématiques. Néanmoins, la forte homologie

détectée entre de nombreux membres de la famille *PTR* a imposé le choix de la technologie GST (Gene Sequence Tag) pour limiter au maximum les problèmes d'hybridation aspécifique, fréquemment rencontrés avec les premières générations de puces EST. Ainsi, la seconde étape du travail a consisté à élaborer ces GSTs (détermination de leur séquence, clonage, amplification, purification), avant de réaliser le dépôt des séquences correspondantes sur membrane de nylon.

L'utilisation de la membrane basse densité ainsi obtenue a enfin nécessité la mise au point de protocoles d'utilisation, dont la partie la plus délicate a correspondu à la validation d'une méthode originale de normalisation des données. C'est un problème central des approches transcriptomiques basées sur les puces ADN (Schuchhardt *et al.*, 2000, Wolkenhauer *et al.*, 2002). La plupart des méthodes de normalisation sont basées sur le principe d'invariance du signal total, qui postule que la grande majorité des transcrits présents dans un échantillon ne voient pas leur abondance changer d'un traitement à l'autre (Schaffer *et al.*, 2001, Wang *et al.*, 2000, Yazaki *et al.*, 2000). Cette méthode n'est pas applicable dans notre cas, car l'hypothèse d'invariance du signal total ne peut être raisonnablement formulée pour une cinquantaine de gènes seulement. Les normalisations portant sur un effectif restreint de gènes s'appuient généralement sur un ou plusieurs gènes dits « de ménage » (Reymond *et al.*, 2000, Seki *et al.*, 2001, Ledger *et al.*, 2004), dont l'expression est supposée constitutive. Cette dernière condition est en fait rarement remplie (Brunner *et al.*, 2004), ce qui conduit à remettre fortement en cause ce type de procédure de normalisation. Compte tenu de ces difficultés, nous avons opté pour le principe d'étalonnage interne à l'aide d'un transcrit synthétique (Eickhoff *et al.*, 1999, Holstege *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 2000, van de Peppel *et al.*, 2003). Celui-ci est ajouté en quantité connue aux échantillons d'ARN de plante avant transcription inverse, ce qui permet théoriquement de normaliser de manière rigoureuse les données quantitatives obtenues sur différents échantillons.

Nous avons enfin été confrontés au problème de la variabilité d'efficacité de la production des ADNc retro-transcrits utilisés pour l'hybridation sur la membrane. En effet, la nécessité d'utiliser des séquences spécifiques pour chacun des gènes *PTR* a parfois imposé de choisir des GSTs situées largement en amont de l'extrémité 3' du transcrit. Dans ce cas, l'intensité du signal d'hybridation obtenu avec la GST dépend beaucoup de la synthèse d'ADNc de longueur suffisante. Une normalisation supplémentaire s'impose donc pour corriger les variations éventuelles de la taille moyenne des ADNc produits à partir d'échantillons différents. Bien qu'aucune étude portant sur ce sujet n'ait à notre connaissance

Nom usuel	n°AGI	n°accession			
<i>AtNRT1.1(CHL1)</i>	<i>At1a12110</i>	TC261228	<i>AtNRT1.3</i>	<i>At3a01350</i>	TC270251
	<i>At1g18880</i>	TC272131		<i>At3g16180</i>	TC273027
	<i>At1g22540</i>	TC255446		<i>At3g21670</i>	TC271057
	<i>At1g22550</i>	TC264343		<i>At3g25260</i>	TC273869
	<i>At1g22570</i>	TC270273		<i>At3g25280</i>	TC260821
	<i>At1g27040</i>	TC263230		<i>At3g45650</i>	TC273585
	<i>At1g27080</i>	TC260902		<i>At3g45660</i>	TC260551
	<i>At1g32450</i>	TC252687		<i>At3g45680</i>	TC276492
	<i>At1g33440</i>	TC258825		<i>At3g45690</i>	TC268867
	<i>At1g52190</i>	TC252289		<i>At3g45700</i>	TC275774
	<i>At1g59740</i>	TC254533		<i>At3g45710</i>	TC276404
	<i>At1g62200</i>	TC265373		<i>At3g45720</i>	TC279797
	<i>At1g68570</i>	TC253917		<i>At3g47960</i>	TC251784
	<i>AtNRT1.2(NTL1)</i>	<i>At1g69850</i>		TC262237	<i>AtPTR1</i>
<i>At1g69860</i>		TC260532	<i>At3g54140</i>	TC252193	
<i>At1g69870</i>		TC252706	<i>At4g21680</i>	TC263007	
<i>At1g72120</i>		TC274356	<i>At5g01180</i>	TC266413	
<i>At1g72130</i>		TC254188	<i>At5g11570</i>	TC260535	
<i>AtPTR2B</i>	<i>At2g02040</i>	TC252180	<i>At5g13400</i>	TC272247	
	<i>At2g02040</i>	TC252180	<i>At5g14940</i>	TC259146	
<i>AtNRT1.4(NTP2)</i>	<i>At2g26690</i>	TC261568	<i>At5g19640</i>	T29J13.60	
	<i>At2g37900</i>	T8P21.19	<i>At5g28470</i>	F24J2.10	
	<i>At2g38100</i>	TC270469	<i>At5g46040</i>	TC267421	
	<i>At2g40460</i>	TC264391	<i>At5g46050</i>	TC256103	
			<i>At5g62680</i>	TC253374	
			<i>At5g62730</i>	TC277595	

Tableau 3.1 : Liste des membres de la famille PTR chez *Arabidopsis thaliana* identifiés par homologie de séquence avec *AtNRT1.1*. Les numéros d'accèsion AtGI correspondent à la version 12.1 de la banque de contigs d'EST de TIGR, les autres sont répertoriés dans la version 5.0 de la banque d'annotations de TIGR. AtGI : *Arabidopsis thaliana* Gene Index, TC : Tentative Consensus, AGI : Arabidopsis Genome Initiative.

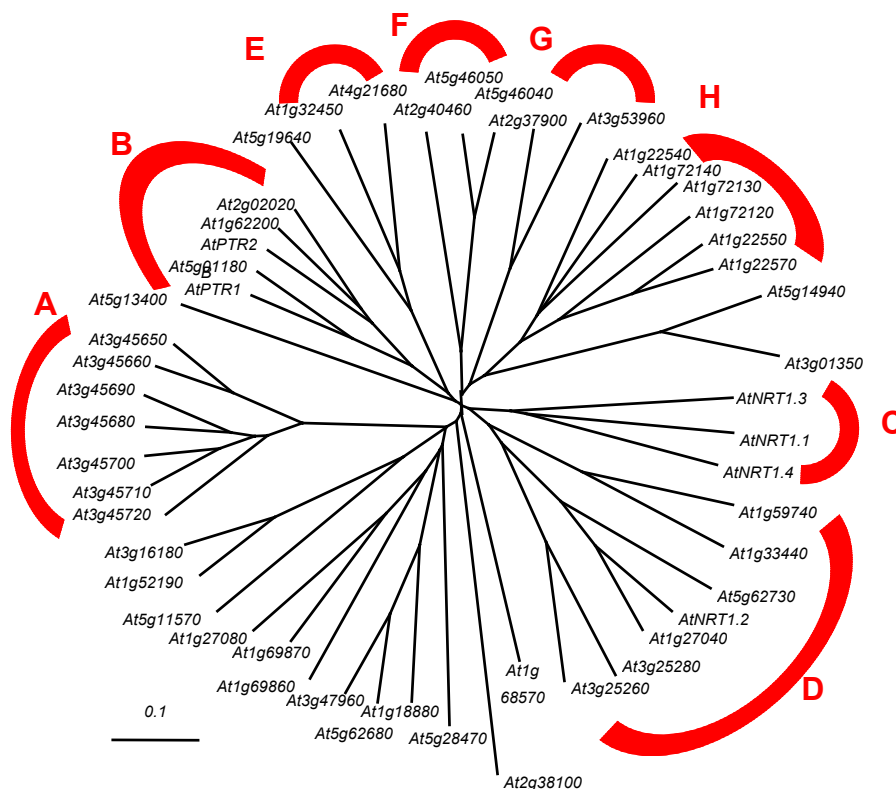


Figure 3.1 : Arbre de la famille PTR chez *Arabidopsis thaliana*.

Les séquences protéiques des annotations les plus probables ont été alignées avec le logiciel CLUSTAL W version 1.83. Les matrices des distances sont visualisées sous forme d'un arbre grâce au logiciel Treeview version 1.6.6.

été publiée, nous avons été amenés à proposer une procédure originale pour tenter de nous affranchir de ce problème.

Enfin, la dernière partie de ce chapitre est consacrée à l'analyse des profils d'expression obtenus pour certains gènes de la famille PTR, dans les conditions qui nous ont permis de sélectionner les gènes candidats qui ont été étudiés plus en détail dans la suite du travail.

### **3.2 Identification *in silico* des membres de la famille PTR chez *Arabidopsis thaliana***

Nous avons entrepris en novembre 2001 une recherche *in silico* ayant pour but d'identifier les gènes appartenant à la famille PTR chez *Arabidopsis*. La méthode employée a consisté à aligner la séquence protéique prédite d'*AtNRT1.1* avec les séquences disponibles dans les banques NCBI. Ceci a permis d'identifier 148 séquences protéiques homologues d'*AtNRT1.1*, qui ont pu être regroupées en 70 annotations différentes (données non montrées). Une analyse plus poussée de ces 70 annotations a révélé qu'elles correspondaient en fait à 52 protéines différentes, qui ont pu être associées, au fur et à mesure de l'avancée de l'annotation du génome, à 52 loci physiques différents.

L'étape suivante a consisté à rechercher l'annotation la plus probable pour chacun des loci identifiés. Lors de ce travail, une des annotations a été retirée des banques de données (*At3g54450*), réduisant l'effectif de la famille à 51 membres. Nous avons ensuite confronté les différentes annotations avec les données expérimentales d'expression, grâce notamment à la banque de contigs d'ESTs mise en place sur le site de TIGR. L'ensemble de ce travail a été réactualisé en fonction des informations disponibles au 8 octobre 2004 dans la version 12.1 de la banque de contigs de TIGR ([ftp://ftp.tigr.org/pub/data/tgi/Arabidopsis\\_thaliana/](ftp://ftp.tigr.org/pub/data/tgi/Arabidopsis_thaliana/)). Les données présentées correspondent à cette version réactualisée de l'analyse. La liste des différents gènes de la famille PTR d'*Arabidopsis* ainsi que les numéros d'accèsion des contigs correspondants sont présentés dans le Tableau 3.1.

Les séquences des 51 protéines correspondant aux annotations les plus probables ont été alignées, ce qui a permis de générer un arbre de la famille (Figure 3.1). Ces résultats montrent qu'il est difficile d'établir une classification univoque des protéines PTR en sous-groupes clairement distincts en terme d'homologie de séquence. Seul le groupe indiqué A est

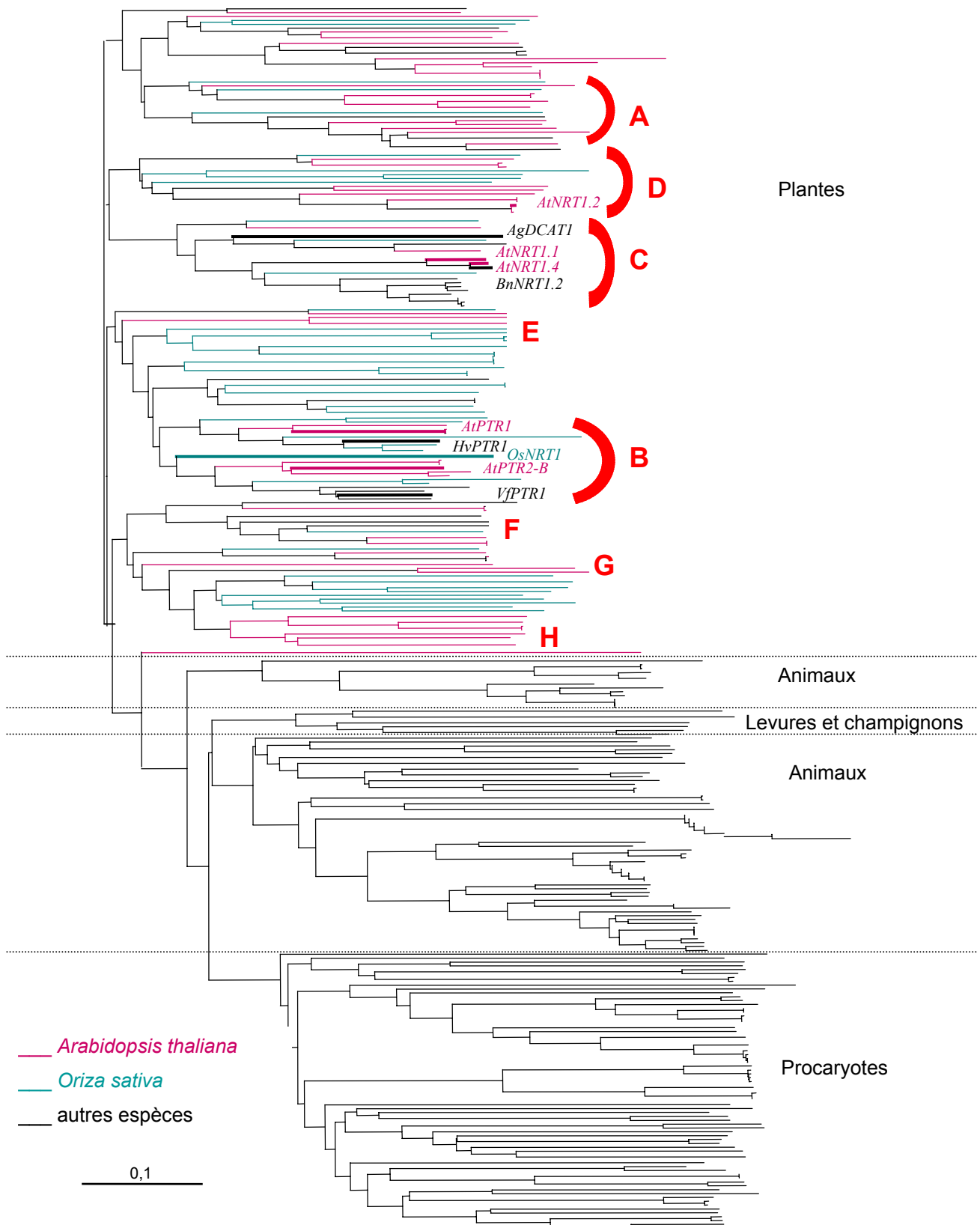


Figure 3.2 : **Structure de l'homologie dans la famille PTR.**

Les domaines PTR des protéines (banque de donnée PFAM) ont été alignés. En traits épais les séquences de protéines dont l'activité de transport a été démontrée.

suffisamment distant de tout le reste de la famille pour être individualisé. Ce groupe est de plus remarquable par le fait qu'il contient 7 *PTR* contigus, très homologues entre eux (voir §3.4) et localisés sur le chromosome 3. La structure relativement diffuse de l'homologie sur le reste de l'arbre rendrait la définition d'autres sous groupes très spéculative. Par contre, l'existence de sous-groupes fonctionnels en terme de spécificité de substrat pourrait être suggérée par les éléments suivants :

2 des 3 transporteurs de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> identifiés (AtNRT1.1 et AtNRT1.4) semblent appartenir à une même clade contenant également AtNRT1.3 (groupe C).

les deux transporteurs de peptides AtPTR1 et AtPTR2B, partagent une ramification de l'arborescence avec 3 autres protéines (groupe B).

Le groupe comprenant *AtNRT1.2* est proche, mais distinct des 2 autres *PTR* caractérisés en tant que transporteurs de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. En l'état actuel des connaissances, l'existence d'autres groupes fonctionnels n'est pas à exclure.

### **3.3 Identification *in silico* des membres de la famille *PTR* chez tous les êtres vivants**

La famille *PTR* n'est pas restreinte à *Arabidopsis thaliana* ou aux plantes. On trouve également des membres de cette famille chez tous les êtres vivants étudiés. La banque de données PFAM (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) met à disposition les séquences protéiques de divers organismes ayant été identifiées comme appartenant à une même famille sur la base de la présence d'un domaine spécifique à cette famille. Dans le cas de la famille *PTR*, deux motifs distincts caractérisent le domaine *PTR* :

Motif 1 : [GA]-[GAS]-[LIVMFYWA]-[LIVM]-[GAS]-D-x-[LIVMFYWT]-[LIVMFYW]-G-x(3)-[TAV]-[IV]-x(3)-[GSTAV]-x-[LIVMF]-x(3)- [GA]

Motif 2 : [FYT]-x(2)-[LMFY]-[FYV]-[LIVMFYWA]-x-[IVG]-N-[LIVMAG]-G-[GSA]-[LIMF]

La recherche dans PFAM de l'ensemble des protéines contenant ces motifs nous a permis de construire un arbre basé sur le domaine *PTR* (Figure 3.2). Deux aspects intéressants



émergent de son analyse. Premièrement, les domaines PTR des protéines de plantes divergent notablement de ceux retrouvés chez les animaux, levure et champignons, ou procaryotes. Deuxièmement, la diversité des protéines PTR semble considérablement plus importante chez les plantes. En effet, en plus des protéines identifiées chez *Arabidopsis*, 62 motifs PTR différents sont retrouvés chez le riz, alors que le séquençage du génome de cette espèce n'est que partiel, contre seulement 14 chez l'homme, 14 chez la drosophile et 1 seul chez la levure.

On retrouve dans la partie « plante » de l'arbre les mêmes groupes A, B (transporteurs de peptides), C (transporteurs de  $\text{NO}_3^-$ ), D E, F, G et H proposés chez *Arabidopsis thaliana* enrichis de séquences issues d'un grand nombre d'espèces et plus particulièrement du riz. Seuls deux exemples viennent à l'encontre de l'hypothèse de sous groupes fonctionnels dans la famille PTR (OsNRT1, transporteur de  $\text{NO}_3^-$  se situant dans le groupe des transporteurs de peptides et AgDCAT1, transporteur de dicarboxylates se situant dans le groupe des transporteurs de  $\text{NO}_3^-$ ). En l'absence de plus de données fonctionnelles, aucune conclusion définitive ne peut être tirée.

### **3.4 Définition et production des GST des gènes *PTR* d'*Arabidopsis***

Une difficulté avérée des études d'expression sur les familles multigéniques au moyen de puces à ADN est l'existence d'hybridations aspécifiques due à une trop forte homologie entre différents membres de la famille. Pour caractériser de manière précise ce risque potentiel dans le cas de la famille *PTR*, nous avons réalisé une analyse détaillée de l'ensemble des identités locales au sein de cette famille. Des travaux antérieurs réalisés sur la très grande famille *P450* chez *Arabidopsis* suggèrent que d'une manière générale, le risque d'hybridations croisées devient faible lorsque le degré global d'identité de séquence entre 2 transcrits est inférieur à 80%, et que ce risque devient pratiquement nul lorsque ce degré d'identité chute en dessous de 70% (Xu *et al.*, 2001). Néanmoins, des couples de gènes échappent à cette règle, dans la mesure où une hybridation croisée significative est observée alors que leur faible degré d'identité globale prédit le contraire. Dans ces cas, le problème s'explique par l'existence d'homologies locales très fortes (sur des zones de 150pb ou moins), suffisantes pour générer une hybridation malgré la divergence de séquence des autres portions des transcrits (Evertsz *et al.*, 2001, Xu *et al.*, 2001). De manière remarquable, il est démontré qu'une identité totale de séquence sur une portion aussi réduite que 20pb suffit à engendrer

Transcrit	Taux d'homologie maximum avec un autre transcrit	Transcrit le plus homologue
AtNRT1.1	68,4%	AtNRT1.4
At1g18880	<b>75,2%</b>	At5g62680
At1g22540	<b>78,8%</b>	At1g72130
At1g22550	<b>89,2%</b>	At1g22570
At1g22570	<b>89,2%</b>	At1g22550
At1g27040	<b>82,0%</b>	AtNRT1.2
At1g27080	<b>78,4%</b>	At1g69870
At1g32450	<b>77,2%</b>	At4g21680
At1g33440	<b>75,6%</b>	At1g59740
At1g52190	<b>82,8%</b>	At3g16180
At1g59740	<b>75,6%</b>	At1g33440
At1g62200	<b>85,2%</b>	At2g02020
At1g68570	68,0%	At5g46040
AtNRT1.2	<b>82,0%</b>	At1g27040
At1g69860	67,6%	At1g69870
At1g69870	<b>78,4%</b>	At1g27080
At1g72120	<b>77,6%</b>	At1g22570
At1g72130	<b>79,6%</b>	At1g72140
At1g72140	<b>79,6%</b>	At1g72130
At2g02020	<b>85,2%</b>	At1g62200
AtPTR2B	<b>83,2%</b>	At2g02020
AtNRT1.4	69,2%	AtNRT1.3
At2g37900	<b>86,8%</b>	At3g53960
At2g38100	65,2%	At5g46040
At2g40460	68,0%	At5g46050
At3g01350	<b>92,4%</b>	At5g14940
At3g16180	<b>82,8%</b>	At1g52190
AtNRT1.3	69,2%	AtNRT1.4
At3g25260	<b>81,6%</b>	At3g25280
At3g25280	<b>81,6%</b>	At3g25260
At3g45650	<b>95,6%</b>	At3g45660
At3g45660	<b>95,6%</b>	At3g45650
At3g45680	<b>93,2%</b>	At3g45690
At3g45690	<b>93,2%</b>	At3g45680
At3g45700	<b>93,2%</b>	At3g45710
At3g45710	<b>93,2%</b>	At3g45700
At3g45720	<b>88,0%</b>	At3g45680
At3g47960	<b>86,0%</b>	At5g62680
At3g53960	<b>86,8%</b>	At2g37900
AtPTR1	<b>77,6%</b>	At5g01180
At4g21680	<b>77,2%</b>	At1g32450
At5g01180	<b>77,6%</b>	AtPTR1
At5g11570	65,2%	At3g16180
At5g13400	68,4%	AtNRT1.4
At5g14940	<b>92,4%</b>	At3g01350
At5g19640	<b>76,8%</b>	At1g32450
At5g28470	67,2%	At1g27080
At5g46040	<b>90,4%</b>	At5g46050
At5g46050	<b>90,4%</b>	At5g46040
At5g62680	<b>86,0%</b>	At3g47960
At5g62730	<b>74,8%</b>	At1g27040

Tableau 3.2 : Taux d'homologie locale maximale avec un autre transcrit.

Transcrit	Position de la GST		Longueur de la	Homologie des GST avec un autre transcrit	
	début	fin		Taux maximum d'homologie	Transcrit
AtNRT1.1	46	272	226	56%	At5g13400
At1g18880	1404	1633	229	66%	At3g47960
At1g22540	35	280	245	65%	At1g72140
At1g22550	165	444	279	<b>84%</b>	At1g22570
At1g22570	601	889	288	72%	At1g22550
At1g32450	1685	1957	272	63%	At4g21680
At1g33440	6	277	271	69%	At1g59740
At1g52190	768	1048	280	<b>79%</b>	At3g16180
At1g59740	1721	1997	276	58%	At1g52190
At1g62200	1557	1825	268	68%	At2g02020
At1g68570	162	447	285	61%	At1g69870
AtNRT1.2	1580	1855	275	61%	At3g21670
At1g69860	1465	1726	261	66%	At1g69870
At1g69870	56	290	234	30%	At1g22550
At1g72140	35	264	229	61%	At1g22550
At2g02020	1717	2035	318	<b>72%</b>	At1g62200
AtPTR2B	942	1232	290	63%	At1g62200
At2g37900	1016	1305	289	<b>77%</b>	At3g53960
At2g40460	1556	1820	264	61%	At5g46040
At3g16180	1782	2010	228	57%	At5g13400
AtNRT1.3	97	371	274	56%	At3g25260
At3g25260	123	410	287	59%	At1g59740
At3g25280	1603	1823	220	68%	At3g25260
At3g45650	984	1210	226	<b>77%</b>	At3g45660
At3g45660	487	721	234	<b>78%</b>	At3g45650
At3g45700	85	387	302	<b>87%</b>	At3g45710
At3g45710	612	906	294	<b>73%</b>	At3g45650
At3g47960	68	298	230	66%	At5g62680
At3g53960	732	964	232	59%	At1g68570
AtPTR1	2172	2479	307	63%	At1g62200
At4g21680	1780	2029	249	61%	At1g32450
At5g01180	15	293	278	70%	AtPTR1
At5g11570	80	262	182	64%	At1g52190
At5g13400	1485	1720	235	61%	At1g22540
At5g14940	51	319	268	56%	AtNRT1.2
At5g28470	852	1093	241	60%	At1g69870
At5g46040	1653	1922	269	<b>81%</b>	At5g46050
At5g46050	1398	1691	293	<b>77%</b>	At5g46040
At5g62680	1686	1931	245	63%	At3g47960

Tableau 3.3 : Caractéristiques des GST définies pour les gènes de la famille PTR.

une hybridation aspécifique significative (Kane *et al.*, 2000). Pour tenir compte de ces aspects, l'analyse réalisée sur la famille *PTR* ne s'est donc pas limitée à une comparaison globale de séquence, mais a consisté à identifier toutes les homologues locales susceptibles de perturber l'analyse d'expression au moyen d'une membrane basse densité. Dans ce but, les séquences prédites de tous les transcrits des gènes *PTR* ont été découpées *in silico* en fragments recouvrants de 250 pb. Par exemple le transcrit AtNRT1.1, d'une longueur de 2130 pb, a ainsi généré 1881 fragments virtuels de 250 pb, le premier de la base 1 à la base 250, le deuxième de la base 2 à la base 251, jusqu'au dernier de la base 1881 à la base 2130. Tous les fragments virtuels issus de tous les transcrits ont ensuite été comparés avec chacun des transcrits (à l'exception de celui ayant généré les fragments considérés). Ceci a représenté plus de 2 millions de comparaisons individuelles, parmi lesquelles le meilleur alignement entre un fragment virtuel de 250pb et un transcrit a été retenu. Les résultats de cette analyse montrent que pour la quasi-totalité d'entre eux, les transcrits *PTR* présentent une identité locale de séquence (sur 250 bp) supérieure à 75% avec un autre transcrit de la même famille (Tableau 3.2). Le taux maximal d'identité locale n'est inférieur à 70% que pour 9 transcrits, et est supérieur à 90% pour 10 autres transcrits. Ces données démontrent que l'utilisation d'ADNc pleine longueur, ou même d'EST, comme cibles<sup>1</sup> nucléotidique conduira inévitablement à des hybridations croisées de grande ampleur entre ces cibles et différents ADNc des transcrits *PTR*, rendant impossible toute détermination fiable des niveaux d'expression des gènes correspondants.

Pour pallier à ce problème, une nouvelle analyse *in silico* a été conduite pour identifier les zones les plus spécifiques de chaque transcrit, en vue de générer des GST. La méthode a consisté à aligner toutes les séquences des transcrits *PTR* avec l'ensemble des séquences disponibles sur le site de NCBI. Les zones des transcrits avec le plus faible score d'identité de séquence ont été retenues comme GST, après vérification qu'elles ne présentaient pas plus de 70% d'identité avec aucune autre séquence du génome d'*Arabidopsis* (dont celles de la famille *PTR*). Il a été également vérifié qu'il n'existait pas, au sein de ces GST, de portion de plus de 20 paires de bases identiques à 100% à toute autre séquence du génome. Après homogénéisation de la taille, cette méthode nous a amené à définir et à cloner des GST d'environ 300 paires de bases pour 39 gènes *PTR* (Tableau 3.3). Trois gènes (*At3g45680*,

---

<sup>1</sup> La convention adoptée pour le manuscrit ( §2.3.2) amène à nommer dans le cas des puces à ADN « cible » les fragments d'ADN fixés sur la membrane et « sonde » (dite complexe) les ARN rétro-transcrits hybridés.

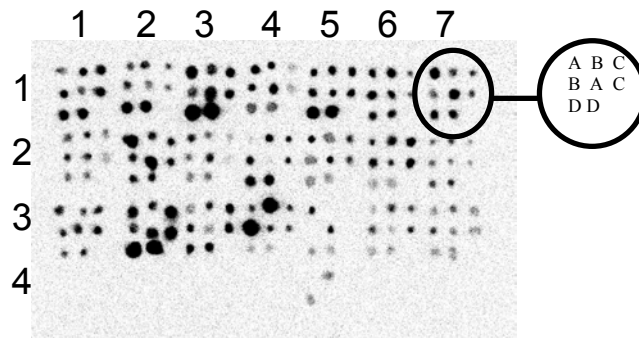


Figure 3.3 : **Structure générale de la membrane basse densité.**

Image d'une membrane basse densité hybridée avec une sonde issue d'ARN de racines. Les dépôts sont organisés en matrices 3x3. Chaque matrice contient 3 GST (indiquées A, B et C) différentes déposées en double. La neuvième position ne reçoit pas d'ADN et est utilisée pour mesurer le bruit de fond local. La membrane dédiée à la famille PTR contient 21 matrices disposées sur 4 lignes et 7 colonnes.

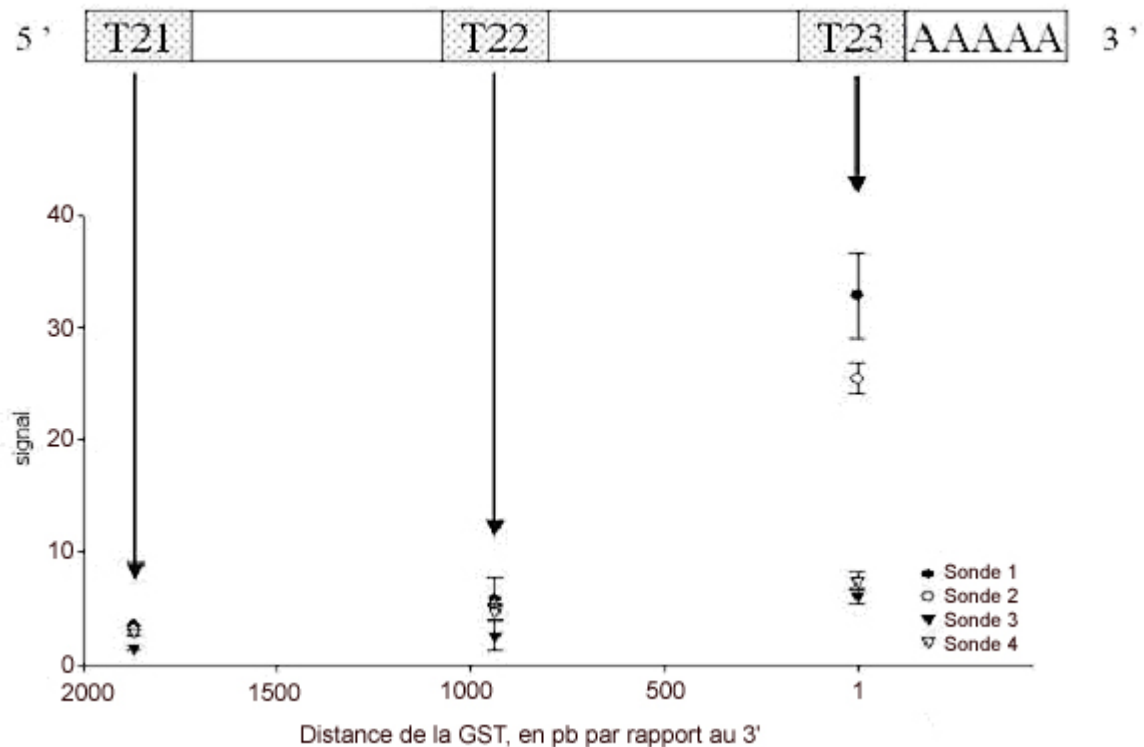


Figure 3.4 : **Effet de la position de la GST sur le signal d'hybridation.**

Les données ont été générées à partir de l'hybridation successive d'une même membrane avec 4 sondes complexes différentes. En abscisse, distance séparant la GST de l'extrémité 3' du transcrit. En ordonnée,  $S_r$  (signal brut débarrassé du bruit de fond local).

*At5g45690*, *At5g45720*) ont été écartés car il était impossible de définir pour eux une GST présentant un minimum de spécificité (taux d'identité avec une séquence d'un autre *PTR* > 90%). Le gène *At1g72120* a été également écarté car il est constitué de la répétition de 2 motifs *PTR* quasiment identiques, cette caractéristique ne permettant pas non plus d'isoler une zone de moindre homologie. Sept autres gènes ont enfin été exclus de nos analyses car nous n'avons pas réussi à amplifier et cloner les GST définies *in silico*. La comparaison des Tableaux 3.2 et 3.3 démontre l'intérêt de l'utilisation de GST pour les études d'expression au sein de la famille *PTR*. Le taux maximum d'identité locale calculée en considérant les séquences complètes des ADNc (Tableau 3.2) est en effet nettement plus élevé que celui obtenu avec les GST (Tableau 3.3). La trop forte homologie de certains des gènes *PTR* (en particulier ceux du groupe A, Figure 3.1) n'a toutefois pas permis l'isolement de séquences réellement spécifiques. Quelques GST présentent en effet un taux d'identité supérieur à 70% avec une partie de la séquence d'un autre gène *PTR*, et restent donc susceptibles d'engendrer une hybridation croisée. A l'intérieur de ces alignements, l'identité entre les séquences est diffuse. Seules 4 GST présentent des séquences dont l'identité est totale sur plus de 20 pb (1 séquence de 23 pb pour la GST d'*At1g22550*, 1 séquence de 21 pb pour la GST d'*At1g62200*, 1 séquence de 23 pb pour la GST d'*At5g46040* et 1 séquence de 20 pb pour la GST d'*At5g46050*). Le fait que certaines GST se révèlent moins spécifiques qu'espéré en janvier 2002 semble être dû au complément des annotations depuis cette période.

La même démarche d'obtention de GST a été menée sur les familles multigéniques *AMT* (famille des transporteurs de  $\text{NH}_4^+$  *AtAMT1.1*, *AtAMT1.2*, *AtAMT1.3* et *AtAMT2* comprenant 6 membres au total) et *NRT2* (famille du transporteur de nitrate à haute affinité *AtNRT2.1* comprenant 7 membres au total). Les gènes étudiés en plus de ceux de la famille *PTR* sont: *AtNRT2.2* (*At1g08100*), *AtNRT2.3* (*At5g60780*), *AtNRT2.5* (*At1g12940*) et *AtNRT2.7* (*At5g14570*) pour la famille *NRT2*, et *AtAMT1.1* (*At4g13510*), *AtAMT1.2* (*At1g64780*), *AtAMT1.3* (*At3g24300*), *AtAMT2* (*At3g28290*), et *At3g24290* pour les familles *AMT1* et 2.

### 3.5 Composition et structure de la membrane thématique

La membrane thématique produite immobilise les clones listés ci dessous :

-39 GST correspondant à des gènes de la famille *PTR* (Tableau 3.3)

-4 GST correspondant à des gènes de la famille *NRT2* (*AtNRT2.2*, 2.3, 2.5 et 2.7)

- 5 GST correspondant à des gènes des familles *AMT1* et *AMT2* (*AtAMT1.1*, *1.3*, *At3g24290* et *AtAMT2*)
- 1 GST correspondant au gène *AtNIA1* de la nitrate réductase
- 2 GST correspondant à des gènes ayant une expression organe-spécifique (*AtAKT1* pour les racines et *AtLHCP* pour les feuilles)
- 2 GST correspondant à des gènes couramment utilisés comme témoins constitutifs (Histone H4 et *AtEF1 $\alpha$* )
- 3 GST hétérologues (T1.1, T1.2 et T1.3 issues du génome du phage  $\lambda$ , Tableau 2.3), servant de témoins négatifs
- 3 GST hétérologues (T21, T22 et T23, issues du génome du phage  $\lambda$ , Tableau 2.3) servant de témoins de normalisation. Ces 3 GST correspondent au transcrit synthétique utilisé comme étalon interne, et ajouté aux échantillons d'ARNs à analyser avant transcription inverse (voir § 2.6.2.2).

Le clonage ainsi que le dépôt des GSTs sur membrane ont été décrits précédemment (voir § 2.3 et 2.6.2.2). La structure générale de la membrane thématique obtenue est visualisée dans la Figure 3.3.

## 3.6 Elaboration de la procédure de normalisation des données

### 3.6.1 Calcul du signal d'hybridation

Pour chaque GST sur la membrane, le signal réel d'hybridation ( $S_r$ ) est classiquement obtenu par soustraction du bruit de fond local ( $B$ , mesuré sur la position de chaque matrice ne recevant pas d'ADN) au signal brut mesuré ( $S_b$ ).

$$(1) \quad S_r = S_b - B$$

Le seuil de détection est défini comme la moyenne des  $S_r$  mesurés sur les GST témoins négatifs hétérologues (soit 6 valeurs issues des 3 GST présentes en double sur chaque membrane). Les signaux issus des GST d'intérêt sont considérés comme non détectés (ND) lorsqu'ils sont inférieurs ou égaux à ce seuil.

### **3.6.2 Variation du signal d'hybridation en fonction de la distance de la GST à l'extrémité 3' du transcrit**

Les premiers essais d'hybridation de la membrane thématique ont été réalisés avec des sondes complexes issues de 4 lots de 5µg d'ARN extraits respectivement de parties aériennes, racines, tiges et fleurs, auxquels ont été rajoutés 0,5ng (rapport optimal des quantités dans nos conditions = 1/10000, données non montrées) du transcrit étalon interne polyadénylé et coiffé synthétisé *in vitro* (T2). L'analyse des résultats a montré une très forte variabilité des signaux correspondant aux 3 GSTs de ce transcrit synthétique, avec une intensité d'autant plus élevée que la GST est proche de l'extrémité 3' du transcrit (Figure 3.4). En effet, les valeurs de  $S_r$  mesurées sur les GST T22 et T21 ne représentent respectivement que 17,7% et 10,9% de celui de la GST T23 pour la sonde complexe des parties aériennes, 20,9% et 12,3% pour la sonde complexe des racines, 41,9% et 24% pour la sonde complexe des tiges et 63,5% et 38,4% pour la sonde complexe des fleurs. Ainsi, la décroissance du signal observée en fonction de la distance séparant la GST de l'extrémité 3' est variable d'une sonde à l'autre. De plus, le signal mesuré avec la GST T23 (séquence contiguë à l'extension polyA) n'est pas la même suivant les sondes, alors qu'une même quantité de transcrit synthétique a été ajoutée aux différents échantillons avant transcription inverse. L'explication de ces observations réside probablement dans le fait que l'efficacité de la transcription inverse n'est pas totale (de nombreux ADNc sont tronqués) et varie d'une expérience à l'autre (la quantité totale des ADNc et leur distribution en taille diffèrent suivant les sondes produites).

### **3.6.3 Méthode de normalisation destinée à corriger les variations d'efficacité de transcription inverse**

Les observations détaillées dans le paragraphe précédent ont des conséquences importantes sur les protocoles d'utilisation de la membrane thématique produite. En effet, cette membrane immobilise des GST dont la position sur le transcrit cible varie beaucoup (Tableau 3.3). A concentrations égales, un transcrit dont la GST est proche de l'extrémité 3' génère un signal beaucoup plus fort qu'un autre dont la GST est localisée plus en amont (Figure 3.4). De plus, cette perte de signal en fonction de l'éloignement de la GST de l'extrémité 3' est variable d'une expérience à l'autre (Figure 3.4). Il n'est donc pas possible de comparer les signaux des GST d'une hybridation à l'autre.

Une procédure de correction a été élaborée à partir des signaux mesurés pour les 3 GST (T21, T22 et T23) du transcrit synthétique servant de témoin de normalisation (T2). Le principe de cette procédure est le suivant : pour chaque hybridation, les valeurs des signaux T21, T22 et T23 sont utilisées pour générer une équation qui décrit la décroissance du signal d'hybridation en fonction de la distance (en pb) séparant la GST de l'extrémité 3' du transcrit. Cette équation permet alors de calculer le signal théorique que générerait le transcrit normalisateur T2 pour n'importe quelle position de GST ( $S_tT2$ ).

Dans le détail :

Pour chaque hybridation, les valeurs de  $S_r$  mesurées sur les 3 GST T21, T22 et T23 sont utilisés pour calculer une équation du type:

$$(2) \quad S_tT2 = a + \frac{b}{c + x}$$

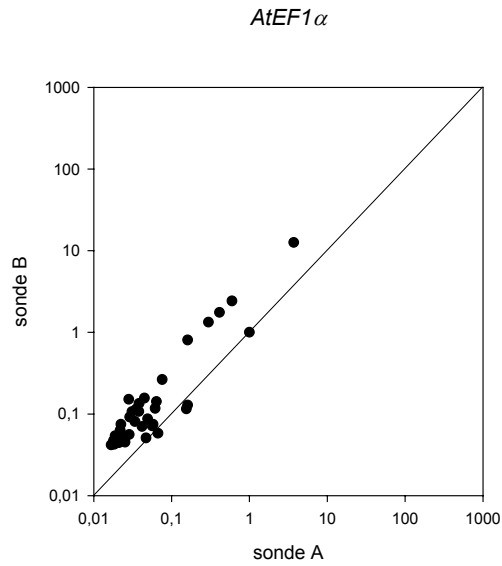
où  $S_tT2$  représente le signal d'hybridation théorique que l'on obtiendrait pour une GST de l'ARN T2 située à la distance  $x$  (exprimée en pb) de l'extrémité 3',  $a$ ,  $b$  et  $c$  les paramètres calculés par le logiciel. Parmi plusieurs testés, ce type d'équation a généré les meilleures corrélations ( $r^2 > 0,98$ , données non montrées).

Pour chaque GST d'intérêt de position  $x$  est calculée la valeur correspondante de  $S_tT2$  à l'aide de l'équation (2). Cette valeur  $S_tT2$  est ensuite utilisée pour normaliser le signal  $S_r$  calculé pour la GST:

$$(3) \quad S_n = \frac{S_r}{S_tT2}$$

où  $S_n$  est le signal normalisé, proportionnel au rapport de l'abondance du transcrit d'intérêt à celle du transcrit T2. L'abondance relative de T2 est par définition constante dans tous les échantillons d'ARN. La comparaison des valeurs de  $S_n$  entre deux hybridations autorise donc une analyse quantitative de la variation de l'abondance du transcrit d'intérêt entre les échantillons d'ARN utilisés pour réaliser ces hybridations.

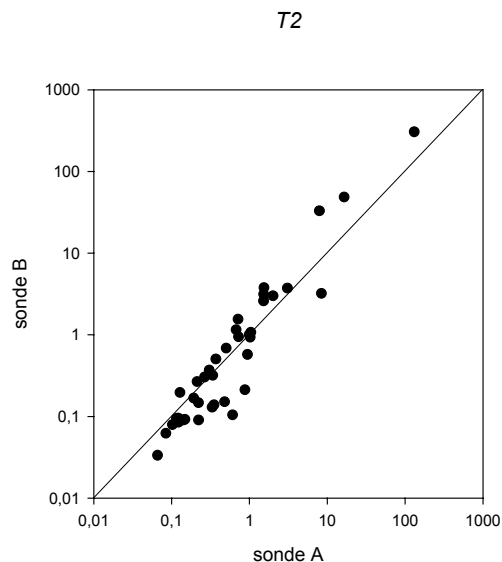




**Figure 3.5 : Comparaison des données de 2 hybridations homéotypiques normalisées par *AtEF1 $\alpha$* .**

Les deux hybridations ont été réalisées suivant le même protocole, sur les mêmes membranes à partir d'un même lot d'ARN. La courbe représentée est la droite  $y = x$ .

---



**Figure 3.6 : Comparaison des données de 2 hybridations homéotypiques normalisées par le transcrit synthétique T2.**

Les deux hybridations ont été réalisées suivant le même protocole, sur les mêmes membranes à partir d'un même lot d'ARN. La courbe représentée est la droite  $y = x$ .

### 3.6.4 Test de la méthode de normalisation

La procédure de validation de la méthode de normalisation a consisté à vérifier que l'hybridation répétée d'un lot de 3 membranes avec des sondes complexes issues d'un même échantillon d'ARN (hybridations dites « homéotypiques ») donnait bien les mêmes résultats. Plusieurs expériences indépendantes ont été réalisées sur ce principe, et ont abouti aux mêmes conclusions.

Lorsque la normalisation des signaux recueillis pour chaque GST est réalisée de manière classique par rapport au signal correspondant au gène *AtEF1 $\alpha$* , suivant la formule :

$$(4) \quad S_n = \frac{S_r}{S_r AtEF1\alpha}$$

les résultats obtenus ont toujours été jugés insatisfaisants (Figure 3.5). En effet, outre le fait que les valeurs de  $S_n$  calculées pour chaque GST se révèlent sensiblement différentes pour les deux hybridations successives, un défaut de cette normalisation est que les valeurs sont très faibles pour une majorité de gènes. Ce dernier point s'explique pour partie par le fait que certains des gènes étudiés sont probablement peu exprimés, mais aussi par le fait que bon nombre de GST sont localisées relativement loin de l'extrémité 3' des transcrits (Tableau 3.3).

La procédure de normalisation proposée dans le cadre de ce travail (équation (3), §3.6.3) améliore très nettement la reproductibilité des hybridations homéotypiques (Figure 3.6), et diminue également la variabilité des résultats obtenus d'une membrane à l'autre dans chaque lot hybridés avec la même sonde complexe (résultats non montrés). De plus, les valeurs de  $S_n$  sont nettement plus élevées pour de nombreux gènes, ce qui améliore la lisibilité des résultats. Ceci résulte de la correction effectuée pour prendre en compte la décroissance du signal en fonction de l'éloignement de la GST de l'extrémité 3' du transcrit.

A l'issue de ces expériences, nous avons donc choisi d'appliquer la méthode de normalisation basée sur les 3 GST du transcrit T2, telle que définie par l'équation (3).

Famille	Gène	Parties aériennes		Hampes		Fleurs		Racines	
		Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET
	<i>At5g01180</i>	0,24	0,07	0,16	0,05	ND		0,25	0,06
	<i>At2g02020</i>	0,21	0,07	0,20	0,05	ND		0,16	0,05
	<i>AtPTR2B</i>	ND		0,14	0,05	ND		0,09	0,02
	<i>At5g11570</i>	0,31	0,03	ND		ND		ND	
	<i>AtNRT1.1</i>	31,27	6,02	6,87	1,16	2,68	0,94	4,64	1,31
	<i>At5g13400</i>	0,15	0,04	0,19	0,07	0,17	0,04	0,20	0,02
	<i>At3g16180</i>	0,62	0,11	ND		ND		0,52	0,15
	<i>At1g18880</i>	ND		0,28	0,09	ND		0,53	0,11
	<i>At3g21670</i>	2,53	1,21	1,85	1,24	1,00	0,27	2,37	0,52
	<i>At4g21680</i>	0,61	0,33	0,23	0,10	ND		0,35	0,07
	<i>At1g22540</i>	0,72	0,23	0,53	0,13	0,43	0,14	0,48	0,10
	<i>At1g22550</i>	ND		0,15	0,05	0,22	0,07	0,15	0,04
	<i>At3g25260</i>	0,13	0,01	ND		0,19	0,02	0,15	0,02
	<i>At3g25280</i>	ND		ND		ND		ND	
	<i>At1g69860</i>	0,64	0,11	0,54	0,09	0,63	0,14	0,97	0,08
	<i>At1g22570</i>	0,84	0,14	0,72	0,16	0,66	0,18	1,28	0,11
	<i>At5g28470</i>	ND		ND		ND		ND	
	<i>At1g32450</i>	0,22	0,09	0,25	0,08	0,46	0,11	1,27	0,16
	<i>At1g33440</i>	ND		ND		0,45	0,10	0,75	0,22
<i>PTR</i>	<i>At2g37900</i>	0,23	0,13	0,35	0,16	0,26	0,06	0,11	0,04
	<i>At2g40460</i>	0,13	0,03	0,22	0,05	0,26	0,07	0,21	0,03
	<i>At3g45650</i>	ND		ND		ND		0,94	0,14
	<i>At3g45660</i>	0,69	0,30	0,64	0,31	0,38	0,09	0,57	0,03
	<i>At3g45700</i>	0,54	0,11	ND		ND		0,63	0,11
	<i>At3g45710</i>	0,80	0,21	0,57	0,30	0,44	0,11	1,40	1,25
	<i>At5g46040</i>	0,14	0,07	0,19	0,04	0,24	0,06	0,20	0,07
	<i>At5g46050</i>	0,26	0,03	0,16	0,04	ND		0,27	0,03
	<i>At3g47960</i>	0,16	0,04	1,01	0,16	0,23	0,05	0,16	0,02
	<i>At1g52190</i>	0,45	0,18	ND		ND		ND	
	<i>At3g53960</i>	0,12	0,06	0,63	0,07	ND		0,15	0,07
	<i>AtPTR1</i>	0,16	0,05	0,27	0,08	0,21	0,05	0,16	0,03
	<i>At1g59740</i>	0,56	0,03	0,45	0,07	0,58	0,15	1,08	0,44
	<i>At1g62200</i>	ND		0,12	0,02	ND		ND	
	<i>At5g62680</i>	0,21	0,05	0,34	0,07	ND		0,34	0,10
	<i>At5g62730</i>	ND		ND		ND		0,56	0,11
	<i>At1g68570</i>	4,87	0,97	1,55	0,22	1,05	0,24	0,25	0,08
	<i>AtNRT1.2</i>	ND		ND		ND		0,86	0,16
	<i>At1g69870</i>	0,75	0,18	0,45	0,08	0,51	0,14	1,23	0,66
	<i>At1g72140</i>	1,13	0,26	0,30	0,02	0,47	0,08	1,06	0,31
	<i>AtAMT11</i>	0,19	0,09	0,17	0,05	ND		0,23	0,13
<i>AMT</i>	<i>AtAMT12</i>	0,22	0,03	0,37	0,08	0,22	0,06	0,36	0,02
	<i>AtAMT13</i>	0,13	0,02	0,11	0,01	ND		0,22	0,02
	<i>AtAMT2</i>	ND		0,33	0,16	ND		0,62	0,83
	<i>At3g24290</i>	0,15	0,04	ND		ND		0,27	0,09
<i>NIA</i>	<i>AtNIA1</i>	0,12	0,02	0,17	0,06	0,21	0,05	0,64	0,21
	<i>AtNRT2.2</i>	0,09	0,04	0,12	0,05	0,21	0,03	0,09	0,01
<i>NRT2</i>	<i>AtNRT2.3</i>	0,12	0,04	0,13	0,04	ND		ND	
	<i>AtNRT2.7</i>	ND		ND		ND		ND	
	<i>AtNRT2.5</i>	ND		ND		ND		ND	

Tableau 3.4 : **Territoire d'expression.**

Données d'hybridations normalisées avec le transcrit synthétique T2. Les moyennes sont calculées à partir d'une hybridation réalisée sur un lot de 3 membranes. Moy : moyenne. ET : écart type. ND : non détecté.

## 3.7 Profils d'expression des gènes de la famille *PTR*

### 3.7.1 Données générales

Sur l'ensemble des expériences réalisées (décrites plus en détail dans les paragraphes suivants), la membrane thématique a permis de détecter de manière reproductible l'expression de tous les gènes étudiés dans au moins un organe et une condition donnée à l'exception d'un seul (*At1g28470*). Le transcrit de ce gène n'a été détecté significativement que dans une seule expérience (présenté §3.7.3, Tableau 3.6). Le niveau d'expression de la plupart des gènes semble faible, certains correspondent toutefois à une accumulation de transcrits importante (*AtNRT1.1*, *AtNRT1.3*, *At1g32450*).

### 3.7.2 Localisation de l'expression dans la plante.

La première série d'expériences a eu pour but de déterminer la distribution de l'accumulation des transcrits *PTR* entre les différents organes de la plante. Les hybridations ont été réalisées à partir d'ARN issus de racines et feuilles de plantes âgées de 6 semaines, cultivées en hydroponie sur milieu HY 1mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, et de hampes florales et fleurs de plantes cultivées en serre sur terreau. L'expression de la grande majorité des gènes *PTR* n'est pas organe-spécifique (Tableau 3.4). Dans l'expérience présentée, les transcrits de quelques gènes sont détectés dans un seul organe (*AtNRT1.2*, *At3g45650* et *At5g62730* pour les racines, *At1g52190* et *At5g11570* pour les feuilles, et *At1g62200* pour les hampes florales). Toutefois, cette spécificité d'expression n'est pas toujours retrouvée dans toutes les expériences. Par exemple, les transcrits d'*At5g11570* et de *At1g62200* ont parfois été détectés dans les racines de certaines plantes (voir Tableaux 3.5 et 3.6). Malgré la détection d'un signal dans d'autres tissus, l'expression de certains gènes est majoritairement localisée dans un organe (dont l'expression la plus forte dans un autre tissu est inférieure à 50% de celle dans le tissu dit « majoritaire ») : *At1g32450* pour les racines, *At1g68570* pour les feuilles, *At3g53960* et *At3g47960* pour les hampes florales.

### 3.7.3 Réponse à la carence en N et à la levée de carence

Pour identifier les gènes *PTR* dont l'expression dans les racines est régulée par le statut nutritionnel en N de la plante, des expériences de privation de source de N, puis de ré-

Famille	Gène	Témoin		-N 24h	
		Moy	ET	Moy	ET
	<i>At5g01180</i>	0,40	0,05	0,21	0,06
	<i>At2g02020</i>	ND		0,26	0,06
	<i>AtPTR2B</i>	0,38	0,16	0,31	0,07
	<i>At5g11570</i>	0,77	0,28	0,53	0,37
	<i>AtNRT1.1</i>	4,67	1,35	1,19	0,58
	<i>At5g13400</i>	0,51	0,11	0,40	0,17
	<i>At3g16180</i>	1,07	0,47	0,84	0,38
	<i>At1g18880</i>	1,07	0,25	0,59	0,16
	<i>AtNRT1.3</i>	5,80	5,64	7,12	4,72
	<i>At4g21680</i>	0,44	0,12	0,26	0,04
	<i>At1g22540</i>	0,84	0,26	0,62	0,25
	<i>At1g22550</i>	0,37	0,10	0,32	0,14
	<i>At3g25260</i>	0,49	0,12	ND	
	<i>At3g25280</i>	ND		ND	
	<i>At1g69860</i>	ND		0,67	0,19
	<i>At1g22570</i>	2,21	0,92	1,77	0,26
	<i>At5g28470</i>	ND		ND	
	<i>At1g32450</i>	3,41	0,91	4,98	0,73
	<i>At1g33440</i>	ND		ND	
<i>PTR</i>	<i>At2g37900</i>	ND		ND	
	<i>At2g40460</i>	0,40	0,07	0,38	0,20
	<i>At3g45650</i>	ND		ND	
	<i>At3g45660</i>	ND		0,57	0,34
	<i>At3g45700</i>	1,62	0,91	1,03	0,53
	<i>At3g45710</i>	ND		1,04	1,17
	<i>At5g46040</i>	0,30	0,08	0,22	0,06
	<i>At5g46050</i>	0,57	0,05	0,31	0,09
	<i>At3g47960</i>	0,32	0,12	0,16	0,03
	<i>At1g52190</i>	ND		ND	
	<i>At3g53960</i>	0,31	0,05	0,21	0,07
	<i>AtPTR1</i>	0,58	0,29	0,45	0,12
	<i>At1g59740</i>	1,29	0,33	1,29	0,50
	<i>At1g62200</i>	0,28	0,10	0,26	0,13
	<i>At5g62680</i>	0,68	0,22	0,57	0,23
	<i>At5g62730</i>	0,87	0,28	0,57	0,19
	<i>At1g68570</i>	0,63	0,20	0,51	0,25
	<i>AtNRT1.2</i>	ND		0,71	0,42
	<i>At1g69870</i>	ND		ND	
	<i>At1g72140</i>	0,93	0,53	ND	
	<i>AtAMT11</i>	0,37	0,10	1,25	0,19
	<i>AtAMT12</i>	0,97	0,28	1,26	0,23
<i>AMT</i>	<i>AtAMT13</i>	0,34	0,03	0,23	0,11
	<i>AtAMT2</i>	ND		0,73	0,37
	<i>At3g24290</i>	0,59	0,27	0,50	0,13
<i>NIA</i>	<i>AtNIA1</i>	2,42	0,96	0,60	0,39
	<i>AtNRT2.2</i>	0,25	0,06	0,20	0,13
<i>NRT2</i>	<i>AtNRT2.3</i>	0,18	0,05	0,13	0,03
	<i>AtNRT2.7</i>	ND		0,43	0,13
	<i>AtNRT2.5</i>	ND		0,67	0,43

Tableau 3.5: **Effet de la carence en N.**

Données d'hybridations normalisées avec le transcrit synthétique T2. Les plantes de 6 semaines ont été cultivées en hydroponie sur milieu HY 1mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (témoin) puis privées de source de N 24h avant récolte pour la condition « -N 24h ». Les moyennes sont calculées à partir d'une hybridation réalisée sur un lot de 3 membranes. Moy : moyenne. ET : écart type. ND : non détecté.

alimentation avec  $\text{NO}_3^-$  ont été réalisées. Des sondes complexes ont été synthétisées à partir d'ARN extraits de racines de plantes âgées de 6 semaines et (i) cultivées sur un milieu HY 1mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , (ii) privées de source de N pendant 1 ou 4 jours (après culture préalable sur milieu HY 1mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), (iii) alimentées à nouveau avec  $\text{NO}_3^-$  1mM pendant 6 h à l'issue d'une période de 4 jours de privation de N.

La privation de N pendant 24 h entraîne une modification sensible de l'accumulation des transcrits d'un certain nombre de gènes représentés sur la membrane (Tableau 3.5). Il est important de noter que parmi ceux-ci se retrouvent 5 gènes déjà connus pour être régulés par la privation de N, à savoir : (i) *AtNRT1.1* et *AtNIA1*, dont les niveaux de transcrits chutent après retrait de la source de N, ce qui a déjà été observé par d'autres (Lejay *et al.*, 1999, Cheng *et al.*, 1991) et est interprété par l'arrêt de l'induction de ces gènes par  $\text{NO}_3^-$  exogène ; et (ii) *AtAMT1.1*, *AtAMT2* et *AtNRT2.5*, dont les niveaux d'accumulation de transcrits augmentent en réponse au traitement de carence, comme décrit précédemment (Gazzarrini *et al.*, 1999, Rawat *et al.*, 1999, Sohlenkamp *et al.*, 2000, Orsel *et al.*, 2002b), ce qui correspond à la levée de la répression exercée par les métabolites N sur l'expression de ces gènes. Les résultats obtenus pour une privation de N pendant 4 jours confirment ces conclusions, en accentuant même la réponse de certains de ces gènes par rapport à la privation de 24 h (Tableau 3.6 et Figure 3.7). La ré-alimentation des plantes avec  $\text{NO}_3^-$  1mM aboutit logiquement à des modifications d'accumulation de transcrits inverses de celles observées en réponse à la privation de N, à savoir : augmentation pour *AtNIA1*, inductible par  $\text{NO}_3^-$ , et diminution pour *AtAMT1.1*, *AtAMT2* et *AtNRT2.5*, réprimés par les métabolites N (Tableau 3.6 et Figure 3.7). L'induction de l'expression d'*AtNRT1.1* par  $\text{NO}_3^-$  n'est toutefois pas apparente dans nos expériences, ce qui est difficilement explicable. Il semble que ceci soit dû à un niveau de transcrits *AtNRT1.1* anormalement élevé dans les racines des plantes privées de N pendant 4 jours. A l'exception de ce dernier point, les résultats obtenus pour *AtNRT1.1*, *AtNIA1*, *AtAMT1.1*, *AtAMT2* et *AtNRT2.5* sont cohérents dans leur grande majorité avec les données publiées pour ces 5 gènes. De plus, d'autres gènes (*AtAMT1.2*, *AtAMT1.3*, *AtNRT2.3* et *AtNRT2.7*) déjà identifiés comme n'étant pas ou peu régulés par la fourniture de N aux plantes (Gazzarrini *et al.*, 1999, Orsel *et al.*, 2002b, Okamoto *et al.*, 2003) ne présentent effectivement pas de variations significatives d'expression dans nos expériences. Ces différents aspects valident les expériences réalisées et permettent de discuter avec confiance les modifications d'expression relevées pour les gènes *PTR* dont la régulation n'est pas connue.

Famille	Gène	Non induit		Induit	
		Moy	ET	Moy	ET
PTR	<i>At5g01180</i>	0,17	0,13	ND	
	<i>At2g02020</i>	0,22	0,08	0,44	0,06
	<i>AtPTR2B</i>	0,37	0,08	0,28	0,07
	<i>At5g11570</i>	0,43	0,19	ND	
	<i>AtNRT1.1</i>	1,83	0,22	0,97	0,12
	<i>At5g13400</i>	0,26	0,16	ND	
	<i>At3g16180</i>	2,22	1,53	0,80	0,41
	<i>At1g18880</i>	0,85	0,17	0,59	0,12
	<i>AtNRT1.3</i>	5,50	2,09	3,05	0,43
	<i>At4g21680</i>	0,29	0,09	ND	
	<i>At1g22540</i>	0,63	0,21	0,50	0,12
	<i>At1g22550</i>	0,29	0,12	ND	
	<i>At3g25260</i>	0,23	0,13	ND	
	<i>At3g25280</i>	ND		ND	
	<i>At1g69860</i>	1,23	0,55	0,88	0,26
	<i>At1g22570</i>	2,28	0,52	1,45	0,20
	<i>At5g28470</i>	0,35	0,06	ND	
	<i>At1g32450</i>	3,97	1,15	5,65	0,68
	<i>At1g33440</i>	ND		ND	
	<i>At2g37900</i>	ND		ND	
	<i>At2g40460</i>	0,42	0,15	0,26	0,06
	<i>At3g45650</i>	ND		ND	
	<i>At3g45660</i>	ND		ND	
	<i>At3g45700</i>	1,45	0,95	0,77	0,21
	<i>At3g45710</i>	2,69	2,30	2,08	1,60
	<i>At5g46040</i>	0,44	0,26	0,31	0,10
	<i>At5g46050</i>	0,38	0,08	ND	
	<i>At3g47960</i>	0,33	0,15	0,25	0,03
	<i>At1g52190</i>	0,49	0,29	ND	
	<i>At3g53960</i>	0,20	0,08	0,23	0,07
	<i>AtPTR1</i>	0,54	0,20	0,48	0,22
	<i>At1g59740</i>	1,80	0,59	0,98	0,13
	<i>At1g62200</i>	0,69	0,41	0,35	0,14
	<i>At5g62680</i>	1,04	0,56	0,66	0,28
<i>At5g62730</i>	0,58	0,15	0,68	0,21	
<i>At1g68570</i>	0,61	0,25	0,39	0,16	
<i>AtNRT1.2</i>	0,67	0,39	ND		
<i>At1g69870</i>	ND		ND		
<i>At1g72140</i>	ND		0,88	0,48	
AMT	<i>AtAMT11</i>	3,49	0,46	1,01	0,18
	<i>AtAMT12</i>	1,03	0,32	0,46	0,19
	<i>AtAMT13</i>	0,23	0,03	0,25	0,03
	<i>AtAMT2</i>	1,62	0,75	0,87	0,99
	<i>At3g24290</i>	0,94	0,13	0,54	0,18
NIA	<i>AtNIA1</i>	0,55	0,32	8,38	2,88
NRT2	<i>AtNRT2.2</i>	0,25	0,11	0,31	0,08
	<i>AtNRT2.3</i>	0,15	0,05	0,23	0,04
	<i>AtNRT2.7</i>	0,56	0,24	0,49	0,01
	<i>AtNRT2.5</i>	1,26	0,35	ND	

Tableau 3.6 : Effet de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

Données d'hybridations normalisées avec le transcrit synthétique T2. Les plantes de 6 semaines ont été cultivées en hydroponie sur milieu HY 1mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> puis privées de source de N 4 jours avant récolte (non induit) avant d'être ré-alimentées avec NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 1mM (induit). Les moyennes sont calculées à partir d'une hybridation réalisée sur un lot de 3 membranes. Moy : moyenne. ET : écart type. ND : non détecté.

Un des gènes *PTR* (*At1g72140*) présente un profil d'expression similaire à *AtNIA1*, et proche d'*AtNRT1.1*. L'expression de ce gène est réprimée par la carence et stimulée par la réalimentation avec  $\text{NO}_3^-$  (Tableaux 3.5, 3.6 et Figure 3.7). Ceci suggère que l'expression d'*At1g72140* est inductible par  $\text{NO}_3^-$ , et probablement non réprimé par les métabolites N. A l'inverse, *AtNRT1.2*, *At1g69860* et *At3g45710* voient leurs niveaux de transcrits augmenter sensiblement en réponse à la privation de N, et diminuer lorsque  $\text{NO}_3^-$  est à nouveau fourni aux plantes (Tableaux 3.5, 3.6 et Figure 3.7). Ce profil d'expression, identique à celui d'*AtAMT1.1*, *AtAMT2* et *AtNRT2.5*, suggère que l'expression des gènes *AtNRT1.2*, *At1g69860* et *At3g45710* est réprimée par les métabolites N. Les autres gènes *PTR* présentent en réponse aux traitements effectués, soit une stabilité d'expression, soit des variations jugées trop faibles pour être significatives (Tableaux 3.5 et 3.6).

### 3.7.4 Réponse à la lumière et au saccharose

Plusieurs gènes codant des transporteurs racinaires d'ions sont régulés par le cycle jour/nuit et la disponibilité des sucres pour les racines (Lejay *et al.*, 2003). En particulier, l'expression d'*AtNRT1.1*, *AtAMT1.2* et *AtAMT1.3* augmente au cours de la phase diurne du nyctémère, et est stimulée à l'obscurité par la fourniture exogène de sucres aux racines (Gazzarrini *et al.*, 1999, Lejay *et al.*, 1999, Lejay *et al.*, 2003). La NR codée par le gène *AtNIA*, est également soumise à une stimulation d'expression de nature transcriptionnelle par la lumière et les sucres (Vincentz *et al.*, 1993). Ces observations ont abouti à l'hypothèse que les sucres sont des signaux induisant l'expression de ces gènes, ce qui assure une coordination entre le prélèvement et l'assimilation de N d'une part, et la photosynthèse d'autre part. Pour identifier des gènes *PTR* potentiellement régulés par les produits de la photosynthèse, des sondes complexes ont été synthétisées à partir d'échantillons racinaires d'ARN issus de plantes âgées de 6 semaines (i) récoltées à la fin de la période diurne du nyctémère, (ii) récoltées à la fin de la période obscure, et (iii) soumises à un apport exogène de saccharose (1%p/v) pendant la période obscure.

Au cours de ces expériences, l'expression d'*AtNRT1.1*, *AtAMT1.2*, *AtAMT1.3* et *AtNIA1* montre l'évolution attendue, avec généralement une diminution de l'accumulation des transcrits la nuit par rapport à la journée, et une stimulation par la fourniture de saccharose à l'obscurité (Tableau 3.7). Les variations observées sont toutefois sensiblement atténuées par rapport à celles rapportées dans d'autres expériences (Gazzarrini *et al.*, 1999, Lejay *et al.*, 1999, Lejay *et al.*, 2003). Au moins 5 gènes de la famille *PTR* (*At3g16180*, *At1g32450*,



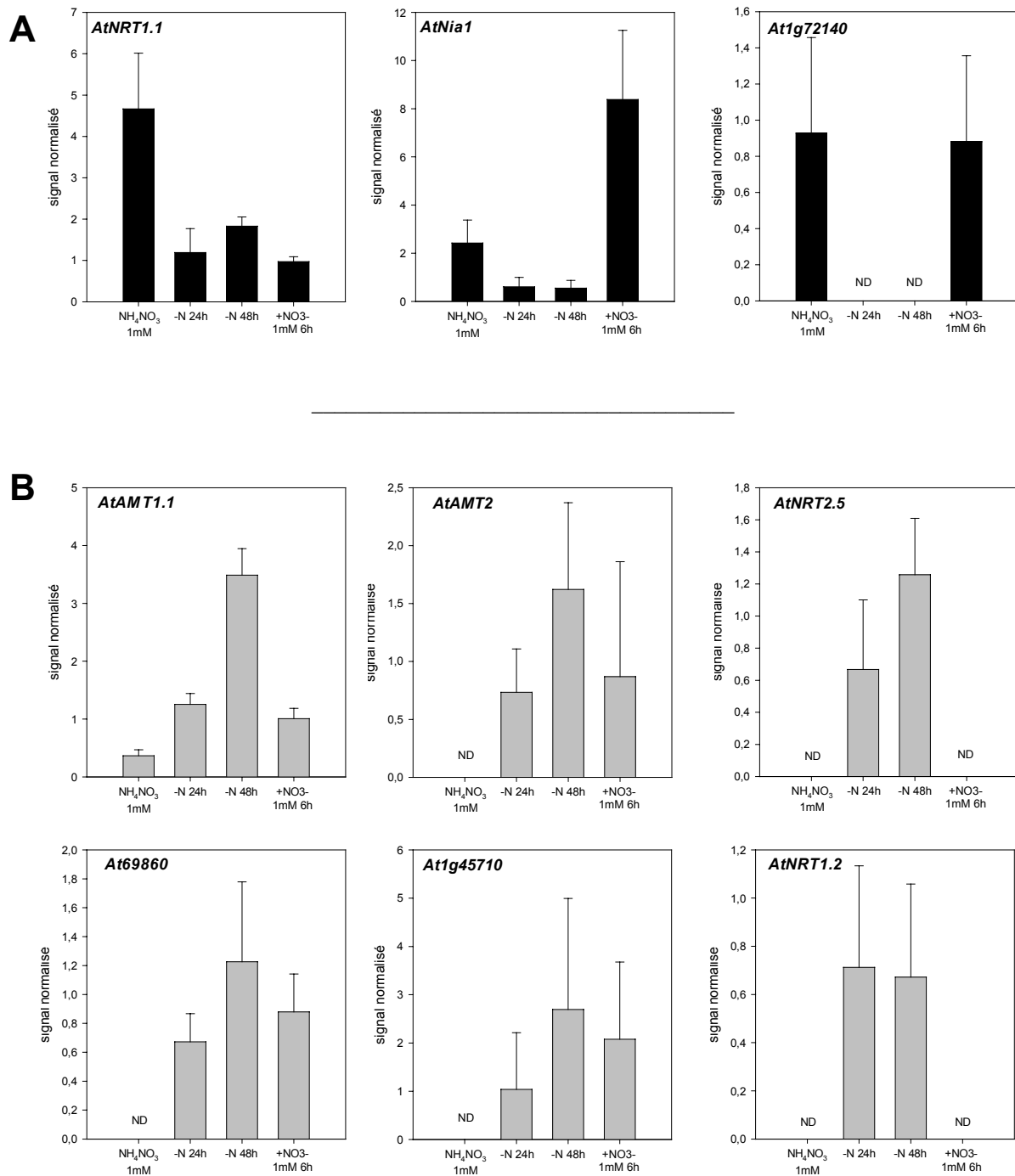


Figure 3.7: **Profils d'expression de gènes en situation de carence et d'induction.** Graphiques de données d'hybridation des tableaux 3.5 et 3.6. Les barres verticales représentent les écart types. ND : non détecté.

A : gènes dont l'expression est induite par le NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

B : gènes dont l'expression est stimulée par la carence en N et diminuée par la réalimentation avec NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

*At1g33440*, *At3g45660*, *At1g69870*) présentent un profil d'expression similaire à celui des 4 gènes pré-cités, suggérant une induction par les produits de la photosynthèse. Trois autres gènes présentent des réponses à la lumière et au sucre plus originales. *At3g25280* ne semble être exprimé que la nuit en l'absence de sucre exogène. *At3g45650* est fortement réprimé par le saccharose exogène, mais n'est pas affecté par le cycle jour/nuit. Enfin, *AtNRT2.7* semble réprimé à l'obscurité, même en présence de saccharose dans le milieu extérieur. Les variations de niveaux de transcrits des autres gènes ont été jugées non significatives, parce que les niveaux d'expression ou les différences entre traitements sont trop faibles.

Famille	Gène	Jour		Nuit		Nuit + sucre	
		Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET
	<i>At5g01180</i>	0,29	0,10	0,21	0,05	0,14	0,04
	<i>At2g02020</i>	0,20	0,11	ND		ND	
	<i>AtPTR2B</i>	ND		ND		ND	
	<i>At5g11570</i>	ND		ND		ND	
	<i>AtNRT1.1</i>	3,13	0,71	2,01	0,45	2,33	0,54
	<i>At5g13400</i>	0,13	0,01	ND		0,19	0,06
	<i>At3g16180</i>	0,90	0,24	ND		0,59	0,01
	<i>At1g18880</i>	0,49	0,08	0,42	0,05	0,24	0,04
	<i>AtNRT1.3</i>	2,98	1,28	2,74	1,32	1,85	0,79
	<i>At4g21680</i>	0,43	0,15	0,27	0,06	ND	
	<i>At1g22540</i>	ND		0,30	0,04	0,36	0,12
	<i>At1g22550</i>	0,14	0,06	0,10	0,02	0,13	0,04
	<i>At3g25260</i>	0,18	0,07	0,12	0,02	0,17	0,05
	<i>At3g25280</i>	ND		0,37	0,05	ND	
	<i>At1g69860</i>	1,03	0,19	0,71	0,15	0,64	0,13
	<i>At1g22570</i>	1,66	0,57	1,04	0,25	0,79	0,17
	<i>At5g28470</i>	ND		ND		ND	
	<i>At1g32450</i>	1,45	0,56	0,87	0,38	2,48	0,23
	<i>At1g33440</i>	0,90	0,38	ND		0,65	0,21
<i>PTR</i>	<i>At2g37900</i>	ND		ND		ND	
	<i>At2g40460</i>	0,26	0,09	0,14	0,04	0,26	0,10
	<i>At3g45650</i>	1,56	0,64	1,53	0,42	ND	
	<i>At3g45660</i>	0,53	0,10	ND		0,38	0,01
	<i>At3g45700</i>	ND		ND		0,52	0,17
	<i>At3g45710</i>	1,47	0,60	0,73	0,42	0,68	0,29
	<i>At5g46040</i>	0,18	0,03	0,15	0,06	0,22	0,09
	<i>At5g46050</i>	ND		ND		ND	
	<i>At3g47960</i>	0,23	0,06	0,13	0,06	ND	
	<i>At1g52190</i>	ND		ND		ND	
	<i>At3g53960</i>	0,16	0,05	0,08	0,04	0,12	0,05
	<i>AtPTR1</i>	0,18	0,00	ND		0,10	0,01
	<i>At1g59740</i>	1,28	0,34	0,88	0,21	0,56	0,13
	<i>At1g62200</i>	ND		ND		0,16	0,09
	<i>At5g62680</i>	0,37	0,13	0,31	0,06	0,26	0,07
	<i>At5g62730</i>	0,74	0,11	0,68	0,21	ND	
	<i>At1g68570</i>	0,20	0,04	0,09	0,01	0,11	0,01
	<i>AtNRT1.2</i>	ND		ND		ND	
	<i>At1g69870</i>	0,97	0,24	ND		0,85	0,21
	<i>At1g72140</i>	1,51	0,50	1,52	0,39	0,44	0,16
	<i>AtAMT11</i>	0,25	0,09	0,28	0,16	0,77	0,16
	<i>AtAMT12</i>	0,31	0,12	0,33	0,11	0,45	0,09
<i>AMT</i>	<i>AtAMT13</i>	0,28	0,04	0,19	0,06	0,27	0,11
	<i>AtAMT2</i>	0,41	0,27	0,22	0,12	0,32	0,18
	<i>At3g24290</i>	0,26	0,06	0,35	0,15	0,48	0,12
<i>NIA</i>	<i>AtNIA1</i>	1,10	0,54	0,61	0,33	1,79	0,44
	<i>AtNRT2.2</i>	0,09	0,02	0,06	0,01	0,19	0,05
<i>NRT2</i>	<i>AtNRT2.3</i>	0,10	0,04	ND		ND	
	<i>AtNRT2.7</i>	0,80	0,06	ND		ND	
	<i>AtNRT2.5</i>	ND		ND		ND	

Tableau 3.7 : **Effet de l'alternance jour/nuit.**

Données d'hybridations normalisées avec le transcrit synthétique. Les plantes de 6 semaines cultivées en hydroponie ont été récoltées à la fin de la période diurne (jour), à la fin de la période obscure (nuit et nuit + sucre) et ont reçu un apport exogène de saccharose de 1%p/v pendant la période obscure précédant la récolte (nuit + sucre). Moy : moyenne. ET : écart type. ND : non détecté.

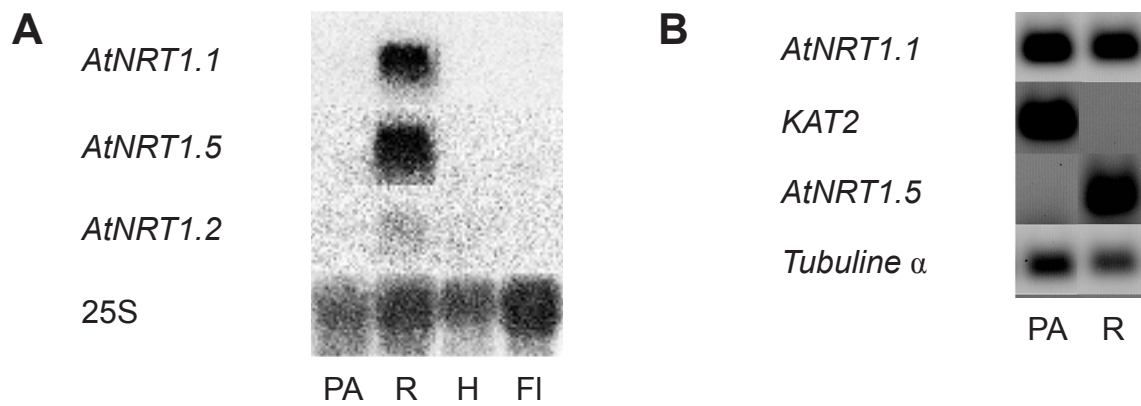


Figure 4.1 : **Territoires d'expression.**

PA : parties aériennes. R : racines. H : hampes florales. FI : Fleurs.

A : Hybridations Northern. Les plantes (6 semaines) sont cultivées en hydroponie sur milieu HY 1mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (PA, R). Les plantes arrivées à floraison sont cultivées en serre sur terreau (H, FI). B : RT-PCR. Les plantes (6 semaines) sont cultivées en hydroponie sur milieu HY 5mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

## 4 Chapitre IV

### ANALYSE COMPAREE DE L'EXPRESSION DES GENES *ATNRT1.1*, *ATNRT1.2* ET *ATNRT1.5*

#### 4.1 Introduction

Les analyses bioinformatiques des séquences des protéines *PTR* d'*Arabidopsis* montrent que les membres de la famille ont en commun des zones plus ou moins grandes. Les analyses d'expression à large échelle décrites dans le chapitre précédent indiquent que cette famille regroupe des gènes dont les territoires et les profils d'expression peuvent être très différents. Cette diversité suggère qu'il existe au sein de cette communauté de gènes une grande diversité fonctionnelle. Un élément connu de cette diversité est la coexistence de protéines possédant des activités de transport différentes (transport de  $\text{NO}_3^-$  vs transport de peptides).

La caractérisation des fonctions de 2 de ces gènes dans la plante est l'objet de ce chapitre et du suivant. Les deux gènes choisis sont *AtNRT1.2* (*At1g69850*) et *At1g32450*. A l'heure actuelle, aucune appellation n'a été attribué au gène *At1g32450*. Or, dans la littérature, les membres de la famille *PTR* supposés ou montrés comme des transporteurs de  $\text{NO}_3^-$  chez *Arabidopsis* ont été nommés d'*AtNRT1.1* à *AtNRT1.4*. En conséquence nous choisissons de nommer *AtNRT1.5* le gène *At1g32450*. Les gènes *AtNRT1.2* et *AtNRT1.5* appartiennent respectivement aux sous-groupes D et E de la famille *PTR* d'*Arabidopsis* définis au chapitre 3 (Figure 3.1). Le gène *AtNRT1.5* n'a fait l'objet d'aucune étude spécifique publiée à ce jour et son annotation fonctionnelle reste uniquement basée sur des homologues de séquence. Bien qu'une étude ait été publiée concernant *AtNRT1.2*, le profil d'expression de ce gène est mal connu et sa fonction largement incomprise. Les critères qui ont guidé notre choix sont multiples. Un premier critère est l'expression des deux gènes dans les racines. Un second critère est que leurs niveaux d'expression sont modulés par des signalétiques connues pour modifier le prélèvement de  $\text{NO}_3^-$  (alternance jour/nuit pour *AtNRT1.5* et statut azoté pour *AtNRT1.2*). Enfin un troisième critère est que les protéines correspondantes ont été exprimées

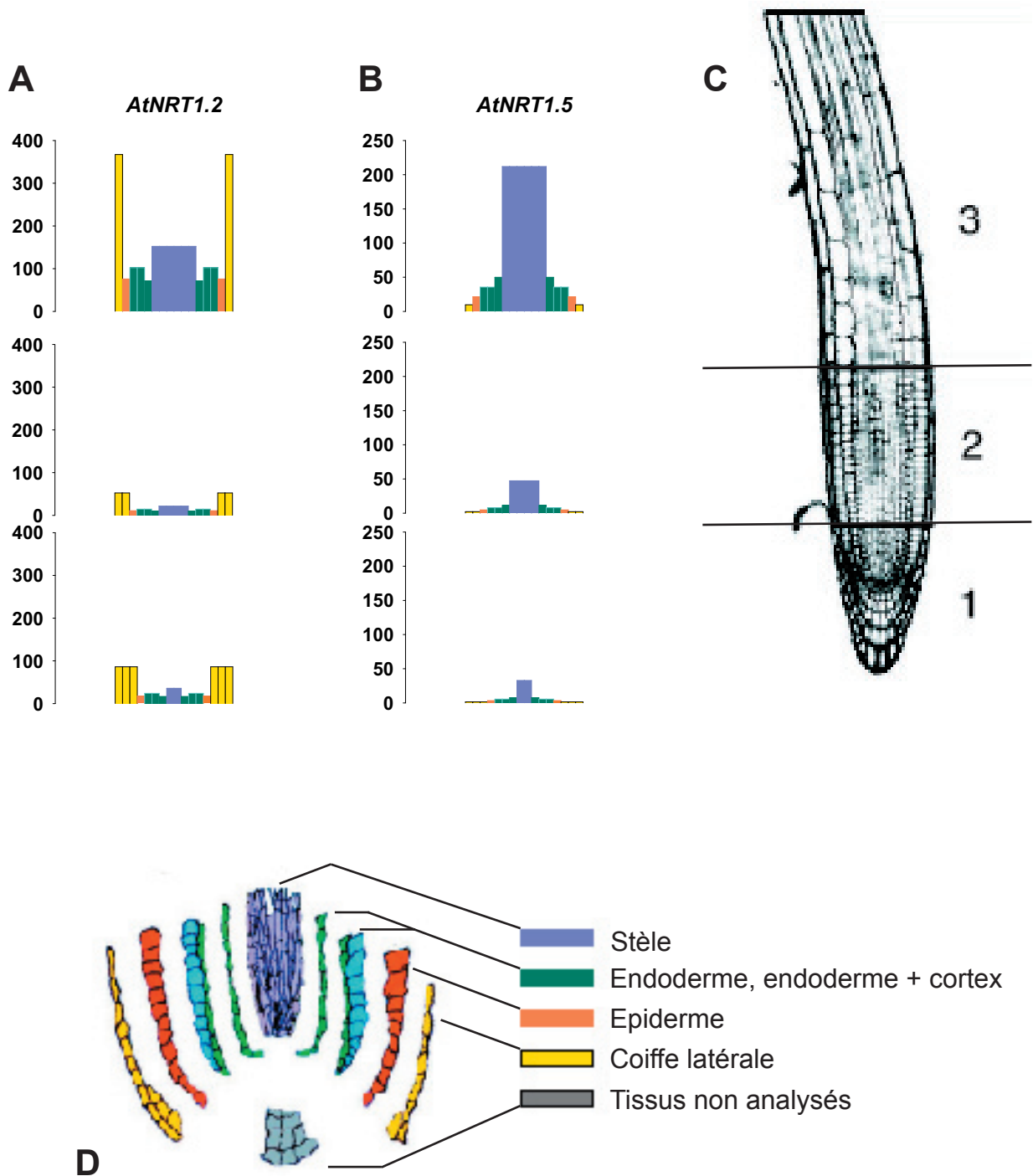


Figure 4.2 : Expression d'*AtNRT1.2* et *AtNRT1.5* dans les différents types cellulaires de la racine.

Représentation réalisée à partir des résultats publiés par Birnbaum *et al* en 2003. A et B, signaux détectés pour les transcrits *AtNRT1.2* et *AtNRT1.5*. C, stades de différenciation de la racine considérés. D, types cellulaires séparés.

dans l'ovocyte de Xénope et dans les deux cas une activité de transport qui permet l'entrée de  $\text{NO}_3^-$  dans la cellule a été mise en évidence (P<sup>r</sup> Y.F. Tsay, communication personnelle).

Deux approches complémentaires ont été poursuivies. Dans ce chapitre est décrit une analyse détaillée des profils d'expression, tandis que dans le suivant, l'impact fonctionnel de la perte de ces gènes chez des mutants est analysé. Nous avons privilégié pour les études d'expression d'*AtNRT1.2* et *AtNRT1.5* des situations physiologiques connues pour leurs impacts sur la régulation du transport  $\text{NO}_3^-$ . Les objectifs sont (i) de confirmer les données des membranes basse densité, et (ii) d'obtenir des indications concernant le rôle de ces transporteurs dans des conditions particulières non étudiées jusqu'à présent. Au cours de ces études, deux gènes codant des transporteurs de  $\text{NO}_3^-$  impliqués dans le prélèvement de  $\text{NO}_3^-$  sont utilisés comme références : *AtNRT1.1*, qui code le transporteur de  $\text{NO}_3^-$  le mieux caractérisé de la famille PTR, et dans certains cas *AtNRT2.1*, qui code un transporteur de la famille *NRT2* dont l'expression est soumise au rétrocontrôle exercée par les métabolites azotés.

## 4.2 Territoires d'expression

L'absorption et le transport de  $\text{NO}_3^-$  dans la plante mettent en jeu un grand nombre d'étapes fonctionnelles. Des transporteurs membranaires sont impliqués dans la plupart de ces étapes. Définir les territoires d'expression des gènes potentiellement impliqués dans le transport de  $\text{NO}_3^-$  est un élément important pour les caractériser leurs fonctions dans la plante. Par exemple, le gène *AtNRT1.1* est exprimé dans les apex des racines et dans les stomates. Au niveau des racines, il participe au prélèvement de  $\text{NO}_3^-$ , dans les parties aériennes, il est impliqué dans les flux de  $\text{NO}_3^-$  qui contrôlent l'ouverture stomatique.

Des ARN ont été extraits à partir d'organes prélevés sur des plantes en état végétatif ou floral et sont analysés par Northern blot. L'expression d'*AtNRT1.2* et *AtNRT1.5* est comparée à celle d'*AtNRT1.1*. Les trois transcrits sont détectés uniquement dans les racines (Figure 4.1 A). Compte tenu du seuil de détection de la technique de Northern blot, un transcrit peu abondant peut ne pas être révélé. Ce risque existe en particulier pour les gènes dont l'expression est restreinte à des types cellulaires peu représentés, comme les cellules de garde. Des expériences de RT-PCR sont donc réalisées afin de vérifier la présence des transcrits *AtNRT1.1* et *AtNRT1.5* dans les parties aériennes. Des couples d'amorces spécifiques du transcrit *KAT2* qui code un canal potassique spécifique des cellules de garde et du parenchyme du phloème (Very et Sentenac, 2003), ou du transcrit de Tubuline  $\alpha$  présent dans

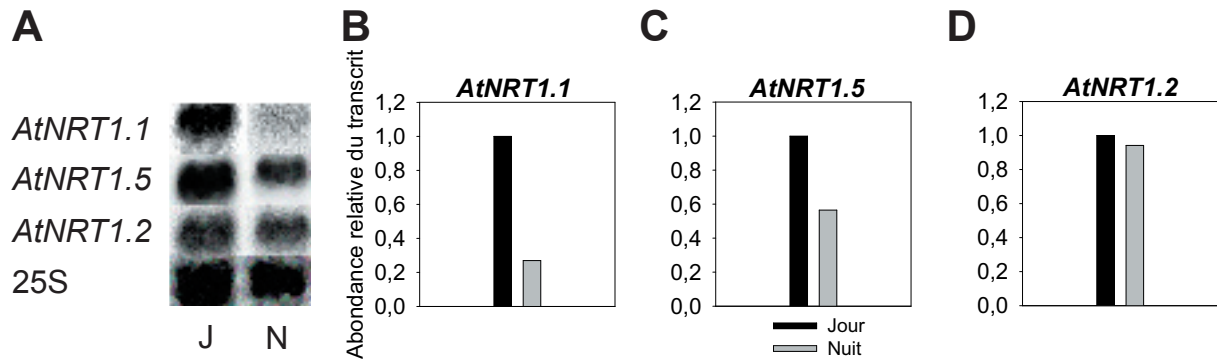


Figure 4.3 : **Alternance jour/nuit.**

Hybridations Northern. Les plantes (6 semaines) sont cultivées en hydroponie sur milieu HY 1mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  et récoltées soit à la fin de la période lumineuse (jour) soit à la fin de la période obscure (nuit). A autoradiogramme, B, C D, quantifications normalisées par le 25S et exprimées relativement au témoin (condition jour).

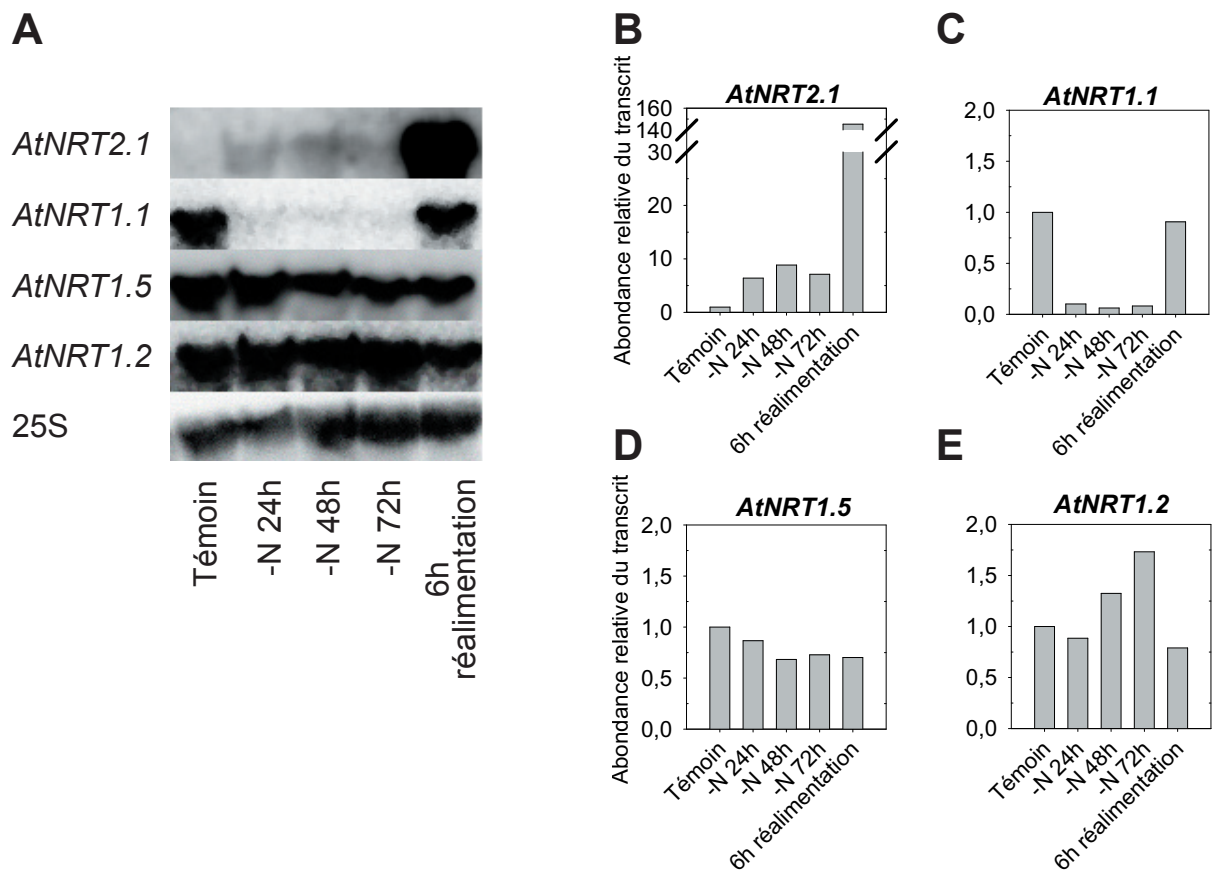


Figure 4.4 : **Effet de  $\text{NO}_3^-$ .**

Hybridations Northern. Les plantes (6 semaines) sont cultivées en hydroponie sur milieu HY 1mM  $\text{NO}_3^-$ . Témoin : ayant toujours reçu une source de N. -N : privées de source de N durant 24, 48 ou 72h. Réalimentation 6h : réalimentées 6h avec  $\text{NO}_3^-$  1mM. A autoradiogramme, B, C et D, quantifications normalisées par le 25S et exprimées relativement au témoin.



la plupart des cellules sont utilisés comme témoins. La technique utilisée permet de détecter des transcrits peu abondant comme KAT2 (Figure 4.1 B). Bien que non détecté par Northern blot, les transcrits AtNRT1.1 sont détectés dans les parties aériennes par RT-PCR (Figure 4.1 B). Par contre, le transcrit AtNRT1.5 n'est pas détecté dans les parties aériennes par cette technique (Figure 4.1 B), ce qui suggère que l'expression du gène est spécifique des racines.

Dans un article publié en 2003, Birnbaum *et al* (Birnbaum *et al.*, 2003) ont réalisé le transcriptome de différents tissus au cours des premier stades de différenciation de la racine primaire. Ces expériences ont consisté à réaliser une digestion de 3 zones de la racine représentant 3 stades de différenciation Figure 4.2, C). les plantes utilisées sont des transformants exprimant le gène de la GFP de manière tissus spécifique. Après séparation, les différents types cellulaires sont triés par cytométrie de flux. Les types cellulaires séparés par cette méthode sont représentées Figure 4.2 D. Les données concernant *AtNRT1.2* et *AtNRT1.5* ont été extraits du site <http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/302/5652/1956/DC1>.

La Figure 4.2 a été construite à partir des données téléchargées pour les gènes *AtNRT1.2* et *AtNRT1.5*. L'expression d'*AtNRT1.2* est détectée dans toutes les cellules et préférentiellement dans les tissus périphériques de la racine au stade le plus âgé considéré dans les expériences (Figure 4.2 A). Le gène *AtNRT1.5* montre une spécificité tissulaire différente. Son expression est détectée majoritairement dans la stèle et l'endoderme de la racine au stade le plus âgé considéré (Figure 4.2 B).

### 4.3 Alternance jour /nuit

L'acquisition de N et de C sont deux processus fortement intégrés au sein de la plante. Ceci est expliqué par la nécessaire adéquation entre l'acquisition de N et la fourniture des squelettes carbonés destinés à produire les acides aminés. Un des aspects de cette intégration est le contrôle exercé par l'activité photosynthétique des parties aériennes sur le prélèvement de N par les racines. En particulier, il a été montré que la lumière exerce *via* les sucres produits par la photosynthèse et transportés vers les racines un rôle stimulateur sur l'expression des gènes *AtNRT1.1* et *AtNRT2.1* qui codent des transporteurs de  $\text{NO}_3^-$ . L'expression d'*AtNRT1.1* au cours d'un cycle jour/nuit est comparée à celle d'*AtNRT1.2* et *AtNRT1.5* dans les racines de plantes cultivées en hydroponie sur un milieu HY 1mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . On retrouve dans ces conditions la forte accumulation préférentielle du transcrit AtNRT1.1 à la lumière (x4, Figure 4.3). L'expression d'*AtNRT1.5* est aussi stimulée à lumière

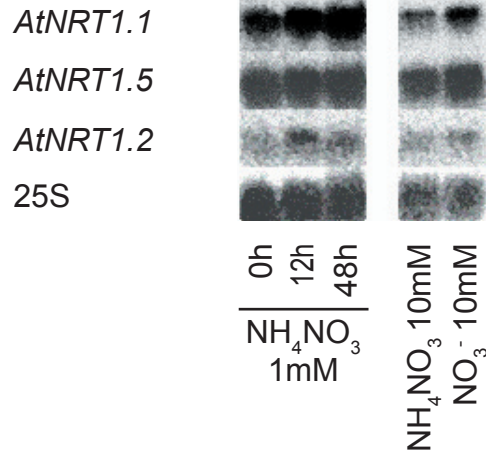
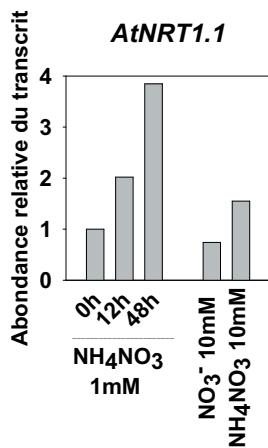
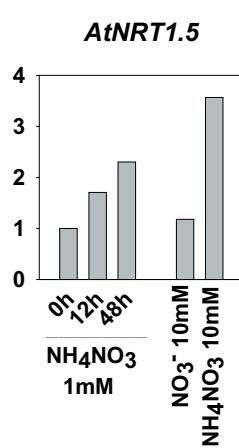
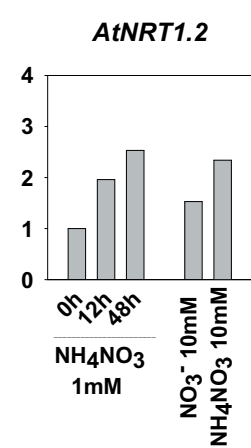
**A****B****C****D**

Figure 4.5 : **Effet de  $\text{NH}_4^+$ .**

Hybridations Northern. Les plantes (6 semaines) sont cultivées en hydroponie sur milieu HY 1mM  $\text{NO}_3^-$ .  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1mM : plantes ayant reçu  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1mM durant 0h, 12h ou 48h.  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  10mM : plantes ayant reçu  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  10mM durant 48h. A autoradiogramme, B, C et D quantifications normalisées par le 25S et exprimées relativement au témoin (0h  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1mM).

avec un facteur de stimulation plus faible (x1,8, Figure 4.3). L'accumulation du transcrit AtNRT1.2 ne varie pas en fonction du cycle jour/nuit.

## 4.4 Effet de la source de N

### 4.4.1 Effet de $\text{NO}_3^-$

Un élément important de la régulation des systèmes d'absorption et d'assimilation de  $\text{NO}_3^-$  est leur activation en présence de  $\text{NO}_3^-$  dans le milieu. Cette observation physiologique est confirmée au niveau moléculaire, l'induction par  $\text{NO}_3^-$  est une régulation commune à de nombreux gènes codant des enzymes et des transporteurs impliqués dans l'acquisition de  $\text{NO}_3^-$ .

L'effet de  $\text{NO}_3^-$  est étudié chez des plantes cultivées en hydroponie sur milieu HY 1mM  $\text{NO}_3^-$ . L'ion est retiré du milieu de culture pendant 1, 2, 3 jours puis rajouté pendant 6h. Les ARN sont extraits des racines et les transcrits AtNRT1.1, AtNRT2.1, AtNRT1.2 et AtNRT1.5 sont analysés par Northern blot. Le retrait de  $\text{NO}_3^-$  du milieu a un effet complexe dû à l'absence de l'ion mais aussi à la privation de N. La variation de l'accumulation des transcrits AtNRT1.1 et AtNRT2.1 en réponse à un retrait de  $\text{NO}_3^-$  du milieu a déjà été décrite. Le suivi de l'expression de ces deux gènes permet donc de caractériser au niveau moléculaire l'effet du traitement. L'accumulation du transcrit AtNRT1.1 dépend de la présence de  $\text{NO}_3^-$  dans le milieu, mais pas de la répression exercée par les assimilats azotés. Le retrait de  $\text{NO}_3^-$  entraîne une diminution de l'accumulation du transcrit AtNRT1.1, tandis que son rajout s'accompagne d'un retour au niveau initial. L'expression du gène *AtNRT2.1* dépend non seulement de la présence de  $\text{NO}_3^-$  mais est aussi soumise à la répression exercée par les assimilats azotés. Le retrait de  $\text{NO}_3^-$  du milieu a donc deux effets opposés : un effet dépressif lié à l'absence de l'ion, comme pour *AtNRT1.1*, et un effet stimulateur lié à la levée de la répression exercée par les métabolites azotés. Les deux phénomènes ayant des cinétiques différentes on observe une stimulation transitoire de l'accumulation du transcrit AtNRT2.1 dès le 1er jour après le retrait de l'ion, un maximum (9 fois le niveau initial) après 2 jours, et une décroissance après 3 jours (Figure 4.4). Le rajout de l'ion après trois jours de carence stimule très fortement l'accumulation du transcrit (facteur 20, Figure 4.4). 6h de réalimentation avec  $\text{NO}_3^-$  réintroduit l'induction par  $\text{NO}_3^-$  ce qui aboutit à une très forte augmentation du niveau d'expression (100 fois supérieur niveau initial) en l'absence de répression par les métabolites N (Figure 4.4).

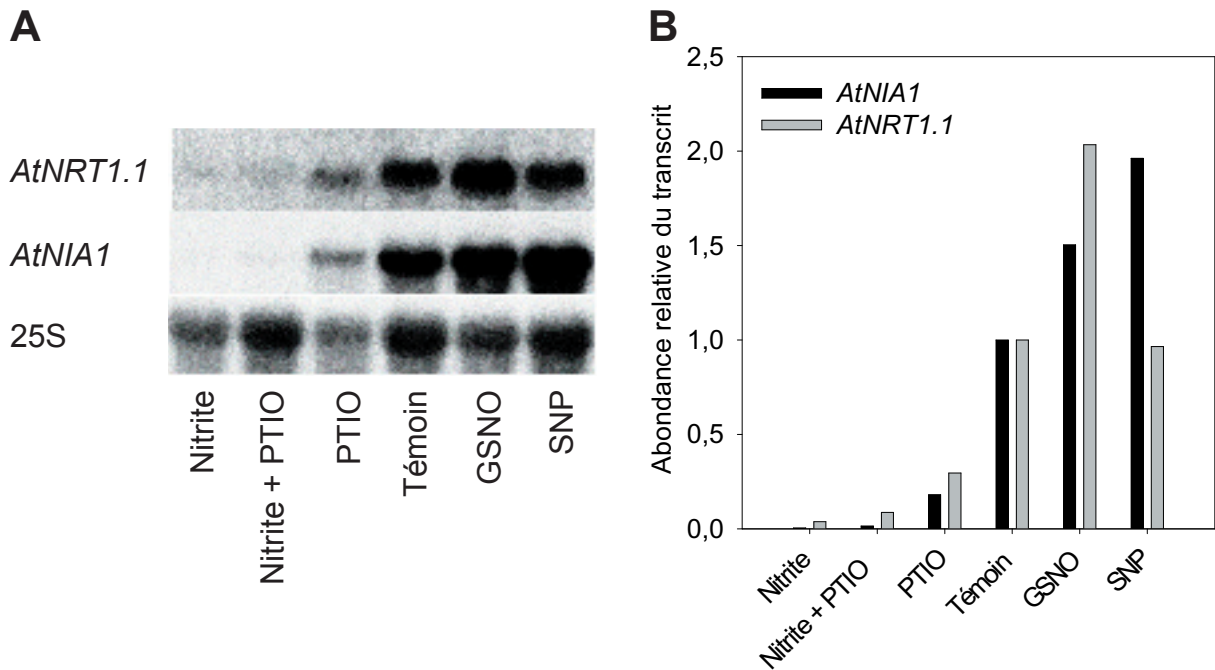


Figure 4.6 : **Effet de  $\text{NO}_2^-$  et NO.**

Hybridations Northern. Les plantes (6 semaines) sont cultivées en hydroponie sur milieu HY 1mM  $\text{NO}_3^-$ . Nitrite : apport exogène de  $\text{NO}_2^-$  1mM pendant 24h. PTIO (piège à NO) : apport exogène de PTIO 0,28mM pendant 24h. GSNO (donneur de NO) : apport exogène de NO 0,25mM pendant 24h. SNP (donneur de NO) : apport exogène de NO 1,1mM pendant 24h. A autoradiogramme, B, quantifications normalisées par le 25S et exprimées relativement au témoin non traité.

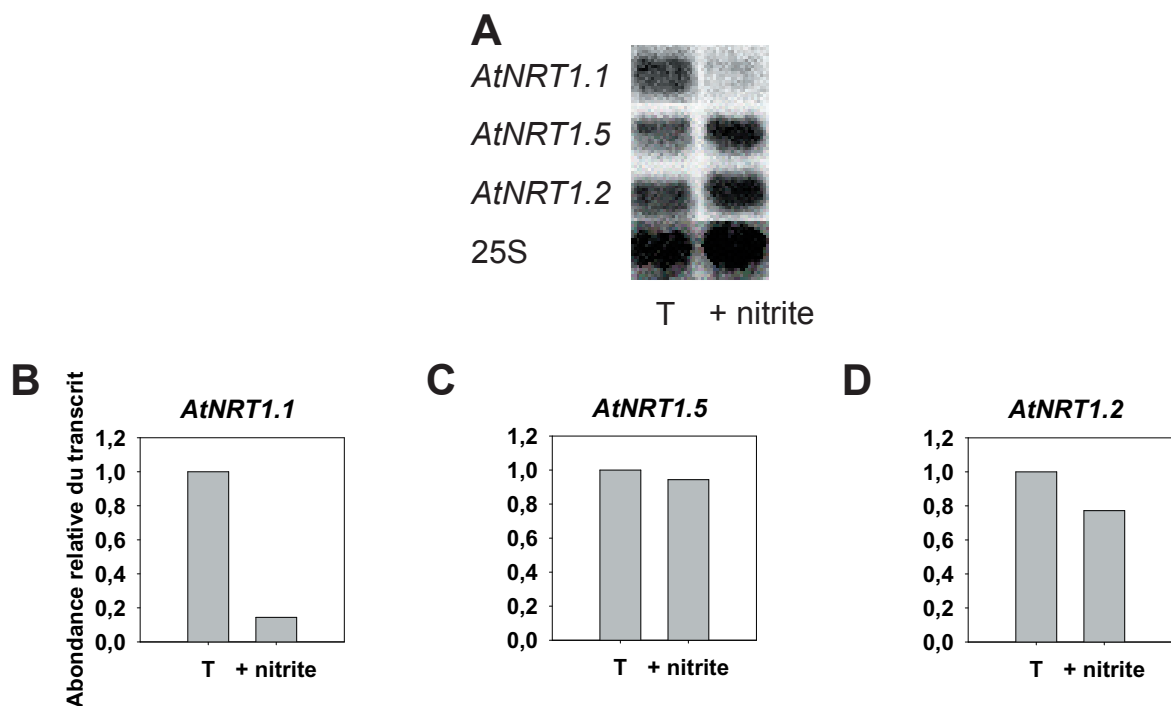


Figure 4.7 : **Effet de  $\text{NO}_2^-$ .**

Hybridations Northern. Les plantes (6 semaines) sont cultivées en hydroponie sur milieu HY 1mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . + nitrite : apport exogène de  $\text{NO}_2^-$  1mM pendant 24h. A autoradiogramme, B, C et D, quantifications normalisées par le 25S et exprimées relativement au témoin non traité (T).

Le retrait ou le rajout de  $\text{NO}_3^-$  du milieu ne modifie pas l'accumulation du transcrit AtNRT1.5 (Figure 4.4), ce qui suggère que l'expression de ce gène ne dépend pas de la présence de  $\text{NO}_3^-$  et n'est pas réprimé par les assimilats azotés. Par contre, l'accumulation du transcrit AtNRT1.2 est légèrement stimulée par le retrait de  $\text{NO}_3^-$  du milieu (stimulation x2, 3 jours après le retrait de  $\text{NO}_3^-$ , Figure 4.4). Cette stimulation est levée par le rajout de  $\text{NO}_3^-$ . Cette régulation n'est probablement pas du même type que celle observée pour *AtNRT2.1*. Il semble qu'en situation de privation de N, l'éléments stimulant l'expression d'*AtNRT1.2* est l'absence de l'ion  $\text{NO}_3^-$  plutôt que la levée de la répression par les métabolites azotés. En effet, l'accumulation du transcrit retrouve son niveau initial immédiatement après rajout de  $\text{NO}_3^-$  alors que le profil d'expression du gène *AtNRT2.1* démontre l'absence de la répression par les métabolites N dans la condition.

#### 4.4.2 Effet de $\text{NH}_4^+$

L'ajout de  $\text{NH}_4^+$  permet de fournir à la plante une autre source de N capable de modifier le statut azoté de la plante sans modifier la concentration en  $\text{NO}_3^-$  du milieu. Cette dualité des sources de N est souvent utilisée dans des stratégies ayant pour but de découpler l'effet inducteur de  $\text{NO}_3^-$  de son effet nutritionnel. L'ajout de  $\text{NH}_4^+$  peut aussi avoir des effets spécifiques liés au cation lui même.

Le traitement consiste à transférer des plantes de 6 semaines cultivées en présence de  $\text{NO}_3^-$  1mM comme seule source de N sur différentes sources de N pendant 48h :  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1mM,  $\text{NO}_3^-$  1mM,  $\text{NO}_3^-$  10mM ou  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  10mM. Les ARN sont extraits des racines et les transcrits AtNRT1.1, AtNRT1.2 et AtNRT1.5 sont analysés par Northern blot. L'apport équimolaire de  $\text{NH}_4^+$  dans une solution nutritive contenant  $\text{NO}_3^-$  provoque une forte augmentation de l'accumulation des transcrits AtNRT1.1 (Figure 4.5). Une stimulation plus modeste des niveaux des transcrits AtNRT1.2 et AtNRT1.5 est également détectée (Figure 4.5). Cet effet est observé pour les deux concentrations de  $\text{NO}_3^-$  étudiées. La stimulation de l'expression d'*AtNRT1.1* par  $\text{NH}_4^+$  n'augmente pas proportionnellement avec la dose de  $\text{NH}_4^+$  apportée. En effet, cette stimulation est légèrement plus faible à 10mM qu'à 1mM  $\text{NH}_4^+$  (Figure 4.5). Dans le cas d'*AtNRT1.5* par contre, l'effet stimulateur de  $\text{NH}_4^+$  augmente avec sa concentration (stimulation plus importante à 10mM qu'à 1mM, Figure 4.5).

Dans le cas d'*AtNRT1.1*, les fortes concentrations de  $\text{NO}_3^-$  provoquent une chute du niveau d'accumulation du transcrit (Figure 4.5). Ceci est probablement lié à la répression exercée sur l'expression du gène par la réduction de  $\text{NO}_3^-$  en  $\text{NO}_2^-$  (voir §4.3.3). Par contre,

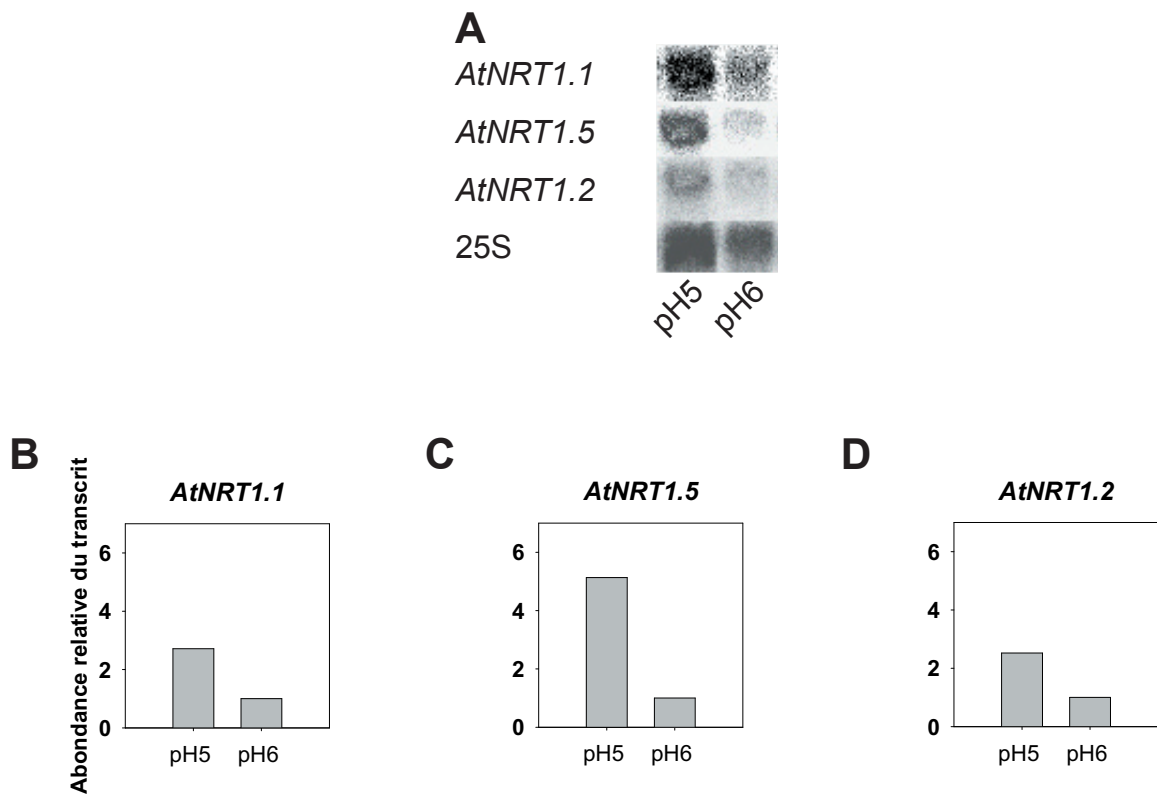


Figure 4.8 : **Effet du pH externe.**

Hybridations Northern. Les plantes (6 semaines) sont cultivées en hydroponie sur milieu HY 1mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  dont le pH est ajusté à 5 ou 6 en présence de Tris-MES 4,4mM. A : autoradiogramme, B, C et D, quantifications normalisées par le 25S et exprimées relativement au témoin (plantes cultivées à pH 6)

les fortes concentrations de  $\text{NO}_3^-$  n'affectent pas l'expression d'*AtNRT1.5* ce qui suggère que le contrôle par la réduction de  $\text{NO}_3^-$  n'existe pas pour ce gène (Figure 4.5).

#### 4.4.3 Effet de $\text{NO}_2^-$

$\text{NO}_2^-$  est le produit de la réduction de  $\text{NO}_3^-$  par la NR. Des travaux menés dans l'équipe ont montré que c'est un puissant répresseur de l'expression du gène *AtNRT1.1*. Cette régulation touche également *AtNIA1*, qui code pour une des deux isoformes de la NR, mais n'affecte pas la plupart des autres gènes étudiés (*AtNRT2.1*, *AtAMT1.1*, *AtNIA2*, *AtNiR*, *AtEF1 $\alpha$* ). Le mécanisme mis en jeu reste entièrement inconnu. Au démarrage de ce travail les expériences réalisées ne permettaient pas de d'attribuer l'effet répresseur à  $\text{NO}_2^-$  ou à un produit de sa métabolisation. Ce point est particulièrement important car il est montré qu'à forte concentration de  $\text{NO}_2^-$  la NR est capable de réduire  $\text{NO}_2^-$  en NO, une molécule signal impliquée dans de nombreux processus chez les plantes. Des expériences ont donc été réalisées avec des molécules donneuses de NO (GSNO, SNP) ou piège à NO (PTIO) afin de répondre à cette question. Des plantes cultivées en hydroponie sur milieu HY 1mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  sont mises en présence de  $\text{NO}_2^-$  et/ou de molécules pièges ou donneuses de NO pendant 24h. Les ARN sont extraits et les transcrits *AtNRT1.1* et *AtNIA1* des racines sont analysés par Northern blot. L'ajout de  $\text{NO}_2^-$  dans le milieu entraîne une très forte réduction de l'accumulation des transcrits *AtNRT1.1* et *AtNIA1* (Figure 4.6). Cet effet est observé même en présence de PTIO, alors que le NO éventuellement présent est piégé et inactif (Figure 4.6). Ceci montre que le  $\text{NO}_2^-$  est la molécule biologiquement active de la régulation étudiée. NO a un effet opposé à  $\text{NO}_2^-$  sur l'accumulation des transcrits *AtNRT1.1* et *AtNIA1* (Figure 4.6). Ceci est montré par l'effet des molécules donneuses de NO (augmentation du niveau des transcrits *AtNRT1.1* et *AtNIA1* après traitement avec GSNO et SNP) ou piège à NO (réduction du niveau d'accumulation des transcrits *AtNRT1.1* et *AtNIA1* après traitement avec PTIO).

L'effet de  $\text{NO}_2^-$  sur l'accumulation des transcrits *AtNRT1.2* et *AtNRT1.5* est étudié dans une autre expérience chez des plantes cultivées en hydroponie en présence de  $\text{NO}_2^-$  pendant 24h.  $\text{NO}_2^-$  provoque une très forte diminution de l'expression d'*AtNRT1.1* mais ne modifie pas l'accumulation des transcrits *AtNRT1.2* et *AtNRT1.5* dans les mêmes conditions (Figure 4.7).

### Teneur en K<sup>+</sup> des parties aériennes

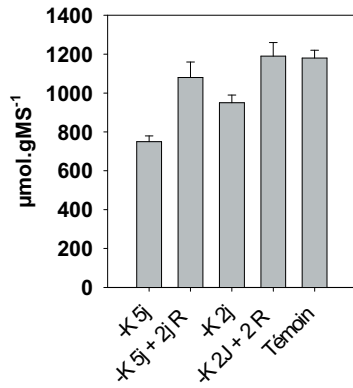


Figure 4.9 : Teneur en K<sup>+</sup> des parties aériennes.

Les plantes (6 semaines) sont cultivées en hydroponie sur milieu HY 1mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. -K : privation de source de K<sup>+</sup> pendant 2 ou 5 jours. R : réversion de 2 jours d'une privation de K<sup>+</sup>. n=12, les barres verticales représentent les écart types.

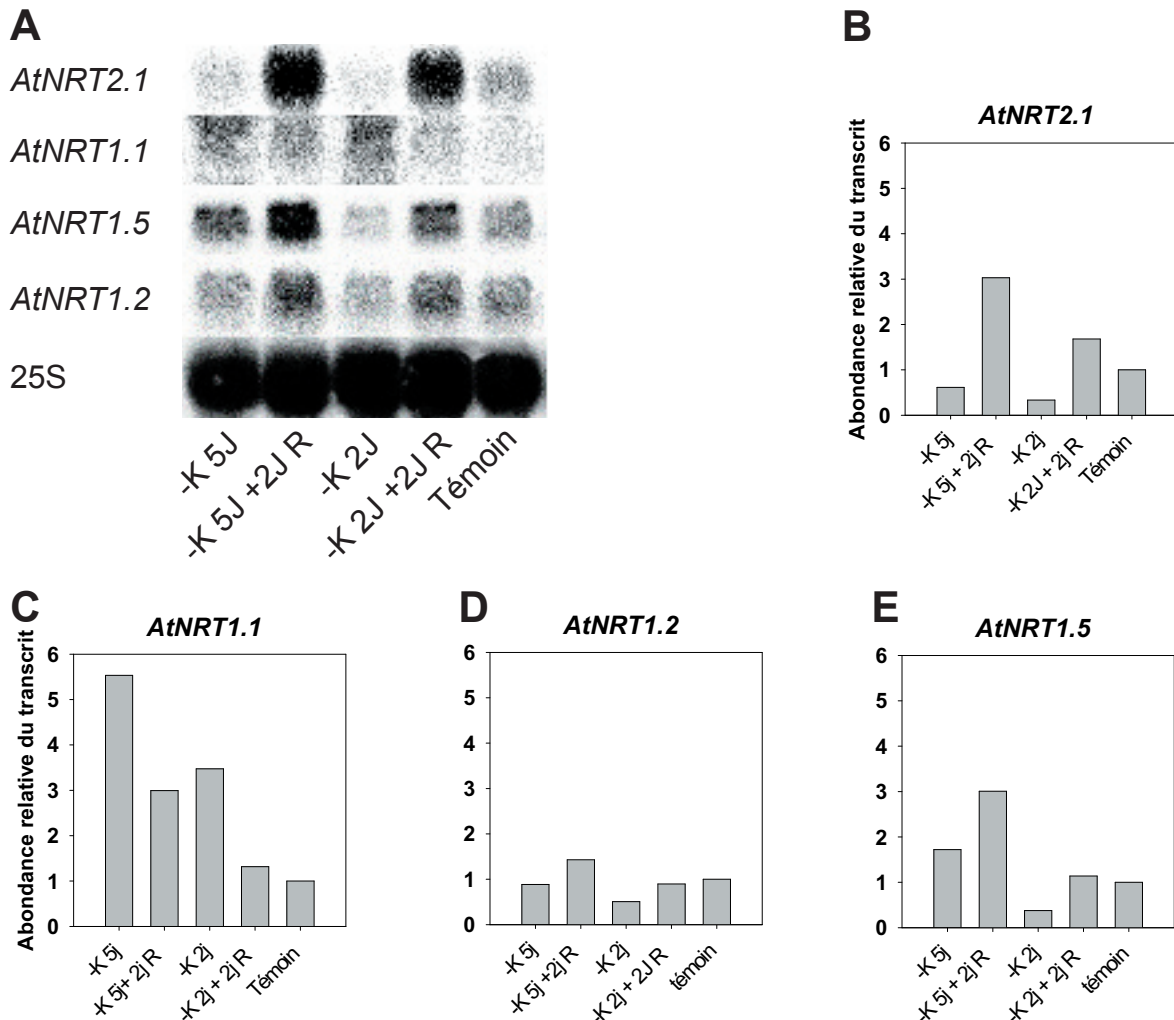


Figure 4.10 : Effet de la carence en K<sup>+</sup>.

Hybridations Northern. Les plantes (6 semaines) sont cultivées en hydroponie sur milieu HY 1mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. -K : privation de source de K<sup>+</sup> pendant 2 ou 5 jours. R : réversion de 2 jours d'une privation de K<sup>+</sup>. A autoradiogramme, B, C, D et E, quantification normalisées par le 25S et exprimées relativement au témoin.



#### 4.4.4 Effet du pH externe et de la disponibilité de K<sup>+</sup>

Le pH du milieu de culture et la disponibilité de K<sup>+</sup> sont des paramètres qui régulent les flux d'ions dans la plantes, en particulier les co-transports avec H<sup>+</sup>.

L'accumulation du transcrit *AtNRT1.1* est stimulée par l'acidification du milieu de culture (Tsay et al, 1993). L'effet du pH externe sur l'expression des gènes *AtNRT1.1*, *AtNRT1.2* et *AtNRT1.5* est étudié chez des plantes cultivées en hydroponie sur des solutions nutritives contenant NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1mM comme source de N et maintenues à pH5 ou 6 en présence de tampons organiques. La plus forte accumulation des transcrits *AtNRT1.1* est observée à pH5 (Figure 4.8). Cette stimulation par un pH acide est retrouvée également pour les transcrits *AtNRT1.2* et *AtNRT1.5* (Figure 4.8).

K<sup>+</sup> est le cation majeur du cytoplasme des cellules végétales. Les mouvements de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et K<sup>+</sup> sont étroitement associés notamment afin d'assurer l'électroneutralité des transports. L'effet d'une limitation en K<sup>+</sup> sur l'expression des gènes *AtNRT1.1*, *AtNRT1.2*, *AtNRT1.5* et *AtNRT2.1* est étudié chez des plantes cultivées en hydroponie sur des solutions nutritives contenant NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 3 mM comme source de N. Le traitement consiste à placer les plantes pendant 48 ou 120h sur une solution nutritive dépourvue de K<sup>+</sup> puis à les remettre 48h en présence de K<sup>+</sup>. L'effet du traitement est caractérisé en mesurant la teneur en K<sup>+</sup> des parties aériennes des plantes. Le retrait du K<sup>+</sup> de la solution nutritive entraîne une diminution de 12% de la teneur en K<sup>+</sup> des parties aériennes chez les plantes traités pendant 48h et de 25% chez les plantes traitées pendant 120h (Figure 4.9). La chute de la teneur en K<sup>+</sup> est totalement restaurée lorsque les plantes carencées sont ré-alimentées 48h avec K<sup>+</sup> 1mM (Figure 4.9). Le retrait de K<sup>+</sup> de la solution nutritive s'accompagne d'une augmentation importante du niveau d'accumulation (stimulation d'un facteur 5) du transcrit *AtNRT1.1* dès 48h (Figure 4.10). Ce niveau est réduit par le traitement inverse de ré-alimentation avec K<sup>+</sup> (Figure 4.10). Ce comportement n'est pas celui des autres gènes étudiés. Le retrait de K<sup>+</sup> milieu entraîne une diminution de 30 à 50% de l'accumulation des transcrits *AtNRT2.1*, *AtNRT1.2*, *AtNRT1.5* (Figure 4.10, mis à part le point -K 5j ; stimulation +50%). Chez ces gènes, la ré-alimentation avec K<sup>+</sup> stimule fortement l'accumulation des transcrits (facteur 1,5 dans le cas de *AtNRT1.2* et facteur 10 dans le cas d'*AtNRT1.5* et *AtNRT2.1*).

		<i>AtNRT1.1</i>	<i>AtNRT1.5</i>	<i>AtNRT1.2</i>
Domaine		racines/feuilles	racines	racines
source N	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	stimulé par la présence	insensible	stimulé par l'absence
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	stimulé par la présence	stimulé par la présence dose dépendant	stimulé par la présence
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	réprimé	insensible	insensible
fortes concentrations		insensible	insensible	insensible
jour/nuit		stimulé le jour	stimulé le jour	insensible
nutrition potassique	carence	stimulé	réprimé	réprimé
	réversion de carence	levée de la stimulation	très fortement stimulé	très fortement stimulé
pH		stimulé	stimulé	stimulé

Tableau 4.1 : **Synthèse des données d'expression concernant *AtNRT1.1*, *AtNRT1.2* et *AtNRT1.5*.**

## 4.5 Discussion

Le Tableau 4.1 récapitule les données d'expression présentées dans ce chapitre.

Les données obtenues par Northern blot avec les GST des gènes *AtNRT1.1*, *AtNRT1.2*, *AtNRT1.5* pour sondes confirment la plupart des tendances observées avec la membrane thématique. Il existe cependant des exceptions. Dans les expériences présentées dans le chapitre 3 un niveau anormalement élevé du transcrit *AtNRT1.1* était détecté dans les feuilles (Tableau 3.4) et dans les racines de plantes cultivées 4 jours sans  $\text{NO}_3^-$  (Tableau 3.6). Ces résultats ne sont pas confirmés dans les expériences de Northern blot, qui, par contre, corroborent ceux déjà publiés. L'expression du gène *AtNRT1.1*, détectée préférentiellement dans les racines, est fortement dépendante de la présence de  $\text{NO}_3^-$  dans le milieu de culture. Les données générées avec la membrane thématique pour ce gène sont peu fiables. Les données de la membrane thématique indiquaient un niveau faible mais significatif de transcrits *AtNRT1.5* dans les feuilles (Tableau 3.4). Ce résultat n'a pas non plus été confirmé par Northern blot ou RT-PCR. Il semble qu'un bruit de fond anormalement élevé est associé à cette GST. En dehors de ces exceptions toutes les autres régulations identifiées avec la membrane basse densité ont été validées par Northern Blot. Ces quelques réserves soulignent l'importance de confirmer les données issues d'analyse à large échelle par d'autres techniques lorsqu'on cible les variations quantitatives de l'expression individuelle de gènes.

Un point commun des gènes étudiés est leur expression préférentielle dans la racine. Ce résultat confirme les données publiées concernant *AtNRT1.1* (Tsay *et al.*, 1993) et *AtNRT1.2* (Huang *et al.*, 1999). Ce caractère général peut recouvrir des profils d'expression différents au niveau tissulaire. C'est le cas pour les 2 gènes de référence que nous avons choisis qui sont tous les deux impliqués dans l'influx de  $\text{NO}_3^-$  à partir du milieu extérieur. *AtNRT2.1* est exprimé dans la zone corticale de la racine mature et *AtNRT1.1* dans les apex racinaires (Guo *et al.*, 2001, Nazon *et al.*, 2003). C'est probablement aussi le cas pour *AtNRT1.2* et *AtNRT1.5*. La consultation des transcriptomes de types cellulaires séparés après digestion ménagée de jeunes racines (Birnbaum *et al.*, 2003) suggère qu'*AtNRT1.5* est exprimé dans la stèle tandis qu'*AtNRT1.2* est présent dans les différents types cellulaires. Bien entendu, ces données grossières doivent être confirmées par des expériences plus fines de localisation *in situ* ou de fusion avec un gène rapporteur. L'expression d'*AtNRT1.5* dans la stèle suggère une fonction particulière pour ce gène. Cortex et cylindre central sont deux régions fonctionnellement différentes vis-à-vis des flux d'ions et en particulier de  $\text{NO}_3^-$  (Clarkson et Lüttge, 1991). Les

trois couches cellulaires périphériques de la racine (épiderme, cortex et endoderme) délimitent une région où il n'existe aucun obstacle à la diffusion des ions dans l'apoplasme. Dans cette zone, les ions ont accès aux sites d'absorption présents à la surface des cellules. La zone corticale constitue la surface d'absorption des ions réelle de la racine. Au niveau de l'endoderme, la bande de Caspari est un obstacle à la diffusion radiale des ions vers le cylindre central par voie apoplasmique. Au delà de cette barrière l'acheminement des ions vers les vaisseaux du xylème impose un passage par voie symplasmique vers la stèle. Le cylindre central est traversé par les vaisseaux du xylème dans lequel circule la sève brute qui achemine une partie importante des ions absorbés vers les parties aériennes. En conséquence, en situation de non perturbée, la zone corticale est en moyenne une zone d'influx net de  $\text{NO}_3^-$  tandis que le cylindre central une zone d'efflux net de l'ion vers le xylème.

Comme *AtNRT1.1*, le transcrit *AtNRT1.5* s'accumule préférentiellement le jour, tandis que le niveau d'accumulation du transcrit *AtNRT1.2* ne varie pas au cours du nyctémère. La régulation par la lumière est un caractère commun à beaucoup de gènes impliqués dans le transport et l'assimilation de N. Elle est liée à l'activité photosynthétique de la plante et à la fourniture de sucres aux organes (Lejay *et al.*, 2003). Cette régulation est expliquée par la nécessaire coordination qui doit exister entre l'absorption, l'assimilation de N et la fourniture des squelettes carbonés par la photosynthèse pour synthétiser les acides aminés. La stimulation par les sucres pour un transporteur de  $\text{NO}_3^-$  est une régulation cohérente avec un rôle dans la nutrition azoté de la plante, ce qui a déjà été montré pour *AtNRT1.1* et *AtNRT2.1*.

Les modifications de la source de N entraînent des variations de l'expression d'*AtNRT1.2* et *AtNRT1.5*. Ces variations traduisent des régulations originales de ces deux gènes par rapport à celles déjà connues des deux gènes de références *AtNRT1.1* et *AtNRT2.1*. A la différence d'*AtNRT1.1*, d'*AtNRT2.1*, et de beaucoup d'autres gènes impliqués dans le transport ou l'assimilation de  $\text{NO}_3^-$ , l'expression d'*AtNRT1.2* et *AtNRT1.5* ne dépend pas de la présence de l'ion  $\text{NO}_3^-$ . L'expression d'*AtNRT1.5* n'est pas modifiée par le retrait de l'ion du milieu, tandis que celle d'*AtNRT1.2* est légèrement stimulée. Bien que ces résultats doivent être confirmés au niveau protéique, il est probable qu'*AtNRT1.2* et *AtNRT1.5* n'appartiennent pas à une composante inductible du transport de  $\text{NO}_3^-$  dans la plante. Ce résultat confirme les données de Huang *et al.* (1999), qui concluaient au caractère « constitutif » de l'expression d'*AtNRT1.2*.

Le retrait de la source de N a également pour conséquence la levée de la répression exercée par les assimilats azotés sur l'absorption de  $\text{NO}_3^-$ . Nos résultats confirment qu'une

cible majeure de ce rétro-contrôle négatif exercé par les métabolites N est *AtNRT2.1* qui, dans ces conditions, est fortement stimulé (Munos *et al.*, 2004, Cerezo *et al.*, 2001). La levée de répression se caractérise par la stimulation transitoire de l'expression d'*AtNRT2.1* lors des premiers jours de privation de N dans nos expériences. La légère stimulation de l'expression d'*AtNRT1.2* dans les mêmes conditions suggère que l'expression de ce gène peut être partiellement contrôlée par le même mécanisme. Ce comportement n'est pas celui d'*AtNRT1.5* ou *AtNRT1.1* dont l'expression est insensible à la répression exercée par les assimilats azotés. Une autre manière de faire varier la source de N est d'ajouter  $\text{NH}_4^+$  dans un milieu contenant  $\text{NO}_3^-$ . L'ajout d'une autre source d'N provoque une fourniture accrue d'assimilats azotés à la plante et une réponse compensatoire négative de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  afin d'ajuster le prélèvement de N à la demande de la plante. La forte répression de l'expression d'*AtNRT2.1* caractérise la répression accrue exercée par les métabolites N (Munos *et al.*, 2004). L'absence de répression d'*AtNRT1.2* dans ces conditions ne confirme pas l'hypothèse d'un contrôle de l'expression du gène par les métabolites N. La légère stimulation observée lors d'une privation totale d'N n'est donc probablement pas due à un contrôle par le statut azoté de la plante, mais plutôt à un signal « local » lié à l'absence de  $\text{NO}_3^-$  (ou de source de N). L'ajout de  $\text{NH}_4^+$  entraîne une plus forte accumulation des transcrits *AtNRT1.1*, *AtNRT1.2* et *AtNRT1.5* dans la racine. La stimulation de l'expression d'*AtNRT1.1* par  $\text{NH}_4^+$  en situation de nutrition mixte n'a pas été décrite à ce jour. Ce résultat est cohérent avec les données fonctionnelles obtenues avec le mutant *chl1.5* (Touraine et Glass, 1997, Huang *et al.*, 1996, Liu *et al.*, 1999), qui montre que le déficit d'absorption à basse affinité de  $\text{NO}_3^-$  associé à la perte d'*AtNRT1.1* est plus élevé en situation de nutrition mixte ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) qu'en nutrition nitrique. La signification biologique d'un mécanisme qui tend à stimuler l'expression de transporteurs de  $\text{NO}_3^-$  lorsque  $\text{NH}_4^+$  est ajouté reste à approfondir. Une hypothèse est qu'il vise à prévenir l'effet délétère d'une nutrition ammoniacale pure. Bien que  $\text{NH}_4^+$  est une forme plus réduite de N que le  $\text{NO}_3^-$ , beaucoup d'espèces végétales supportent mal une nutrition azotée exclusivement à base de  $\text{NH}_4^+$ , qui provoque un syndrome ammoniacal (Mehrer et Mohr, 1989) De fait, la plupart des espèces herbacées atteignent leur plus fort niveau de croissance en nutrition mixte (Salsac *et al.*, 1987, Volk *et al.*, 1992). L'existence d'un tel mécanisme régulateur a déjà été proposé afin d'expliquer la surexpression d'*AtNRT2.1* chez le mutant *chl1.5* cultivé sur  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (Munos *et al.*, 2004). Chez ce mutant, en situation de nutrition mixte, le déficit d'absorption de  $\text{NO}_3^-$  lié à l'absence d'*AtNRT1.1* est partiellement compensée dans le domaine des basses concentrations par la sur-expression d'*AtNRT2.1*. Plusieurs éléments suggèrent l'existence

d'une régulation de ce gène par une demande spécifique en  $\text{NO}_3^-$  non liée à la fourniture d'assimilats azotés. Nos résultats suggèrent que le même type de contrôle pourrait s'exercer sur d'autres gènes impliqués dans le transport de  $\text{NO}_3^-$  comme *AtNRT1.2* et *AtNRT1.5*.

Des travaux réalisés précédemment dans l'équipe ont montré que  $\text{NO}_2^-$  qui est le produit de la réduction de  $\text{NO}_3^-$  par la NR a un effet répresseur très puissant sur l'expression d'*AtNRT1.1* dans la racine (Loqué *et al.*, 2003). Bien qu'appartenant à la même famille de gènes, *AtNRT1.2* et *AtNRT1.5* ne présentent pas le même type de régulation, ce qui suggère qu'il ne s'agit pas d'un caractère général à ce groupe de gènes. L'utilisation de molécules piège ou donneuses de NO nous a permis de préciser que l'effet répresseur observé est vraisemblablement lié à  $\text{NO}_2^-$  lui-même et non à sa dégradation en NO. La signification biologique de cette régulation reste hypothétique. L'idée la plus couramment admise est qu'il existe un large excès d'activité NiR dans les tissus et que  $\text{NO}_2^-$  est un intermédiaire métabolique qui n'est généralement pas accumulé dans la cellule (Beevers et Hageman, 1980). Cependant plusieurs éléments suggèrent que ce modèle général doit être remis en cause. Des résultats récents obtenus avec des lignées transgéniques sur-exprimant la NiR d'épinard suggèrent que la réduction de  $\text{NO}_2^-$  peut dans certains cas être considérée comme une étape métabolique limitante dans la voie d'assimilation (Takahashi *et al.*, 2001). Par ailleurs, il est connu depuis longtemps qu'en situation d'hypoxie les racines accumulent et excrètent  $\text{NO}_2^-$  (Botrel *et al.*, 1996). Cette caractéristique a été largement exploitée pour mesurer l'ANR *in vivo* (Radin, 1974). Dans les racines le NADPH issu de la voie des pentoses phosphates est utilisé pour réduire la ferredoxine, qui elle-même fournit le pouvoir réducteur à la NiR. En absence d'oxygène, l'activité de la voie des pentoses phosphates est largement ralentie en raison d'un détournement de l'essentiel du carbone vers la glycolyse pour la production anaérobie d'ATP. La NiR est inactive faute de source de pouvoir réducteur, et en conséquence  $\text{NO}_2^-$  s'accumule. L'hypoxie est une situation physiologique régulièrement rencontrée par les racines notamment en situation d'excès d'eau. Une hypothèse propose que la régulation de transporteurs de  $\text{NO}_3^-$  par  $\text{NO}_2^-$  est un mécanisme de retro-inhibition destiné à limiter l'accumulation toxique de  $\text{NO}_2^-$ . La raison pour laquelle *AtNRT1.1* est spécifiquement ciblé par ce mécanisme est une question qui reste à élucider.

L'expression des gènes étudiés est fortement modulée dans la racine en fonction de variations de la disponibilité de  $\text{K}^+$ . Deux types de comportements sont observés. Dans le cas d'*AtNRT1.1*, la limitation en  $\text{K}^+$  stimule fortement l'expression du gène tandis que la ré-alimentation par  $\text{K}^+$  a l'effet inverse. Dans le cas des trois autres gènes *AtNRT1.2*, *AtNRT1.5* et *AtNRT2.1*, la limitation en  $\text{K}^+$  s'accompagne au contraire d'une légère diminution de

l'expression du gène. Le traitement de ré-alimentation par  $K^+$  entraîne une forte stimulation du niveau d'expression par rapport au niveau initial. La stimulation de l'expression d'*AtNRT1.1* par la carence en  $K^+$  n'a à notre connaissance jamais été décrite. La diminution de l'accumulation du transcrite *AtNRT2.1* en réponse à la carence en  $K^+$  et sa stimulation après ré-alimentation a déjà été mise en évidence dans des expériences de microarray (Maathuis *et al.*, 2003, Armengaud *et al.*, 2004). L'effet stimulateur de  $K^+$  sur le transport de  $NO_3^-$  dans la racine est connu depuis longtemps (MacRobbie, 1971). La présence de  $K^+$  affecte de manière différentielle les deux étapes du transport  $NO_3^-$  de la racine (la stimulation est beaucoup plus marquée sur la translocation que sur l'absorption, (Rufty *et al.*, 1981). Si la signification biologique de la stimulation de l'expression d'*AtNRT1.1* par la carence en  $K^+$  reste à élucider, la stimulation des trois autres gènes est cohérente avec les données physiologiques. Un des effets de la privation totale de  $K^+$  est un ralentissement de la croissance de la plante qui, en conséquence, s'accompagne d'une baisse de la demande en N de la plante. L'effet stimulateur de la ré-alimentation en  $K^+$  correspondrait à une reprise active de la croissance. Cet effet de la carence en  $K^+$  sur la croissance pourrait expliquer à lui seul les variations d'expression d'*AtNRT2.1*, dont il a été montré que le niveau d'expression est fortement corrélé à la demande en N de la plante (Lejay *et al.*, 1999, Gansel *et al.*, 2001). Cependant, la stimulation parallèle de l'expression des gènes *AtNRT1.2* et *AtNRT1.5* ne peut pas être expliquée par cette hypothèse, car les expériences de privation de N ont montré que l'expression de ces gènes n'est pas régulée par le statut azoté et la demande en N de la plante. L'existence d'un mécanisme régulateur directement lié à la disponibilité de  $K^+$  de ces transporteurs est une hypothèse qui mérite d'être étudiée.

L'expression d'*AtNRT1.2* et *AtNRT1.5* comme celle d'*AtNRT1.1* est fortement stimulée dans la racine par l'acidification du milieu de culture, suggérant qu'il s'agit d'une caractéristique commune de ce groupe de gènes. Ce comportement s'oppose à celui d'*AtNIA1*, *AtNIA2* et *AtNiR*, codant respectivement les 2 isoformes de la NR et la NiR chez *Arabidopsis*, dont l'expression est réprimée dans les mêmes conditions (Loqué *et al.*, 2003). Les études électrophysiologiques réalisées dans l'ovocyte de Xénope suggèrent qu'*AtNRT1.1* transporterait  $NO_3^-$  via un co-transport avec  $H^+$  (Tsay *et al.*, 1993). Certains auteurs ont suggéré que le gène pourrait avoir un rôle dans la régulation du pH intracellulaire (Meraviglia *et al.*, 1996). Ces données montrent que le pH externe est un paramètre important lié à l'activité de transport de ce type de gène. Cependant le rôle biologique de la régulation de ces gènes par le pH externe reste à déterminer.

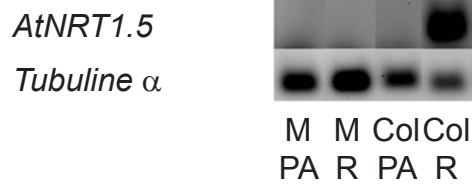


Figure 5.1 : Localisation de l'expression du gène *AtNRT1.5* dans la plante. RT-PCR réalisées sur des ADNc de parties aériennes (PA) et racines (R) des génotypes Columbia (Col) et *atnrt1.5::T* (M). Les plantes (6 semaines) ont été cultivées en hydroponie sur milieu HY 5mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.

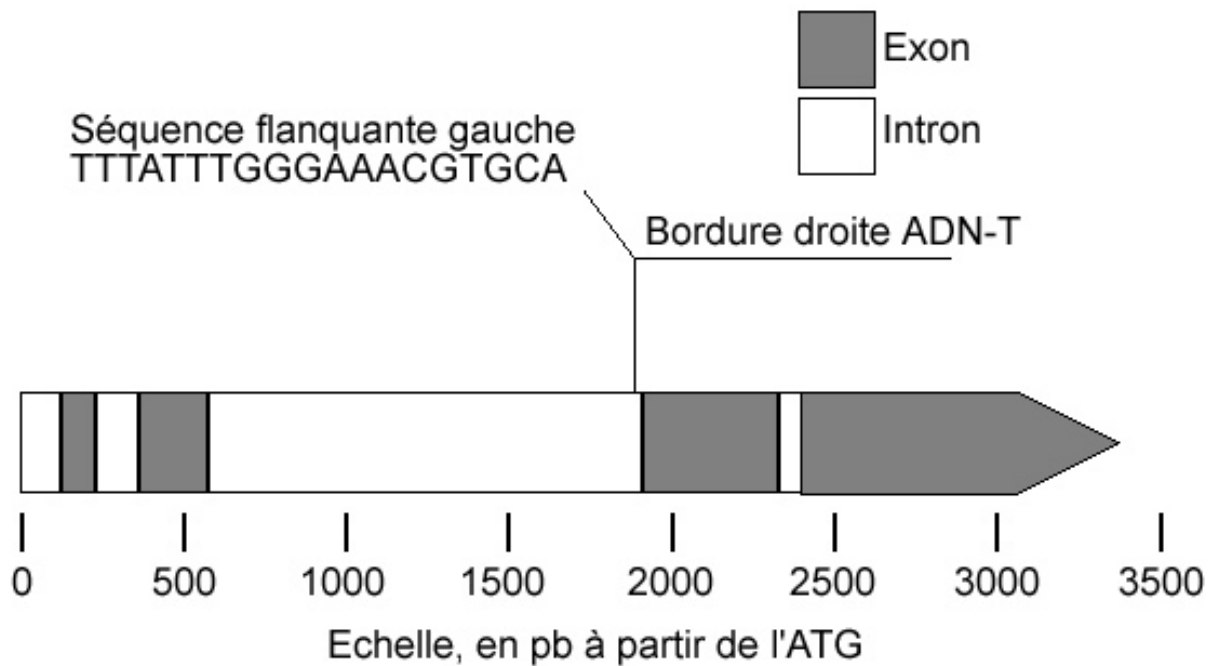


Figure 5.2 : Site d'insertion de l'ADN-T dans le gène *AtNRT1.2* chez le mutant *atnrt1.2::T*.



## 5 Chapitre V

### CARACTERISATION FONCTIONNELLE DES MUTANTS *ATNRT1.2 ::T* ET *ATNRT1.5 ::T*

#### 5.1 Introduction

Les approches présentées dans ce chapitre sont complémentaires de celles présentées dans le chapitre précédent. L'objectif du travail est ici de caractériser la fonction d'*AtNRT1.2* et *AtNRT1.5* (*Atlg32450*) chez des mutants d'insertion ADN-T de ces gènes.

En ce qui concerne *AtNRT1.5*, ce travail est, à notre connaissance, la première tentative destinée à identifier sa fonction. Les études d'expression décrites dans le chapitre précédent suggèrent qu'*ATNRT1.5* est exprimé dans la racine et plus particulièrement dans les tissus de la stèle, ce qui amène l'hypothèse d'un rôle dans la translocation de  $\text{NO}_3^-$  des racines vers les parties aériennes. La caractérisation fonctionnelle de ce gène est réalisée dans le cadre d'une collaboration avec le groupe du P<sup>F</sup> Y.F.Tsay (Academia Sinica, Tapei, Formose). Par expression hétérologue dans l'ovocyte de Xénope, ce groupe a montré qu'*AtNRT1.5* est un transporteur de  $\text{NO}_3^-$  qui permet l'entrée de  $\text{NO}_3^-$  dans la cellule (P<sup>F</sup> Y.F. Tsay, communication personnelle). Ce groupe nous a fourni un mutant porteur d'un ADN-T inséré dans la partie codante du gène (insertion homozygote). Des expériences de Northern blot (données non montrées) et de RT-PCR réalisées sur des plantes sauvages (écotype Columbia) et mutantes cultivées en hydroponie au laboratoire ont confirmé l'absence du transcrit *AtNRT1.5* chez le mutant *atnrt1.5 ::T* (Figure 5.1).

Les éléments de caractérisation fonctionnelle obtenus pour *AtNRT1.2*, aussi bien en système hétérologue (ovocyte de Xénope) qu'*in planta* (lignées anti-sens), indiquent qu'il s'agit d'un transporteur de  $\text{NO}_3^-$  à faible affinité (Huang *et al.*, 1999). Dans la mesure où l'accumulation des transcrits *AtNRT1.2* ne nécessite pas l'apport préalable de  $\text{NO}_3^-$  aux plantes (Huang *et al.*, 1999, Okamoto *et al.*, 2003), l'expression de ce gène est dite « constitutive », par opposition aux gènes de transporteurs inductibles par  $\text{NO}_3^-$  lui-même (exemples d'*AtNRT1.1* et *AtNRT2.1*). Cette caractéristique est confirmée par notre étude

puisque que la carence stimule l'expression du gène et que la ré-alimentation en  $\text{NO}_3^-$  à la suite d'une période de privation de N réduit le niveau d'accumulation des transcrits *AtNRT1.2* dans les racines. Ces considérations justifient un intérêt particulier pour *AtNRT1.2*, car chez de nombreuses espèces, l'activité du système de prélèvement racinaire de  $\text{NO}_3^-$  à faible affinité (LATS) semble de la même manière être peu ou pas inductible par  $\text{NO}_3^-$  (Crawford et Glass, 1998). L'hypothèse qu'*AtNRT1.2* constitue une composante importante de ce LATS est de plus très fortement suggérée par l'observation qu'en l'absence d'induction préalable par  $\text{NO}_3^-$ , plusieurs lignées anti-sens *AtNRT1.2* présentent une activité d'absorption de  $\text{NO}_3^-$  à faible affinité fortement diminuée par rapport au sauvage (de 44 à 73%), alors que l'activité à forte affinité n'est pas altérée (Huang *et al.*, 1999). Cependant, cette déficience du LATS chez les lignées anti-sens *AtNRT1.2* est nettement moins prononcée (10% seulement) à l'issue d'une longue période (14 j) d'alimentation avec une concentration élevée (25 mM) de  $\text{NO}_3^-$  (Huang *et al.*, 1999), suggérant que d'autres transporteurs à faible affinité, inductibles par  $\text{NO}_3^-$ , sont capables de compenser une activité réduite d'*AtNRT1.2*. Plusieurs éléments nous ont amené à poursuivre le travail de caractérisation de la fonction *in planta* d'*AtNRT1.2*. Premièrement, seules les vitesses de prélèvement net sur solutions à forte concentration de  $\text{NO}_3^-$  (5 à 25 mM) ont été mesurées. D'une part, ceci ne permet pas de savoir si les modifications observées sont dues à l'influx et/ou à l'efflux unidirectionnels. D'autre part, ces vitesses ne caractérisent pas spécifiquement le fonctionnement du système d'absorption à faible affinité, dans la mesure où elles résultent de l'activité cumulée du HATS et du LATS. Deuxièmement, l'inhibition spécifique de l'accumulation des ARNm *AtNRT1.2* dans les lignées anti-sens étudiées par Huang *et al.* (1999) n'a pas été démontrée, puisque l'expression des autres gènes PTR, parfois très homologues à *AtNRT1.2*, n'y a pas été caractérisée.

La régulation de l'expression d'*AtNRT1.2* par les métabolites N a été laissée de côté dans les travaux réalisés sur ce gène (Huang *et al.*, 1999, Okamoto *et al.*, 2003). Pour l'instant, seule la rétro-inhibition exercée par ces métabolites sur l'activité du HATS et sur l'expression d'*AtNRT2.1* est abondamment documentée (Crawford et Glass, 1998, Lejay *et al.*, 1999, Zhuo *et al.*, 1999, Cerezo *et al.*, 2001, Gansel *et al.*, 2001). Ainsi, la répression des systèmes de transport de  $\text{NO}_3^-$  par le statut nutritionnel en N de la plante est nettement mieux connue pour ceux à forte affinité que pour ceux à faible affinité. Il s'agit d'un paradoxe, car cette répression est active lorsque le niveau d'alimentation de la plante en  $\text{NO}_3^-$  est élevé, c'est à dire dans des conditions où le prélèvement racinaire est surtout réalisé par les systèmes à faible affinité. Un travail antérieur réalisé dans l'équipe a montré que le retrait de  $\text{NO}_3^-$  du milieu extérieur aboutit à une diminution de l'influx de  $\text{NO}_3^-$  attribuable au LATS, suggérant

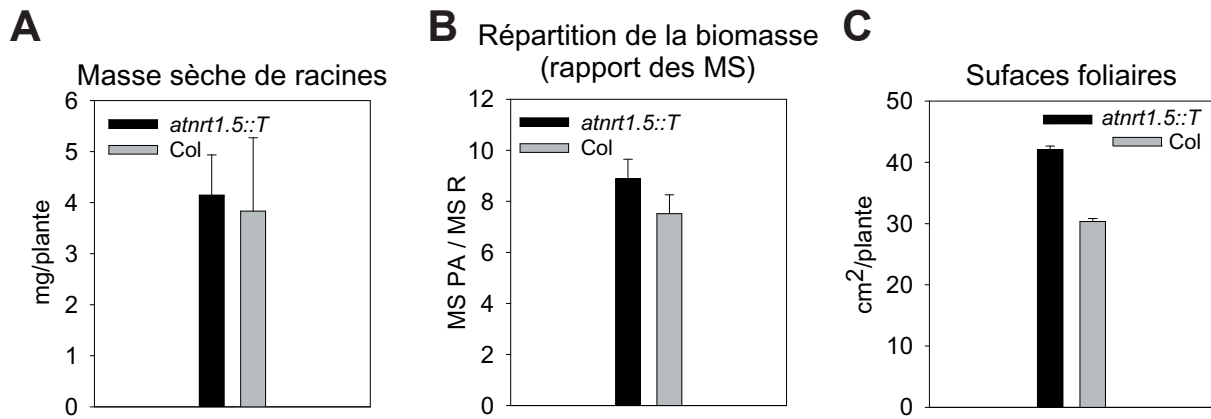


Figure 5.3 : **Répartition de la biomasse.**

Les plantes (6 semaines) ont été cultivées en hydroponie sur milieu HY 5mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . A et B, les parties aériennes ont été séparées des racines puis le tout a été séché 48h à 60°C avant pesées. Les barres verticales représentent les écart types, n = 8 par génotype. C, les surfaces foliaires ont été mesurées par analyse d'image après dissection des rosettes. Les barres verticales représentent les écart types, n=10 par génotype

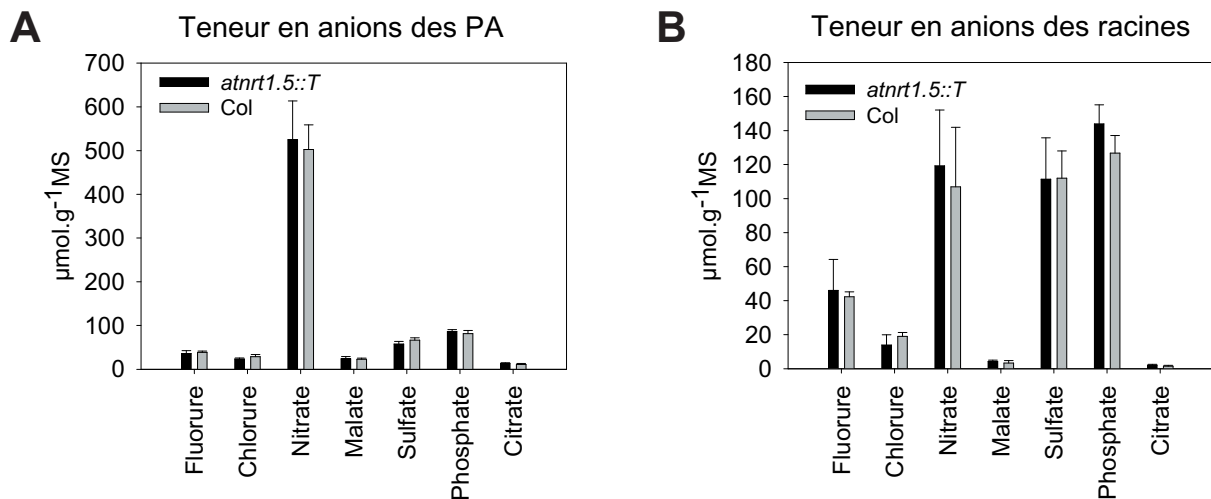


Figure 5.4 : **Accumulation des anions dans les tissus de Columbia et *atnr1.5::T*.** Les plantes (6 semaines) ont été cultivées en hydroponie sur milieu HY 5mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . n=5 par génotype, les barres verticales représentent les écart types.

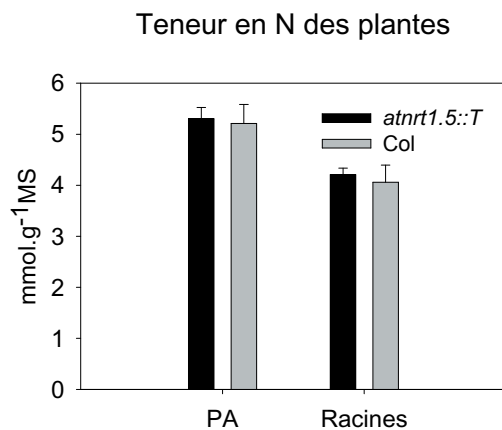


Figure 5.5 : **Teneur en N total des plantes.**

Les plantes (6 semaines) ont été cultivées en hydroponie sur milieu HY 5mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Les teneurs en N des parties aériennes (PA) et racines ont été mesurées par spectrométrie de masse à flux continu. Les barres verticales représentent les écart types, n=10 par génotype.

que ce système n'est pas réprimé par les métabolites N mais plutôt induit par  $\text{NO}_3^-$  lui-même (Lejay *et al.*, 1999). Nos résultats indiquent par contre que l'accumulation des transcrits *AtNRT1.2* est augmentée par la carence en N, et revient à son niveau initial après réalimentation par  $\text{NO}_3^-$  (voir Figure 3.7 et §4.4.1). Ceci suggère l'existence d'une composante du LATS soumise à un contrôle négatif par le statut nutritionnel de la plante en N. Pour toutes ces raisons, il nous a paru nécessaire de mener, chez un mutant KO d'*AtNRT1.2*, une étude plus détaillée des activités HATS et LATS au niveau de l'influx proprement dit. Un mutant disrupté dans le gène *AtNRT1.2* a été identifié dans la banque de lignée d'insertion de l'INRA de Versailles (Figure 5.2).

## 5.2 *atnrt1.5 ::T*

### 5.2.1 Morphologie

Le mutant *atnrt1.5 ::T* ne présente pas d'anomalie morphologique marquée par rapport au sauvage. La biomasse sèche des racines du mutant est comparable à celle du sauvage (Figure 5.3 A). Le rapport des masses sèches parties aériennes : : racines est légèrement plus élevé chez le mutant que chez le sauvage (Figure 5.3 B) indiquant que les parties aériennes du mutant sont un peu plus développées que celles du sauvage. Cet élément est confirmé par la mesure de la surface foliaire du mutant qui se révèle un peu plus importante que celle du sauvage (Figure 5.3 C).

### 5.2.2 Absorption des anions ( $\text{NO}_3^-$ , $\text{SO}_4^{2-}$ , $\text{PO}_4^{3-}$ )

Les teneurs en anions des racines et des parties aériennes des plantes sauvages et mutantes sont mesurées sur des extraits ioniques par Chromatographie HPIC. Les teneurs des anions majeurs ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ) et mineurs (fluorure, chlorure, malate, citrate) sont similaires chez les plantes sauvages et mutantes (Figure 5.4). Par ailleurs, aucune différence de teneur en N total n'est détectée (Figure 5.5).

Les vitesses d'absorption des anions minéraux majeurs sont mesurées. Les plantes sont cultivées sur un milieu HY en présence de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  5mM comme seule source de N. La mesure est réalisée en présence de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  4mM en utilisant l'ion  $^{15}\text{NO}_3^-$  comme traceur. L'abondance de l'isotope lourd dans les tissus est mesurée par spectrométrie de masse isotopique. Des temps de marquage de 5, 30 et 180 minutes sont utilisés. En temps courts (5

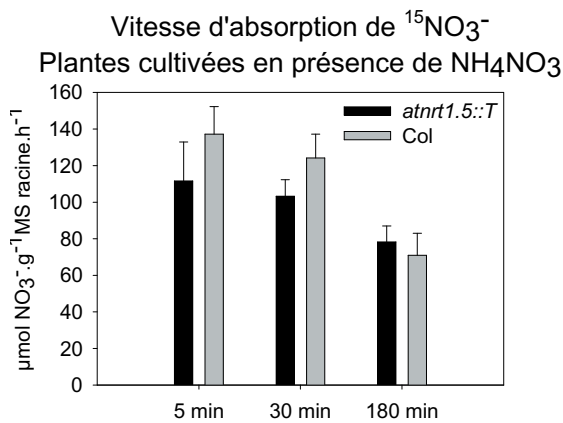


Figure 5.6 : **Absorption de  $\text{NO}_3^-$  en présence de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .** Les plantes (6 semaines) ont été cultivées en hydroponie sur milieu HY 5mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Les plantes sont incubées 5 minutes, 30 minutes et 180 minutes sur un milieu HY 4mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  dont le  $\text{NO}_3^-$  est marqué au  $^{15}\text{N}$ . Les barres verticales représentent les écart types, n=10 par génotype.

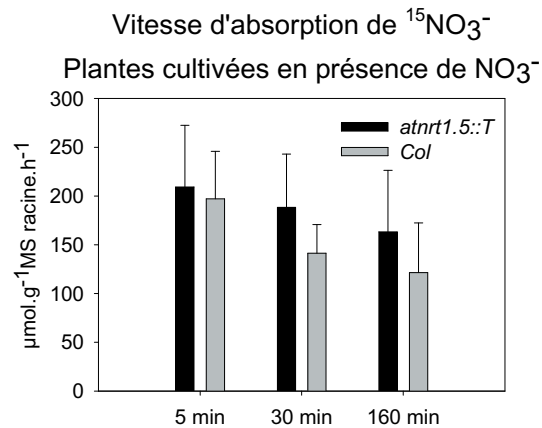


Figure 5.7 : **Absorption de  $\text{NO}_3^-$  en présence de  $\text{NO}_3^-$ .** Les plantes (6 semaines) ont été cultivées en hydroponie sur milieu HY 5mM  $\text{NO}_3^-$ . Les plantes sont incubées 5 minutes, 30 minutes et 160 minutes sur un milieu HY 4mM  $\text{NO}_3^-$  dont le  $\text{NO}_3^-$  est marqué au  $^{15}\text{N}$ . Les barres verticales représentent les écart types, n=10 par génotype.

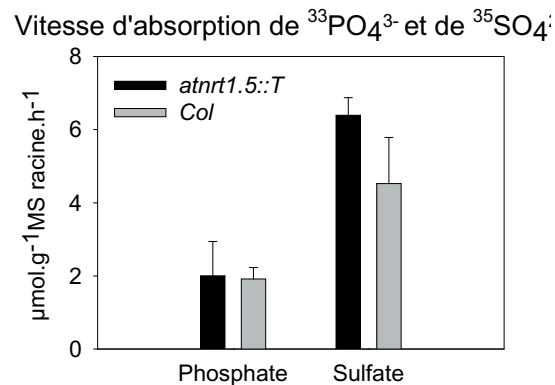


Figure 5.8 : **Absorption de  $\text{PO}_4^{2-}$  et de  $\text{SO}_4^{2-}$ .** Les plantes (6 semaines) ont été cultivées en hydroponie sur milieu HY 5mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Les plantes sont incubées 30 minutes sur milieu HY 5mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  présentant une activité spécifique de  $7,24 \times 10^{11} \text{dpm.mol}^{-1}$  de  $\text{SO}_4^{2-}$  ou  $2,21 \times 10^{11} \text{dpm.mol}^{-1}$  de  $\text{PO}_4^{2-}$ . Les barres verticales représentent les écart types, n=10 par génotype.

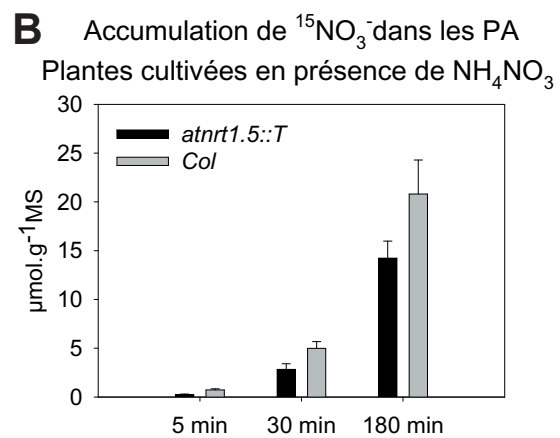
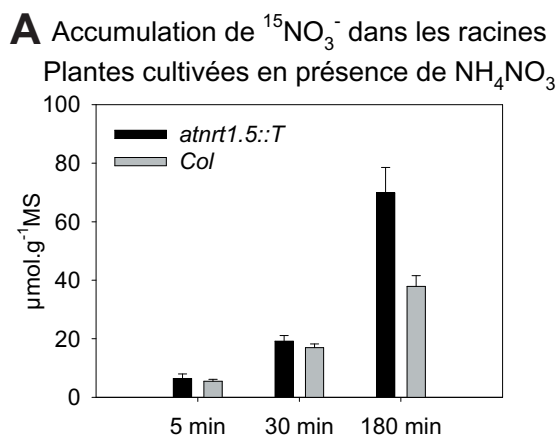


Figure 5.9 : **Accumulation de  $^{15}\text{NO}_3^-$  dans les tissus des plantes cultivées en présence de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .** Les plantes (6 semaines) ont été cultivées en hydroponie sur milieu HY 5mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Les plantes sont incubées 5 minutes, 30 minutes et 180 minutes sur un milieu HY 4mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  dont le  $\text{NO}_3^-$  est marqué au  $^{15}\text{N}$ . Les barres verticales représentent les écart types, n=10 par génotype.

minutes), le traceur transporté à l'intérieur de la cellule est dilué dans le pool intracellulaire de  $^{14}\text{NO}_3^-$  et l'efflux de  $^{15}\text{NO}_3^-$  est considéré comme négligeable. La mesure peut alors être extrapolée à un influx unidirectionnel. Pour des temps de marquage plus longs, l'efflux ne peut plus être négligé, la mesure correspond au bilan net des influx et efflux unidirectionnels de traceur. A 180 minutes, on considère qu'un régime stationnaire d'absorption est établi et que l'accumulation du traceur dans la plante correspond à une mesure d'absorption nette. Le temps 30 minutes est considéré comme intermédiaire entre la mesure d'influx (5 minutes) et la mesure de bilan net (180 minutes). Bien qu'en moyenne l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  soit très légèrement inférieure chez le mutant *atnrt1.5::T* par rapport au sauvage pour les marquages en temps court (5 et 30 minutes, Figure 5.6), cette différence n'a pas de valeur statistique (T-test, pas de différence au seuil de 5%). Elle n'est d'ailleurs plus retrouvée lorsque le temps de marquage utilisé est de 180 minutes (Figure 5.6).

L'effet de la source de N sur l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  est étudié. Les plantes sont cultivées sur un milieu HY en présence de  $\text{NO}_3^-$  5mM comme seule source de N. Les mesures d'absorption sont faites sur cette même source de N à une concentration externe 4mM en présence du traceur  $^{15}\text{NO}_3^-$ . Les résultats ne révèlent pas de différence significative de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  entre mutant et sauvage (Figure 5.7).

Ensemble, ces résultats suggèrent qu'*AtNRT1.5* n'est pas impliqué dans l'étape initiale d'absorption de  $\text{NO}_3^-$  dans la plante dans ces conditions. Afin de déterminer si l'absorption d'autres anions majeurs est perturbée chez le mutant, l'absorption de  $\text{SO}_4^{2-}$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  est mesurée en utilisant  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  et  $^{33}\text{PO}_4^{3-}$  comme traceurs. Les marquages sont fait dans le milieu de culture en présence des traceurs radioactifs ( $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ). L'abondance des isotopes radioactifs dans les tissus est mesurée en scintillation. Pour les 2 anions considérés, les absorptions mesurées chez le mutant sont équivalentes à celles du sauvage (Figure 5.8, T-test, pas de différence au seuil de 5%).

## 5.2.3 Translocation des anions

### 5.2.3.1 Translocation de $\text{NO}_3^-$

Le devenir des ions  $\text{NO}_3^-$  absorbé dans la plante a été étudié à une concentration externe de 4mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  en utilisant  $^{15}\text{NO}_3^-$  comme traceur. Les plantes sont cultivées sur un milieu HY en présence de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  5mM comme seule source de N. Comme précédemment, des temps de marquage de 5, 30 et 180 minutes sont utilisés. La teneur de  $^{15}\text{N}$

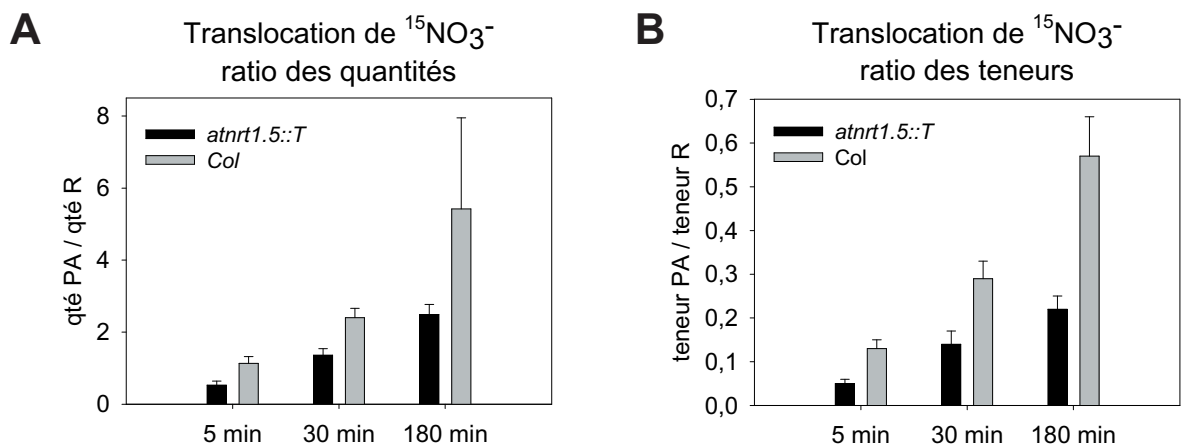


Figure 5.10 : **Translocation de  $^{15}\text{NO}_3^-$  vers les parties aériennes dans les plantes cultivées en présence de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .** Les plantes (6 semaines) ont été cultivées en hydroponie sur milieu HY 5mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Les plantes sont incubées 5 minutes, 30 minutes et 180 minutes sur un milieu HY 4mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  dont le  $\text{NO}_3^-$  est marqué au  $^{15}\text{N}$ . Les barres verticales représentent les écart types, n=10 par génotype.

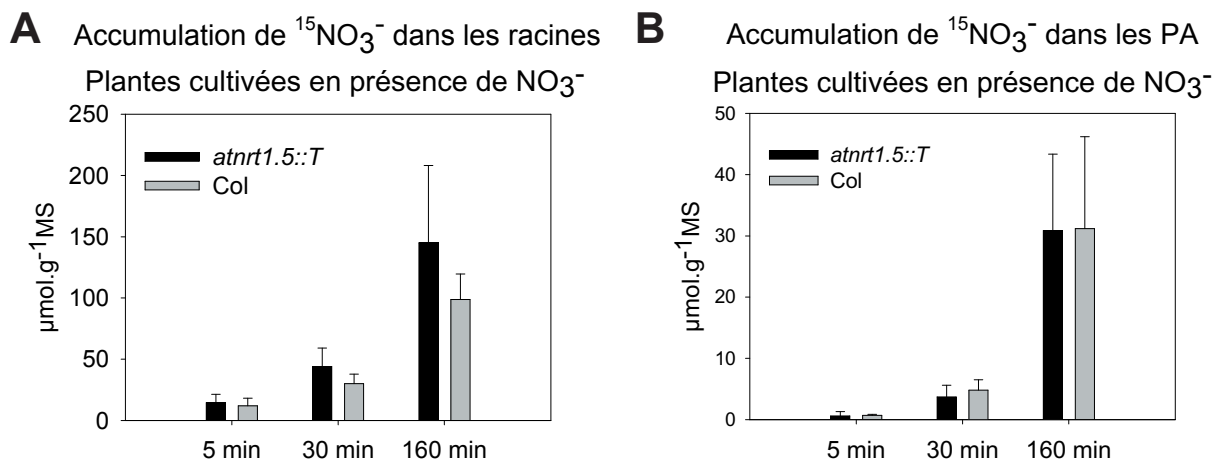


Figure 5.11 : **Accumulation de  $^{15}\text{NO}_3^-$  dans les tissus des plantes cultivées en présence de  $\text{NO}_3^-$ .** Les plantes (6 semaines) ont été cultivées en hydroponie sur milieu HY 5mM  $\text{NO}_3^-$ . Les plantes sont incubées 5 minutes, 30 minutes et 160 minutes sur un milieu HY 4mM  $\text{NO}_3^-$  dont le  $\text{NO}_3^-$  est marqué au  $^{15}\text{N}$ . Les barres verticales représentent les écart types, n=10 par génotype.

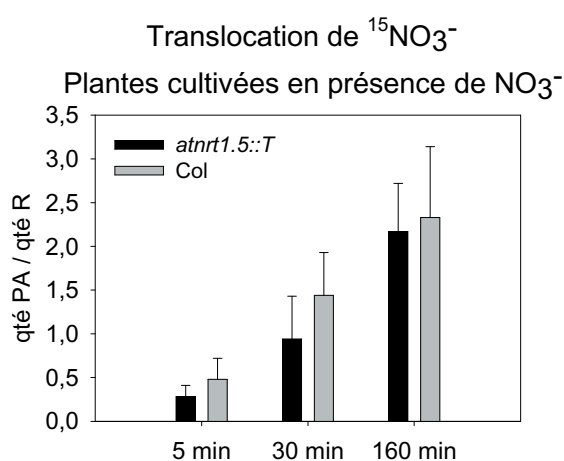
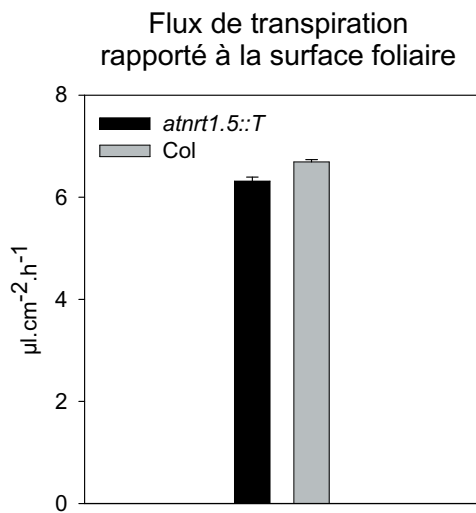
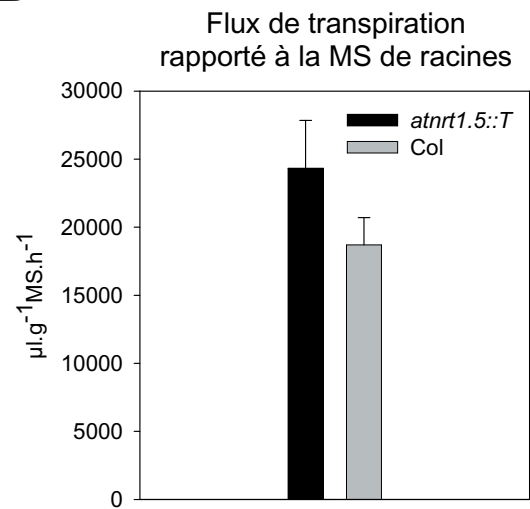


Figure 5.12 : **Translocation de  $^{15}\text{NO}_3^-$  vers les parties aériennes des plantes cultivées en présence de  $\text{NO}_3^-$ .** Les plantes (6 semaines) ont été cultivées en hydroponie sur milieu HY 5mM  $\text{NO}_3^-$ . Les plantes sont incubées sur un milieu HY 4mM  $\text{NO}_3^-$  dont le  $\text{NO}_3^-$  est marqué au  $^{15}\text{N}$ . Les barres verticales représentent les écart types, n=10 par génotype.

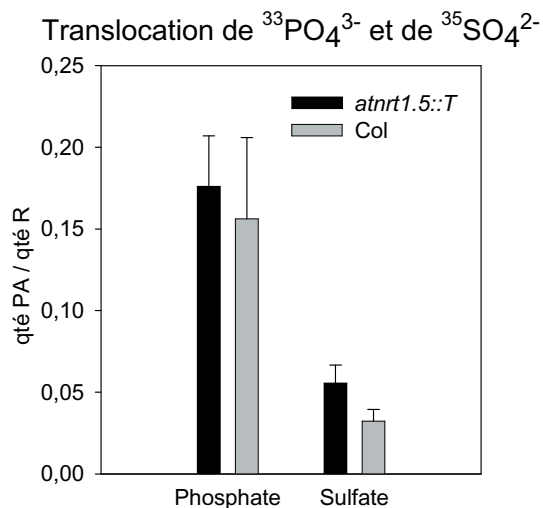
augmente en fonction du temps de marquage dans les différents organes (Figure 5.9). Sauvage et mutant présentent des cinétiques d'accumulation différentes de l'isotope lourd (Figure 5.9). Dans les racines, l'accumulation du  $^{15}\text{N}$  est similaire chez les deux génotypes pour les marquages de 5 et 30 minutes, mais est plus forte chez le mutant lorsque le temps de marquage est de 180 minutes (Figure 5.9 A). A l'inverse, l'accumulation du  $^{15}\text{N}$  dans les parties aériennes est systématiquement réduite chez le mutant comparé au sauvage quelque soit le temps de marquage (Figure 5.9 B). Ces différences d'accumulation du traceur dans les organes aériens suggèrent que l'exportation du  $\text{NO}_3^-$  vers les parties aériennes est affectée par la disruption du gène *AtNRT1.5*. En effet, pour une absorption nette de  $\text{NO}_3^-$  équivalente, le blocage de cette étape doit théoriquement s'accompagner d'une augmentation de l'accumulation de  $^{15}\text{N}$  dans les racines et d'une diminution de celui-ci dans les parties aériennes. La translocation du  $^{15}\text{N}$  des racines vers les parties aériennes est estimée en rapportant par plante la quantité de  $^{15}\text{N}$  des parties aériennes à celles des racines chez les deux génotypes (Figure 5.10 A). Le ratio est diminué chez le mutant par rapport au sauvage, quelque soit le temps de marquage considéré. Cette effet de la mutation sur la translocation n'est pas expliquée par la légère disparité de taille des organes aériens du sauvage et du mutant car la différence entre génotypes est maintenue si l'on rapporte la teneur de  $^{15}\text{N}$  des parties aériennes à celle des racines (Figure 5.10).

L'effet de la source de N est étudiée. Les plantes sont cultivées en hydroponie en présence de  $\text{NO}_3^-$  5mM comme source de N (au lieu de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  5mM dans les conditions précédentes). La translocation de  $^{15}\text{N}$  est mesurée à une concentration externe de 4mM de  $\text{NO}_3^-$  en utilisant  $^{15}\text{NO}_3^-$  comme traceur. Dans ces conditions, les plantes sauvages ont des niveaux d'accumulation de  $^{15}\text{N}$  plus importants que celles cultivées sur  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (Figure 5.9 et 5.11). Cette augmentation de la teneur en  $^{15}\text{N}$  touche préférentiellement les racines (+100%) par rapport aux parties aériennes (+30%) (Figure 5.9 et 5.11). Sur  $\text{NO}_3^-$ , le prélèvement accru du traceur n'est pas accompagné d'une augmentation proportionnelle de translocation du traceur. Le ratio de translocation (qté  $^{15}\text{N}$  parties aériennes/ qté  $^{15}\text{N}$  racines) est réduit d'un facteur 2 (Figure 5.10 5.12). Dans ces conditions également, le sauvage et le mutant ont des cinétiques d'accumulation de  $^{15}\text{N}$  dans les racines et les parties aériennes différentes (Figure 5.11). Une réduction de la translocation  $^{15}\text{N}$  des racines vers les parties aériennes peut être mise en évidence chez le mutant pour les temps de marquage courts (Figure 5.12). Néanmoins le phénotype observé est nettement moins intense que dans le cas



**A****B****Figure 5.13 : Flux de transpiration.**

Pertes en eau de plantes (6 semaines) cultivées en hydroponie sur milieu HY 5mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  mesurées pendant 7h. n=10 par génotype, les barres verticales représentent les écart types.

**Figure 5.14 : Translocation de  $\text{PO}_4^{2-}$  et de  $\text{SO}_4^{2-}$ .**

Les plantes (6 semaines) ont été cultivées en hydroponie sur milieu HY 5mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Les plantes sont incubées 30 minutes sur milieu HY 5mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3^-$  présentant une activité spécifique de  $7,24 \times 10^{11} \text{dpm}\cdot\text{mol}^{-1}$  de  $\text{SO}_4^{2-}$  ou  $2,21 \times 10^{11} \text{dpm}\cdot\text{mol}^{-1}$  de  $\text{PO}_4^{3-}$ . n=10 par génotype, les barres verticales représentent les écart types.

des plantes cultivées sur  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Ce résultat suggère qu'*AtNRT1.5* revêt une importance variable suivant la source de N.

### 5.2.3.2 Transpiration

L'exportation des ions des racines vers les parties aériennes est le résultat non seulement de l'étape de sécrétion des ions qui ont été absorbés au niveau de la zone corticale de la racine vers la sève du xylème mais aussi de la montée de la sève vers les parties aériennes. La montée de la sève dans nos conditions d'étude (70% HR, lumière) est, pour l'essentiel, lié au flux d'eau transpiré par la plante. Afin de distinguer quel aspect de la translocation est affecté chez le mutant, des mesures de transpiration sont effectuées chez des plantes cultivées dans les conditions où la translocation de  $^{15}\text{N}$  est la plus affectée (plantes de 6 semaines cultivées en hydroponie en présence de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  5mM comme seule source de N). Les flux de transpiration sont rapportés à la surface foliaire ou à la masse de racines (Figure 5.13). Aucune différence significative entre plantes sauvages et mutantes n'est observée, la tendance étant plutôt une transpiration plus forte du mutant que du sauvage (tendance non significative, T-Test au seuil de 5%, Figure 5.13 B). L'effet de la mutation sur la translocation de  $\text{NO}_3^-$  des racines vers les parties aériennes ne peut dans ces conditions être attribué à un défaut de transpiration ou de flux de sève chez le mutant. Il est donc probable que la fonction affectée chez les plantes mutantes est la sécrétion des ions dans le xylème.

### 5.2.3.3 Translocation de $\text{PO}_4^{3-}$ et $\text{SO}_4^{2-}$

La spécificité ionique du phénotype du mutant *atnrt1.5::T* est abordée en analysant la translocation de  $\text{PO}_4^{3-}$  et  $\text{SO}_4^{2-}$  vers les parties aériennes chez le mutant et le sauvage. L'acquisition et la répartition de  $\text{SO}_4^{2-}$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  entre racines et parties aériennes sont mesurées en utilisant  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  et  $^{33}\text{PO}_4^{3-}$  comme traceurs, avec des temps de marquage de 30 minutes. L'abondance des isotopes radioactifs dans les tissus est mesurée en scintillation. La translocation des ions des racines vers les parties aériennes est estimée en rapportant par plante la quantité de traceur des parties aériennes à celles des racines chez les deux géotypes (Figure 5.14). Dans les deux cas la translocation du traceur n'est pas affectée ou légèrement plus importante chez le mutant en comparaison du sauvage. Le phénotype de défaut de translocation observé chez le mutant est donc spécifique de  $\text{NO}_3^-$  et ne peut être attribué à un effet général affectant l'exportation des ions vers les parties aériennes.

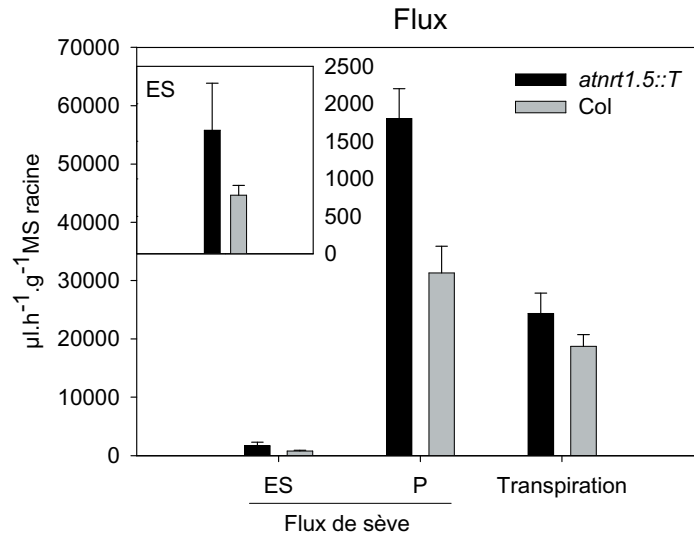


Figure 5.15 : Comparaison du flux de transpiration des plantes intactes et des flux d'exsudation de sève des racines excisées.

Les plantes (6 semaines) ont été cultivées en hydroponie sur milieu HY 5mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Pour ES (exsudation spontanée) et P (pressurisation), flux de sève mesuré à pression atmosphérique ou sous pression (3,5Atm) sur racines excisées. n=4 pour ES et n=10 pour P, les barres verticales représentent les écart types. Pour transpiration, pertes en eau ramenées à la MS de racines mesurées pendant 7h. n=10 par génotype, les barres verticales représentent les écart types.

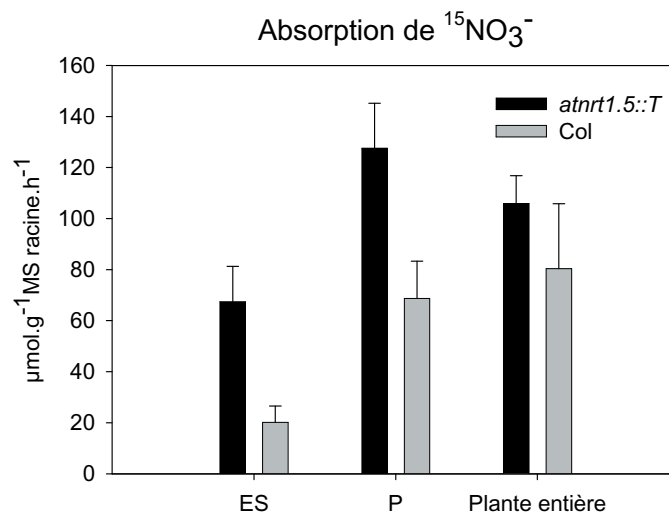


Figure 5.16 : Comparaison des vitesses d'absorption de ¹⁵NO<sub>3</sub><sup>-</sup> des plantes intactes et des racines excisées.

Les plantes (6 semaines) ont été cultivées en hydroponie sur milieu HY 5mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Pour ES et P, quantité de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> marqué au ¹⁵N rapporté à la MS de racines et au temps prélevée par les racines excisées au cours des expériences de récolte de sève. n=4 pour ES et n=10 pour P, les barres verticales représentent les écart types. Pour plante entière, des plantes ont été incubées sur milieu HY 5mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> dont le NO<sub>3</sub><sup>-</sup> est marqué au ¹⁵N. n=10 par génotype, les barres verticales représentent les écart types.

#### 5.2.3.4 Sécrétion de $\text{NO}_3^-$ dans la sève

Les expériences de marquage sur plante entière suggèrent qu'AtNRT1.5 contribue à la sécrétion de  $\text{NO}_3^-$  dans la sève. Des expériences sont réalisées afin de caractériser cette fonction chez le mutant. Les collectes de sève du xylème sont faites sur des racines excisées. Les plantes sont cultivées sur milieu HY en présence de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  5mM comme seule source de N. Les parties aériennes des plantes sont séparées des racines au niveau de la courte tige située à la base de la rosette. Les racines excisées sont maintenues dans le milieu à une concentration externe de 4mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  en utilisant  $^{15}\text{NO}_3^-$  comme traceur. La quantité de  $^{15}\text{NO}_3^-$  est mesurée dans la sève du xylème et dans les racines des deux génotypes. A pression atmosphérique, en absence du « moteur » lié à la transpiration, le système racinaire exsude de la sève du xylème au niveau de la blessure (exsudation spontanée, ES) avec un débit nettement inférieur au flux de transpiration (Figure 5.15 ES et transpiration). Cette faiblesse du flux de sève est corrélée avec une absorption nette de traceur réduite chez le sauvage (Figure 5.15 ES et plante entière). En plaçant les racines sous pression, on peut ajuster le débit d'exsudation de la sève à une valeur proche du flux de transpiration (exsudation sous pression, Figure 5.15 P et transpiration). Dans ces conditions, l'absorption nette de  $\text{NO}_3^-$  par les racines excisées des plantes sauvages atteint une valeur du même ordre de grandeur que celle d'une plante entière (Figure 5.15 P et plante entière).

De manière inattendue, dans les deux dispositifs expérimentaux (exsudation sous pression ou spontanée), le débit de sève est plus élevé chez le mutant que chez le sauvage (Figure 5.15). Dans les deux cas le flux d'eau traversant la racine est près de deux fois plus élevé chez le mutant que chez le sauvage. L'augmentation du flux traversant la racine chez le mutant s'accompagne aussi d'un accroissement de la vitesse d'absorption de  $\text{NO}_3^-$  (Figure 5.16). En conséquence, la quantité de  $^{15}\text{NO}_3^-$  accumulé dans la racine ou excrété dans la sève est plus élevée chez le mutant que chez le sauvage dans les 2 dispositifs (Figure 5.17). Alors que (i) la concentration de  $\text{NO}_3^-$  dans la sève (Figure 5.18) est du même ordre de grandeur chez les deux génotypes, et (ii) la part du  $^{15}\text{N}$  absorbé excrété dans la sève est équivalente chez les 2 génotypes (Figure 5.19). Le mutant excrète plus de 50% de plus de  $^{15}\text{NO}_3^-$  vers la sève que le sauvage en exsudation forcée ou spontanée (Figure 5.17). Cette différence d'absorption nette de  $\text{NO}_3^-$  entre le sauvage et le mutant est donc strictement corrélée au volume de sève exsudé.

On ne retrouve pas sur racines excisées le déficit de translocation mis en évidence chez le mutant en plante entière. Un résultat particulièrement inattendu est la stimulation des flux

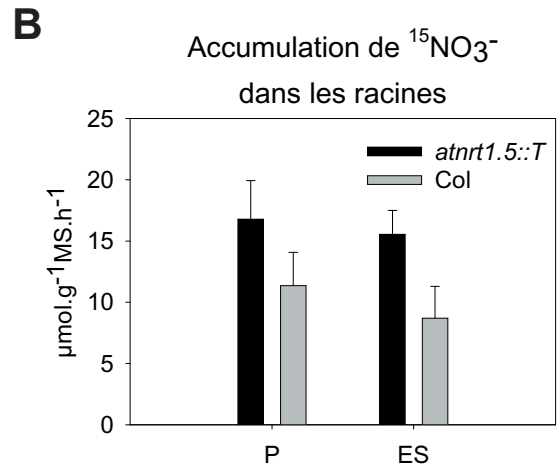
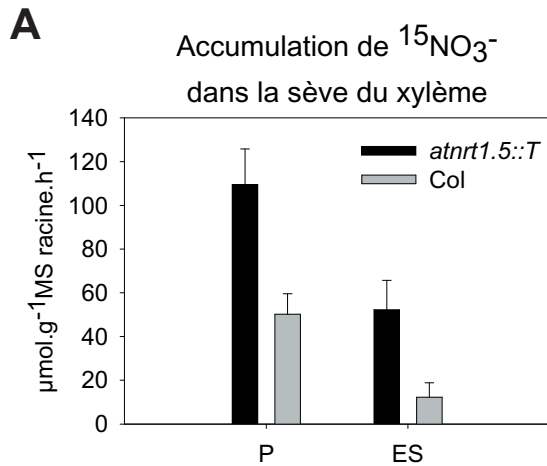


Figure 5.17 : **Accumulation de  $^{15}\text{NO}_3^-$  dans les tissus de la racine et la sève.** Les plantes (6 semaines) ont été cultivées en hydroponie sur milieu HY 5mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Quantité de  $\text{NO}_3^-$  marqué au  $^{15}\text{N}$  rapporté à la biomasse sèche de racines et au temps dosé dans la sève (A) et les racines (B) après récolte de sève.  $n = 10$  par génotype pour P et 4 par génotype pour ES, les barres verticales représentent les écart types.

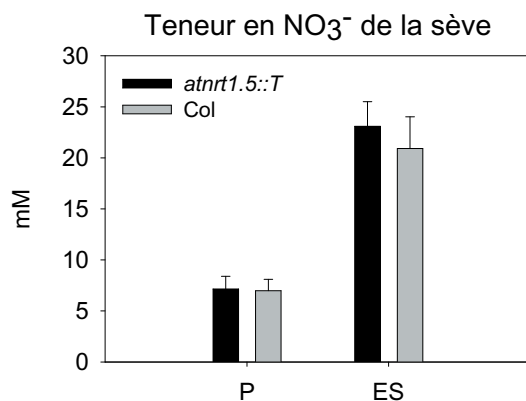


Figure 5.18 : **Concentration de  $\text{NO}_3^-$  dans les exsudats xylémiques.** Teneurs en  $\text{NO}_3^-$  dosées par colorimétrie. Les plantes (6 semaines) ont été cultivées en hydroponie sur milieu HY 5mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .  $n = 10$  par génotype pour P et  $n = 4$  par génotype pour ES, les barres verticales représentent les écart types.

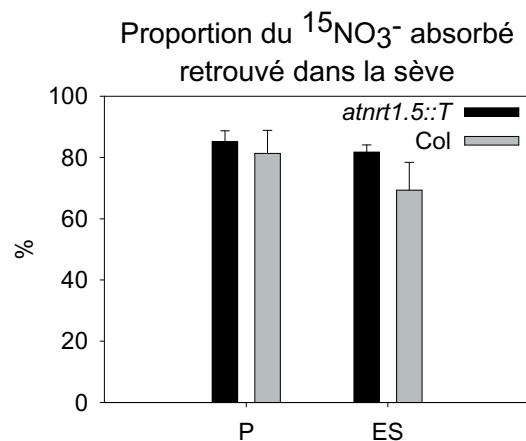


Figure 5.19 : **Proportion du  $^{15}\text{NO}_3^-$  absorbé retrouvé dans les exsudats xylémiques.** Les plantes (6 semaines) ont été cultivées en hydroponie sur milieu HY 5mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .  $n = 10$  par génotype pour P et  $n = 4$  par génotype pour ES, les barres verticales représentent les écart types

de sève exsudée et de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  des racines excisées du mutant par rapport au sauvage (Figure 5.15). Apparemment, les dispositifs expérimentaux de type « racines excisées » qui donnent accès à la composition des sèves ne permettent pas de reproduire les conditions de « plante entière » pour lesquelles nous avons mis en évidence un déficit de translocation de  $\text{NO}_3^-$  chez le mutant.

#### **5.2.4 Analyse par membrane basse densité du transcriptome d'*atnrt1.5 ::T***

Le transport de  $\text{NO}_3^-$  dans la plante est un phénomène complexe qui résulte du fonctionnement de multiples transporteurs dont les activités peuvent être au moins partiellement redondantes. L'inactivation d'*AtNRT1.5* peut entraîner des changements d'expression d'autres gènes. Cela peut traduire une réponse compensatoire plus ou moins partielle liée à la fonction du gène muté (exemple de la compensation par *AtNRT2.1* de l'extinction de *AtNRT1.1*), ou encore une conséquence indirecte de la perturbation fonctionnelle engendrée par la mutation.

L'impact de la mutation du gène *AtNRT1.5* sur le transcriptome des racines a été étudié grâce à la membrane thématique basse densité décrite au chapitre 3. Les 2 génotypes sont cultivés en hydroponie en présence de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  5mM comme source de N. Ces conditions sont différentes de celles décrites dans le chapitre 3. La source de N fournie aux plantes témoins est beaucoup plus importante ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  5mM vs  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ou  $\text{NO}_3^-$  1mM) ce qui a pour conséquence que le prélèvement de  $\text{NO}_3^-$  passe majoritairement par les systèmes de transport à basse affinité. Dans ces conditions, la répression exercée par les métabolites azotés est plus forte que dans les expériences précédentes. Les racines du mutant *atnrt1.5 ::T* ont été comparées à celles du sauvage. Les méthodes d'analyse utilisées sont celles décrites au chapitre 3.

Une attention particulière a été portée au seuil de détection ainsi qu'à la signification statistique du différentiel mesuré et 2 critères supplémentaires ont été utilisés pour trier les données de cette expérience :

(1) Ne sont pris en compte que les signaux pour lesquels le signal mesuré retranché de son écart type est supérieur au signal des témoins négatifs additionné de son écart type avant correction des données. Dans le cas où cette condition n'est pas remplie, la valeur du  $S_n$  est reportée à titre indicatif en prenant la précaution de la distinguer par une typographie différente (petits caractères italiques)

	Gène	Col		<i>atnrt1.5 ::T</i>		Ratio <i>atnrt1.5 ::T/Col</i>
		Moy	ET	Moy	ET	
Sous- exprimés	<i>AtNRT1.5</i>	0,24	0,08	ND		
	<i>At3g25280</i>	0,26	0,16	ND		
	<i>At3g45650</i>	0,84	0,14	ND		
	<i>At1g72140</i>	0,78	0,3	ND		
	<i>At2g40460</i>	0,37	0,05	0,15	0,09	0,4
Sur- exprimés	<i>At1g22540</i>	0,3	0,08	0,75	0,3	2,5
	<i>AtNIA1</i>	0,19	0,06	0,5	0,18	2,6
	<i>At1g22570</i>	0,71	0,28	2,04	0,51	2,9
	<i>AtAMT12</i>	0,2	0,08	0,59	0,18	3,0
	<i>AtAMT2</i>	0,34	0,11	1,07	0,18	3,1
	<i>At1g69860</i>	0,77	0,21	2,73	0,88	3,5
	<i>AtNRT1.3</i>	0,71	0,2	2,58	0,63	3,6
	<i>At1g59740</i>	0,74	0,1	2,74	0,88	3,7
	<i>At1g62200</i>	0,05	0,02	0,23	0,13	4,6
	<i>At4g21680</i>	0,34	0,18	1,75	0,37	5,1
	<i>AtNRT1.1</i>	1,23	0,12	6,59	1,8	5,4
	<i>AtAMT1.1</i>	0,11	0,03	1,89	0,47	17,2
	<i>AtPTR2B</i>	ND		0,95	0,11	
	<i>AtPTR1</i>	ND		0,23	0,04	
	<i>At5g62680</i>	ND		1,12	0,36	
<i>AtNRT1.2</i>	ND		1,56	0,47		

Tableau 5.1 : **Gènes différentiellement exprimés chez le mutant *atnrt1.5 ::T*.**

Données d'hybridation normalisées avec le transcrit synthétique. Les plantes (6 semaines) ont été cultivées en hydroponie sur milieu HY 5mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Les moyennes sont calculées à partir d'une hybridation réalisée sur un lot de 3 membranes. Moy : moyenne. ET : écart type. ND : non détecté.

(2) Nous avons considéré comme correspondant à des gènes différentiellement exprimés les GST pour lesquelles le ratio mutant/sauvage est supérieur à 2 ou inférieur à 0,5.

Deux groupes de gènes pour lesquels les ratios mutant/sauvage montrent une expression différentielle ont été définis (Tableau 5.1).

#### *Les gènes « sous exprimés »*

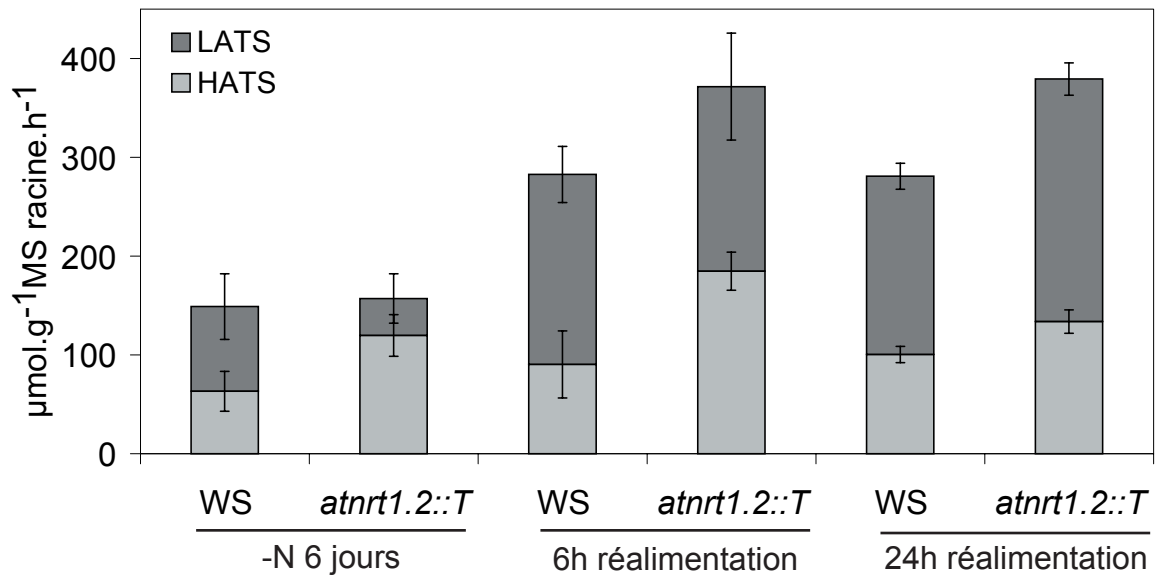
Outre *AtNRT1.5* qui est disrupté chez le mutant, trois autres gènes qui sont exprimés chez le sauvage ne sont plus détectés dans les racines du mutant *atnrt1.5 ::T* (*At3g25280*, *At3g45650*, et *At1g72140*). Par ailleurs le gène *At2g40460* est réprimé d'un facteur 2,5 dans les racines du mutant.

#### *Les gènes « sur exprimés »*

Quatre gènes sont détectés dans les racines du mutant alors qu'aucun signal spécifique n'est observé chez le sauvage. Parmi eux, se trouvent les 2 transporteurs de peptide *AtPTR1* et *AtPTR2B* et le transporteur de  $\text{NO}_3^-$  *AtNRT1.2*. Treize autres sont préférentiellement exprimés chez le mutant et présentent un ratio supérieur à 2. Parmi eux 3 des 5 gènes codant des transporteurs de  $\text{NH}_4^+$  présents sur la membrane (*AtAMT1.1*, *AtAMT1.2*, *AtAMT2*). Le profil le plus extrême est celui d'*AtAMT1.1* (ratio égal à 17,6). On trouve également parmi ces gènes *AtNIA1* qui code l'isoforme mineure de l'apoprotéine de la NR (ratio égal à 2,6) et le gène *AtNRT1.1* (ratio égal à 5,4).

Ces résultats sont préliminaires car pour l'instant un seul lot de plante a été analysé. Ils devront être confirmés sur d'autres répétitions biologiques. La tendance semble que la mutation du gène *AtNRT1.5* a un effet important sur les plusieurs gènes des familles *PTR*, *AMT* et *NIA* dont les membres sont potentiellement impliqués dans le transport ou l'assimilation de N. C'est en particulier le cas pour le transporteur de  $\text{NH}_4^+$  *AtAMT1.1* dont l'expression est la plus fortement stimulée dans l'expérience. C'est aussi le cas, mais dans une moindre mesure, pour d'autres transporteurs de  $\text{NH}_4^+$ , de peptide ou de  $\text{NO}_3^-$ . L'hypothèse d'un effet pleiotrope de la disruption d'*AtNRT1.5* sur l'activité d'autres gènes et d'autres fonctions que celle directement exercé par *AtNRT1.5* mérite d'être examinée plus en détail. On ne peut pas exclure que les perturbations fonctionnelles du mutant *atnrt1.5 ::T* soit le résultat de la modification de l'expression de plusieurs gènes et non du seul gène *AtNRT1.5* chez le mutant *atnrt1.5 ::T*.



**A**Induction par le  $\text{NO}_3^-$ **B**

## Carence

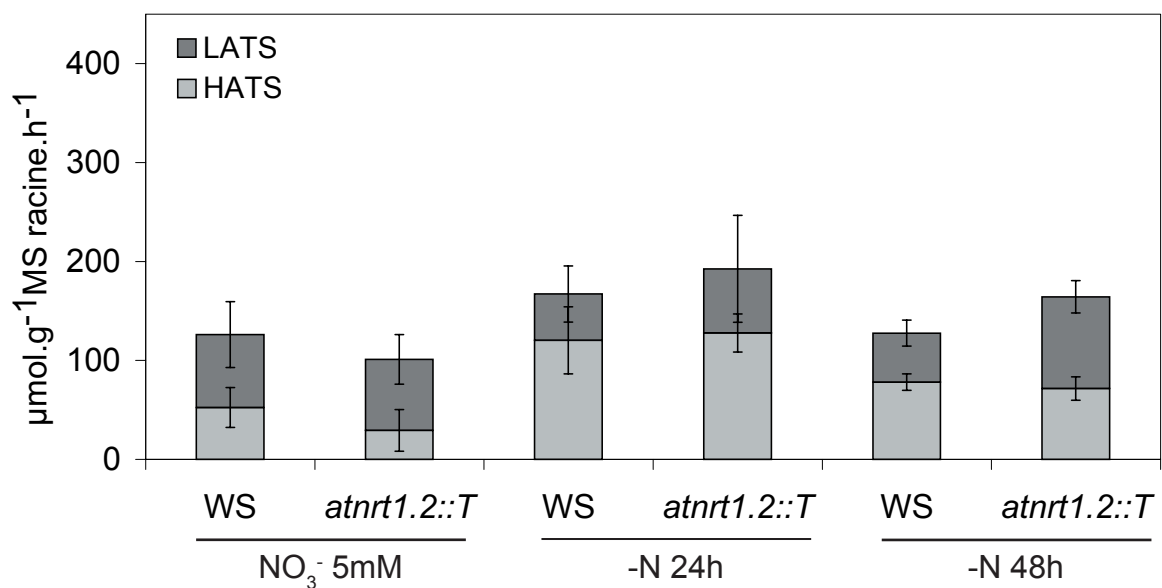


Figure 5.20 : Influx de  $^{15}\text{NO}_3^-$  par les systèmes HATS et LATS chez le sauvage (WS) et le mutant (*atnrt1.2::T*).

Expériences de prélèvement de  $\text{NO}_3^-$  marqué au  $^{15}\text{N}$  réalisées sur des plantes (6 semaines) cultivées en hydroponie sur milieu HY 5mM  $\text{NO}_3^-$  puis soumises à divers traitements de nutrition azotée.  $n=12$  par génotype. Les barres verticales représentent les écart types. HATS indique l'influx mesuré à une concentration externe de 0,2mM. LATS indique l'influx mesuré à une concentration externe de 5mM de retranché de l'influx mesuré à 0,2mM.

### 5.3 Caractérisation des activités HATS et LATS de $\text{NO}_3^-$ chez le mutant *atnrt1.2 :: T*

L'implication éventuelle d'*AtNRT1.2* dans l'activité du LATS a été étudiée dans deux situations physiologiques différentes: (i) avant et après induction par  $\text{NO}_3^-$ , et (ii) en réponse à une privation de N. Dans les deux cas, l'activité des systèmes HATS et LATS a été déterminée chez le sauvage (WS) et le mutant KO d'*AtNRT1.2* (*atnrt1.2 :: T*) grâce à des mesures d'influx unidirectionnels de  $^{15}\text{NO}_3^-$ , réalisées à 0,2 ou 5mM de concentration externe. La mesure à 0,2mM fournit une mesure du  $V_{\max}$  du HATS. Celle à 5mM correspond à l'activité cumulée des HATS et LATS. L'influx résultant de l'activité spécifique du LATS est donc calculé par soustraction de la valeur mesurée à 0,2 mM de celle mesurée à 5mM.

Dans les plantes où l'induction des systèmes d'absorption par  $\text{NO}_3^-$  a été supprimée (plantes préalablement transférées pendant 6 jours sur un milieu dépourvu de N), l'activité du LATS est fortement diminuée chez le mutant par rapport au sauvage (-60%, Figure 5.20 A). Ceci est compensé par une activité accrue du HATS (+80%), qui abouti à des valeurs d'influx mesurées à 5mM approximativement égales entre les 2 génotypes. L'ajout de  $\text{NO}_3^-$  10mM dans la solution nutritive abouti, après 6h et 24 h, à une stimulation générale de l'influx de  $\text{NO}_3^-$  dans les racines (Figure 5.20 A). Les deux systèmes, HATS et LATS, voient leur activité augmentée. La stimulation de l'influx imputable au HATS est relativement modeste (+60% au maximum), et globalement similaire chez le mutant et le sauvage, bien qu'après 24h, l'influx dû à ce système devienne pratiquement équivalent chez les deux génotypes. L'activité du LATS est au contraire très fortement accrue après fourniture de  $\text{NO}_3^-$ , particulièrement chez le mutant (+400% et + 550% après 6 et 24 h respectivement, contre +220% et +200% chez le sauvage). Ces résultats indiquent que seule l'activité LATS mesurée dans les plantes non-induites est sensiblement diminuée chez le mutant, en accord avec l'hypothèse qu'*AtNRT1.2* est impliqué dans un LATS « constitutif » vis à vis du  $\text{NO}_3^-$  (Huang *et al.*, 1999). Ces résultats démontrent également l'existence d'une composante du LATS, inductible par  $\text{NO}_3^-$ . Cette composante est indépendante d'*AtNRT1.2*, car sa mise en place s'observe chez le mutant comme chez le sauvage. Dès 6 h après l'ajout de  $\text{NO}_3^-$ , le LATS inductible compense pleinement la déficience du LATS « constitutif » chez le mutant. L'influx attribuable aux systèmes à faible affinité devient équivalent à celui mesuré chez le sauvage. Ceci confirme donc les observations préalables de Huang *et al.* (1999), indiquant

une absence de déficit de prélèvement net de  $\text{NO}_3^-$  chez des plantes cultivées pendant 14 jours sur une solution contenant  $\text{NO}_3^-$  25 mM.

En accord avec les données présentées ci-dessus, l'influx attribuable au LATS est similaire chez les plantes mutantes et sauvages après culture pendant 6 semaines sur solution nutritive contenant  $\text{NO}_3^-$  5mM (Figure 5.20 B). Chez ces mêmes plantes, on observe une activité du HATS réduite chez le mutant par rapport au sauvage (différence cependant non significative, T-test pas de différence au seuil de 5%). Le transfert sur milieu dépourvu de source de N aboutit à une stimulation marquée de l'activité du HATS chez les deux génotypes (+220 et +300% après 24h chez le sauvage et le mutant, respectivement). A l'inverse, l'influx imputable au LATS diminue chez le sauvage comme décrit précédemment (Lejay *et al.*, 1999), alors qu'il semble rester relativement constant chez le mutant. Ainsi, la mutation d'*AtNRT1.2* n'entraîne pas la perte d'une composante du LATS stimulée par la carence en N, comme aurait pu le laisser supposer la régulation de l'expression de ce gène, telle qu'elle a été caractérisée au niveau des ARNm (voir Figure 3.7 et §4.4.1). De plus, il ne semble pas qu'une telle composante existe, puisque l'activité du LATS dans son ensemble semble plutôt diminuée que stimulée par la carence.

## 5.4 Discussion

Les travaux présentés dans ce chapitre avaient pour but de préciser la fonction des deux gènes *AtNRT1.2* et *AtNRT1.5* dans la plante. Dans les deux cas l'approche a été d'identifier l'impact de l'inactivation du gène chez des mutants ou il est interrompu par l'insertion d'un ADN-T.

Les études concernant *AtNRT1.2* ont consisté à caractériser l'activité des différentes composantes de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  chez le mutant *atnrt1.2 ::T*. Nos études confirment que l'activité du LATS chez *Arabidopsis* peut être subdivisée en deux composantes constitutive et inductible par  $\text{NO}_3^-$  (Lejay *et al.*, 1999). Cette dernière prédomine largement lorsque les plantes sont cultivées en présence de  $\text{NO}_3^-$  alors qu'en absence de  $\text{NO}_3^-$  c'est la seule composante constitutive qui est mesurée. Les mesures d'influx réalisées chez le mutant *atnrt1.2 ::T* confirment les données de Huang *et al.* (1999) sur des lignées antisens, qui concluaient qu'*AtNRT1.2* est impliqué dans cette composante constitutive du LATS. Ces résultats sont cohérents avec les données d'expression des chapitres 3 et 4 qui indiquent que l'expression du gène ne dépend pas de la présence de  $\text{NO}_3^-$  dans le milieu. Parce que le retrait de  $\text{NO}_3^-$  du milieu s'accompagne d'une stimulation de l'accumulation du transcrit *AtNRT1.2*

ce transporteur pourrait avoir un rôle dans une éventuelle réponse du cLATS à la carence. Les études d'expression lors d'un ajout de  $\text{NH}_4^+$  (chapitre 4) indiquent qu'*AtNRT1.2* ne répond pas aux variations du statut N de la plante entière. La stimulation observée serait due à la privation locale de  $\text{NO}_3^-$  plutôt qu'au déficit en assimilats azotés. Les mesures d'influx réalisées sur le mutant et le sauvage correspondant ne permettent cependant pas d'attribuer d'impact fonctionnel à la stimulation de l'expression du gène en absence de  $\text{NO}_3^-$ . En effet, le LATS n'est pas stimulé en réponse à une privation de  $\text{NO}_3^-$  de 48h et il n'existe pas de différence d'absorption entre sauvage et mutant dans ces conditions.

Les études d'expression concernant *AtNRT1.5* ont montré que le transcrite est préférentiellement accumulé dans les racines, probablement dans la stèle ce qui suggère un rôle dans la sécrétion de  $\text{NO}_3^-$  dans la sève du xylème. Ces données sont cohérentes avec les résultats de l'analyse fonctionnelle du mutant. La caractérisation des flux de  $^{15}\text{NO}_3^-$  montre que la translocation de  $^{15}\text{N}$  des racines vers les parties aériennes est réduite chez le mutant alors que l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  est peu affectée. L'effet de la mutation est spécifique de  $\text{NO}_3^-$ , car elle n'affecte ni la translocation de  $\text{PO}_4^{3-}$ , ni celle de  $\text{SO}_4^{2-}$ . La diminution de la translocation de  $^{15}\text{N}$  observée chez le mutant *atnrt1.5::T* est cependant partielle (30-50%), ce qui laisse penser que d'autres gènes sont impliqués dans cette fonction. L'absence d'effet de la mutation sur l'absorption nette de  $\text{NO}_3^-$  et la teneur en N des plantes indique que l'étape de translocation n'est à long terme pas un facteur qui limite l'acquisition de  $\text{NO}_3^-$  par la plante dans les conditions ou nous avons travaillé.

L'effet de l'inactivation d'*AtNRT1.5* sur la translocation de  $\text{NO}_3^-$  dépend de la présence de  $\text{NH}_4^+$  dans le milieu. Il est marqué lorsque les plantes sont cultivées en présence de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  comme source de N et il est réduit lorsque  $\text{NO}_3^-$  est la seule source de N. L'effet de la présence de  $\text{NH}_4^+$  sur l'absorption, la réduction, et la translocation de  $\text{NO}_3^-$  est décrit en détail chez le maïs (MacKown *et al.*, 1982). Chez cette espèce, l'ajout de  $\text{NH}_4^+$  dans un milieu contenant  $\text{NO}_3^-$  provoque une baisse de l'absorption et une stimulation de la translocation de  $\text{NO}_3^-$  (MacKown *et al.*, 1982). Le même type d'effet est observé chez *Arabidopsis* dans nos expériences. La translocation de  $^{15}\text{N}$  est stimulée par  $\text{NH}_4^+$  tandis que l'absorption de  $^{15}\text{NO}_3^-$  est réprimée. L'effet sur la translocation de  $^{15}\text{N}$  est corrélé avec la stimulation de l'expression d'*AtNRT1.5*, dont l'accumulation du transcrite est augmentée dans ces conditions. C'est aussi dans ces conditions, où le gène est le plus fortement exprimé, que le déficit de translocation du mutant est le plus marqué. Ensemble, ces données sont cohérentes et soutiennent l'hypothèse d'un rôle d'*AtNRT1.5* dans le transfert de  $\text{NO}_3^-$  des racines vers les parties aériennes. L'absence d'expression du gène dans les parties aériennes, des flux de transpiration

équivalents chez le sauvage et le mutant, la translocation normale d'autres anions ( $\text{PO}_4^{3-}$  et  $\text{SO}_4^{2-}$ ) excluent à priori un effet du gène sur le flux de sève. L'hypothèse la plus vraisemblable est donc un rôle d'*AtNRT1.5* sur le transfert de  $\text{NO}_3^-$  de la stèle vers la sève du xylème.

Compte tenu du phénotype du mutant *atnrt1.5::T*, l'hypothèse la plus simple est que l'inactivation d'*AtNRT1.5* entraîne la réduction de la sécrétion de  $\text{NO}_3^-$  dans la sève. Des mutants affectés sur la translocation de  $\text{K}^+$  (*SKOR*, Gaymard *et al.*, 1998), de  $\text{Na}^+$  (*SOS1*, Shi *et al.*, 2002) de  $\text{PO}_4^{3-}$  (*PHO1*, Poirier *et al.*, 1991, Hamburger *et al.*, 2002), de  $\text{SO}_4^{2-}$  (*SULTR3.5*, Takahashi *et al.*, 2000, Kataoka *et al.*, 2004) et de  $\text{BO}_4^{3-}$  (*BOR1*, Takano *et al.*, 2002) des racines vers les parties aériennes ont été décrits chez *Arabidopsis*. L'inactivation de *PHO1* entraîne une diminution considérable de la translocation de  $\text{PO}_4^{3-}$  des racines vers les parties aériennes. La protéine possède 6 segments transmembranaires potentiels, et son activité de transport n'a pour l'instant pas été démontrée ni caractérisée. L'inactivation du gène *SKOR* entraîne une diminution de la sécrétion de  $\text{K}^+$  vers la sève. *SKOR* code un canal à travers lequel a lieu un efflux passif de  $\text{K}^+$  au niveau des cellules du parenchyme du xylème. L'antiporteur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  *SOS1* et le transporteur *BOR1* sont impliqués respectivement dans l'efflux de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{BO}_4^{3-}$  vers la sève du xylème. Bien que l'inactivation de *SULTR3.5* entraîne également un défaut de translocation de  $\text{SO}_4^{2-}$ , ce transporteur est caractérisé dans la levure comme un transporteur d'influx. Ces données suggèrent que la translocation des ions des racines vers les parties aériennes est le résultat de l'activité combinée non seulement de transporteurs d'efflux mais aussi de transporteurs d'influx. La sécrétion de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{2-}$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{SO}_4^{2-}$  du parenchyme du xylème vers la sève est supposée se dérouler dans le sens du gradient de potentiel électrochimique de l'ion et donc s'effectuer *via* des transporteurs d'efflux passifs. Dans le cas de  $\text{NO}_3^-$  des conductances indicatrices d'un efflux à travers des canaux anioniques (*X-SLAC* et *X-QUAC*) ont été également identifiées et caractérisées chez l'orge et le blé (Kohler et Raschke, 2000, Kohler *et al.*, 2002, Gilliam et Tester, 2005). Bien que les protéines impliquées n'ont pour l'instant pas été identifiées, il est très probable qu'il s'agisse de canaux anioniques d'efflux dont la structure est différentes de transporteurs tels qu'*AtNRT1.1* (symporteur  $\text{H}^+/\text{NO}_3^-$ ). *AtNRT1.5* (comme *SULTR3.5* pour  $\text{SO}_4^{2-}$ ) a été caractérisé dans l'ovocyte de Xénope comme permettant une entrée de  $\text{NO}_3^-$  dans la cellule. Il est peu vraisemblable que ces transporteurs soient directement responsables de l'efflux de l'ion des cellules du parenchyme xylème vers la sève. Dans le cas de *SULTR3.5*, il a été proposé que ce transporteur d'influx permette la réabsorption des ions présents dans l'apoplasme des cellules du cylindre central (Kataoka *et al.*, 2004). En limitant la fuite des

ions du symplasma, ce type de transporteur favoriserait leur sécrétion préférentielle dans la sève *via* les transporteurs d'efflux. Nous proposons le même type de fonction pour AtNRT1.5. En participant à la réabsorption de  $\text{NO}_3^-$  au niveau du parenchyme de la stèle, le transporteur favoriserait l'approvisionnement du symplasma. A ce niveau, les ions seraient alors pris en charge par des canaux anioniques pour être sécrété vers la sève.

Au cours de ce travail, nous avons cherché à caractériser l'effet de l'inactivation d'*AtNRT1.5* sur la sève du xylème. Un des freins essentiels à l'étude de la translocation des ions est que le siège de ces transports se situe dans une zone interne de la racine. Les dispositifs expérimentaux utilisés ne nous ont pas permis de retrouver le phénotype mis en évidence sur plante entière. Classiquement, l'accès à la sève du xylème ou aux cellules de la stèle requiert des méthodes destructives de prélèvements et de mesures (décapitation, pressurisation, digestions enzymatiques) qui sont traumatisantes pour la plante. Ces techniques interfèrent fortement avec le paramètre qu'elles visent à caractériser (Schurr et Schulze, 1995). La méthode de récolte utilisée consiste à décapiter des plantes maintenues sur milieu de culture. En absence de transpiration, lorsque les racines sont à pression atmosphérique, la charge du xylème s'accompagne d'une augmentation relative de la concentration en ion de la sève par rapport à l'apoplasme qui a pour conséquence d'accroître le flux d'eau et l'exsudation de liquide au niveau de la blessure (« exsudation spontanée »). Cette méthode relativement facile à mettre en oeuvre présente plusieurs inconvénients. Premièrement, le contenu des cellules endommagées de la zone de blessure est libéré dans l'exsudat et contamine la sève. Deuxièmement, la décapitation rompt les relations qui existent entre parties aériennes et racines. Or on connaît plusieurs rôles pour ces liens dans l'activité de la racine dont l'approvisionnement en métabolites, la transmission de signaux régulateurs (Marschner *et al.*, 1996, Bloom et Caldwell, 1988, Graham et Bowling, 1977) auxquels pourraient s'ajouter le maintien des conditions biophysiques (pression, teneurs en différents éléments). Troisièmement, la décapitation des plantes entraîne l'arrêt des mouvements d'eau liés à la transpiration qui est le moteur essentiel de la montée de sève à la lumière. Cette absence de transpiration a pour conséquence un flux d'eau considérablement amoindri à travers les racines par rapport à des plantes entières. Un moyen d'accroître le niveau d'exsudation est d'augmenter la pression au niveau des racines afin d'ajuster le flux d'exsudation à une valeur comparable au flux de transpiration de plantes non décapitées cultivées dans les mêmes conditions (« exsudation forcée »). L'augmentation du flux d'eau à travers les racines dans ces conditions entraîne effectivement une baisse générale des concentrations en ions pour atteindre une valeur proche de celle de plantes entières, bien que

des différences demeurent pour quelques substances (Schurr et Schulze, 1995). Cependant, la technique d'exsudation forcée souffre des mêmes problèmes que la précédente en ce qui concerne la déconnexion des liens avec les parties aériennes. De fait, dans nos conditions, les techniques destructives ne nous ont pas permis de mettre en évidence sur racines excisées le déficit de translocation du mutant *atnrt1.5::T* observé sur plante entière. La présence des parties aériennes, avec des liens xylémiens et phloémiens intacts sont nécessaires à la manifestation du phénotype. Un exemple de rôle régulateur des parties aériennes sur les racines est la régulation transcriptionnelle de gènes au cours du cycle jour/nuit probablement *via* les sucres transportés dans le phloème (Lejay *et al.*, 2003). Il n'est pas à exclure que la disruption de ce type de lien régulateur entraîne une réduction de l'expression du gène *AtNRT1.5* et la disparition du phénotype associé à son inactivation. Néanmoins l'échelle de temps à laquelle nous avons réalisé nos expériences (40 minutes pour les racines pressurisées et 3h pour les racines à pression atmosphérique) suggère un phénomène plus direct. Un élément particulièrement surprenant des études sur racines excisées est l'accroissement chez le mutant de l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  et du flux de sève traversant les racines. Les raisons de l'effet de la décapitation sur ces paramètres restent à déterminer et le lien éventuel avec l'activité de transport de  $\text{NO}_3^-$  d'*AtNRT1.5* est complètement incompris. Alors que chez les plantes entières les flux de transpiration sont équivalents pour les deux génotypes, l'accroissement du flux d'eau à travers les racines chez le mutant se traduit par un débit d'exsudation plus élevé que chez le sauvage aussi bien en exsudation forcée que spontanée. L'interprétation de ces résultats est particulièrement délicate notamment parce que la disponibilité de l'ion au niveau des sites de sécrétion, les échanges ioniques le long des vaisseaux du xylème et la sécrétion elle-même dépendent de la valeur du flux d'eau qui traverse les racines (Schurr et Schulze, 1995). Il est difficile de savoir si l'augmentation du prélèvement de  $\text{NO}_3^-$  dans ces conditions est la cause ou la conséquence de l'augmentation du flux d'eau. La comparaison de systèmes racinaires dont le débit d'exsudation serait équivalent en plaçant les racines des deux génotypes à des pressions différentes serait une expérience complémentaire à réaliser. Par ailleurs, le développement récent de technologies non-destructives permettant d'avoir accès à la composition de la sève du xylème dont l'avantage est de ne pas perturber la physiologie de la plante (Wegner et Zimmermann, 1998, Zimmermann *et al.*, 2002, Zimmermann *et al.*, 2004) permet d'envisager des alternatives aux techniques de décapitation. La possibilité d'utiliser ces techniques chez une plante de la taille d'*Arabidopsis* reste cependant à démontrer.

Jusqu'à ce stade de la discussion nous avons implicitement fait l'hypothèse que le phénotype du mutant *atnrt1.5::T* a pour seule cause l'inactivation d'*AtNRT1.5*. Bien qu'une seule insertion ait été identifiée chez ce mutant on ne peut exclure a priori que d'autres mutations non liés à l'insertion de l'ADN-T puissent être avoir été introduites lors de l'obtention de la lignée. Il conviendra donc par exemple d'identifier d'autres allèles de perte de fonction du gène afin de confirmer la relation de cause à conséquence entre le phénotype et la disruption d'*AtNRT1.5*. D'autre part, l'inactivation d'un gène peut avoir pour conséquence des modifications profondes de l'expression d'autres gènes. Par exemple, chez le mutant *chl1.5*, l'inactivation du gène *AtNRT1.1* s'accompagne de modifications de l'expression d'au moins 296 gènes (Munos *et al.*, 2004). Parmi ceux là on trouve un autre transporteur de  $\text{NO}_3^-$  dont la sur-expression compense partiellement le défaut d'absorption lié à l'inactivation d'*AtNRT1.1*. On ne peut exclure à priori que tout ou une partie du phénotype d'*atnrt1.5::T* soit un effet de la dérégulation d'autres gènes. Une approche préliminaire destinée à caractériser l'impact de l'inactivation d'*AtNRT1.5* sur l'expression des autres gènes de la famille *PTR* a été réalisée grâce à la membrane thématique décrite au chapitre 3. La mutation du gène *AtNRT1.5* semble avoir un effet important sur plusieurs gènes des familles *PTR*, *AMT* et *NIA* dont les membres sont potentiellement impliqués dans le transport ou l'assimilation de N. C'est en particulier le cas pour le transporteur de  $\text{NH}_4^+$  *AtAMT1.1* dont l'expression est la plus fortement stimulée dans l'expérience. C'est aussi le cas, mais dans une moindre mesure, pour d'autres transporteurs de  $\text{NH}_4^+$ , de peptides ou de  $\text{NO}_3^-$ . L'hypothèse d'un effet pleiotrope de la disruption d'*AtNRT1.5* sur l'activité d'autres gènes mérite d'être prise en compte. On ne peut donc pas exclure que les perturbations fonctionnelles du mutant *atnrt1.5::T* soit la résultante de la modification de l'expression de plusieurs gènes chez le mutant.



## CONCLUSIONS

L'objectif du travail était de débiter une approche de génomique fonctionnelle ciblée sur la large famille de transporteurs PTR, dont la majorité des membres restent sans fonction identifiée *in planta*. De plus, la spécificité de substrat n'est pas claire au sein de cette famille ( $\text{NO}_3^-$ , peptides). La possibilité que certains transporteurs ne soient pas impliqués dans le métabolisme azoté a été récemment envisagée, puisque qu'au moins un des gènes a été caractérisé comme un transporteur d'acides organiques.

La première étape de cette approche massive a été de construire une membrane basse densité thématique permettant des études d'expression génique. Pour assurer une bonne fiabilité à cet outil quant à la spécificité des hybridations, j'ai élaboré et utilisé des GST pour la majorité des gènes PTR. Cette approche a nécessité de mieux caractériser *in silico* l'effectif et les contours de la famille PTR. Ceci a notamment permis de mettre en évidence l'existence de sous groupes fonctionnels putatifs.

L'utilisation de la membrane thématique a souligné les impératifs techniques très contraignants de ce type d'approche (sensibilité, reproductibilité, normalisation, etc...). Nous y avons répondu par la proposition d'une méthode originale de normalisation des données, basée sur l'utilisation d'un étalon interne (transcrit synthétique T2). Cette méthode reste à améliorer (étalons internes supplémentaires, meilleure formalisation mathématique, etc...), mais elle a tout de même permis de générer une base de données fiable des régulations transcriptionnelles affectant les familles *PTR*, *AMT*, *NRT2* et *NIA*. Les GST utilisées pour certains gènes doivent être redéfinies. De plus, la membrane basse densité ne permet aujourd'hui d'étudier que 75% des membres de la famille *PTR*, 5/7 *NRT2*, 5/6 *AMT* et 1/2 *NIA*. Il serait souhaitable de la compléter et y adjoindre des GST destinées à l'étude des gènes codant pour la NiR, la GS et la GOGAT. L'idée d'une membrane thématique vraiment complète mérite d'être approfondie car elle se révélerait probablement précieuse, non seulement pour déterminer les régulations affectant les différents gènes de la nutrition azotée, mais aussi pour caractériser plus finement le phénotype des mutants de certains de ces gènes (voir ci-dessous).

Une deuxième partie du travail a consisté à valider et approfondir, sur un nombre réduit de gènes, les résultats obtenus à l'aide de la membrane thématique. Nous avons pu identifier plusieurs régulations originales affectant les transporteurs PTR étudiés. Un des exemples les

plus marquants concerne l'effet de la nutrition potassique, qui module très fortement plusieurs gènes *PTR*, codant des transporteurs caractérisés de  $\text{NO}_3^-$ . Nous interprétons cet effet comme un mécanisme permettant à la plante de coordonner ses prélèvements de  $\text{NO}_3^-$  et de  $\text{K}^+$ . Le pH externe ainsi que l'ajout de  $\text{NH}_4^+$  dans le milieu extérieur sont également des facteurs importants de variation d'expression de certains *PTR*. L'action de  $\text{NH}_4^+$  est très intrigante car elle semble s'exercer indépendamment du statut N de la plante, suggérant une signalisation liée à la nature de la source de N. L'existence d'une régulation des transporteurs de  $\text{NO}_3^-$  par une demande spécifique de  $\text{NO}_3^-$  a été proposée suite à un travail réalisé dans l'équipe (Munos et al, 2004). Le rôle de cette régulation a été interprété comme visant à prévenir les effets délétères d'une nutrition ammoniacale pure. La régulation transcriptionnelle par  $\text{NH}_4^+$  de 3 transporteurs de  $\text{NO}_3^-$  de la famille *PTR* est donc cohérente avec cette hypothèse et la renforce.

La suite du travail s'est focalisée sur la caractérisation fonctionnelle *in planta* de deux transporteurs, AtNRT1.2 et AtNRT1.5, basée sur le phénotypage de mutants KO pour les gènes correspondants. Si les résultats obtenus pour AtNRT1.2 n'ont fait que conforter les hypothèses déjà émises pour le rôle de ce transporteur (implication dans la composante constitutive du LATS), ceux concernant AtNRT1.5 sont nettement plus originaux car ils ont permis, pour la première fois, de relier la fonction de translocation de  $\text{NO}_3^-$  dans le xylème à un transporteur spécifique. L'impact physiologique de la régulation de l'expression du gène *AtNRT1.5* par  $\text{NH}_4^+$  a en particulier été démontré à l'occasion de ce travail. Il est connu depuis longtemps que la présence de  $\text{NH}_4^+$  dans le milieu extérieur inhibe le prélèvement de  $\text{NO}_3^-$  par la racine, mais pas le flux de  $\text{NO}_3^-$  exporté vers les parties aériennes. Ceci indique que l'activité de sécrétion de  $\text{NO}_3^-$  vers le xylème est favorisée en conditions de nutrition mixte. Nos données suggèrent qu'AtNRT1.5 joue un rôle crucial dans cette réponse. De fait,  $\text{NH}_4^+$  induit l'expression d'*AtNRT1.5*, et le phénotype du mutant déficient pour ce gène (exportation de  $\text{NO}_3^-$  vers les parties aériennes diminuée) est surtout marqué en présence de  $\text{NH}_4^+$  dans le milieu extérieur. Ce phénotype n'est toutefois pas évident à relier à l'observation qu'AtNRT1.5 se comporte comme un transporteur d'influx en système hétérologue. Le modèle proposé pour la fonction de ce transporteur est le suivant : en plus de l'activité de sécrétion dans le xylème, il existe un second point de contrôle de l'exportation de  $\text{NO}_3^-$  vers les parties aériennes au niveau de la disponibilité de  $\text{NO}_3^-$  dans le symplasma de la stèle. AtNRT1.5 participerait de manière importante au maintien de cette disponibilité, en assurant la ré-absorption du  $\text{NO}_3^-$  efflué vers l'apoplasme de la stèle. Pour conforter cette

hypothèse, il convient de déterminer la localisation subcellulaire de la protéine AtNRT1.5, qui est supposée dans notre proposition se situer sur le plasmalemme. Ce travail doit aussi être complété par l'étude d'un deuxième allèle. Une autre façon de valider ce modèle pourrait être de compléter le mutant à l'aide d'une construction plaçant la séquence codante du gène *AtNRT1.5* sous le contrôle d'un promoteur inductible, ce qui permettrait d'observer l'impact du niveau d'expression du gène sur les différents flux de  $\text{NO}_3^-$  dans la plante.

Si le rôle d'AtNRT1.5 est de favoriser l'alimentation en  $\text{NO}_3^-$  des parties aériennes, on pourrait s'attendre à ce que le mutant *atnrt1.5::T* présente des teneurs en  $\text{NO}_3^-$  diminuées dans les parties aériennes par rapport au sauvage en présence de  $\text{NH}_4^+$ . Or, ce n'est pas le cas. Ceci laisse supposer des mécanismes compensatoires de la gestion de N chez le mutant (diminution de la réduction foliaire de  $\text{NO}_3^-$ , altération de la rythmicité jour/nuit de la translocation de  $\text{NO}_3^-$ , etc...). Les résultats obtenus avec la macroarray thématique vont dans ce sens et suggèrent des pistes pour identifier ces compensations. De nombreux gènes des familles PTR, NIA et AMT voient leur expression modifiée dans les racines du mutant. On peut comparer ces résultats au transcriptome du mutant *chl1.5* réalisé par SAGE dans l'équipe. Chez le mutant *chl1.5*, le seul gène appartenant aux familles PTR, NIA et AMT identifié comme différentiellement exprimé par rapport au sauvage est *AtNRT1.5* (Munos et al, 2004). La comparaison de ces deux cas de figure suggère des reprogrammations d'expression génique très différentes dans ces deux génotypes. Il conviendrait de répéter ces expériences, de vérifier que ces modifications d'expression génique ont un effet au niveau des activités protéiques (mesure d'ANR, influx de  $\text{NH}_4^+$ ), et d'élargir l'étude aux parties aériennes, ce que nous avons écarté dans un premier temps, du fait de l'expression exclusive du gène *AtNRT1.5* dans les racines.

A ce jour, 5 transporteurs de  $\text{NO}_3^-$  sont identifiés et caractérisés chez *Arabidopsis thaliana*, dont 3 impliqués dans le prélèvement racinaire de  $\text{NO}_3^-$  (AtNRT1.1, AtNRT1.2, AtNRT2.1), 1 dans la répartition du  $\text{NO}_3^-$  dans la plante (AtNRT1.5) et 1 dans la compartimentation du  $\text{NO}_3^-$  dans les feuilles (AtNRT1.4). C'est encore très peu par rapport à l'effectif total des gènes PTR, pouvant potentiellement coder des transporteurs de  $\text{NO}_3^-$  (46 PTR et 6 NRT2 non caractérisés).

Le travail réalisé, conjointement à d'autres, illustre la complexité moléculaire des transports de  $\text{NO}_3^-$  *in planta*. Premièrement, certains transports restent difficiles à étudier dans

des conditions physiologiques, car internes à la plante (transports intra-cellulaires, inter-tissus et inter-organes). Le cas de la translocation de  $\text{NO}_3^-$  vers les parties aériennes est typique à cet égard car les résultats des expériences réalisées sur systèmes racinaires excisés sont difficiles à concilier avec ceux obtenus sur plantes intactes. Deuxièmement, le phénotype d'un mutant ne permet pas de conclure définitivement sur la fonction physiologique du gène muté. Chez *chl1-5* par exemple, 296 gènes sont différentiellement exprimés par rapport au sauvage en réponse à la mutation d' *AtNRT1.1* (Munos et al, 2004). Il s'avère en particulier qu' *AtNRT2.1* est très fortement sur-exprimé chez *chl1-5*, ce qui compense au niveau fonctionnel (absorption racinaire de  $\text{NO}_3^-$ ) la perte d'activité d' *AtNRT1.1*. Seules des mesures fines de cinétiques d'influx de  $^{15}\text{NO}_3^-$  ont permis de mettre en évidence cette compensation fonctionnelle, en quantifiant les contributions respectives de *AtNRT1.1* et *AtNRT2.1* dans l'absorption totale. Ainsi, la perte de fonction du gène muté peut être masquée au niveau global par une réponse compensatoire d'un autre gène. Réciproquement, rien n'exclut la possibilité que le phénotype d'un mutant ne soit pas directement causé par le gène muté, mais soit en fait dû à l'altération de l'expression d'un autre gène. Les résultats préliminaires obtenus à l'aide de la membrane basse densité suggèrent des reprogrammations génétiques importantes chez le mutant *atnrt1.5 ::T*, dont il serait intéressant d'étudier la signification par rapport à la translocation de  $\text{NO}_3^-$  vers les parties aériennes.

Nous avons par ailleurs confirmé qu' *AtNRT1.2* intervient dans un transport de  $\text{NO}_3^-$  à basse affinité constitutif vis à vis de  $\text{NO}_3^-$ . A cette occasion nous avons également mis en évidence l'existence d'une composante iLATS capable de compenser la perte de fonction du mutant en présence de  $\text{NO}_3^-$ . Clairement nous sommes en présence d'un cas de figure dans lequel la membrane thématique pourrait permettre d'identifier un nouvel exemple de compensation de perte de fonction. L'hypothèse que cette compensation soit due à l'expression accrue d'un autre transporteur *PTR* mériterait d'être explorée, car contrairement au système iHATS dont la composante principale a été identifiée et correspond à *AtNRT2.1*, le système iLATS reste encore largement inconnu au niveau moléculaire.

## -REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES-

- Amarasinghe BH, de Bruxelles GL, Braddon M, Onyeocha I, Forde BG, Udvardi MK** (1998) Regulation of *GmNRT2* expression and nitrate transport activity in roots of soybean (*Glycine max*). *Planta* **206**: 44-52
- Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815
- Armengaud P, Breitling R, Amtmann A** (2004) The potassium-dependent transcriptome of *Arabidopsis* reveals a prominent role of jasmonic acid in nutrient signaling. *Plant Physiology* **136**: 2556-2576
- Beevers L, Hageman RH** (1980) Nitrate and nitrite reduction. In BJ Miflin, ed, The biochemistry of plants, Vol 5. Academic Press, pp 115-168
- Birnbaum K, Shasha DE, Wang JY, Jung JW, Lambert GM, Galbraith DW, Benfey PN** (2003) A gene expression map of the *Arabidopsis* root. *Science* **302**: 1956-1960
- Bloom AJ, Caldwell RM** (1988) Root excision decreases nutrient absorption and gas fluxes. *Plant Physiology* **87**: 794-796
- Bloom AJ, Sukrapanna SS, Warner RL** (1992) Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. *Plant Physiology* **99**: 1294-1301
- Blumwald E, Poole RJ** (1985) Nitrate storage and retrieval in *Beta vulgaris*: effect of nitrate and chloride on proton gradients in tonoplast vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**: 3683-3687
- Botrel A, Magné C, Kaiser WM** (1996) Nitrate reduction, nitrite reduction and ammonium assimilation in barley roots in response to anoxia. *Plant Physiology and Biochemistry* **34**: 645-652
- Brownlee AG, Arst HN** (1983) Nitrate uptake in *Aspergillus nidulans* and involvement of the third gene of the nitrate assimilation gene cluster. *Journal of Bacteriology* **155**: 1138-1146
- Brugière N, Suzuki A, Hirel B** (1997) Assimilation de l'ammonium. In JF Morot-Gaudry, ed, Assimilation de l'azote chez les plantes. Aspects physiologique, biochimique and moléculaire. INRA éditions, Paris, France, pp 85-107
- Brunner A, Yakovlev I, Strauss S** (2004) Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biology* **4**: 14

- Cardenas-Navarro R, Adamowicz S, Robin P** (1998) Diurnal nitrate uptake in young tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants: test of feedback-based model. *Journal of Experimental Botany* **49**: 721-730
- Cerezo M, Tillard P, Filleur S, Munos 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 Physiology* **127**: 262-271
- Chaillou S, Lamaze T** (1997) Nutrition ammoniacale des plantes. In JF Morot-Gaudry, ed, Assimilation de l'azote chez les plantes. Aspects physiologique, biochimique et moléculaire. INRA éditions, Paris, France
- Chaillou S, Morot-Gaudry J-F, Salsac L, Lesaint C, Jolivet E** (1986) Compared effect of nitrate and ammonium on growth and metabolism of French bean. *Physiologie Végétale* **24**: 679-687
- Cheng CL, Acedo GN, Cristinsin M, Conkling MA** (1992) Sucrose mimics the light induction of *Arabidopsis* nitrate reductase gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 1861-1864
- Cheng CL, Acedo GN, Dewdney J, Goodman HM, Conkling MA** (1991) Differential expression of the two *Arabidopsis* nitrate reductase genes. *Plant Physiology* **96**: 275-279
- Chiang CS, Stacey G, Tsay YF** (2004) Mechanisms and functional properties of two peptide transporters, AtPTR2 and fPTR2. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 30150-30157
- 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 and Cell Physiology* **45**: 1139-1148
- Choumane W, Heizman P** (1988) Structure and variability of nuclear ribosomal genes in the genus *Helianthus*. *Theoretical and Applied Genetics* **76**: 481-489
- Clarkson DT** (1986) Regulation of the absorption and release of nitrate by plant cells: a review of current ideas and methodology. In H Lambers, JJ Neetson, I Stulen, eds, Fundamental, ecological and agricultural aspects of nitrogen metabolism in higher plants. Martinus Nijhoff, Boston, pp 3-27
- Clarkson DT, Lüttge U** (1991) Mineral nutrition: inducible and repressible nutrient transport systems. *Progress in Botany* **52**: 61-83
- Clément CR, Hopper MJ, Jones LH, Leafe EL** (1978a) The uptake of nitrate by *Lolium perenne* from flowing nutrient solution. II. Effect of light, defoliation, and relationship to CO<sub>2</sub> flux. *Journal of Experimental Botany* **29**: 1173-1183

- Clément CR, Hopper MJ, Jones LHP** (1978b) The uptake of nitrate by *Lolium perenne* from flowing nutrient solution. I. Effect of concentration. *Journal of Experimental Botany* **29**: 453-464
- Coschigano KT, Melo-Oliveira R, Lim J, Coruzzi GM** (1998) *Arabidopsis gls* mutants and distinct Fd-GOGAT genes. Implications for photorespiration and primary nitrogen assimilation. *The Plant Cell* **10**: 741-752
- Cox WJ, Reisenauer HM** (1973) Growth and ion uptake by wheat supplied nitrogen as nitrate, or ammonium, or both. *Plant Soil* **38**: 363-380
- Crawford NM** (1995) Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *The Plant Cell* **7**: 859-868
- Crawford NM, Arst HN** (1993) The molecular-genetics of nitrate assimilation in fungi and plants. *Annual Review of Genetics* **27**: 115-146
- Crawford NM, Glass ADM** (1998) Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends In Plant Science* **3**: 389-395
- Deane-Drummond CE, Glass ADM** (1983) Short term studies of nitrate uptake into barley plants using ion-specific electrodes and  $^{36}\text{ClO}_3^-$ . II. Regulation of  $\text{NO}_3^-$  efflux by  $\text{NH}_4^+$ . *Plant Physiology* **73**: 105-110
- Delhon P, Gojon A, Tillard P, Passama L** (1996) Diurnal regulation of  $\text{NO}_3^-$  uptake in soybean plants IV. Dependence on current photosynthesis and sugar availability to the roots. *Journal of Experimental Botany* **47**: 893-900
- Dietrich D, Hammes U, Thor K, Suter-Grotemeyer M, Fluckiger R, Slusarenko AJ, Ward JM, Rentsch D** (2004) AtPTR1, a plasma membrane peptide transporter expressed during seed germination and in vascular tissue of *Arabidopsis*. *Plant Journal* **40**: 488-499
- Eickhoff B, Korn B, Schick M, Poustka A, Bosch Jvd** (1999) Normalization of array hybridization experiments in differential gene expression analysis. *Nucleic Acids Research* **27**: e33
- Epstein E** (1966) Dual pattern of ion absorption by plant cells and by plants. *Nature* **212**: 1324-1327
- Epstein E, Hagen CE** (1952) A kinetic study of absorption of cations by Barley roots. *Plant Physiology* **27**: 457-474
- Epstein E, Rains DW, Elzam OE** (1963) Resolution of dual mechanisms of potassium uptake by barley roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **49**: 684-692

- Evertsz EM, Au-Young J, Ruvolo MV, Lim AC, Reynolds MA** (2001) Hybridization cross-reactivity within homologous gene families on glass cDNA microarrays. *BioTechniques* **31**: 1182-1192
- Ezeta FN, Jackson WA** (1975) Nitrate translocation by detopped corn seedlings. *Plant Physiology* **56**: 148-156
- Faure JD, Meyer C, Caboche M** (1997) Assimilation du nitrate : nitrate et nitrite reductases. In JF Morot-Gaudry, ed, Assimilation de l'azote chez les plantes. Aspects physiologique biochimique et moléculaire. INRA éditions, Paris, France, pp 45-83
- Faure-Rabasse S, Le Deunff E, Laine P, Macduff JH, Ourry A** (2002) Effects of nitrate pulses on *BnNRT1* and *BnNRT2* genes: mRNA levels and nitrate influx rates in relation to the duration of N deprivation in *Brassica napus* L. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1711-1721
- Feinberg AP, Vogelstein B** (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry* **132**: 6-13
- Filleur S, Daniel-Vedele F** (1999) Expression analysis of a high-affinity nitrate transporter isolated from *Arabidopsis thaliana* by differential display. *Planta* **207**: 461-469
- Filleur S, Dorbe MF, Cerezo M, Orsel M, Granier F, Gojon A, Daniel-Vedele F** (2001) An *Arabidopsis* T-DNA mutant affected in *NRT2* genes is impaired in nitrate uptake. *FEBS Letters* **489**: 220-224.
- Forde BG** (2000) Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1465**: 219-235
- Forde BG, Clarkson DT** (1999) Nitrate and ammonium nutrition of plants : Physiological and molecular perspectives. *Advances in Botanical Research* **30**: 1-90
- Frommer WB, Hummel S, Rentsch D** (1994) Cloning of an *Arabidopsis* histidine transporting protein related to nitrate and peptide transporters. *FEBS Letters* **347**: 185-189
- Fraisier V, Dorbe M-F, Daniel-Vedele F** (2001) Identification and expression analyses of two genes encoding putative low-affinity nitrate transporters from *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Molecular Biology* **45**: 181-190
- Frost WB, Blevins DG, Barnett NM** (1978) Cation pretreatment effects on nitrate uptake, xylem exudate, and malate levels in wheat seedling. *Plant Physiology* **61**: 323-326
- Gansel X, Munos S, Tillard P, Gojon A** (2001) Differential regulation of the  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  transporter genes *AtNrt2.1* and *AtAmt1.1* in *Arabidopsis* : relation with long-distance and local controls of N status of the plant. *Plant Journal* **26**: 143-155



- Gastal F, Saugier B** (1989) Relationships between nitrogen uptake and carbon assimilation in whole plants of tall fescue. *Plant Cell and Environment* **12**: 407-418
- Gaymard F, Pilot G, Lacombe B, Bouchez D, Bruneau D, Boucherez J, Michaux-Ferriere N, Thibaud JB, Sentenac H** (1998) Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K<sup>+</sup> release into the xylem sap. *Cell* **94**: 647-655
- Gazzarrini S, Lejay L, Gojon A, Ninnemann O, Frommer WB, von Wirén N** (1999) Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell* **11**: 937-947
- Gilliam M, Tester M** (2005) The regulation of anion loading to the maize root xylem. *Plant Physiology* **137**: 819-828
- Glass ADM, Brito DT, Kaiser BN, Kronzucker HJ, Kumar A, Okamoto m, Rawat SR, Siddiqi MY, Silim SM, Vidmar JJ, Zhuo D** (2001) Nitrogen transport in plants, with an emphasis on regulation of fluxes to match plant demand. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **164**: 199-207
- Glass ADM, Shaff JE, Kochian LV** (1992) Studies of the uptake of nitrate in barley. IV. Electrophysiology. *Plant Physiology* **99**: 456-463
- Glass ADM, Siddiqi MY, Ruth TJ, Rufty TWJ** (1990) Studies of the uptake of nitrate in barley. II. Energetics. *Plant Physiology* **93**: 1585-1589
- Gojon A, Dapoigny L, Lejay L, Tillard P, Rufty TW** (1998) Effects of genetic modification of nitrate reductase expression on <sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake and reduction in *Nicotiana* plants. *Plant Cell and Environment* **21**: 43-53
- Gojon A, Touraine B** (1997) Intégration de l'absorption du nitrate dans la plante. In JF Morot-Gaudry, ed, *Assimilation de l'azote chez les plantes. Aspects physiologique biochimique et moléculaire*. INRA éditions, Paris, France, pp 109-127
- Graham RD, Bowling DJF** (1977) Effect of the shoot on the transmembrane potentials of root cortical cells of sunflower. *Journal of Experimental Botany* **28**: 886-893
- Grignon C, Thibaud JB, Lamaze T** (1997) Transport du nitrate par la racine. In JF Morot-Gaudry, ed, *Assimilation de l'azote chez les plantes. Aspects physiologique, biochimique et moléculaire*. INRA éditions, Paris, France, pp 27-41
- Guo FQ, Wang R, Chen M, Crawford NM** (2001) The *Arabidopsis* dual-affinity nitrate transporter gene *AtNRT1.1 (CHLI)* is activated and functions in nascent organ development during vegetative and reproductive growth. *Plant Cell* **13**: 1761-1777.

- Hageman RH, Flesher D** (1960) The effect of an anaerobic environment on the activity of alcohol dehydrogenase and other enzymes of corn seedlings. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **87**: 203-209
- Hamburger D, Rezzonico E, MacDonald-Comber Petetot J, Somerville C, Poirier Y** (2002) Identification and characterization of the *Arabidopsis* PHO1 gene involved in phosphate loading to the xylem. *Plant Cell* **14**: 889-902
- Hanson JB** (1978) Application of the chemiosmotic hypothesis to ion transport across the root. *Plant Physiology* **62**: 402-405
- Hatch DJ, Hopper MJ, Dhanoas MS** (1986) Measurements of ammonium ions in flowing solution culture and diurnal variation in uptake by *Lolium perenne* L. *Journal of Experimental Botany* **37**: 589-596
- Hildebrandt U, Schmelzer E, Bothe H** (2002) Expression of nitrate transporter genes in tomato colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Physiologia Plantarum* **115**: 125-136
- Hirel B, Marsolier MC, Hoarau A, Hoarau J, Brangeon J, Schafer R, Verma DPS** (1992) Forcing expression of a soybean root glutamine-synthetase gene in tobacco-leaves induces a native gene encoding cytosolic enzyme. *Plant Molecular Biology* **20**: 207-218
- Hirel B, Miao GH, Verma DPS** (1992) Metabolic and developmental control of glutamine synthetase genes in legume and non-legume plants. *In* DPS Verma, ed, Control of plant gene expression. CRC press, Boca Raton, pp 443-458
- Hole DJ, Emran AM, Fares Y, Drew MC** (1990) Induction of nitrate transport in maize roots, and kinetics of influx, measured with nitrogen-13. *Plant Physiology* **93**: 642-647
- Holstege FC, Jennings EG, Wyrick JJ, Lee TI, Hengartner CJ, Green MR, Golub TR, Lander ES, Young RA** (1998) Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* **95**: 717-728
- 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.
- 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. *The Plant Cell* **11**: 1381-1392
- Hwang CF, Lin Y, D'Souza T, Cheng CL** (1997) Sequences necessary for nitrate-dependent transcription of *Arabidopsis* nitrate reductase genes. *Plant Physiology* **113**: 853-862.

- Imsande J, Touraine B** (1994) N demand and the regulation of nitrate uptake. *Plant Physiology* **105**: 3-7
- Ingemarsson B, Oscarson P, afUgglas M** (1987) Nitrogen utilization in *Lemna*. III. Short-term effects of ammonium on nitrate uptake and nitrate reduction. *Plant Physiology* **85**: 865-867
- Jackson WA, Flesher D, Hageman RH** (1973) Nitrate uptake by dark-grown corn seedlings. *Plant Physiology* **51**: 120-127
- Jackson WA, Pan WL, Moll RH, Kamprath EJ** (1986) Uptake, translocation, and reduction of nitrate. In CA Neyra, ed, *Biochemical Basis of Plant Breeding. Nitrogen metabolism.*, Vol II. CRC press, Cleveland, Ohio, pp 63-108
- Jeong J, Suh S, Guan C, Tsay YF, Moran N, Oh CJ, An CS, Demchenko KN, Pawlowski K, Lee Y** (2004) A nodule-specific dicarboxylate transporter from alder is a member of the peptide transporter family. *Plant Physiology* **134**: 969-978
- Kaestner KH, Sze H** (1987) Potential-dependant anion transport in tonoplast vesicles from oat roots. *Plant Physiology* **83**: 483-489
- Kaiser WM, Huber SC** (2001) Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1981-1989
- Kane MD, Jatko TA, Stumpf CR, Lu J, Thomas JD, Madore SJ** (2000) Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays. *Nucleic Acids Research* **28**: 4552-4557
- Kataoka T, Hayashi N, Yamaya T, Takahashi H** (2004) Root-to-shoot transport of sulfate in *Arabidopsis*. Evidence for the role of SULTR3;5 as a component of low-affinity sulfate transport system in the root vasculature. *Plant Physiology* **136**: 4198-4204
- Kohler B, Raschke K** (2000) The delivery of salts to the xylem. Three types of anion conductance in the plasmalemma of the xylem parenchyma of roots of barley. *Plant Physiology Bethesda* **122**: 243-254
- Kohler B, Wegner LH, Osipov V, Raschke K** (2002) Loading of nitrate into the xylem: apoplastic nitrate controls the voltage dependence of X-QUAC, the main anion conductance in xylem-parenchyma cells of barley roots. *Plant Journal* **30**: 133-142
- Krapp A, Fraiser V, Scheible W-R, Quesada A, Gojon A, Stitt M, Caboche M, Daniel-Vedele F** (1998) Expression studies of *Nrt2;INp*, a putative high-affinity nitrate transporter: Evidence for its role in nitrate uptake. *Plant Journal* **14**: 723-731

- Kronzucker HJ, Glass AD, Siddiqi MY** (1999) Inhibition of nitrate uptake by ammonium in barley. Analysis of component fluxes. *Plant Physiology* **120**: 283-292
- Lainé P, Ourry A, Boucaud J** (1995) Shoot control of nitrate uptake rates by roots of *Brassica napus* L.: effects of localized nitrate supply. *Planta* **196**: 77-83
- Lam HM, Coschigano K, Schultz C, Melo-Oliveira R, Tjaden G, Oliveira I, Ngai N, Hsieh MH, Coruzzi G** (1995) Use of *Arabidopsis* mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 887-898
- Lancien M, Martin M, Hsieh MH, Leustek T, Goodman H, Coruzzi GM** (2002) *Arabidopsis glt1-T* mutant defines a role of NADH-GOGAT in the non-photorespiratory ammonium assimilatory pathway. *Plant Journal* **29**: 347-358
- Lauter FR, Ninnemann O, Bucher M, Riesmeier JW, Frommer WB** (1996) Preferential expression of an ammonium transporter and of two putative nitrate transporters in root hairs of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 8139-8144
- Le Bot J, Kirkby EA** (1992) Diurnal uptake of nitrate and potassium during the vegetative growth of tomato plants. *Journal of Plant Nutrition* **15**: 247-264
- Ledger TN, Pinton P, Bourges D, Roumi P, Salmon H, Oswald IP** (2004) Development of a macroarray to specifically analyze immunological gene expression in swine. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **11**: 691-698
- Lee RB** (1993) Control of net uptake of nutrients by regulation of influx in barley plants recovering from nutrient deficiency. *Annals of Botany* **72**: 223-230
- Lee RB, Clarkson DT** (1986) Nitrogen-13 studies of nitrate fluxes in barley roots. I. Compartmental analysis from measurements of <sup>13</sup>N efflux. *Journal of Experimental Botany* **37**: 1753-1767
- Lee RB, Purves JV, Ratcliffe RG, Saker LR** (1992) Nitrogen assimilation and the control of ammonium and nitrate absorption by maize roots. *Journal of Experimental Botany* **43**: 1385-1396
- Lejay L, Gansel X, Cerezo M, Tillard P, Mueller C, Krapp A, von Wiren N, Daniel-Vedele F, Gojon A** (2003) Regulation of root ion transporters by photosynthesis: functional importance and relation with hexokinase. *The Plant Cell* **15**: 2218-2232
- Lejay L, Quilleré I, Roux Y, Tillard P, Cliquet J-B, Meyer C, Morot-Gaudry J-F, Gojon A** (1997) Abolition of posttranscriptional regulation of nitrate reductase partially prevents the decrease in leaf nitrate reduction when photosynthesis is inhibited by CO<sub>2</sub> deprivation, but not in darkness. *Plant Physiology* **115**: 623-630

- Lejay L, Tillard P, Lepetit M, Domingo Olive F, Filleur S, Daniel-Vedele F, Gojon A** (1999) Molecular and functional regulation of two  $\text{NO}_3^-$  uptake systems by N- and C-status of *Arabidopsis* plants. *Plant Journal* **18**: 509-519
- Limpens E, Bisseling T** (2003) Signaling in symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 343-350
- Lin CM, Koh S, Stacey G, Yu SM, Lin TY, Tsay YF** (2000) Cloning and functional characterization of a constitutively expressed nitrate transporter gene, OsNRT1, from rice. *Plant Physiology* **122**: 379-388
- Liu KH, Huang CY, Tsay YF** (1999) CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of *Arabidopsis* involved in multiple phases of nitrate uptake. *The Plant Cell* **11**: 865-874
- Lobréaux S, Massenet O, Briat JF** (1992) Iron induces ferritin synthesis in maize plantlets. *Plant Molecular Biology* **19**: 563-575.
- Loqué D, Tillard P, Gojon A, Lepetit M** (2003) Gene expression of the  $\text{NO}_3^-$  transporter *NRT1.1* and the nitrate reductase *NIA1* is repressed in *Arabidopsis* roots by  $\text{NO}_2^-$ , the product of  $\text{NO}_3^-$  reduction. *Plant Physiology* **132**: 958-967
- Maathuis FJ, Filatov V, Herzyk P, Krijger GC, Axelsen KB, Chen S, Green BJ, Li Y, Madagan KL, Sanchez-Fernandez R, Forde BG, Palmgren MG, Rea PA, Williams LE, Sanders D, Amtmann A** (2003) Transcriptome analysis of root transporters reveals participation of multiple gene families in the response to cation stress. *Plant Journal* **35**: 675-692
- Maathuis FJM, Sanders D** (1993) Energization of potassium uptake in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **191**: 302-307
- Mackown CT, Jackson WA, Volk RJ** (1982) Restricted nitrate influx and reduction in corn seedlings exposed to ammonium. *Plant Physiology* **69**: 353-359
- Mackown CT, Volk RJ, Jackson WA** (1981) Nitrate accumulation, assimilation and transport by decapitated corn roots: effects of prior nitrate nutrition. *Plant Physiology* **68**: 133-138
- MacRobbie EAC** (1971) Phloem translocation. Facts and mechanisms : a comparative survey. *Biological Reviews* **46**: 428-481
- Marschner H** (1995) Mineral nutrition in higher plants. *In* H Marschner, ed, Academic Press, London, UK.
- Marschner H, Kirkby EA, Cakmak I** (1996) Effect of mineral nutritional status on shoot-root partitioning of photoassimilates and cycling of mineral nutrients. *Journal of Experimental Botany* **47**: 1255-1263

- Marsolier MC, Hirel B** (1993) Metabolic and developmental control of cytosolic glutamine-synthetase genes in soybean. *Physiologia Plantarum* **89**: 613-617
- Martinoia E, Massonneau A, Frangne N** (2000) Transport processes of solutes across the vacuolar membrane of higher plants. *Plant and Cell Physiology* **41**: 1175-1186
- Martinoia E, Schramm MJ, Kaiser WM, Heber U** (1986) Transport of anions in isolated barley vacuoles. I. Permeability to anions and evidence for a Cl<sup>-</sup> uptake system. *Plant Physiology* **80**: 895-901
- Matt P, Schurr U, Klein D, Krapp A, Stitt M** (1998) Growth of tobacco in short-day conditions leads to high starch, low sugars, altered diurnal changes in the NIA transcript and low nitrate reductase activity, and inhibition of amino acid synthesis. *Planta* **207**: 27-41
- Meharg AA, Blatt MR** (1995) NO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport across the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* root hairs: kinetic control by pH and membrane voltage. *Journal of Membrane Biology* **145**: 49-66
- Mehrer I, Mohr H** (1989) Ammonium toxicity : description of the syndrom in *Sinapis alba* and the search for its causation. *Physiologia Plantarum* **77**: 545-554
- Meraviglia G, Romani G, Beffagna N** (1996) The *chl1 Arabidopsis* mutant impaired in nitrate-inducible NO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporter has an acidic intracellular pH in the absence of nitrate. *Journal of Plant Physiology* **149**: 307-310
- Mifflin BJ, Lea PJ** (1980) Ammonia Assimilation. In BJ Mifflin, ed, *The Biochemistry of Plants*, Vol 5. Academic Press, New York
- Miller AJ, Smith SJ** (1996) Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells. *Journal of experimental Botany* **47**: 843-854
- Minotti PL, Williams DC, Jackson WA** (1968) Nitrate uptake and reduction as affected by calcium and potassium. *Soil Science Society of America Proceedings* **32**: 692-698
- Miranda M, Borisjuk L, Tewes A, Dietrich D, Rentsch D, Weber H, Wobus U** (2003) Peptide and amino acid transporters are differentially regulated during seed development and germination in faba bean. *Plant Physiology* **132**: 1950-1960
- Morgan MA, Volk RJ, Jackson WA** (1985) *p*-fluorophenylalanine-induced restriction of ion uptake and assimilation by maize roots. *Plant Physiology* **77**: 718-721
- Müller B, Tillard P, Touraine B** (1995) Nitrate fluxes in soybean seedlings roots and their response to amino acids: an approach using <sup>15</sup>N. *Plant Cell and Environment* **18**: 1267-1279

- Müller B, Touraine B** (1992) Inhibition of  $\text{NO}_3^-$  uptake by various phloem-translocated amino acids in soybean seedlings. *Journal of Experimental Botany* **43**: 617-623
- Munos S, Cazettes C, Fizames C, Gaymard F, Tillard P, Lepetit M, Lejay L, Gojon A** (2004) Transcript profiling in the *chl1-5* mutant of *Arabidopsis* reveals a role of the nitrate transporter NRT1.1 in the regulation of another nitrate transporter, NRT2.1. *The Plant Cell* **16**: 2433-2447
- Nazoa P, Vidmar JJ, Tranbarger TJ, Mouline K, Damiani I, Tillard P, Zhuo D, Glass AD, Touraine B** (2003) Regulation of the nitrate transporter gene *AtNRT2.1* in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate, amino acids and developmental stage. *Plant Molecular Biology* **52**: 689-703
- Okamoto M, Vidmar JJ, Glass ADM** (2003) Regulation of *NRT1* and *NRT2* gene families of *Arabidopsis thaliana*: Responses to nitrate provision. *Plant and Cell Physiology* **44**: 304-317
- Ono F, Frommer WB, von Wiren N** (2000) Coordinated diurnal regulation of low- and high-affinity nitrate transporters in tomato. *Plant Biology* **2**: 17-23
- Orsel M, Filleur S, Fraissier V, Daniel-Vedele F** (2002a) Nitrate transport in plants: which gene and which control? *Journal of Experimental Botany* **53**: 825-833
- Orsel M, Krapp A, Daniel-Vedele F** (2002b) Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in *Arabidopsis*. Structure and gene expression. *Plant Physiology* **129**: 886-896
- Ourry A, Macduff JH, Prudhomme M-P, Boucaud J** (1996) Diurnal variation in the simultaneous uptake and "sink" allocation of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  by *Lolium perenne* in flowing solution culture. *Journal of Experimental Botany* **47**: 1853-1863
- Pao SS, Paulsen IT, Saier MH** (1998) Major Facilitator Superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**: 1-34
- Peterman TK, Goodman HM** (1991) The glutamine synthetase gene family of *Arabidopsis thaliana*: light-regulation and differential expression in leaves, roots and seeds. *Molecular and General Genetics* **230**: 145-154
- Pilgrim ML, Caspar T, Quail PH, McClung CR** (1993) Circadian and light-regulated expression of nitrate reductase in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **23**: 349-364
- Pitman MG** (1988) Whole plants. In DA Baker, JL Hall, eds, *Solute transport in plant cells and tissues*. Longman Scientific and Technical, Harlow, pp 346-391
- Poirier Y, Thoma S, Sommerville C, Schiefelbein J** (1991) A mutant of *Arabidopsis* deficient in xylem loading of phosphate. *Plant Physiology* **97**: 1087-1093

- Pope AJ, Leigh RA** (1987) Some characteristics of anion transport at the tonoplast of oat roots, determined from the effects of anions on pyrophosphate-dependent proton transport. *Planta* **172**: 91-100
- Prosser S, Gojon A, Barrie A** (1993) Fast, automated analysis of nitrogen-15 nitrate from plant and soil extracts. *Soil Science Society of America Journal* **57**: 410-414
- Quaggiotti S, Ruperti B, Borsa P, Destro T, Malagoli M** (2003) Expression of a putative high-affinity NO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporter and of an H<sup>+</sup>-ATPase in relation to whole plant nitrate transport physiology in two maize genotypes differently responsive to low nitrogen availability. *Journal of Experimental Botany* **54**: 1023-1031
- Quesada A, Galvan A, Fernandez E** (1994) Identification of nitrate transporter genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal* **5**: 407-419
- Quesada A, Krapp A, Trueman LJ, Daniel-Vedele F, Fernandez E, Forde BG, Caboche M** (1997) PCR-identification of a *Nicotiana plumbaginifolia* cDNA homologous to the high-affinity nitrate transporters of the *CRNA* family. *Plant Molecular Biology* **34**: 265-274
- Radin JW** (1974) Distribution and development of nitrate reductase activity in germinating cotton seedlings. *Plant Physiology* **53**: 458-463
- Rastogi R, Bate NJ, Sivasankar S, Rothstein SJ** (1997) Footprinting of the spinach nitrite reductase gene promoter reveals the preservation of nitrate regulatory elements between fungi and higher plants. *Plant Molecular Biology* **34**: 465-476.
- Rawat SR, Silim SN, Kronzucker HJ, Siddiqi MY, Glass ADM** (1999) *AtAMT1* gene expression and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels. *Plant Journal* **19**: 143-152
- Redinbaugh MG, Campbell WH** (1993) Glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthase expression in the maize (*Zea mays*) root primary response to nitrate. *Plant Physiology* **101**: 1249-1255
- Rentsch D, Laloi M, Rouhara I, Schmelzer E, Delrot S, Frommer WB** (1995) NTR1 encodes a high affinity oligopeptide transporter in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* **370**: 264-268
- Rexach J, Llamas A, Fernandez E, Galvan A** (2002) The activity of the high-affinity nitrate transport system I (NRT2;1, NAR2) is responsible for the efficient signalling of nitrate assimilation genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* **215**: 606-611



- Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE** (2000) Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **12**: 707-719
- Rideout JW, Chaillou S, Raper CD, Morot-Gaudry JF** (1994) Ammonium and nitrate uptake by soybean during recovery from nitrogen deprivation. *Journal of Experimental Botany* **45**: 23-33
- Roelfsema MRG, Levchenko V, Hedrich R** (2004) ABA depolarizes guard cells in intact plants, through a transient activation of R- and S-type anion channels. *Plant Journal* **37**: 578-588
- Rufty TW, Jackson WA, Raper D** (1981) Nitrate reduction in roots as affected by the presence of potassium and by flux of nitrate through the roots. *Plant Physiology* **68**: 605-609
- Salsac L, Chaillou S, Morot-Gaudry JF, Lesaint C, Jolivet E** (1987) Nitrate and ammonium nutrition in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **25**: 805-812
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory press.
- Santi S, Locci G, Monte R, Pinton R, Varanini Z** (2003) Induction of nitrate uptake in maize roots: expression of a putative high-affinity nitrate transporter and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase isoforms. *Journal of Experimental Botany* **54**: 1851-1864
- Schaffer R, Landgraf J, Accerbi M, Simon V, Larson M, Wisman E** (2001) Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **13**: 113-123
- Scheible WR, Gonzalez-Fontes A, Lauerer M, Muller-Rober B, Caboche M, Stitt M** (1997) Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *The Plant Cell* **9**: 783-798
- Schroeder JI, Keller BU** (1992) Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 5025-5029
- Schuchhardt J, Beule D, Malik A, Wolski E, Eickhoff H, Lehrach H, Herzel H** (2000) Normalization strategies for cDNA microarrays. *Nucleic Acids Research* **28**: e47-E47
- Schulze W, Frommer WB, Ward JM** (1999) Transporters for ammonium, amino acids and peptides are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes*. *Plant Journal* **17**: 637-646

- Schumaker KS, Sze H** (1987) Decrease of pH gradient in tonoplast vesicles by  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{Cl}^-$ : evidence for  $\text{H}^+$ -coupled anion transport. *Plant Physiology* **83**: 490-496
- Schurr U, Schulze ED** (1995) The concentration of xylem sap constituents in root exudate, and in sap from intact, transpiring castor bean-plants (*Ricinus-communis* L). *Plant Cell and Environment* **18**: 409-420
- Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K** (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *The Plant Cell* **13**: 61-72
- Shi H, Quintero FJ, Pardo JM, Zhu JK** (2002) The putative plasma membrane  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter SOS1 controls long-distance  $\text{Na}^+$  transport in plants. *Plant Cell* **14**: 465-477
- Siddiqi MY, Glass ADM** (1993) Mechanisms of nitrate uptake by higher plants. *Current Topics in Plant Physiology* **1**: 219-228
- Siddiqi MY, Glass ADM** (2002) An evaluation of the evidence for, and implications of, cytoplasmic nitrate homeostasis. *Plant Cell and Environment* **25**: 1211-1217
- Smith IK, Cheema HK** (1985) Sulphate transport into plants and excised roots of soybean (*Glycine max* L.). *Annals of Botany* **56**: 219-224
- Sohlenkamp C, Shelden M, Howitt S, Udvardi M** (2000) Characterization of *Arabidopsis* AtAMT2, a novel ammonium transporter in plants. *FEBS Letters* **467**: 273-278
- Somerville CR, Ogren WL** (1980) Inhibition of photosynthesis in *Arabidopsis* mutants lacking leaf glutamate synthase activity. *Nature* **286**: 257-259
- Song W, Koh S, Czako M, Marton L, Drenkard E, Becker JM, Stacey G** (1997) Antisense expression of the peptide transport gene *AtPTR2-B* delays flowering and arrests seed development in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology* **114**: 927-935
- Steiner HY, Song W, Zhang L, Naider F, Becker JM, Stacey G** (1994) An *Arabidopsis* peptide transporter is a member of a new class of membrane transport proteins. *The Plant Cell* **6**: 1289-1299
- Stedle E, Murrmann M, Peterson CA** (1993) Transport of water and solutes across maize roots modified by puncturing the endodermis: further evidence for the composite transport model of the root. *Plant Physiology Bethesda* **103**: 335-349
- Stitt M** (1999) Nitrate regulation of metabolism and growth. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 178-186

- Suzuki A, Rothstein S** (1997) Structure and regulation of ferredoxin-dependent glutamase synthase from *Arabidopsis thaliana*. Cloning of cDNA, expression in different tissues of wild-type and *gltS* mutant strains, and light induction. *European Journal of Biochemistry* **243**: 708-718
- Takahashi H, Watanabe-Takahashi A, Smith FW, Blake-Kalff M, Hawkesford MJ, Saito K** (2000) The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **23**: 171-182
- Takahashi M, Sasaki Y, Ida S, Morikawa H** (2001) Nitrite reductase gene enrichment improves assimilation of  $\text{NO}_2^-$  in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **126**: 731-741.
- Takano J, Noguchi K, Yasumori M, Kobayashi M, Gajdos Z, Miwa K, Hayashi H, Yoneyama T, Fujiwara T** (2002) *Arabidopsis* boron transporter for xylem loading. *Nature* **420**: 337-340
- Tanaka T, Ida S, Irifune K, Oeda K, Morikawa H** (1994) Nucleotide-sequence of a gene for nitrite reductase from *Arabidopsis Thaliana*. *DNA Sequence* **5**: 57-61
- Tillard P, Passama L, Gojon A** (1998) Are phloem amino acids involved in the shoot to root control of  $\text{NO}_3^-$  uptake in *Ricinus communis* plants? *Journal of Experimental Botany* **49**: 1371-1379
- Tischner R** (2000) Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. *Plant Cell and Environment* **23**: 1005-1024
- Tischner R, Waldeck B, Goyal SS, Rains WD** (1993) Effect of nitrate pulses on the nitrate-uptake rate, synthesis of mRNA coding for nitrate reductase, and nitrate-reductase activity in the roots of barley seedlings. *Planta* **189**: 533-537
- Tong Y, Zhou JJ, Li ZS, Miller AJ** (2005) A two-component high-affinity nitrate uptake system in barley. *Plant Journal* **41**: 442-450
- Touraine B, Glass ADM** (1997)  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{ClO}_3^-$  fluxes in the *chl1-5* mutant of *Arabidopsis thaliana*. Does the *CHL1-5* gene encode a low-affinity  $\text{NO}_3^-$  transporter? *Plant Physiology* **114**: 137-144
- Touraine B, Gojon A** (1997) Intégration de l'absorption du nitrate dans la plante entière. In JF Morot-Gaudry, ed, Assimilation de l'azote chez les plantes. Aspects physiologique, biochimique and moléculaire. INRA Editions, Paris, France, pp 109-128
- Trinchant JC, Drevon JJ, Rigaud J** (1997) Fixation symbiotique de l'azote. In JF Morot-Gaudry, ed, Assimilation de l'azote chez les plantes. Aspects physiologique, biochimique and moléculaire. INRA éditions, Paris, France pp 133-145

- Trueman LJ, Richardson A, Forde BG** (1996) Molecular cloning of higher plant homologues of the high-affinity nitrate transporters of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Aspergillus nidulans*. *Gene* **175**: 223-231
- 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* [published errata appear in Proc. Natl Acad. Sci. USA 1991 May 15;88(10):4564 and 1995 Mar 28;92(7):3076]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 204-208
- Unkles SE, Rouch DA, Wang Y, Siddiqi MY, Glass AD, Kinghorn JR** (2004) Two perfectly conserved arginine residues are required for substrate binding in a high-affinity nitrate transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 17549-17554
- van der Leij M, Smith SJ, Miller AJ** (1998) Remobilisation of vacuolar stored nitrate in barley root cells. *Planta* **205**: 64-72
- van de Peppel J, Kemmeren P, van-Bakel H, Radonjic M, van Leenen D, Holstege FCP** (2003) Monitoring global messenger RNA changes in externally controlled microarray experiments. *EMBO reports* **4**: 387-393
- Very AA, Sentenac H** (2003) Molecular mechanisms and regulation of K<sup>+</sup> transport in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 575-603
- Vidmar JJ, Zhuo D, Siddiqi MY, Schjoerring JK, Touraine B, Glass AD** (2000) Regulation of high-affinity nitrate transporter genes and high-affinity nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley. *Plant Physiology* **123**: 307-318
- Vincentz M, Moureaux T, Leydecker MT, Vaucheret H, Caboche M** (1993) Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. *Plant Journal* **3**: 315-324
- Volk RJ, Challiou S, Mariotti A, Morot-Gaudry JF** (1992) Beneficial effects of concurrent ammonium and nitrate nutrition on the growth of *Phaseolus vulgaris* : a <sup>15</sup>N study. *Plant Physiology and Biochemistry* **30**: 487-493
- Volk RJ, Pearson CJ, Jackson WA** (1979) Reduction of plant tissue nitrate to nitric oxide for mass spectrometric <sup>15</sup>N analysis. *Analytical Biochemistry* **97**: 131-135

- Wang R, Crawford NM** (1996) Genetic identification of a gene involved in constitutive, high-affinity nitrate transport in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 9297-9301
- Wang R, Guegler K, LaBrie ST, Crawford NM** (2000) Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. *The Plant Cell* **12**: 1491-1509.
- Wang TB, Gassmann W, Rubio F, Schroeder JI, Glass ADM** (1998) Rapid up-regulation of *HKT1*, a high-affinity potassium transporter gene, in roots of barley and wheat following withdrawal of potassium. *Plant Physiology* **118**: 651-659
- Wang YH, Garvin DF, Kochian LV** (2001) Nitrate-induced genes in tomato roots. Array analysis reveals novel genes that may play a role in nitrogen nutrition. *Plant Physiology* **127**: 345-359
- Wang YL, Liu CL, Storey JD, Tibshirani RJ, Herschlag D, Brown PO** (2002) Precision and functional specificity in mRNA decay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 5860-5865
- Warner RL, Kleinhofs A** (1992) Genetics and molecular biology of nitrate metabolism in higher plants. *Physiologia Plantarum* **85**: 245-252
- Wegner LH, Raschke K** (1994) Ion channels in the xylem parenchyma of barley roots: a procedure to isolate protoplasts from this tissue and a patch-clamp exploration of salt passageways into xylem vessels. *Plant Physiology Bethesda* **105**: 799-813
- Wegner LH, Zimmermann U** (1998) Simultaneous recording of xylem pressure and trans-root potential in roots of intact glycophytes using a novel xylem pressure probe technique. *Plant Cell and Environment* **21**: 849-865
- West CE, Waterworth WM, Stephens SM, Smith CP, Bray CM** (1998) Cloning and functional characterisation of a peptide transporter expressed in the scutellum of barley grain during the early stages of germination. *Plant Journal* **15**: 221-229
- Wilkinson JQ, Crawford NM** (1991) Identification of the *Arabidopsis* *CHL3* gene as the nitrate reductase structural gene *NIA2*. *Plant Cell* **3**: 461-471.
- Wilkinson JQ, Crawford NM** (1993) Identification and characterization of a chlorate-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with mutations in both nitrate reductase structural genes *NIA1* and *NIA2*. *Molecular and General Genetics* **239**: 289-297.
- Wolkenhauer O, Möller-Levet C, Sanchez-Cabo F** (2002) The curse of normalization. *Comparative and Functional Genomics* **3**: 375-379

- Xu W, Bak S, Decker A, Paquette SM, Feyereisen R, Galbraith DW** (2001) Microarray-based analysis of gene expression in very large gene families: the cytochrome P450 gene superfamily of *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **272**: 61-74
- Yazaki J, Kishimoto N, Nakamura k, Fujii F, Shimbo K, Otsuka Y, Wu J, Yamamoto K, Sakata K, Sasaki T** (2000) Embarking on rice functional genomics via cDNA microarray : use of 3' UTR probe specific gene expression analysis. *DNA research* **7**: 367-370
- Yokoyama T, Kodama N, Aoshima H, Izu H, Matsushita K, Yamada M** (2001) Cloning of a cDNA for a constitutive NRT1 transporter from soybean and comparison of gene expression of soybean NRT1 transporters. *Biochimica et Biophysica Acta* **1518**: 79-86
- Zhou JJ, Fernandez E, Galvan A, Miller AJ** (2000a) A high affinity nitrate transport system from *Chlamydomonas* requires two gene products. *FEBS Letters* **466**: 225-227
- Zhou JJ, Theodoulou FL, Muldin I, Ingemarsson B, Miller AJ** (1998) Cloning and functional characterization of a *Brassica napus* transporter that is able to transport nitrate and histidine. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 12017-12023
- Zhou JJ, Trueman LJ, Boorer KJ, Theodoulou FL, Forde BG, Miller AJ** (2000b) A high affinity fungal nitrate carrier with two transport mechanisms. *J Biol Chem* **275**: 39894-39899
- Zhuo DG, Okamoto M, Vidmar JJ, Glass ADM** (1999) Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (*Nrt2;1At*) in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **17**: 563-568
- Zimmermann U, Schneider H, Wegner LH, Haase A** (2004) Water ascent in tall trees: does evolution of let plants rely on a highly metastable state? *New Phytologist* **162**: 575-615
- Zimmermann U, Schneider H, Wegner LH, Wagner HJ, Szimtenings M, Haase A, Bentrup FW** (2002) What are the driving forces for water lifting in the xylem conduit? *Physiologia Plantarum* **114**: 327-335

## **-RESUME-**

L'objectif du travail a été d'initier une approche de génomique fonctionnelle sur la famille *PTR* chez *Arabidopsis thaliana*. Après analyse *in silico*, 51 gènes *PTR*, dont la grande majorité sont inconnus ont été identifiés. Des études d'expression systématiques sur une grande majorité des transporteurs putatifs de  $\text{NO}_3^-$  (*PTR* and *NRT2*) et  $\text{NH}_4^+$  (*AMT*) présents chez *A. thaliana* ont été menées à bien grâce à une membrane basse densité thématique à GST (Gene Sequence Tag). Les résultats de ces études, ainsi que ceux des validations individuelles par Northern blot, montrent que de nombreux gènes *PTR* sont exprimés dans les racines, où certains sont régulés au niveau transcriptionnel par (i) la nature de la source de N (ii) le statut nutritionnel en N de la plante (iii) la lumière et les sucres et (iv) la nutrition potassique.

La suite du travail s'est focalisée sur l'analyse fonctionnelle d'*AtNRT1.2* et *AtNRT1.5*. L'étude d'un mutant KO d'*AtNRT1.2* a confirmé qu'*AtNRT1.2* joue un rôle important dans la composante constitutive du système d'absorption à faible affinité de  $\text{NO}_3^-$ . Les résultats obtenus avec *AtNRT1.5* se sont révélés très originaux. L'expression de ce gène est essentiellement localisée dans la stèle de la racine. De plus, le mutant KO est affecté dans l'exportation du nitrate des racines vers les parties aériennes, plus particulièrement en conditions de nutrition mixte ( $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ). *AtNRT1.5* est le premier transporteur identifié comme étant directement impliqué dans cette étape cruciale. L'hypothèse avancée pour la fonction de ce transporteur est qu'il favorise la sécrétion de  $\text{NO}_3^-$  dans le xylème en assurant la ré-absorption de cet ion par les cellules du parenchyme de la stèle. Par ailleurs, nous avons identifié des reprogrammations importantes de l'expression des autres transporteurs *PTR* et *AMT* provoqués par la mutation d'*AtNRT1.5*. La signification de ces réponses moléculaires reste encore à explorer.

Mots clés : *Arabidopsis thaliana*, famille multigénique, *PTR*, *NRT2*, *AMT*, transcriptome, *AtNRT1.1*, *AtNRT1.2*, *AtNRT1.5*, flux de  $\text{NO}_3^-$ , translocation.

## **-ABSTRACT-**

The aim of this work was to initiate a functional genomic approach in order to characterize the *Arabidopsis thaliana* *PTR* gene family. An *in silico* analysis allows us to identify 51 *PTR* genes. The functions of most of these genes remains unknown. Transcript profiling of a large number of putative  $\text{NO}_3^-$  transporters (*PTR* and *NRT2* family) and  $\text{NH}_4^+$  (*AMT* family) has been done using a dedicated GST (Gene Sequence Tag) macro-array. A large numbers of *PTR* genes are expressed in roots. Some *PTR* genes are regulated by the N source, the N status, light and sugars or potassium availability.

The functions of two genes *AtNRT1.2* and *AtNRT1.5* have been investigated using KO mutants. The phenotype of *AtNRT1.2* mutant confirms a role of the gene in cLATS (constitutive Low Affinity Transport System) of nitrate. Results concerning *AtNRT1.5* show that the gene has a unique role in nitrate transport. The *AtNRT1.5* transcript accumulation is localized specifically in root stele. Inactivation of *AtNRT1.5* is correlated with a deficiency in the export of  $\text{NO}_3^-$  from root to shoot when plants are grown on  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  as sole N source. *AtNRT1.5* is the 1<sup>st</sup>  $\text{NO}_3^-$  transporter known to be involved in this function. This influx transporter may favor the  $\text{NO}_3^-$  secretion into the xylem sap by reabsorbing ions present in the apoplasm into the stele symplasm. Transcript profiles of the mutant and the wild type have been compared using the dedicated macro-array. Inactivation of *AtNRT1.5* has important consequences on the expression of *PTR* and *AMT* genes. The significance of these molecular responses remains to be understood.

Key words : *Arabidopsis thaliana*, multigenic family, *PTR*, *NRT2*, *AMT*, transcriptome, *AtNRT1.1*, *AtNRT1.2*, *AtNRT1.5*, flux de  $\text{NO}_3^-$ , translocation.

## **-RESUME-**

L'objectif du travail a été d'initier une approche de génomique fonctionnelle sur la famille *PTR* chez *Arabidopsis thaliana*. Après analyse *in silico*, 51 gènes *PTR*, dont la grande majorité sont inconnus ont été identifiés. Des études d'expression systématiques sur une grande majorité des transporteurs putatifs de  $\text{NO}_3^-$  (*PTR* and *NRT2*) et  $\text{NH}_4^+$  (*AMT*) présents chez *A. thaliana* ont été menées à bien grâce à une membrane basse densité thématique à GST (Gene Sequence Tag). Les résultats de ces études, ainsi que ceux des validations individuelles par Northern blot, montrent que de nombreux gènes *PTR* sont exprimés dans les racines, où certains sont régulés au niveau transcriptionnel par (i) la nature de la source de N (ii) le statut nutritionnel en N de la plante (iii) la lumière et les sucres et (iv) la nutrition potassique.

La suite du travail s'est focalisée sur l'analyse fonctionnelle d'*AtNRT1.2* et *AtNRT1.5*. L'étude d'un mutant KO d'*AtNRT1.2* a confirmé qu'*AtNRT1.2* joue un rôle important dans la composante constitutive du système d'absorption à faible affinité de  $\text{NO}_3^-$ . Les résultats obtenus avec *AtNRT1.5* se sont révélés très originaux. L'expression de ce gène est essentiellement localisée dans la stèle de la racine. De plus, le mutant KO est affecté dans l'exportation du nitrate des racines vers les parties aériennes, plus particulièrement en conditions de nutrition mixte ( $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ). *AtNRT1.5* est le premier transporteur identifié comme étant directement impliqué dans cette étape cruciale. L'hypothèse avancée pour la fonction de ce transporteur est qu'il favorise la sécrétion de  $\text{NO}_3^-$  dans le xylème en assurant la ré-absorption de cet ion par les cellules du parenchyme de la stèle. Par ailleurs, nous avons identifié des reprogrammations importantes de l'expression des autres transporteurs *PTR* et *AMT* provoqués par la mutation d'*AtNRT1.5*. La signification de ces réponses moléculaires reste encore à explorer.

Mots clés : *Arabidopsis thaliana*, famille multigénique, *PTR*, *NRT2*, *AMT*, transcriptome, *AtNRT1.1*, *AtNRT1.2*, *AtNRT1.5*, flux de  $\text{NO}_3^-$ , translocation.

## **-ABSTRACT-**

The aim of this work was to initiate a functional genomic approach in order to characterize the *Arabidopsis thaliana* *PTR* gene family. An *in silico* analysis allows us to identify 51 *PTR* genes. The functions of most of these genes remains unknown. Transcript profiling of a large number of putative  $\text{NO}_3^-$  transporters (*PTR* and *NRT2* family) and  $\text{NH}_4^+$  (*AMT* family) has been done using a dedicated GST (Gene Sequence Tag) macro-array. A large numbers of *PTR* genes are expressed in roots. Some *PTR* genes are regulated by the N source, the N status, light and sugars or potassium availability.

The functions of two genes *AtNRT1.2* and *AtNRT1.5* have been investigated using KO mutants. The phenotype of *AtNRT1.2* mutant confirms a role of the gene in cLATS (constitutive Low Affinity Transport System) of nitrate. Results concerning *AtNRT1.5* show that the gene has a unique role in nitrate transport. The *AtNRT1.5* transcript accumulation is localized specifically in root stele. Inactivation of *AtNRT1.5* is correlated with a deficiency in the export of  $\text{NO}_3^-$  from root to shoot when plants are grown on  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  as sole N source. *AtNRT1.5* is the 1<sup>st</sup>  $\text{NO}_3^-$  transporter known to be involved in this function. This influx transporter may favor the  $\text{NO}_3^-$  secretion into the xylem sap by reabsorbing ions present in the apoplasm into the stele symplasm. Transcript profiles of the mutant and the wild type have been compared using the dedicated macro-array. Inactivation of *AtNRT1.5* has important consequences on the expression of *PTR* and *AMT* genes. The significance of these molecular responses remains to be understood.

Key words : *Arabidopsis thaliana*, multigenic family, *PTR*, *NRT2*, *AMT*, transcriptome, *AtNRT1.1*, *AtNRT1.2*, *AtNRT1.5*, flux de  $\text{NO}_3^-$ , translocation.