



HAL
open science

Multi-faceted and integrated approaches to unravel water flows and water status in plant roots, under stationary and transient conditions

Yann Boursiac

► **To cite this version:**

Yann Boursiac. Multi-faceted and integrated approaches to unravel water flows and water status in plant roots, under stationary and transient conditions. Life Sciences [q-bio]. Université Montpellier, 2024. tel-04780179

HAL Id: tel-04780179

<https://hal.inrae.fr/tel-04780179v1>

Submitted on 13 Nov 2024

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.

Mémoire en vue de l'obtention de l'HDR auprès de l'école doctorale GAIA, Université Montpellier

**Approches biophysiques, moléculaires, et
de modélisation pour l'étude des flux
racinaire d'eau en conditions
stationnaires et transitoires**

Yann BOURSIAC

Chercheur INRAE au laboratoire IPSiM, Montpellier

C'est une lettre de l'alphabet.

C'est également une substance essentielle.

Sans elle le manuscrit et le travail qui suivent n'existeraient pas.

Elle est faite de deux H et d'un air respiré. Elle effectue un cycle en s'élevant de la mer vers les nuages, puis en chutant sur terre en altitude et en plaines, en averses de pluie, de neige, de glace. Elle dévale ensuite les reliefs et les vallées jusqu'à revenir à la mer. Entre-temps, les plantes, les bactéries et maints uni- et pluri-cellulaires la prélèvent et s'en servent afin de vivre et se perpétuer.

Dans cette entité se succèdent certains aspects des cycles majeurs de la vie : Krebs, Calvin, Linnen. Chez les plantes, elle emmène les nutriments des racines vers les feuilles et les puits, par la sève brute et le xylème. Plus tard elle emmènera les sucres, les ARNs, les petits peptides. Elle aide à réguler les cellules de garde et les échanges gazeux. Elle est nécessaire à la turgescence, l'ajustement de la température, elle sert à la structure.

Bref, indispensable à la vie, mais pas à ce texte !

" Je déclare avoir respecté, dans la conception et la rédaction de ce mémoire d'HDR, les valeurs et principes d'intégrité scientifique destinés à garantir le caractère honnête et scientifiquement rigoureux de tout travail de recherche, visés à l'article L.211-2 du Code de la recherche et énoncés par la Charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et la Charte d'intégrité scientifique de l'Université de Montpellier. Je m'engage à les promouvoir dans le cadre de mes activités futures d'encadrement de recherche."

TABLE DES MATIERES

Table des Matieres.....	5
CV	7
I. FORMATION	8
II. EXPERIENCES de la RECHERCHE	8
III. ENSEIGNEMENT, DIFFUSION des CONNAISSANCES	9
IV. Participations scientifiques orales	9
Liste des publications	11
Autres valorisations des produits de la recherche	13
ABBREVIATIONS.....	14
TRAVAUX ANTERIEURS.....	15
I. Influences de l’architecture sur la conductance de couche limite	16
II. Dissection moléculaire de l’hydraulique de la feuille et des vaisseaux.....	16
1. Rôles des aquaporines de la feuille chez Arabidopsis.....	16
III. Impact d’une altération des vaisseaux du xylème sur l’hydraulique de la plante.....	19
IV. Mécanismes de régulation du transport racinaire d’eau	19
1. Le NaCl régule les aquaporines de la racine à plusieurs niveaux.....	19
2. Les espèces activées d’oxygène régissent le transport d’eau racinaire	21
3. Génétique quantitative de l’hydraulique de la racine chez Arabidopsis.....	22
V. Projets scientifiques du premier stage post-doctoral	24
1. Etude du phénotype d’un mutant de 2 pompes calciques vacuolaires : <i>ACA4</i> et <i>ACA11</i>	24
2. Crible génétique d’une suppression des lésions chez <i>aca4/11</i>	26
3. Mise au point de la technique Caméleon pour l’étude des signaux calciques.....	27
VI. Caractérisation de la famille des NPF chez Arabidopsis.....	27
CONTRATS DE RECHERCHE, supervision des travaux, collaborations.....	29
I. CONTRATS de Recherche obtenus.....	30
II. Etudiants et CDD encadrés.....	31
III. Principales Collaborations.....	34
1. En cours (projets financés ou non)	34
2. Passées.....	34
Responsabilités collectives.....	35
Projets de recherche récents, en cours,.....	36

à venir.....	36
I. Fonctionnement hydraulique intégré de la racine chez Arabidopsis.....	37
1. Etat des lieux	37
2. Rootbarriers.....	41
3. Modélisations	42
4. Perspectives de l'axe	50
II. Du signal physique au signal biologique de la contrainte hydrique.....	52
1. Contexte : Le Languedoc Roussillon et la contrainte hydrique.....	52
2. Carte dynamique des signalisations précoces de la contrainte hydrique.....	54
3. Projet WATERMARKERS.....	55
4. Perspectives de l'axe	58
Bibliographie.....	62

CV

I. FORMATION

2005	Doctorat de Biologie Végétale	Supagro/ Université Montpellier 2
2002	DEA Biologie Végétale (rang: 1 ^{er})	Supagro/ Université Montpellier 2
2001	Maîtrise de Biologie (rang: 1 ^{er})	Université Toulouse 3
2000	Licence de Biologie (rang: 7 ^{ème})	Université Toulouse 3

II. EXPERIENCES DE LA RECHERCHE

2013-	Chargé de recherche	INRAE, Montpellier
<u>Objectif de recherche</u> : Fonctionnement hydraulique intégré de la racine chez Arabidopsis, perception de la contrainte hydrique		
2012-2013	Post-Doc	INRA, Montpellier
<u>Objectif de recherche</u> : Découverte du rôle de la famille des transporteurs « Nrt1/Ptr Family » chez Arabidopsis		
<u>Réalisations</u> : 3 publications, mise au système d'un crible fonctionnel après expression hétérologue, banque de mutants chez Arabidopsis		
2011-2014	Auto-entrepreneur	
<u>Objectif</u> : création de prototypes pour l'amélioration des mesures expérimentales		
2010-2011	ATER	Université Montpellier 2
<u>Objectif de recherche</u> : modélisation et dissection moléculaire des transports d'eau et de CO ₂ dans les feuilles et les racines		
<u>Réalisations</u> : une publication scientifique, organisation d'un congrès, obtention de financements		
2008-2010	Post-Doc	CNRS, Montpellier
<u>Objectif du projet</u> : identifier les éléments déterminant le transport d'eau et de CO ₂ dans les feuilles		
<u>Réalisations</u> : deux publications scientifiques, encadrement de deux stagiaires M2, participation à deux congrès internationaux, création d'un prototype de mesure		
2006-2008	Post-Doc	University of Nevada Reno, USA
<u>Objectifs du projet</u> : comprendre le rôle du calcium dans la réponse des plantes à l'environnement		
<u>Réalisations</u> : deux publications scientifiques, encadrement d'une stagiaire L1, invitation à un congrès européen, bourse de voyage lors d'un congrès international		

2002-2005 Thèse-Monitorat

Université Montpellier 2

Objectif de recherche: étudier la régulation du transport d'eau par l'environnement dans les racines

Réalisations: cinq publications scientifiques, participation à deux congrès internationaux, obtention d'une bourse de thèse, prix « jeune chercheur »

III. ENSEIGNEMENT, DIFFUSION DES CONNAISSANCES

En cours	Interventions, 15h environ par an, dans le cadre de la formation Master « Biologie des Plantes pour l'Agro-environnement », sur l'architecture hydraulique des plantes, la modélisation et la biophysique Ecole thématique du master BiPa, école d'été internationale MISTRAL : Ateliers pratique de mesure du transport d'eau dans les plantes Accueil d'étudiants de classe préparatoire en TIPE, participation à des modules de vulgarisation par des étudiants de l'Université Montpellier, de la Cité des Sciences et de l'Industrie
2015	Cours de 1h : Formation de la biomasse végétale. Ecole doctorale SINCHEM et journée du labex Chemisyst, Montpellier.
2010-2011	ATER, Université Montpellier II : plus de 100h d'enseignements en Biologie/ Physiologie Végétale du L2 au M2 Co-organisation du workshop « Transmembrane Water Transport in Plants », 16h de cours et TP à des doctorants et post-doctorants
2004, 2008	Animation d'un stand CNRS pour la journée de la Science, « Découverte de la transpiration chez les plantes », Nîmes Animation de la Caravane des Sciences dans l'Aude et en Lozère lors de la Fête des Sciences durant une semaine, « De l'ADN à la plante entière ». Ateliers de 2h présentés à des collégiens de 3 ^{ème} .
2002-2005	Moniteur à l'Université Montpellier 2, 64h équivalent TD/an, animation de TD et TP en Physiologie Moléculaire des Plantes

IV. PARTICIPATIONS SCIENTIFIQUES ORALES

2023	Présentation invitée , INUPRAG symposium on integrative biology, Umeå, Sweden Présentation sélectionnée , MiFoBio, Giens, France
-------------	---

2022 Discussion leader, Gordon Conference on Salt and Water Stress, Les Diablerets, Switzerland

Séminaire invité, CIALE, Salamanca, Spain

Présentation, Journées du GDR PhyP (biophysique et biomécanique des plantes), Carry le Rouet, France

2020 Présentation invitée, iCROP 2020 Phenotyping and modelling side event, Montpellier, France

2019 Présentation invitée, Plant Apoplastic Diffusion Barriers meeting, Bonn, Germany

Présentation sélectionnée, Plant Biomechanics summer school, Udine, Italy

2018 Présentation invitée, Journées Netbio, Montpellier, France

Présentation/organisation, Workshop on Turgor Pressure, Montpellier, France

Présentation sélectionnée, First International Plant Systems Biology meeting, Roscoff, France

2017 Présentation, Plants Biophysics and Biomechanics workshop, Marseille, France

Présentation sélectionnée, Modeling workshop, Montpellier, France

2016 Présentation sélectionnée, Gordon Conference on Salt and Water Stress, Les Diablerets, Suisse

2015 Conférencier invité, Modeling workshop, Montpellier, France

Présentation sélectionnée, Plant Apoplastic Diffusion Barriers meeting, Nantes, France

2013 Conférencier invité

Journée du LabEx Chemisyst, Avignon, France

2012 Conférencier invité

Università della Basilicata, Potenza, Italie

2011 Conférencier invité

3rd European Calcium Workshop, Seix, France

Participation aux comités de lecture des revues Scientific reports, Plant Cell Signaling and Behaviour, FEBS letter, Journal of Experimental Botany, Plant Physiology et The Plant Journal, Frontiers in Plant Science

LISTE DES PUBLICATIONS

- Boursiac Y, Bauget F (2023) Do roots need a good haircut for water uptake? *New Phytologist* *nph.19336*, [10.1111/nph.19336](https://doi.org/10.1111/nph.19336)
- Crabos A, Huang Y, Boursat T, Maurel C, Ruffel S, Krouk G, Boursiac Y (2023) Distinct early transcriptional regulations by turgor and osmotic potential in the roots of *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* *74*: 5917–5930, <https://doi.org/10.1093/jxb/erac307>, <https://hal.inrae.fr/hal-04193805v1>
- Bauget F., Protto V., Pradal C., Boursiac Y., Maurel C. (2023). A root functional-structural model allows to assess effects of water deficit on water and solute transport parameters. *Journal of Experimental Botany*, , erac471, <https://dx.doi.org/10.1093/jxb/erac471>, <https://hal.inrae.fr/hal-03915413>, OA
- Boursiac Y., Protto V., Rishmawi L., Maurel C. (2022). Experimental and conceptual approaches to root water transport. *Plant and Soil*, *478* (1-2), 349-370, <https://dx.doi.org/10.1007/s11104-022-05427-z>, <https://hal.inrae.fr/hal-03688082>, OA
- Boursiac Y., Pradal C., Bauget F., Lucas M., Delivorias S., Godin C., Maurel C. (2022-06-16). Phenotyping and modeling of root hydraulic architecture reveal critical determinants of axial water transport. *Plant Physiology*, *190* (2), 1289-1306, <https://dx.doi.org/10.1093/plphys/kiac281>, <https://hal.inrae.fr/hal-03701955>, OA
- Pascut F., Couvreur V., Dietrich D., Leftley N., Reyt G., Boursiac Y., Calvo-Polanco M., Casimiro I., Maurel C., Salt D., Draye X., Wells D., Bennett M., Webb K. (2021-12). Non-invasive hydrodynamic imaging in plant roots at cellular resolution. *Nature Communications*, *12* (1), <https://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-24913-z>, <https://hal.inrae.fr/hal-03418637>, OA
- Reyt G., Ramakrishna P., Salas-González I., Fujita S., Love A., Tiemessen D., Lapierre C., Morreel K., Calvo-Polanco M., Flis P., Geldner N., Boursiac Y., Boerjan W., George M., Castrillo G., Salt D. (2021-12). Two chemically distinct root lignin barriers control solute and water balance. *Nature Communications*, *12*, 2320, <https://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-22550-0>, <https://hal.inrae.fr/hal-03202734>, OA
- Calvo-polanco M., Ribeyre Z., Dauzat M., Reyt G., Hidalgo-shrestha C., Diehl P., Frenger M., Simonneau T., Muller B., Salt D., Franke R., Maurel C., Boursiac Y. (2021). Physiological roles of Casparian strips and suberin in the transport of water and solutes.. *New Phytologist*, , <https://dx.doi.org/10.1111/nph.17765>, <https://hal.inrae.fr/hal-03373045>, OA
- Léran S., Noguero M., Corratgé-Faillie C., Boursiac Y., Brachet C., Lacombe B. (2020). Functional Characterization of the *Arabidopsis* Abscisic Acid Transporters NPF4.5 and NPF4.6 in *Xenopus* Oocytes. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 44, <https://dx.doi.org/10.3389/fpls.2020.00144>, <https://hal.inrae.fr/hal-02498980>, OA
- Wang P., Calvo-Polanco M., Reyt G., Barberon M., Champeyroux C., Santoni V., Maurel C., Franke R., Ljung K., Novak O., Geldner N., Boursiac Y., Salt D. (2019-12). Surveillance of cell wall diffusion barrier integrity modulates water and solute transport in plants. *Scientific Reports*, *9* (1), 4227, <https://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-40588-5>, <https://hal.inrae.fr/hal-02118884>, OA
- Beauzamy L., Fourquin C., Dubrulle N., Boursiac Y., Boudaoud A., Ingram G. (2016-06-10). Endosperm turgor

pressure decreases during early Arabidopsis seed development.. *Development (Cambridge, England)*, 143 (18), 3295-3299, <https://dx.doi.org/10.1242/dev.137190>, <https://hal.inrae.fr/hal-01354252>, OA

Shahzad Z., Canut M., Tournaire-Roux C., Martiniere A., Boursiac Y., Loudet O., Maurel C. (2016). A potassium-dependent oxygen sensing pathway regulates plant root hydraulics. *Cell*, 167 (1), 87-98, <https://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.068>, <https://hal.inrae.fr/hal-01417732>, OA

Maurel C., Boursiac Y., Luu D., Santoni V., Shahzad Z., Verdoucq L. (2015). Aquaporins in Plants.. *Physiological Reviews*, 95 (4), 1321-58, <https://dx.doi.org/10.1152/physrev.00008.2015>, <https://hal.inrae.fr/hal-01282576>

Sade N., Shatil-Cohen A., Attia Z., Maurel C., Boursiac Y., Kelly G., Granot D., Yaaran A., Lerner S., Moshelion M. (2014-10-31). The Role of Plasma Membrane Aquaporins in Regulating the Bundle Sheath-Mesophyll Continuum and Leaf Hydraulics. *Journal of Plant Physiology*, 166 (3), 1609-20, <https://dx.doi.org/10.1104/pp.114.248633>, <https://hal.inrae.fr/hal-01137644>, OA

Léran S., Garg B., Boursiac Y., Corratgé-Faillie C., Brachet C., Tillard P., Gojon A., Lacombe B. (2014-11-30). AtNPF5.5, a nitrate transporter affecting nitrogen accumulation in Arabidopsis embryo. *Scientific Reports*, 5, 7962, <https://dx.doi.org/10.1038/srep07962>, <https://hal.inrae.fr/hal-01141003>, OA

Prado K., Boursiac Y., Tournaire-Roux C., Monneuse J.-M., Postaire O., da Ines O., Schäffner A. R., Hem S., Santoni V., Maurel C. (2013-03). Regulation of Arabidopsis leaf hydraulics involves light-dependent phosphorylation of aquaporins in veins.. *The Plant cell*, 25 (3), 1029-39, <https://dx.doi.org/10.1105/tpc.112.108456>, <https://hal.inrae.fr/hal-00921030>, OA

Boursiac Y., Léran S., Corratgé-Faillie C., Gojon A., Krouk G., Lacombe B. (2013-06). ABA transport and transporters.. *Trends in Plant Science*, 18 (6), 325-33, <https://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2013.01.007>, <https://hal.inrae.fr/hal-00860434>

Sutka M., Li G., Boudet J., Boursiac Y., Doumas P., Maurel C. (2011-03). Natural variation of root hydraulics in Arabidopsis grown in normal and salt-stressed conditions.. *Plant Physiology*, 155 (3), 1264-76, <https://dx.doi.org/10.1104/pp.110.163113>, <https://hal.inrae.fr/hal-00576512>, OA

Lefebvre V., Fortabat M.-N., Ducamp A., North H. M., Maia-Grondard A., Trouverie J., Boursiac Y., Mouille G., Durand-Tardif M. (2011). ESKIMO1 disruption in Arabidopsis alters vascular tissue and impairs water transport.. *PLoS ONE*, 6 (2), e16645, <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0016645>, <https://hal.inrae.fr/hal-00593947>, OA

Boursiac Y., Lee S. M., Romanowsky S., Blank R., Sladek C., Chung W. S., Harper J. F. (2010). Disruption of the vacuolar calcium-ATPases in Arabidopsis results in the activation of a salicylic acid-dependent programmed cell death pathway.. *Plant Journal*, 154 (3), 1158-71, <https://dx.doi.org/10.1104/pp.110.159038>, <https://hal.inrae.fr/hal-01172135>, OA

Postaire O., Tournaire C., Grondin A., Boursiac Y., Morillon R., Schäffner A. R., Maurel C. (2010-03). A PIP1 aquaporin contributes to hydrostatic pressure-induced water transport in both the root and rosette of Arabidopsis.. *Plant Physiology*, 152 (3), 1418-30, <https://dx.doi.org/10.1104/pp.109.145326>, <https://hal.inrae.fr/hal-00508425>, OA

Boursiac Y., Boudet J., Postaire O., Luu D.-T., Tournaire-Roux C., Maurel C. (2008-06-20). Stimulus-induced down-regulation of root water transport involves reactive oxygen species-activated cell signalling and plasma membrane intrinsic protein internalization.. *Plant Journal*, 56 (2), 207-218, <https://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03594.x>, <https://hal.inrae.fr/hal-00330107>, OA

Boursiac Y., Prak S., Boudet J., Postaire O., Luu D., Tournaire-Roux C., Santoni V., Maurel C. (2008). The response of Arabidopsis root water transport to a challenging environment implicates reactive oxygen species- and phosphorylation-dependent internalization of aquaporins. *Plant Signaling and Behavior*, 3 (12), 1096-1098, <https://dx.doi.org/10.4161/psb.3.12.7002>, <https://hal.inrae.fr/hal-02661016>, OA

C. Vander W., Postaire O., Tounaire-Roux C., Boursiac Y., Maurel C. (2006). Expression and inhibition of aquaporins in germinating Arabidopsis seeds. *Plant and Cell Physiology*, 47, 1241-1250, <https://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcj094>, <https://hal.inrae.fr/hal-00098217>, OA

Boursiac Y., Chen S., Luu D.T., Sorieul M., van den Dries N., Maurel C. (2005). Early effects of salinity on water transport in Arabidopsis roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiology*, 139, 790-805, <https://dx.doi.org/10.1104/pp.105.065029>, <https://hal.inrae.fr/hal-00086138>, OA

AUTRES VALORISATIONS DES PRODUITS DE LA RECHERCHE

Déclaration d'invention : Système de mesure semi-automatique des propriétés hydrauliques d'organes de plantes, INRAE, DI-RV-21-0103, 2021

ABBREVIATIONS

K_{ros}	Conductivité hydraulique de la rosette
Lp_r	Conductivité hydraulique de la racine
L_o	Conductance racinaire
P	Pression de turgescence
Pi ou Π	Pression osmotique

TRAVAUX ANTERIEURS

Résumé :

Les aquaporines sont des protéines canaux centrales du transport de l'eau dans la plante. Au cours de ma thèse, j'ai montré que, chez *Arabidopsis*, la capacité de transport racinaire d'eau (L_{pr}) par le NaCl implique une régulation des aquaporines aux niveaux transcriptionnel, traductionnel et de leur localisation subcellulaire. J'ai également caractérisé la régulation de la L_{pr} en réponse aux espèces activées de l'oxygène, molécules ubiquitaires de la réponse aux stress, et montré que leurs effets impliquent des signalisations nécessitant un influx de calcium et la relocalisation des aquaporines. A la suite de ce travail, j'ai approfondi mes connaissances sur la signalisation calcique par l'étude d'un double mutant de pompes calciques vacuolaires et de son phénotype de lésions. Des approches de physiologie et de génétique de suppression ont mis en évidence le rôle de la nutrition minérale et de l'acide salicylique dans les signalisations activées par le calcium cytosolique. J'ai ensuite retravaillé sur les aquaporines, dans les feuilles cette fois-ci, où j'ai mis en évidence un rôle spécifique de chaque isoforme dans les conductances à l'eau et au CO₂ de la feuille. Le dernier projet précédant mon entrée en fonction en tant que chargé de recherche 1^{ère} classe INRA au sein du laboratoire BPMP (désormais IPSiM) a porté sur la fonction des protéines de la famille NPF, notamment vis-à-vis du transport du nitrate, de peptides et de l'ABA.

Pour une lecture plus efficace, ces travaux sont présentés par cohérence thématique plutôt que dans l'ordre chronologique.

A l'issue de ma formation initiale sanctionnée par une Maîtrise de Biologie Cellulaire et Physiologie à l'Université Paul Sabatier (Toulouse), j'ai souhaité découvrir un aspect peu abordé antérieurement : la physiologie intégrée de la plante. J'ai donc effectué un stage volontaire de 5 mois dans le Laboratoire d'Écophysiologie des Plantes sous Stress Environnementaux (LEPSE, INRA, Montpellier), sous l'encadrement du Dr Thierry Simonneau. L'acquisition de compétences nouvelles en écophysiologie a complété ma formation, très cellulaire, et a fortement influencé l'ensemble de mes projets de recherche par la suite. J'ai ainsi acquis une sensibilité « intégrative » qui constitue un socle important de mon parcours et de mes projets de recherche.

I. INFLUENCES DE L'ARCHITECTURE SUR LA CONDUCTANCE DE COUCHE LIMITE

La conductance de couche limite tempère les transferts de gaz entre l'atmosphère et les stomates. Au LEPSE, j'ai réalisé plusieurs maquettes de rosette d'*Arabidopsis* dont la conductance de couche limite a été mesurée au travers des échanges de chaleur. Il en est ressorti que l'angle d'émergence des feuilles par rapport à la tige influence la conductance de couche limite. Ce stage a également permis d'évaluer et de réduire l'impact de ce paramètre sur la mesure de la conductance stomatique en chambres de cultures.

II. DISSECTION MOLECULAIRE DE L'HYDRAULIQUE DE LA FEUILLE ET DES VAISSEAUX

1. Rôles des aquaporines de la feuille chez *Arabidopsis*

Les aquaporines sont des protéines transmembranaires majeures, présentes dans quasiment toutes les membranes biologiques. Leur implication dans le transport d'eau tant au niveau cellulaire qu'au niveau de l'organe a été démontré (Maurel et al., 2015). L'équipe du Dr Christophe Maurel, au laboratoire IPSiM (anciennement B&PMP) de Montpellier, s'intéresse à la fonction et à la régulation des aquaporines chez les plantes. Un de mes projets post-doctoral dans cette équipe (2008-2011) s'inscrit dans le cadre du projet ANR « LeafFlux » sur la fonction des aquaporines de la feuille. Alors que la conductance des stomates régule les échanges d'eau et de gaz entre la feuille et l'atmosphère, les conductances internes de la feuille à l'eau et au CO₂ déterminent les équilibres hydriques entre tissus. Des variations de la conductance hydraulique interne foliaire (K_{leaf}) peuvent être observées, en réponse à la lumière par exemple, et il semble que les aquaporines interviennent dans ces processus (Cochard et al., 2007). Par ailleurs, la capacité des aquaporines à transporter le CO₂ a été mise en avant par plusieurs groupes. Il a été montré qu'une modification de l'expression de l'aquaporine NtAQP1 affecte la conductance du mésophylle au CO₂ (g_m) et l'activité photosynthétique nette chez le tabac (Flexas et al., 2006; Uehlein et al., 2008). La localisation de NtAQP1 sur l'enveloppe du chloroplaste, bien qu'elle n'ait pas pu être étendue à d'autres espèces pour l'instant, pourrait en être l'une des causes. Il semblerait donc que les aquaporines permettent un couplage moléculaire entre les échanges d'eau et l'assimilation du carbone dans la plante. Le projet LeafFlux visait à tester ces hypothèses en déterminant quel est, chez *Arabidopsis*, le rôle des aquaporines de la feuille dans les conductances internes à l'eau et au CO₂. Ce dernier aspect a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Dr Bernard Genty (laboratoire LEMP, CEA Cadarache).

Mon travail dans ce projet concernait majoritairement l'étude du transport d'eau. Des données transcriptomiques (Alexandersson et al., 2005) et protéomiques (données de l'équipe) avaient mis en évidence l'expression majoritaire de 4 isoformes PIP au niveau des membranes plasmiques des cellules de la feuille : PIP1;2, PIP2;1, PIP2;6 et PIP2;7. Il avait également été montré que la conductance hydraulique de la rosette (K_{ros}) d'*Arabidopsis* est augmentée en condition de nuit prolongée, en partie grâce à une composante sensible au mercure, c'est à dire vraisemblablement aux aquaporines (Maurel et al., 2015). En accord avec cette idée, un mutant invalidé pour le gène *PIP1;2* présente une diminution significative de la K_{ros} en condition de nuit prolongée. J'ai montré que les mutants *pip2;1* et *pip2;6*, mais pas le mutant *pip2;7* ont une K_{ros} réduite en condition de nuit prolongée. En condition de jour, seuls les mutants *pip1;2* et *pip2;6* montrent une tendance à la baisse (Figure 1). Nous avons également complété cette analyse par l'observation du territoire d'expression de ces aquaporines grâce à des fusions promoteur-GUS. Il en ressortit que toutes les aquaporines hormis PIP2;7 sont exprimées au niveau des vaisseaux, ce qui suggérait que la régulation diurnale de la K_{ros} pouvait provenir des cellules entourant les vaisseaux conducteurs.

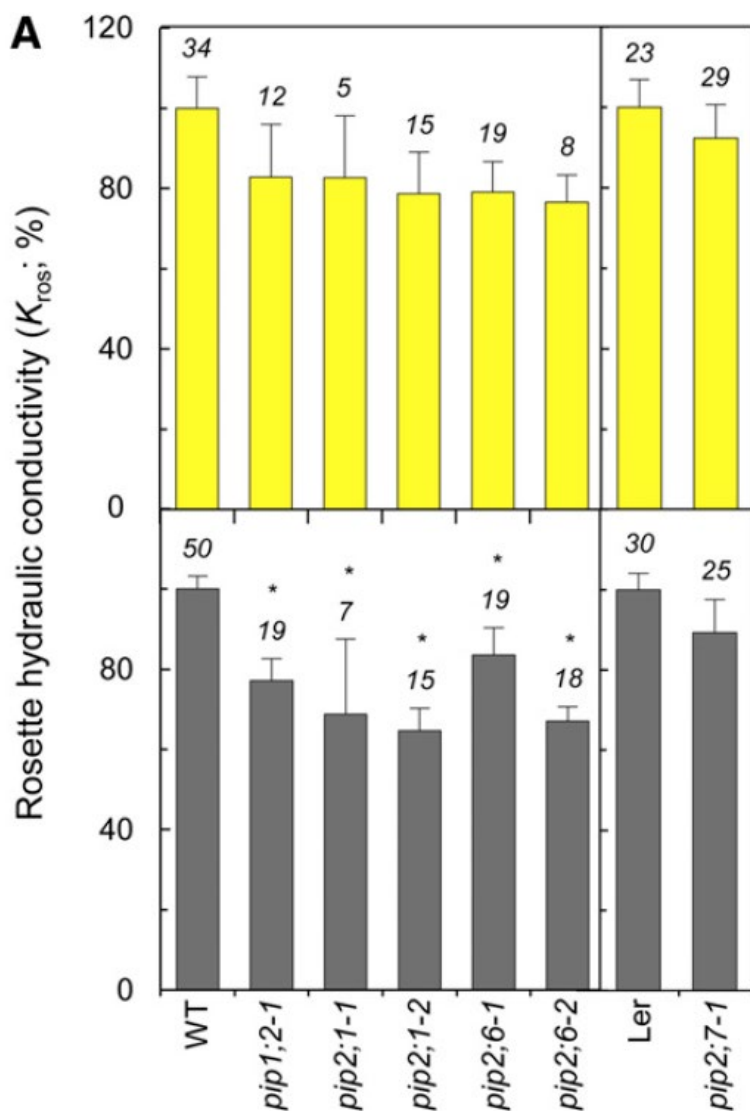


Figure 1 : Effets de la mutation d'isoformes PIP sur la conductivité hydraulique de la rosette d'Arabidopsis (K_{ros}).

Des plantes sauvages ou mutées pour des aquaporines exprimées dans la rosette ont été cultivées en condition de jours longs pendant 20 jours, puis leur K_{ros} a été mesurée à l'aide d'une chambre à pression. Les rosettes ont été prélevées durant la journée ou à après une nuit prolongée d'au minimum 3h supplémentaires. Les * indiquent des différences significatives ($p < 0.05$) par rapport aux plantes sauvages.

Ce travail a été complété par Karine Prado en 2010 lors de son stage de master 2 que j'ai co-encadré, puis pendant le début de sa thèse. Grâce à l'utilisation d'un promoteur spécifique des nervures (pGLDPA), elle a pu mesurer spécifiquement les perméabilités hydriques des cellules de nervures, et montré que l'on retrouve une augmentation de perméabilité en condition de nuit prolongée, de façon similaire à la conductivité hydraulique de la rosette, et à la différence des cellules provenant d'autres tissus (qui montrent, elles, une diminution de leur perméabilité hydrique). De plus, la complémentation du phénotype du mutant *pip2;1* en condition de nuit prolongée par expression de l'aquaporine PIP2;1 sous le contrôle unique du promoteur GLDPA a confirmé le rôle prépondérant des cellules des nervures dans la régulation de la conductivité hydraulique interne des feuilles chez Arabidopsis. Des analyses protéomiques ont également montré que la phosphorylation de résidus de l'extrémité C-terminale de l'aquaporine PIP2;1 intervenaient dans ces régulations. L'ensemble de ce travail a été publié en 2013 dans le journal The Plant Cell (Prado et al., 2013).

Le rôle des aquaporines de la rosette vis-à-vis de l'assimilation du carbone par la plante fut plus difficile à identifier. Au niveau physiologique tout d'abord, l'équipe de Bernard Genty (CEA, Cadarache) a montré que la conductivité des tissus au CO₂ (g_m) était abaissée chez les mutants *pip2;1* et *pip2;6*, mais que cette diminution était systématiquement corrélée à celle de la conductivité stomatique. Ce point rendrait a priori indiscernable un effet spécifique des aquaporines sur le transport de CO₂ par rapport à un effet plus global sur la physiologie de la plante via son action sur le transport d'eau. Au niveau moléculaire, notre équipe a poursuivi deux approches complémentaires. D'une part, des tests en expression hétérologue (dans des ovocytes de Xénope ou en levure) visaient à mesurer l'activité de transport du CO₂ des isoformes d'aquaporines mentionnées ci-dessus. D'autre part, j'ai cherché à vérifier leur présence au niveau des membranes des chloroplastes par des techniques de microscopie, grâce à l'utilisation de constructions d'aquaporines fusionnées à la GFP. Après avoir constaté que des signaux aspécifiques provenant des pigments du chloroplaste parasitent le signal émis par la GFP, j'ai utilisé une méthode basée sur la technique FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) pour différencier ces molécules. En effet, la durée de vie de fluorescence de pigments excités du chloroplaste est généralement inférieure à 1.4 ns (Petrášek et al., 2009) tandis que celle de la GFP est supérieure à 2 ns. Mes données de microscopie biphotonique ont confirmé la distinction possible entre des signaux fluorescents issus de la GFP ou de pigments du chloroplaste. Il est également apparu que la protéine fusion PIP1;2-GFP est bien localisée au niveau des chloroplastes, à la différence de GFP-PIP1;2 ou de fusions entre la GFP et l'isoforme PIP2;1. A la suite des résultats non concluants de la partie physiologique et d'absence de démonstration par l'équipe d'une activité de transport de CO₂ en expression hétérologue, ce volet du projet LeafFlux n'a pas été publié.

III. IMPACT D'UNE ALTERATION DES VAISSEAUX DU XYLEME SUR L'HYDRAULIQUE DE LA PLANTE

En collaboration avec l'équipe de Mylène Durand-Tardif (INRA, Versailles), j'ai caractérisé, en 2009, la capacité de transport racinaire d'eau (ou conductivité hydraulique racinaire, L_p_r) des mutants *esk1*, identifiés initialement comme résistants aux contraintes abiotiques telles que le froid (Xin and Browse, 1998; Bouchabke-Coussa et al., 2008). Ces mutants présentent un défaut d'ouverture stomatique, une forte teneur en ABA en absence de stress, et une L_p_r réduite de près de 80% par rapport aux plantes témoins. Le patron d'expression de ESK1 est associé aux vaisseaux en développement, et une altération de la composition de la paroi a été détectée chez ces mutants. De fait, la structure des vaisseaux du xylème est fortement altérée, ce qui réduit leur conductivité de 80% environ chez *esk1*. Notre modèle actuel suggère que la perte de conductivité des vaisseaux du xylème chez le mutant *esk1* crée un déficit hydrique au niveau des feuilles qui aboutit à la synthèse d'ABA, à la fermeture des stomates et à un phénotype général « de stress ». Cette étude a donc mis en évidence la sensibilité de l'état hydraulique de la plante à une variation des capacités de transport d'eau du xylème (Lefebvre et al., 2011).

IV. MECANISMES DE REGULATION DU TRANSPORT RACINAIRE D'EAU

1. Le NaCl régule les aquaporines de la racine à plusieurs niveaux

Lors de mon arrivée dans l'équipe Aquaporines du laboratoire BPMP en 2002 pour mon stage de DEA, j'ai eu pour objectif de rechercher, chez *Arabidopsis*, un parallèle entre la régulation transcriptionnelle des aquaporines et l'inhibition du transport d'eau racinaire en réponse à un traitement salin. Après une caractérisation biophysique de la racine, j'ai mis en évidence que la conductivité hydraulique racinaire (ou L_p) est ainsi inhibée d'environ 60%, avec un temps de demi-effet ($T_{1/2}$) de l'ordre de 40 min, par 100 mM NaCl (Figure 2A). L'étude parallèle de la régulation transcriptionnelle des aquaporines pendant ce processus a nécessité un effort conséquent de mises au point technologiques et méthodologiques. L'approche choisie fut d'utiliser une membrane de type « macro-array » portant des séquences spécifiques de chacun des 35 gènes d'aquaporines d'*Arabidopsis* mise au point par un chercheur post-doctorant de l'équipe, Sheng Chen. Au final, nous avons pu établir un inventaire des aquaporines exprimées dans la racine d'*Arabidopsis* et observer leur régulation lors d'un traitement salin. La majorité des transcrits d'aquaporines les plus abondants manifestent une inhibition de leur expression après 2h de traitement, qui perdure pendant au moins 24h (Figure 2B). Par Western blot et tests Elisa, j'ai également montré qu'il existe, à moyen terme (>6h), une diminution de la quantité totale d'aquaporines en réponse à 100mM NaCl mais qu'il n'existe pas de réponse coordonnée des différentes isoformes à court terme. D'autres mécanismes de régulation ont été abordés dans le cadre de ce travail. A l'aide de fusions d'aquaporines avec la protéine fluorescente verte (GFP), Doan Luu (CR au laboratoire) a notamment mis en évidence une relocalisation partielle et limitée de ces protéines dans des structures intracellulaires induites par le sel après 2h de traitement. Ce travail a été publié dans la revue *Plant Physiology* en 2005 (Boursiac et al., 2005). Une des conclusions principales de ce travail est que, chez *Arabidopsis*, le sel induit une forte inhibition de la capacité de transport d'eau de la racine dans des temps très courts ainsi qu'une régulation des aquaporines à des niveaux multiples (expression des ARNm, quantité de protéines et localisation subcellulaire). Cependant aucune des régulations moléculaires identifiées n'est à même d'expliquer l'inhibition précoce de la L_p . Ce travail suggère donc qu'il existe d'autres types de régulations des aquaporines, notamment post-traductionnelles, qui sont responsables de la baisse de la L_p dans les 40min suivant le traitement au sel. De fait, des modifications post-traductionnelles des aquaporines d'*Arabidopsis*, comme la phosphorylation et la méthylation, ont été identifiées et leur rôle partiellement mis à jour (Santoni et al., 2003; Prak et al., 2008).

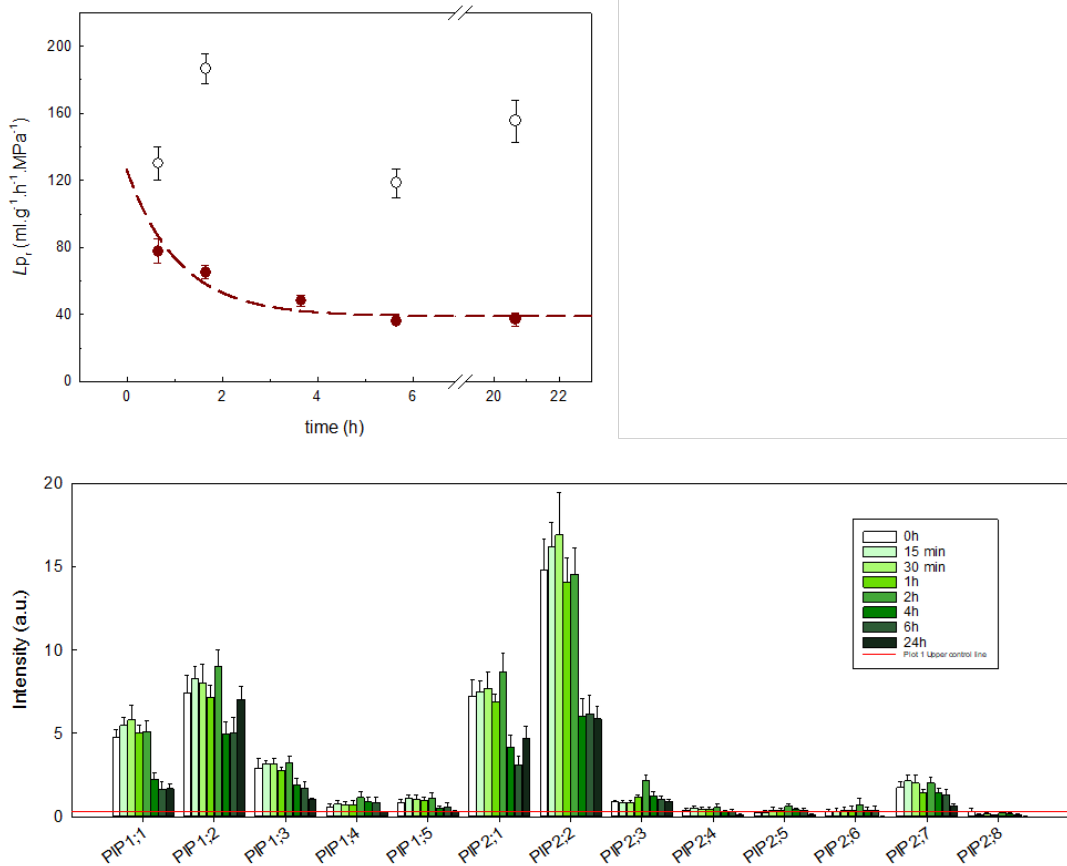


Figure 2: Cinétique des effets d'un traitement par 100mM NaCl sur la conductivité hydraulique (L_p) et l'expression des isoformes PIP dans la racine d'*Arabidopsis*.

2. Les espèces activées d'oxygène régissent le transport d'eau racinaire

Un second aspect de ma thèse fut l'étude d'un autre type de stimulus également lié à des contextes de stress : les espèces activées de l'oxygène, ou ROS (Pei et al., 2000; Overmyer et al., 2003).

J'ai montré qu'un traitement par 10 μM à 8mM de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) inhibe la L_p , en moins de 15 min et jusqu'à 80 % chez *Arabidopsis*. De telles rapidité et amplitude d'inhibition suggèrent un rôle prépondérant des aquaporines dans ces régulations. L'hypothèse d'une action directe des ROS par oxydation des aquaporines a été testée en exprimant fonctionnellement en ovocyte de xénope un membre des familles PIP1 et PIP2 (les aquaporines majoritaires de la membrane plasmique, étape limitante au transport d'eau par les cellules) puis en testant leur sensibilité aux ROS. Il en ressort qu'aucune des isoformes exprimées n'est sensible à une oxydation directe, ce qui suggère que des mécanismes indirects (de signalisation) interviennent dans cette réponse précoce. Une approche pharmacologique montra que l'inhibition du flux d'eau racinaire après traitement par H_2O_2 dépend de l'activité de protéines kinases et d'un influx primaire de calcium depuis l'apoplasme. J'ai également recherché, sans succès, l'implication dans cette réponse de grandes voies de signalisation impliquant des ROS et un influx de calcium. Pour cela, la sensibilité aux ROS du transport d'eau racinaire fut testée chez différentes lignées mutantes, dont *tpc1-2* (muté dans le canal Two Pore Channel, canal calcique vacuolaire dont l'influx de calcium en réponse à H_2O_2 est perdu (Kawano et al.,

2004), et *oxi1*, une protéine kinase impliquée dans l'activation de MAP Kinases en réponse à un traitement par de l' H_2O_2 (Rentel et al., 2004).

Ce travail a ensuite été complété dans l'équipe par Julie Boudet (post-doctorante), Olivier Postaire (thésard) et Doan Luu. Ils ont, d'une part, montré que l'acide salicylique rentre dans le cadre défini ci-dessus en tant qu'inhibiteur de la Lp_r via une production de ROS. D'autre part, dans le contexte d'un traitement salin, un lien causal a été établi entre la production de ROS et la relocalisation des aquaporines dans des structures intracellulaires. L'ensemble de ces données a été publié en 2008 dans la revue *The Plant Journal* (Boursiac et al., 2008a). Au final, ce travail confirme l'importance de la relocalisation des aquaporines dans la régulation du transport d'eau au niveau de la racine. Les partenaires protéiques participant à ce mode de régulation ainsi que les résidus d'aquaporines impliqués restent à découvrir.

Contributions de ma thèse au travail du groupe : Tout d'abord, la mise au point d'un protocole d'hybridation « macro-array » a fourni un outil adéquat de mesure de l'expression des gènes de l'ensemble de la famille des aquaporines d'*Arabidopsis*. Cette technique a ainsi été utilisée dans plusieurs études du groupe pour caractériser les aquaporines exprimées lors de la germination de la graine (Vander Willigen et al., 2006) ou encore chez diverses accessions naturelles d'*Arabidopsis* (Sutka et al., 2011). Mon travail a surtout permis d'établir deux cadres fonctionnels (les traitements par NaCl et H_2O_2), pour analyser la fonction et la régulation des aquaporines racinaires. Ces cadres ont, par exemple, été utilisés pour étudier le rôle de la phosphorylation des aquaporines (Prak et al., 2008) par des techniques de spectrométrie de masse ou la régulation de l'activité des aquaporines par des mécanismes d'internalisation (Boursiac et al., 2008a). Dans son ensemble, mon travail a contribué à bâtir un modèle général de la régulation du transport d'eau racinaire d'eau, en réponse à des contraintes biotiques ou abiotiques (Boursiac et al., 2008b).

3. Génétique quantitative de l'hydraulique de la racine chez *Arabidopsis*

L'analyse par génétique inverse de l'hydraulique racinaire est judicieuse pour intégrer la fonction d'éléments bien identifiés, comme les aquaporines (Javot et al., 2003; Postaire et al., 2010), ou encore des facteurs de la biosynthèse et la déposition de subérine (Baxter et al., 2003; Wang et al., 2019; Calvo-Polanco et al., 2021). Toutefois, des approches complémentaires de génétique quantitative sont pertinentes afin d'identifier sans a priori d'autres déterminants moléculaires de l'hydraulique racinaire. Ce type d'approche est devenu envisageable pour des questions hydrauliques chez *Arabidopsis* après que j'ai créé, entre 2009 et 2011, un système de mesure à moyen débit de la Lp_r (chambres semi-automatiques). Lors de mon séjour post-doctoral dans l'équipe, je me suis attaché à améliorer significativement le débit des mesures en conditions hydrostatiques. L'utilisation de capteurs de flux d'une très grande précision, associée à une régulation automatique de la pression et à une intégration logicielle avancée, a permis d'avoir une mesure semi-automatique de la Lp_r . Le laboratoire s'est progressivement doté de 8 chambres à pression de ce type (Figure 3A) qui ont alors permis jusqu'à 200 mesures par jour (contre une vingtaine auparavant). Cette amélioration vers des mesures à « moyen-débit », a autorisé la mise en place d'approches génétiques plus ambitieuses.

J'ai donc développé, à partir de 2010, un projet visant à utiliser les approches de génétique « forward » et de modélisation pour la découverte des déterminants moléculaires du transport d'eau

dans la racine. Dans l'équipe, une étude pilote (Sutka et al., 2011) avait été réalisée sur un ensemble de 13 accessions, incluant la « core-collection » de 8 accessions de l'INRA de Versailles (McKhann et al., 2004). Ce travail avait mis en évidence la variation de la L_p , d'un facteur 2 environ entre les écotypes les plus contrastés. J'ai alors effectué une première caractérisation de L_p sur 50 lignées recombinantes (RILs) issues du croisement Col0 x Blh1 (Simon et al., 2008). Nous avons ainsi pu observer des variations d'un facteur 8,8 et 3,4 (Figure 3B) ainsi que des héritabilités (h^2) de 0.38 et 0.3 pour, respectivement, la L_o et la L_p . Malgré des effectifs réduits, des relations significatives apparaissent entre certains marqueurs et la L_o ou la L_p (Figure 3C).

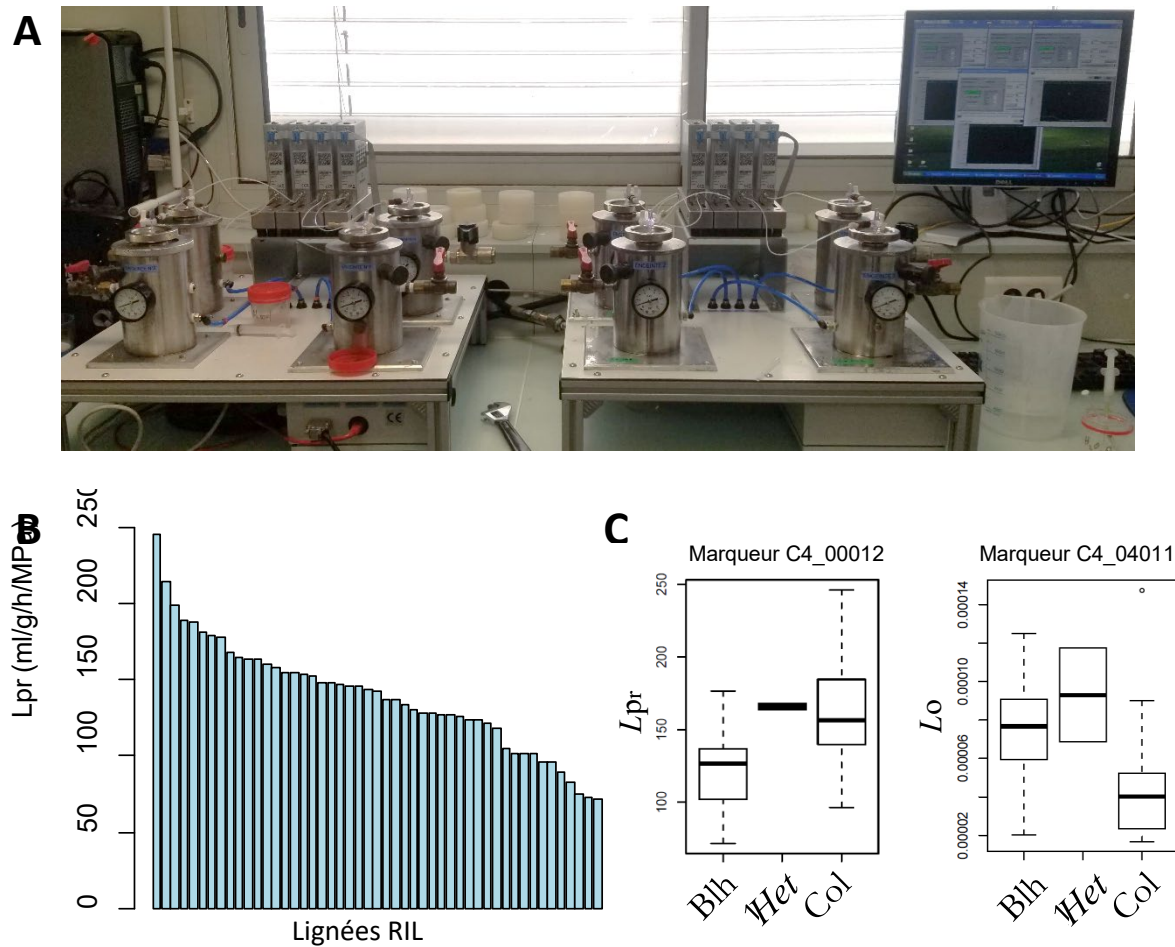


Figure 3 : Etude pilote de la variabilité naturelle de la L_p et L_o chez *Arabidopsis*, mesurées par des chambres à pression semi-automatiques. A, photo du ban actuel des chambres à pression semi-automatiques. B, variabilité de la L_p sur un lot de 50 RILs issues du croisement Col0 x Blh1. C, associations entre la L_p ou la L_o et un marqueur SNP pour les 50 RILs mesurées.

Cette étude préliminaire apporta deux arguments majeurs qui confirmèrent la faisabilité d'une approche de génétique quantitative sur des paramètres aussi précis que la L_o et la L_p . D'une part, l'analyse QTL mettait en évidence l'existence de plusieurs régions du génome déterminant l'hydraulique de la racine ; d'autre part, l'héritabilité observée était faible mais suffisante pour détecter

de manière reproductible le ou les QTLs d'intérêt et s'engager dans leur clonage. Le volet génétique de ce projet avait été réalisé en collaboration avec l'équipe d'Olivier Loudet (INRA, Versailles). Ce travail a notamment permis d'obtenir des financements par l'ANR et Syngenta pour ce projet (Hydroroot). Le Dr Zaigham Shahzad a ainsi poursuivi la caractérisation de populations recombinantes et a identifié plusieurs QTL agissant sur la capacité de transport racinaire d'eau. 2 QTLs ont notamment été cartographiés finement et leur base moléculaire identifiée. Le premier, nommé RHC1, a pu être cloné et code pour une protéine kinase impliquée dans la réponse à l'anoxie et aux carences en potassium (Shahzad et al., 2016). Ce premier travail a ouvert la voie dans l'équipe à une approche de GWAS qui a également pu être menée à terme, avec la caractérisation notamment d'un gène impliqué dans le développement des vaisseaux du xylème (Tang et al., 2018).

V. PROJETS SCIENTIFIQUES DU PREMIER STAGE POST-DOCTORAL

Mes travaux de thèse avaient mis en évidence l'intervention de voies de signalisation dépendantes du calcium et de protéines kinases dans la régulation du transport d'eau racinaire. J'ai voulu approfondir ce thème en développant un projet de recherche au sein du laboratoire du Dr Jeffrey Harper, à l'Université du Nevada à Reno, USA, de 2006 à 2008, afin d'étudier plus en détail les processus de la signalisation calcique.

Le calcium joue un rôle signalétique très important dans la cellule en contribuant à l'activation de nombreuses voies de réponses à des stress biotiques ou abiotiques (Sanders et al., 2002), principalement via une augmentation de sa concentration dans le cytosol ($[Ca^{2+}]_{cyt}$). Une régulation très fine du $[Ca^{2+}]_{cyt}$ est donc nécessaire. Elle est assurée par une soixantaine de canaux, antiporteurs et pompes calciques (Sanders et al., 2002). Très peu de protéines d'efflux ont été décrites en détail, c'est à dire chez les antiporteurs et les pompes calciques. Il est néanmoins établi que les antiporteurs de la famille CAX interviennent plus spécifiquement dans la nutrition calcique alors que les pompes calciques (ACA et ECA, (Baxter et al., 2003), dont l'affinité est plus forte mais la capacité plus faible, assurent la régulation fine de $[Ca^{2+}]_{cyt}$. La famille des ACA (auto-inhibited calcium pumps) compte 10 membres chez *Arabidopsis*. A mon arrivée au laboratoire, la fonction d'une seule pompe ACA, celle de ACA9 dans le grain de pollen (Schjøtt et al., 2004), avait été décrite *in planta*.

1. Etude du phénotype d'un mutant de 2 pompes calciques vacuolaires : ACA4 et ACA11

Mon travail a été basé sur l'analyse de plantes invalidées pour les gènes *ACA4* et *ACA11* tous deux localisés au niveau de la membrane de la vacuole (Geisler et al., 2000; Lee et al., 2007). Le double mutant *aca4/11* montre un phénotype de lésions s'apparentant à une réponse hypersensible (HR), et ce, en l'absence de tout traitement inducteur. La double mutation aboutit ainsi à des plantes de petite taille dont la rosette meurt rapidement (Figure 4A). J'ai identifié une condition nutritive particulière, basée sur une concentration élevée en anions tels que le nitrate, le phosphate ou le chlore, permettant de prévenir l'apparition de lésions chez le double mutant *aca4/11* (Figure 4B). Cela m'a permis de décrire précisément la chronologie d'induction des lésions et de montrer que seules les cellules du mésophile sont à l'origine de nouvelles lésions. Des dosages d'ions par HPLC et ICP n'ont pas mis en évidence de défaut de nutrition en calcium mais plutôt un déficit de stockage des anions, a priori dans la vacuole, lors de l'induction des lésions.

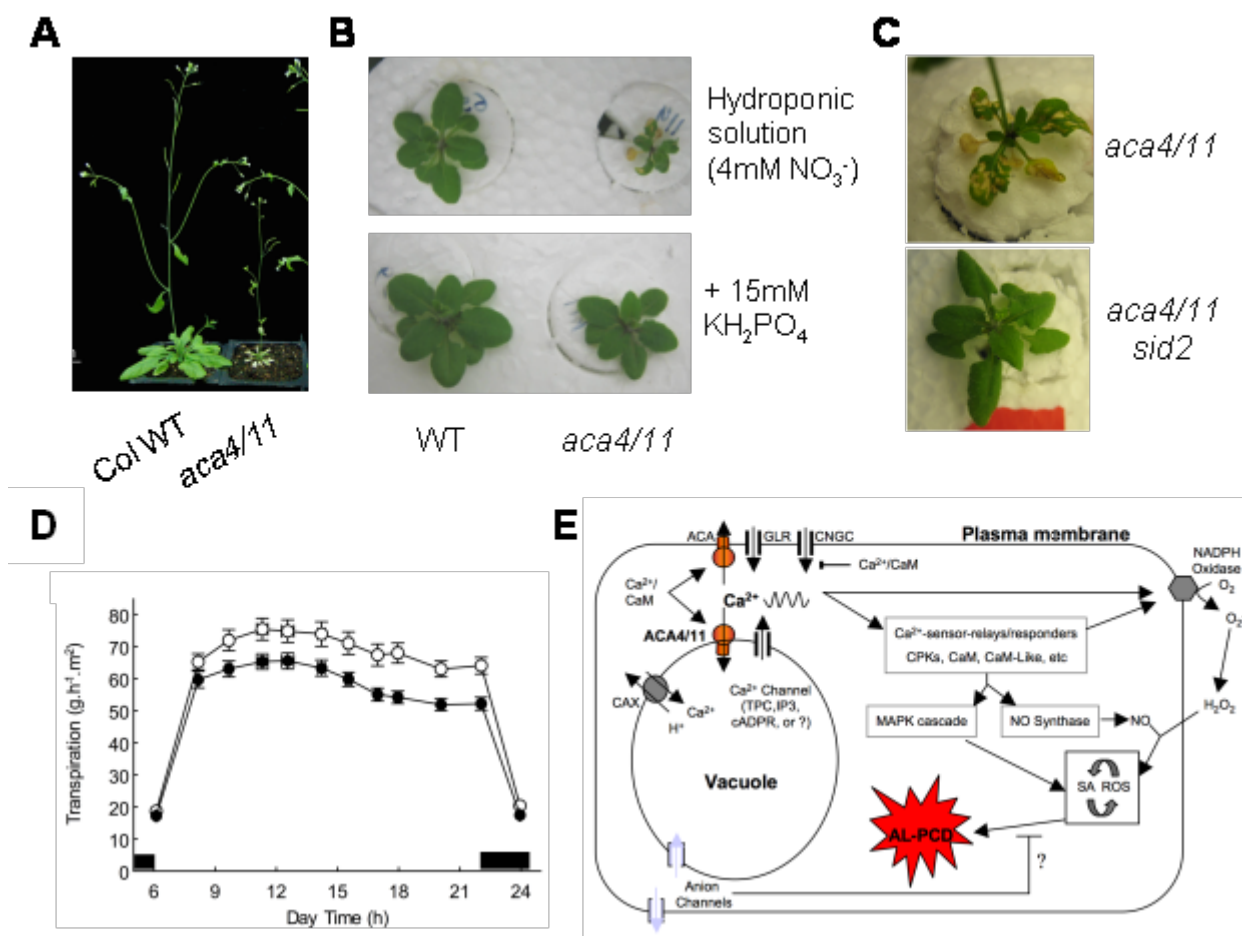


Figure 4 : Etude physiologique et génétique du double mutant de pompes calciques vacuolaires *aca4/11*. A, phénotype de *aca4/11* cultivé en terreau ou B, en solution d'hydroponie complétement en KH₂PO₄. C, phénotype du triple mutant *aca4/11 sid2* (ne synthétisant plus d'acide salicylique). D, phénotype de transpiration d'*aca4/11* (ronds noirs) comparé aux plantes sauvages. E, modèle impliquant les pompes calciques vacuolaires *ACA4* et *11* dans l'homéostasie du calcium cytosolique.

La dissection de voies de signalisation impliquées dans l'apparition du phénotype de HR fut également entreprise par une approche génétique. Nous avons notamment montré que l'acide salicylique est nécessaire à ce processus (Figure 4C) et que l'activité de NADPH oxydases y joue un rôle protecteur. Enfin, dans les conditions d'absence de lésion, des phénotypes de transpiration plus élevée (Figure 4D) ou une résistance accrue à des pathogènes tels que *P. syringae* apparaissent.

En conclusion, ce travail a permis de décrire les effets phénotypiques précis de la mutation des deux pompes calciques de la vacuole. Il a été l'un des premiers, chez Arabidopsis, à mettre au jour le rôle de ce compartiment dans l'homéostasie du calcium dans la cellule, capable de réguler des voies de signalisation aussi diverses que la mort cellulaire programmée ou celles régulant la transpiration. Ce travail a également abouti à la découverte d'une suppression nutritionnelle du phénotype de lésions. L'ensemble de ces données peut être représenté dans le modèle de travail de la figure 4E. La

majeure partie de ces résultats a été publiée en 2010 dans la revue *Plant Physiology* (Boursiac et al., 2010).

2. Crible génétique d'une suppression des lésions chez *aca4/11*

Le volet ci-dessus a prouvé l'existence de « supprimeurs génétiques » des lésions chez *aca4/11*. Une approche génétique de réversion du phénotype a donc été engagée. Des graines *aca4/11* ont été mutagénisées à l'EMS et leur criblage m'a permis d'isoler plusieurs supprimeurs ayant perdu le phénotype de lésions, tout en conservant les mutations *aca4* et *aca11*. Deux supprimeurs, en particulier, montrent un phénotype sauvage (suppresseur 1) de floraison tardive (suppresseur 2) (Figure 5A). Ces plantes *aca4-1/11-1* obtenues dans l'écotype WS, ont été croisées avec le mutant *aca4-3/11-5* d'écotype Columbia. L'analyse de la descendance F1 a conclu à une ségrégation monogénique récessive dans la suppression 1, et à une ségrégation monogénique dominante dans le cas de la suppression 2. J'ai prolongé cette approche jusqu'à l'obtention de plus de 60 lignées F2 indépendantes issues d'un croisement du supprimeur 1 avec *aca4-3/11-5*. Ces analyses ont mis en évidence une liaison génétique de la mutation supprimeur des lésions avec l'allèle *aca4-1* (Figure 5B). Le caractère dominant du supprimeur 2 a nécessité un protocole plus élaboré pour l'obtention de descendance homozygote pour le supprimeur. Cela a donné lieu au stage de Corin Asuzec, alors en 2^{ème} année de Biologie, que j'ai encadré. Son objectif était d'étudier la ségrégation de lésions sur les descendants « graine à graine » F3 issus de l'autofécondation des plantes F2, elles-mêmes issues d'un croisement du supprimeur avec le double mutant *aca4-3/11-5*.

Ce travail a été poursuivi un temps dans le laboratoire par le Dr Tunc (post-doctorante) et Jeffrey Harper. Mes collègues ont, dans un premier temps, établi de nouvelles générations en rétro-croisement. Ils avaient observé une ségrégation entre le phénotype de floraison tardive et la suppression des lésions chez le supprimeur 2. Il s'agissait ensuite de sélectionner des marqueurs génétiques différenciant les écotypes WS et Col sur le chromosome 2 (lequel porte le gène *ACA4*) afin de cartographier la mutation à l'origine du supprimeur 1. L'identification du supprimeur 2 devait être entreprise par cartographie des lignées descendantes à l'aide de la puce Genechip[®] Tilling array d'Affymétrie, la mutation d'intérêt se situant dans une portion du génome issu de WS. L'un des

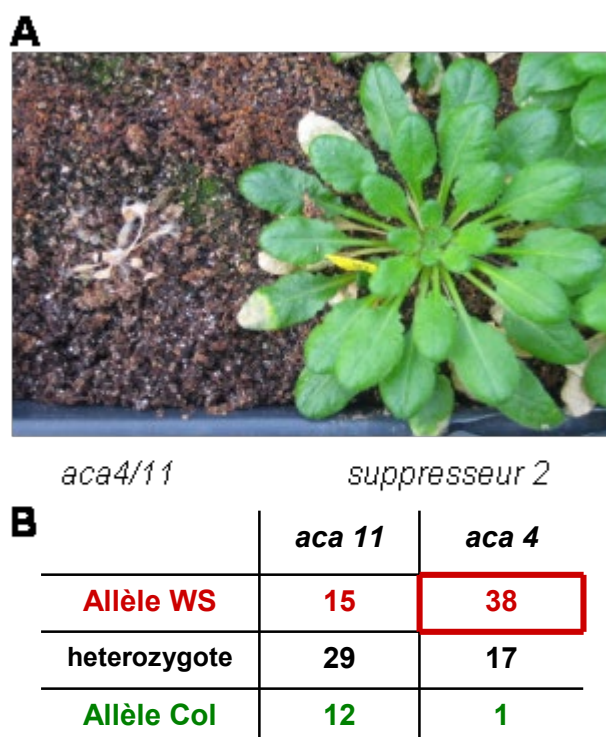


Figure 5 : Analyse de supprimeurs génétique de *aca4/11* obtenus par mutagenèse EMS. A, phénotype du supprimeur 2 qui porte une mutation monogénique dominante dans un fond *aca4/11*. B, ségrégation (nb de plantes) des allèles *aca4* et *aca11* issus de WS ou Columbia dans la descendance F2 sans lésions issues du croisement entre le supprimeur 1 (*aca4-1/11-1* dans WS) et *aca4/3/11-5* chez Col.

avantages de cette démarche repose sur la facilité de crible des supprimeurs : les plantes à sélectionner apparaissent saines au milieu d'un parterre de plantes petites et à la rosette desséchée. L'intérêt principal de cette approche « sans a priori » est qu'elle devrait permettre la découverte de nouveaux acteurs régulant la mort cellulaire programmée. Ce projet n'a malheureusement pas été poursuivi après 2012 dans l'équipe de Jeff Harper.

3. Mise au point de la technique Caméléon pour l'étude des signaux calciques

Le laboratoire de Jeffrey Harper a participé à la première utilisation, chez les plantes, de la technique du rapporteur de calcium *Caméléon* (Allen et al., 1999). Brièvement, une construction reliant une molécule CFP (cyan fluorescent protein) à une molécule YFP (yellow fluorescent protein) via une calmoduline est exprimée en plantes transgéniques. La fixation du calcium à la calmoduline entraîne un repliement qui va rapprocher les deux protéines fluorescentes. Par un chevauchement des longueurs d'onde d'excitation et d'émission entre fluorophores, l'énergie émise après excitation de la CFP excite alors la YFP qu'il sera possible d'observer en microscopie. Ce principe est connu sous le nom de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Cette technique a permis de grandes avancées sur le rôle des oscillations calciques dans la régulation de l'ouverture des stomates (Allen et al., 2001) mais reste relativement peu utilisée chez la plante.

Au cours de mon post-doctorat, et dans l'objectif de maîtriser la technique *Caméléon* pour caractériser le mutant *aca4/11*, j'ai appliqué cette technique à la croissance du tube pollinique. Cela m'a notamment permis d'initier ou de prolonger des collaborations avec le Dr Messerli (Marine Biological Laboratory, Woods Hole, USA) et avec le département de mathématiques de l'Université du Nevada à Reno, dans un projet réunissant au final des compétences très larges. D'autre part, j'ai construit des versions *Caméléon* fusionnées à l'aquaporine TIP2;1 ou à l'extrémité N-terminale d'une protéine kinase (caractérisée au laboratoire) afin d'observer plus précisément les signaux calciques au niveau, respectivement, du tonoplaste et de la membrane plasmique. Ce travail a été un temps poursuivi à Reno par les Dr Tunc et Dr Zinn (post-doctorantes) mais les challenges expérimentaux proposés par cette technique ont eu raison de la poursuite de ce projet.

VI. CARACTERISATION DE LA FAMILLE DES NPF CHEZ ARABIDOPSIS

Dans le contexte de la nutrition hydrominérale de la plante, j'ai longuement étudié les transports d'eau régis par des forces motrices indirectes et autorisés par des voies bidirectionnelles. J'ai souhaité aborder une autre forme de nutrition et d'homéostasie au travers des trajets de l'azote dans la plante, et des rôles des protéines de la famille des NPT (NRT1 /PTR family) chez Arabidopsis. Sur les 53 membres de la famille (Tsay et al., 2007), la fonction in planta d'une dizaine d'entre eux seulement a été décrite. Entre Janvier 2012 et Mars 2013, j'ai travaillé dans le laboratoire B&PMP, sous la direction de Benoît Lacombe, coordinateur du projet ANR « NUTSE ». J'ai développé des outils génétique et d'expression hétérologue afin d'identifier les NPF plus particulièrement impliqués dans le transport et la remobilisation de l'azote mais également de l'ABA. Ce dernier point a d'ailleurs fait l'objet d'une revue dans Trends in Plant Science (Boursiac et al., 2013).

Mon approche génétique visait la mise au point de tests simplifiés et à haut débit de fonctions générales de transport, de perception et de recyclage de l'azote. Avec l'assistance de Chantal Brachet, technicienne dans l'équipe, j'ai purifié 76 lignées d'insertion homozygotes mutantes pour 46 gènes de la famille. Certaines de ces lignées sont toujours étudiées dans l'équipe ou ont été disséminées dans des laboratoires avec lesquels collabore Benoît Lacombe. J'ai initié certaines caractérisations physiologiques de ces lignées, dont notamment l'étude de la germination en présence ou non d'ABA exogène, qui se poursuivent actuellement. Enfin, en collaboration avec le Dr Claire Corratgé-Faillie, nous avons mis au point un système d'expression hétérologue des protéines NPF en levure ainsi que des tests d'autotrophie et de transport de différents dipeptides. Ces tests ainsi que les lignées de plante ont notamment permis d'identifier le gène NPF5.5 et son rôle dans la teneur en azote de l'embryon d'*Arabidopsis* (Léran et al., 2015).

**CONTRATS DE RECHERCHE, SUPERVISION DES
TRAVAUX, COLLABORATIONS**

I. CONTRATS DE RECHERCHE OBTENUS

En tant que coordinateur :

- Eaudissect : ANR, 492k€, **2023-2026**
- Eaudissect 2, MITI CNRS, 55k€, **2021-2022**
- Turgomap, MITI CNRS, 59k€, **2019-2020**
- Water Potential Markers, Labex Agro, 30k€, **2015-2016**
- Modèle mathématique Eaudissect, Labex Numev Montpellier, co-coordonateur, 43k€, **2015-2018**
- Projet Starter, INRA département BV, 25k€, **2014-2015**
- Rootbarriers, ERA-CAPS, coordinateur de la partie française, 2071k€ dont ~200k€ pour la France, **2014-2017**

En tant que partenaire ou encadrant :

- Cafcae, INRAE département BAP, porté par Sylvie Dinant (IJPB, Versailles) 12 k€, **2022-2023**
- Bourse CSC (Chine) de Yunji Huang, **2019-2023**
- Projet ABAqua, ANR-DFG, porté par Christophe Maurel (IPSiM, Montpellier) et Erwin Grill (TUM, Munich) **2019-2022**
- Projet Hyarchi, ERC, porté par Christophe Maurel, **2019-2025**
- Post-doctorat Agreenskills du Dr Monica Calvo-Polanco **2015-2018**

Autres financements obtenus :

- Bourse d'échange de l'association des journalistes scientifiques de la presse d'information (AJSPI), 2015
- Bourse de voyage pour le 18th New Phytologist Symposium, Dublin, 2007
- Young Investigator Award, conférence internationale sur les Aquaporines, Genval, Belgique, 2005
- Bourse de thèse du MENRT, 2002

II. ETUDIANTS ET CDD ENCADRES

Période	Nom, niveau	Statut actuel
2009 (8 mois)	Noémie Rullier , M2	chargée de mission en prévision agro-climatique, Nitidae
	Rôle de l'isoforme PIP2;6 dans le transport d'eau de la rosette d'Arabidopsis	
2010 (8 mois)	Karine Prado , M2	Post-doctorante Stanford
	Régulation des aquaporines et du transport d'eau par la lumière	
<u>Publication co-signée</u>	Prado K, Boursiac Y, Tournaire-Roux C, Monneuse JM, Postaire O, Da Ines O, Schäffner AR, Hem S, Santoni V, Maurel C. 2013 . Regulation of Arabidopsis leaf hydraulics involves light-dependent phosphorylation of aquaporins in veins. <i>Plant Cell</i> . Volume 25, 1029-39	
2014 (3 mois)	Sandy Bergès , L3	Post-doctorante Montpellier
	Perception de la contrainte hydrique dans les feuilles et racines d'Arabidopsis	
2014 (2 mois)	Roger Srey , M1	Ingénieur développement logiciel
	Développement d'une reconnaissance automatique de protoplastes	
2015 (6 mois)	Léo Flandin , M2	Programmeur, Airbus industries
	Développement d'une méthode de mesure de la perméabilité hydrique de protoplastes	
2015 (6 mois)	Amandine Crabos , CDD IE	Ingénieure d'étude INRAE
	Développement de marqueurs du potentiel hydrique dans la racine d'Arabidopsis	
<u>Publication co-signée</u>	Crabos A, Huang Y, Boursat T, Maurel C, Ruffel S, Krouk G, Boursiac Y (2023). Distinct early transcriptional regulations by turgor and osmotic potential in the roots of Arabidopsis. <i>Journal of Experimental Botany</i>	
2015 (12 mois)	Ana Maria Velez Cardona , CDD IE	Ingénieure, SKF
	Modélisation du trajet radial de l'eau dans la racine	
2015 (30 mois)	Monica Calvo Polanco , CDD Post-doctorat	Professeure, Université de Salamanque
	Rôle des barrières de diffusion apoplastique dans le transport d'eau et de solutés	
<u>Publications co-signées</u>	Rôle des barrières de diffusion apoplastiques dans le transport d'eau racinaire	
	<ul style="list-style-type: none"> Calvo-Polanco M, Ribeyre Z, Dauzat M, Reyt G, Hidalgo-Shrestha C, Diehl P, Frenger M, Simonneau T, Muller B, Salt DE, Franke RB, Maurel C, Boursiac Y (2021) Physiological roles of Casparian strips and suberin in the transport of water and solutes. <i>New Phytologist</i> 232: 2295–2307 	

	<ul style="list-style-type: none"> • Pascut FC, Couvreur V, Dietrich D, Leftley N, Reyt G, Boursiac Y, Calvo-Polanco M, Casimiro I, Maurel C, Salt DE, et al (2021) Non-invasive hydrodynamic imaging in plant roots at cellular resolution. Nat Com 12: 4682 • Reyt G, Ramakrishna P, Salas-González I, Fujita S, Love A, Tiemessen D, Lapierre C, Morreel K, Calvo-Polanco M, Flis P, et al (2021) Two chemically distinct root lignin barriers control solute and water balance. Nature Com 12: 2320 • Wang P, Calvo-Polanco M, Reyt G, Barberon M, Champeyroux C, Santoni V, Maurel C, Franke RB, Ljung K, Novak O, Geldner N, Boursiac Y, Salt DE (2019) Surveillance of cell wall diffusion barrier integrity modulates water and solute transport in plants. Scientific Reports 9: 4227
2016 (6 mois)	<p>Linh Lan Azria, M2 Ingénieure d'étude, INSERM Développement d'un système microfluidique pour la mesure de la perméabilité hydrique de protoplastes</p>
2017 (4 mois)	<p>Laïna Sophie, M1 Ingénieur projet, Green technologie Développement d'un système microfluidique pour la mesure de la perméabilité hydrique de protoplastes</p>
2018 (4 mois)	<p>Soukkaina Hajjaj, M1 Clinical research associate, IQVIA Développement d'un système microfluidique pour la mesure de la perméabilité hydrique de protoplastes</p>
2019 (2 ans)	<p>Stathis Delivorias, ATER Post-doctorant Méthode analytique de description de l'architecture racinaire <u>Publication co-signée</u> Boursiac Y, Pradal C, Baugeat F, Lucas M, Delivorias S, Godin C, Maurel C (2022) Phenotyping and modeling of root hydraulic architecture reveal critical determinants of axial water transport. Plant Physiology</p>
2019 (6 sem.)	<p>Thomas Cazin, BTS Etudiant Ingénieur 3eme année Développement d'un système microfluidique pour la mesure de la perméabilité hydrique de protoplastes</p>
2019 (4 ans)	<p>Yunji Huang, thèse En recherche de post-doc Perception de la contrainte hydrique dans la racine <u>Publication co-signée</u> Crabos A, Huang Y, Boursat T, Maurel C, Ruffel S, Krouk G, Boursiac Y (2023). Distinct early transcriptional regulations by turgor and osmotic potential in the roots of Arabidopsis. Journal of Experimental Botany</p>
2021 (4 mois)	<p>Léo Tellez-Arenas, M2, co-encadrement Ingénieur développement, Paarly Méthode de deep-learning pour la mesure de la perméabilité hydrique de protoplastes</p>
2021 (3 ans)	<p>Thomas Boursat, thèse En cours Mécano-biologie du cambium <u>Publication co-signée</u> Crabos A, Huang Y, Boursat T, Maurel C, Ruffel S, Krouk G, Boursiac Y (2023). Distinct early transcriptional regulations by turgor and osmotic potential in the roots of Arabidopsis. Journal of Experimental Botany</p>

2023 (2 mois)	Audrey Rigaud, Amélie Malleville, L3	Etudiantes M1
	Mesure du transport d'eau aux niveaux cellulaires et de l'organe entier	
2023 (28 mois)	Fabrice BAUGET	En cours
	CDD post-doctorat	
	Modélisation et expérimentation sur le trajet radial de l'eau dans la racine	
<u>Publication co-</u> <u>signée</u>	<u>Boursiac Y, Bauguet F (2023) Do roots need a good haircut for water uptake?</u> New Phytologist	

III. PRINCIPALES COLLABORATIONS

1. En cours (projets financés ou non)

Pr Didier Felbacq (Physique), laboratoire L2C, Montpellier

Dr Henri Lhuissier et Bloen Metzger (Physique des milieux granulaires), laboratoire IUSTI, Marseille

Dr Yves-Marie Legrand (Chimie organique), laboratoire CHIMECO, Montpellier

Mr Volker Bäker (Analyse d'image), UMS Biocampus, Montpellier

Dr Benoît Charlot (Microfluidique), laboratoire IES, Montpellier

Dr Gabriel Krouk (Biologie), laboratoire IPSiM, CNRS, 1 publication commune

Dr Sylvie Dinant (Biologie), laboratoire IJPB, Versailles

Pr Leslie Sieburth (biologie, dégradation des ARNs), University of Utah Salt Lake, USA

Dr Juan Baca Cabrera et Pr Guillaume Lobet (hydraulique de la racine), Juelich, Allemagne

Mme Marta Lucas Gutierrez et Pr Miguel Rosales (hydraulique de la racine), Seville, Espagne

Dr Bruno Clair et Dr Tancrède Alméras (mécanobiologie du cambium), LMGC, Montpellier

2. Passées

Prof Erwin Grill et Alexander Christmann, Université Munich, Allemagne

Christophe Pradal (Modélisation), CIRAD, Montpellier, 2 publications communes

Dr Christophe Godin, INRIA, Montpellier, 1 publication commune

Pr David Salt (Biologie), Université d'Aberdeen, Ecosse, 4 publications communes

Dr Rochus B Franke (Biologie), Université de Bonn, Allemagne, 2 publications communes

Dr Gwyneth Ingram, Prof Arezki Boudaoud (Biophysique), ENS Lyon, 1 publication commune

Dr Jurgen Kleine-Vehn (Biologie), Institut de Génétique Appliquée et Biologie Cellulaire, Vienne, Autriche

Pr Menachem Moshelion (Biologie), Université de Jerusalem, Israël, 1 publication commune

Dr Mylène Durand-Tardif (Biologie) ; INRA Versailles, 1 publication commune

RESPONSABILITES COLLECTIVES

Membre du conseil d'unité du laboratoire IPSiM

Membre du conseil scientifique du GDR PhyP (biophysique et biomécanique des Plantes)

**PROJETS DE RECHERCHE RECENTS, EN COURS,
A VENIR**

Au cours des dernières années, mon activité de recherche s'est développée, et se poursuivra, dans 2 directions : d'une part je cherche à mieux comprendre le fonctionnement hydraulique de la racine, et d'autre part je souhaite mieux identifier quels sont les mécanismes de transduction de l'environnement physique en signal biologique, en particulier dans le contexte d'une contrainte hydrique. Le second volet se nourrit du premier et les approches mises en œuvre dans ces deux axes sont complémentaires. La progression de mes projets pourrait se comprendre comme la transition d'une vision des flux d'eau en conditions stationnaires vers une étude des flux en conditions dynamiques ou transitoires et des réponses biologiques que cela peut entraîner. L'objectif est de contribuer à une meilleure connaissance des relations hydriques chez les plantes, en conditions environnementales stationnaires et transitoires.

I. **FONCTIONNEMENT HYDRAULIQUE INTEGRE DE LA RACINE CHEZ ARABIDOPSIS.**

Résumé :

Les propriétés hydrauliques de la racine jouent un rôle crucial dans le maintien du statut hydrique des plantes. Le trajet radial de l'eau peut s'y représenter par un modèle composite où chaque couche cellulaire et ses parois contribuent à la conductivité du tissu et de la racine (L_p). Bien que plusieurs acteurs majeurs de ce trajet soient identifiés, le modèle reste incomplet tant sur le plan moléculaire que sur l'importance de chaque tissu et de l'architecture. De plus, c'est l'intégration des propriétés hydrauliques racinaire dans son architecture complète qui est responsable de la capacité totale de transport d'eau de l'organe, c.a.d sa conductance hydraulique racinaire (L_o). Cet axe de mes recherches vise à comprendre l'hydraulique de la racine chez l'espèce modèle *Arabidopsis*. Il s'agit (1) de mieux cerner la fonction de candidats (produits de gènes ou structures) au transport d'eau, (2) d'intégrer ces connaissances dans un nouveau type de modèle composite du trajet radial, et (3) réaliser un modèle d'architecture hydraulique de la racine d'*Arabidopsis*. Une meilleure compréhension des transports d'eau et de solutés dans la racine d'*Arabidopsis*, en milieu homogène et dans le sol, sont attendus. Plusieurs projets ont été développés dans cet axes de mon travail, un est actuellement en cours.

1. Etat des lieux

La plante, qui peut être traversée chaque jour par un flux d'eau représentant plusieurs fois sa masse fraîche, doit assurer en permanence une régulation stricte de son statut hydrique. Dans ce processus, les racines jouent un rôle crucial car elles servent de point d'absorption de l'eau du sol. La majeure partie de celle-ci, après un trajet radial au travers des différents tissus vivants de la racine, est transférée par les vaisseaux du xylème jusque dans les parties aériennes où elle est perdue par transpiration.

En toutes conditions, le flux d'eau (J_v) dans la racine peut être décrit par l'équation suivante (Dalton et al., 1975; Fiscus, 1975):

$$J_v = Lp_r \cdot S \cdot \Delta\Psi$$

où Lp_r représente la conductivité hydraulique de la racine (i.e sa capacité de transport d'eau mentionné plus haut), S la surface d'échange de la racine avec le milieu extérieur, et $\Delta\Psi$ la différence de potentiel hydrique entre le milieu extérieur et l'extrémité de la racine (l'hypocotyle). La variable $(Lp_r \cdot S)$ représente la conductance racinaire Lo . Elle traduit la capacité de transport d'eau de l'appareil racinaire entier, alors que la Lp_r représente la perméabilité intrinsèque d'un élément donné de racine.

a) Mesures des Lo et Lp_r

Au laboratoire, nous mesurons des flux racinaires d'eau sur organe excisé, soit en condition d'exsudation spontanée (gradient de potentiel osmotique) soit au moyen d'une chambre à pression (cf. 1.1.4), qui permet d'appliquer une différence de pression (gradient de potentiels hydrostatiques) entre l'appareil racinaire et l'hypocotyle. Le flux de sève induit par ces différences de potentiel est mesuré au niveau de l'hypocotyle et permet de calculer la conductance des tissus (Lo). On peut ensuite rapporter la conductance à la masse ou à la surface des racines pour obtenir la conductivité hydraulique racinaire (Lp_r). Les valeurs obtenues, Lp_{r-o} ou Lp_{r-h} , correspondent respectivement à des mesures effectuées en présence de forces osmotiques ou hydrostatiques.

b) Présentation du modèle composite

Historiquement, il a été calculé, dans la racine de maïs ou de blé, que la conductivité hydraulique des vaisseaux du xylème est de 100 à 1000 fois supérieure à la conductivité radiale, représentant le trajet de l'eau depuis le sol vers les vaisseaux du xylème au travers de différents tissus vivants (Steudle and Peterson, 1998; Bramley et al., 2009). Ces tissus, comprenant l'épiderme, le cortex, et l'endoderme notamment, semblent donc jouer un rôle capital dans le contrôle des flux entrant d'eau.

Deux voies principales permettent le trajet radial de l'eau dans ces couches cellulaires : d'une part, l'apoplasme, qui représente le continuum de parois entourant les cellules ; d'autre part, la voie « de cellule à cellule », qui regroupe plusieurs cheminements possibles durant lesquels l'eau franchit des membranes cellulaires. L'intégration de ces représentations anatomiques et fonctionnelles a mené à un « modèle composite » du transport d'eau dans la racine (Steudle and Peterson, 1998). La racine est alors représentée par un réseau de résistances hydrauliques placées en série et en parallèle, figurant chacune les voies apoplastique ou « de cellule-à-cellule » d'un tissu ou d'une couche cellulaire donnée (Figure 6).

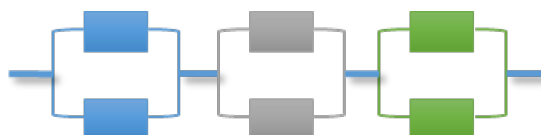


Figure 6 : illustration du modèle composite sous forme de résistances en série ou en parallèle, chaque couleur représentant un type cellulaire donné, par exemple.

c) Candidats influençant le trajet de l'eau dans la racine : voies apoplastiques et de cellule à cellule, vaisseaux du xylème, architecture

Il est désormais établi que les aquaporines sont des déterminants majeurs de la conductivité hydraulique des membranes végétales et, par conséquent, agissent sur la conductivité de la voie « de cellule à cellule » (Maurel et al., 2015). Dans cette voie, la membrane plasmique (MP) et le tonoplaste sont les deux principales membranes cellulaires permettant le passage de l'eau, la MP étant considérée comme l'élément limitant (Maurel, 1997; Tournaire-Roux et al., 2003). Des approches de génétique et de physiologie moléculaire chez *Arabidopsis* ont apporté un éclairage sur le rôle des aquaporines dans le transport racinaire d'eau. Par exemple, des études protéomiques ont identifié 9 isoformes PIPs exprimées dans la membrane plasmique des cellules de racine (Santoni et al., 2003; Prak et al., 2008). Parmi ces isoformes, *AtPIP1;2* et *AtPIP2;2* jouent chacune un rôle significatif, mais qualitativement distinct, dans le transport d'eau. Ainsi, des plantes mutantes invalidées pour le gène *PIP2;2* ont une L_{p-r-o} (mesurée grâce à une différence de potentiel osmotique) réduite alors que leur L_{p-r-h} (mesurée par une différence de potentiel hydrostatique) reste inchangée (Javot et al., 2003). Un phénotype inverse a été observé chez des plantes mutantes pour le gène *PIP1;2* (Postaire et al., 2010). Enfin, le rôle de *PIP2;1* a également été démontré (Péret et al., 2012). En conclusion, un rôle de la voie « de cellule à cellule », et des aquaporines en particulier, semble désormais bien établi chez *Arabidopsis*. Cependant les différences de phénotype selon la mesure effectuée ou l'isoforme considérée ne sont pas encore comprises.

La dissection moléculaire des composants de la voie apoplastique m'était nettement moins familière lors de mon entrée en fonction en 2013. La principale résistance des parois au transfert de l'eau dans la racine d'*Arabidopsis* semblait être l'endoderme, avec la présence de la bande de Caspary et de subérine. Bien que cette notion soit sujette à caution (Steudle and Peterson, 1998; Schreiber et al., 2005), la présence de subérine opposerait une barrière imperméable à l'eau et aux ions, orientant le flux d'eau vers la voie « de cellule à cellule » au niveau de l'endoderme. Ainsi, chez le maïs existe une corrélation entre la quantité de subérine et la présence de certains monomères de lignine, et la L_p (Zimmermann et al., 2000). Dans des mutants d'*Arabidopsis* dont la composition en subérine est altérée (Hofer et al., 2008; Baxter et al., 2009), il semble y avoir une relation (non symétrique) entre la quantité de subérine et transport d'eau (Ranathunge and Schreiber, 2011). Des expériences antérieures aux années 2000 avaient également conduit à conclure sur le rôle non négligeable des barrières apoplastiques (aussi bien l'endoderme que l'exoderme) dans le transport racinaire d'eau, mais l'interprétation de certaines de ces études aura dû être revue quand il a été génétiquement démontré que la bande de Caspary chez *Arabidopsis* était composée de lignine (Naseer et al., 2012). De fait, le rôle de ce polymère comme barrière à l'eau n'est pas clair. Entre 2014 et 2019, dans le cadre du projet Européen ERA-CAPS RootBarriers (coordonné par David Salt, University Aberdeen, Ecosse) j'ai précisément travaillé sur ces aspects-ci (voir II, plus bas).

La taille des pores de la paroi détermine également la L_p (Asli and Neumann, 2009). De nombreux mutants ayant une altération de leurs parois ont été identifiés à ce jour mais, dans la plupart des cas, la structure entière de la plante est fortement altérée (Turner and Somerville, 1997). Certaines mutations qui affectent peu le développement des plantes se traduisent par un collapsus des vaisseaux du xylème, entraînant une diminution de la conductivité axiale. Deux mutants en particulier ont une altération de leur réponse stomatique, associée à une réduction de l'ouverture des vaisseaux, il s'agit des mutants *irx3* (Liang et al., 2010) et *esk1* (Lefebvre et al., 2011). Cette dernière étude, à laquelle j'avais pris part, avait montré que les vaisseaux peuvent jouer un rôle limitant. Nous avons complété cette analyse ultérieurement par une approche de modélisation (voir 7, plus bas).

Les plasmodesmes (PD) créent un continuum symplasmique entre les cellules. Il est logique d'imaginer que les gradients osmotiques et hydrostatiques du potentiel hydrique entre cellules sont court-circuités par ces structures. De la même façon, les PD devraient contribuer à la L_p . A ce jour cependant, cela n'a pas été démontré. Le seul article de notre connaissance mentionnant le rôle des PD sur la L_p (Zhang and Tyerman, 1991) utilise l'azide, qui s'est avéré être un puissant inhibiteur indirect des aquaporines (Tournaire-Roux et al., 2003). Dans le cadre d'une potentielle collaboration avec JY Lee (Univ. Delaware, USA), j'ai réalisé une expérience préliminaire sur des mutants *pdlp*, affectés dans le degré d'ouverture des PD, qui n'a pas mis en évidence de phénotype lié à la L_p .

Enfin, la capacité totale de transport d'eau, Lo , nécessite d'intégrer les propriétés de transport des tissus dans une architecture racinaire complète (ou RSA : root system architecture). Cette intégration rajoute en premier lieu la surface de la racine mais questionne également l'influence des types et des ordres racinaires ainsi que leur positionnement dans le cas où les vaisseaux sont limitants. J'ai contribué à un travail de modélisation qui a abordé ces aspects (voir 7, plus bas).

d) Améliorations et limites du modèle composite

Diverses approches pharmacologiques et physiologiques ont permis d'affiner le modèle composite chez plusieurs espèces. Ainsi, la voie apoplastique semble prépondérante chez le blé et le pois alors qu'elle reste mineure chez le lupin et *Arabidopsis* (Beaudette et al., 2007; Bramley et al., 2009). Chez cette espèce, une inhibition des aquaporines, par le mercure, l'azide ou encore H_2O_2 , réduit jusqu'à 80% le flux racinaire d'eau (Tournaire-Roux et al., 2003; Boursiac et al., 2008a). Chez le lupin, la conductivité hydraulique des cellules ($L_{p_{cell}}$) augmente progressivement de l'épiderme jusqu'à l'endoderme. Dans ce cas, le modèle composite permet de formaliser mathématiquement les propriétés hydrauliques d'un ensemble de couches cellulaires concentriques, la conductivité de la voie « de cellule à cellule » étant déduite de la $L_{p_{cell}}$ dans chacune de ces couches (Bramley et al., 2009). La version la plus aboutie du modèle composite a été réalisée par des collègues de Louvain (Couvreux et al., 2018). Le modèle MECHA reconstruit une coupe transversale de racine dans laquelle les parois et les différents tissus sont représentés par une ensemble de résistances hydrauliques. Hormis l'intérieur des cellules qui ne sont représentées que par une seule résistance, MECHA prend en compte une grande partie de la géométrie du système et propose une vision quasi 2D puis 3D (en « empilant » les coupes transversales) de la racine. Il permet d'assister des approches de phénotypage, comme dans un travail auquel j'ai participé (Pascut et al., 2021), ou encore de proposer des scénarii de fonctionnement hydraulique (Mehra et al., 2022). Etant très complet, ce modèle présente cependant l'inconvénient de nécessiter un grand nombre de paramètres qui ne sont pas tous mesurables à l'heure actuelle.

e) Problématiques

Bien que les propriétés hydrauliques de la racine d'*Arabidopsis* et la fonction des aquaporines dans cet organe aient déjà fait l'objet de nombreuses études, l'application du modèle composite dans cette espèce reste encore très parcellaire, voire limitée. En premier lieu, il est probable que chaque portion de racine contribue différemment au transport d'eau. De plus, les couches cellulaires limitantes ne sont pas connues et ne sont souvent pas accessibles à une analyse directe. Ainsi, la $L_{p_{cell}}$ peut être mesurée dans les cellules corticales à l'aide d'une sonde de pression cellulaire (Javot et al., 2003), alors que les autres types cellulaires sont trop petits pour ce type d'approche. Au niveau moléculaire, il reste

à déterminer le rôle d'autres isoformes d'aquaporines que *AtPIP1;2* et *AtPIP2;1*. En outre, le rôle de structures comme les bandes de Caspary et les couches de subérine semblait être établi (Steudle and Frensch, 1996; Zimmermann et al., 2000) mais nécessite une remise à jour de nos connaissances depuis qu'il a été montré que les bandes de Caspary ne sont constituées que de lignine (Naseer et al., 2012). Le modèle composite demanderait donc à être enrichi et réexploité, voire actualisé. Enfin, l'intégration des caractéristiques hydrauliques locales à la racine entière permettrait de comprendre comment des propriétés de transport d'eau au niveau d'un organe entier découlent de l'échelle inférieure.

J'ai développé trois projets sur ce thème : un projet expérimental et deux projets de modélisation, dont un est encore en cours. Ces projets se sont principalement focalisés sur *Arabidopsis*, qui reste un modèle de choix pour aborder les bases moléculaires du transport racinaire d'eau. Bien que certaines mesures physiologiques y soient délicates, l'organisation anatomique de la racine est relativement simple, avec une seule couche de cellules corticales. *Arabidopsis* dispose également de nombreuses ressources génétiques d'intérêt. Certaines de ces approches ont été, depuis, portées dans l'équipe ou par des collaborations sur d'autres espèces comme le maïs (Bauget et al., 2023), la tomate (collaboration avec M. Rosales, Séville) ou le blé (collaboration G. Lobet, Juelich).

2. Rootbarriers

Le projet Rootbarriers a été financé par le programme ERA-CAPS à hauteur de 2072k€ de 2014 à fin 2016. Il était coordonné par le Prof David Salt, Université d'Aberdeen, Ecosse (puis Université de Nottingham, Angleterre) et comprenait des partenaires Allemands (Benni Franke, Shahid Siddique, Université de Bonn, Nicolaus Von Wiren, IPK, Gatersleben), Danois (Jan Schoering, Daniel Persson, Université Copenhague), et Hollandais (Mark Aarts, Wageningen). Il était également complété par une collaboration proche avec le groupe Suisse de Niko Geldner (Université de Lausanne). La partie française, que j'ai coordonnée, regroupait les laboratoires LEPSE (Thierry Simonneau, Bertrand Muller) et BPMP (désormais IPSiM, Christophe Maurel et moi-même). L'objectif de ce consortium était de mettre en évidence les rôles physiologiques de la subérine et des bandes de Caspary (nutrition hydrominérale, tolérance à la sécheresse, au sel, aux métaux lourds et à l'infection par des nématodes), au travers de l'étude d'un ensemble d'une quinzaine de mutants d'*Arabidopsis* présentant des combinaisons d'altérations de leur bande de Caspary et de subérine. Ce programme de recherche a notamment été renforcé par la présence dans notre laboratoire du Dr Monica Calvo-Polanco, qui bénéficiait d'une bourse post-doctorale Agreenskills+ / INRA de 2015 à 2018, et dont j'ai supervisé le travail.

En premier lieu, nous avons caractérisé l'intégrité fonctionnelle de la bande de Caspary (perméabilité de l'endoderme à l'iodure de propidium) et les niveaux et le développement de la subérine dans l'ensemble des mutants. Cela nous a conduit à proposer une classification des

group	CS-Sub+	CS-Sub=	CS=Sub+	CS=Sub-	CS=SubX
CS	-	-	=	=	=
suberin	+	=	+	-	X
mutants	<i>myb36</i> <i>esb1</i>	<i>sgn3</i> <i>sgn esb</i> <i>casp1</i> <i>casp3</i>	<i>fact3</i> <i>anac038</i> <i>gelp51</i>	<i>horst</i> <i>horst ralph</i>	<i>ralph</i>

génotypes dans 5 groupes CS(-)Sub(+), CS(-)Sub(=), CS(+Sub(-), CS(+Sub(+), CS(+Sub(X) correspondant à des bandes de Caspary fonctionnelles (CS(+)) ou non (CS(-)) ainsi que des contenus en subérine plus élevés (Sub(+)), moins élevés (Sub(-)), ou des polymères a priori altérés (Sub(X)) (Tableau

ci-contre). Au niveau de la capacité de transport d'eau de la racine, les mutants de bande de Caspary ont une réduction générale de leur capacité de transport d'eau, tandis que ceux qui disposent de dépôts de subérine altérés ont une augmentation de cette capacité (Figure 7). Il s'avère cependant que dans les mutants de bande de Caspary comme *esb1* ou *myb36*, la fraction du transport d'eau qui dépend des aquaporines est réduite. Cette inhibition de la voie dépendante des aquaporines est partiellement supprimée dans le double mutant *sgn3 esb1* qui perd

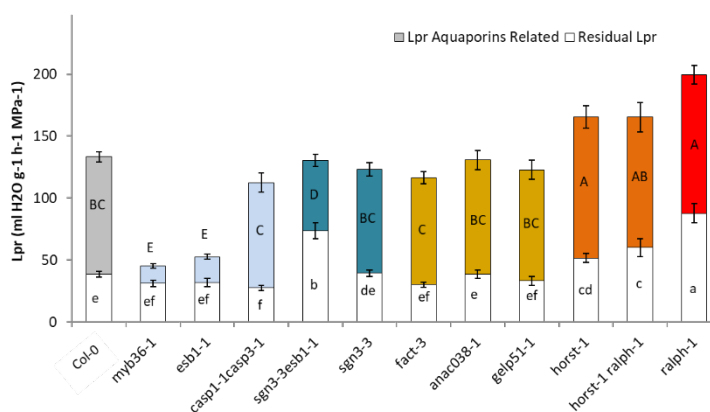


Figure 7: Conductivité hydraulique racinaire de mutants de bande de Caspary et/ou subérine. La zone colorée représente la part dépendante des aquaporines.

également la fonction de SGN3, considérée comme un « surveillant » de l'intégrité de la bande de Caspary (Doblas et al., 2017). La réduction de la Lpr dans des géotypes à la bande de Caspary altérée ne provient donc pas du rôle physique que peut exercer cette barrière, mais plutôt de l'activation de la signalisation de la voie SGN3 qui en découle. Cet aspect, que l'on retrouve également dans la régulation stomatique, a fait l'objet d'une publication en 2019 (Wang et al., 2019). La réduction du contenu en subérine se caractérise, elle, par une augmentation de la Lpr, ce qui peut être interprété comme une action directe de ce polymère en tant que barrière physique au transport d'eau. Ces plantes ont été également caractérisées pour leur activité de pompage de solutés ou leur fuite de solutés dans le xylème. Les mutants de bande de Caspary sont fortement affectés tandis que les mutants altérés pour la subérine ne présentent pas de phénotype majeur. Il semblerait donc que, dans nos conditions, la bande de Caspary soit un frein au passage par diffusion des solutés, tandis que la subérine représente une barrière au passage de l'eau. La croissance et le fonctionnement des parties aériennes a été étudiée en parallèle. Des défauts de croissance sont détectés dans les mutants de bande de Caspary, et nos données semblent indiquer qu'ils n'ont pas pour origine un défaut d'alimentation en eau, mais une dérégulation de l'ionome et une altération des propriétés mécaniques des parois. Ces données ont été publiées dans un article dont je suis le dernier auteur (Calvo-Polanco et al., 2021).

Enfin, un échantillon de notre collection de mutants a été étudiée en condition de stress salin. Comme dans les conditions de culture « standard », nous retrouvons une hypersensibilité des mutants de bande de Caspary tandis que les mutants de subérine ne sont pas affectés différemment des plantes sauvages. Cette hypersensibilité ne proviendrait à nouveau pas d'un déficit d'alimentation en eau mais d'une dérégulation de l'homéostasie des différents éléments, dont le Na qui pourrait s'accumuler à des concentrations probablement létales. Ce travail fait l'objet d'un article en cours de rédaction.

3. Modélisations

a) Eaudissect

Le projet Eaudissect a été financé par le Labex Numev depuis 2015 au travers de 3 appels à projets, à hauteur de 41k€ environ (3 stages M1/M2, 1 CDD IE 1 an et 7k€ de matériel). J'en suis le responsable scientifique avec le professeur de physique Didier Felbacq (Laboratoire Charles Coulomb, Université Montpellier). Il a également été financé partiellement sur 2 ans par le département BAP de l'INRA (projet STARTER, 25k€). Dans un contexte éminemment pluridisciplinaire, il comprenait également d'autres partenaires Montpellierains : Olivier Strauss (spécialiste en imagerie, LIRMM, UM/CNRS) et Benoît Charlot (spécialiste en microfluidique, IES, UM/CNRS) puis a bénéficié de l'apport d'autres collaborateurs : Wolker Backer (UMS Biocampus, Montpellier, pour des aspects d'analyse d'image) ainsi que Bloen Metzger et Henri Lhuissier (UMR IUSTI, Marseille, sur des aspects de mécanique des fluides). L'objectif de ce partenariat était de modéliser le trajet de l'eau au sein d'une coupe radiale de racine en conditions stationnaires. Ce projet, dont je suis le coordinateur, fait actuellement l'objet d'un financement par l'ANR pour la période 2023-2026.

Le modèle composite se traduit le plus souvent par une analogie électrique où les voies apoplastiques et de cellule-à-cellule sont agencées en séries et parallèles, puis analysées au moyen des équations classiques à cette représentation : loi d'Ohm, loi des nœuds, loi des mailles (Figure 6 et §7). L'itération la plus aboutie de ce type d'approches est le modèle MECHA, développé par des collègues de l'Université de Louvain (Belgique), qui est quasiment un modèle 2D (Couvreur et al., 2018). A l'origine du projet, nous avons souhaité apporter un nouvel éclairage sur cette vision du trajet radial, en partant d'une approche de mécanique des fluides.

i. Bases théoriques du modèle

Cette approche a tout d'abord nécessité une refonte des bases de modélisation que nous utilisons. Dans ce projet, notre hypothèse de départ est de considérer que les flux d'eau sont provoqués par des différences de potentiel hydrique, quelles qu'en soient les origines (osmotique et/ou hydrostatique). La loi de Darcy, qui formalise la relation entre un flux d'eau (q) et un champ de pression hydrostatique (p) s'écrit sous la forme

$$\mathbf{q} = -c \nabla p$$

Où c représente la conductivité hydraulique locale d'un milieu poreux (Darcy, 1856). Ce formalisme est tout à fait adapté aux flux d'eau radiaux tels qu'on peut les imaginer dans l'apoplaste ou dans la cellule, mais ne rend pas compte d'un gradient de pression osmotique et du rôle de la membrane. D'autres lois effectives ont clairement formalisé les transports d'eau au travers d'une membrane cellulaire, sous la forme :

$$Jv = Lp(\Delta p - \sigma \Delta \pi)$$

Dans lequel Jv représente le flux d'eau, Lp est la conductivité hydraulique de la membrane, Δp et $\Delta \pi$ sont, respectivement, les gradients de pression hydrostatique et osmotique, et σ est le coefficient de réflexion de la membrane aux solutés (Kedem and Katchalsky, 1958).

Une hypothèse forte de notre modèle est de considérer que σ , pour la majorité des solutés, est proche de 1, ce qui permet de simplifier l'équation de transport sous la forme

$$Jv = Lp(\Delta \Psi)$$

avec $\Delta\Psi = \Delta p - \Delta\pi$, représentant alors le potentiel hydrique. L'équation de transport se rapproche ainsi de la loi de d'Arcy, mais elle utilise un champ de potentiel hydrique et non pas seulement hydrostatique. Cette équation différentielle peut se résoudre par la méthode des éléments finis et permettra de calculer, sachant les potentiels hydriques dans le sol et les vaisseaux du xylème et les différentes conductivités des tissus traversés, le potentiel hydrique et les flux d'eau en tout point d'une coupe radiale de racine.

ii. Un modèle expérimental de racine

Avec mes collègues Didier Felbacq, Henri Lhuissier et Bloen Metzger, nous avons ensuite défini un modèle radial de racine. L'un des objectifs de ce modèle étant d'assurer un lien étroit entre théorie et expérimentation, nous avons fait le choix de débiter par une version disposant d'un nombre restreint de paramètres. Ce choix nous éloigne d'une représentation « réaliste » du trajet radial, mais permet d'identifier les paramètres saillants pour le trajet de l'eau, et donc ceux qui devront être mesurés expérimentalement. Le modèle de racine a donc été défini comme un milieu poreux complexe, de géométrie circulaire, composé de 3 domaines de conductivité hydraulique croissante : les membranes cellulaires, l'apoplaste, et l'ensemble cytosol/vacuole.

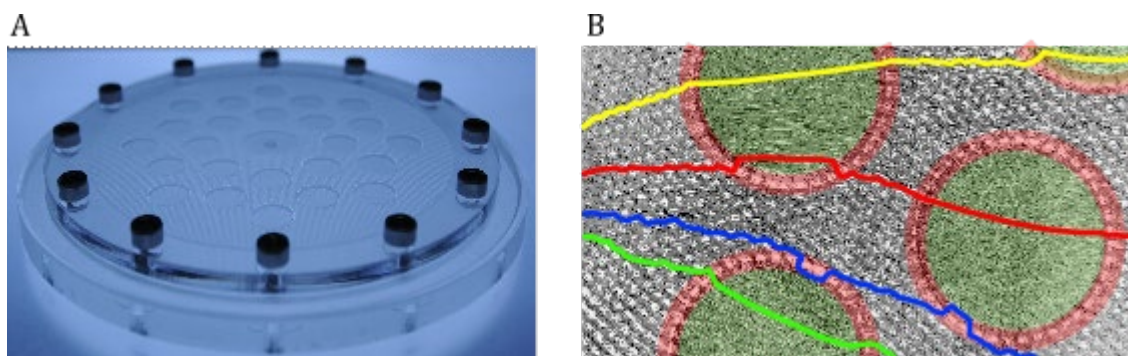


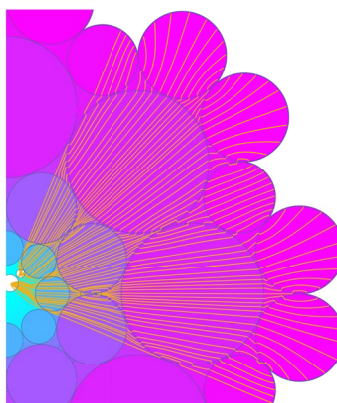
Figure 8 : modèle expérimental de coupe radiale de racine. A, disque de verre gravé représentant deux milieux de perméabilité contrastées. B, reconstitution des trajectoires de l'eau (jaune, rouge, bleu) dans le modèle expérimental (fond vert : cellules, fond rouge : membranes, fond gris : apoplaste).

Un modèle expérimental ne comprenant pas les « membranes » a été gravé dans un disque de verre par nos collègues de Marseille (Figure 8A). L'absence de membrane dans ce modèle a permis de faire circuler un liquide sous gradient de pression hydrostatique, dans des conditions de flux comparables à celles pouvant être rencontrées dans la racine. De plus, l'absence de sélectivité liée à la membrane et les pores dessinés dans ce modèle expérimental étant suffisamment larges, des particules fluorescentes ont pu être employées comme traceurs (Figure 8B). Ce modèle met en évidence des trajectoires complexes des flux d'eau, et notamment des trajets non linéaires et parfois beaucoup plus longs que la trajectoire la plus directe.

Un modèle géométrique de racine a également été créé dans le cadre du recrutement d'Ana Maria Velez Cardona, titulaire d'un M2 en dynamique des fluides, comme Ingénieure d'Etude pendant 12 mois au laboratoire. Ce modèle reprend les caractéristiques de taille de cellules, de membrane et d'apoplaste pour l'épiderme, le cortex et l'endoderme d'une racine d'*Arabidopsis* développée (mais n'ayant pas encore de périderme). La résolution de l'équation de transport définie plus haut a permis de calculer les potentiels hydriques dans cette coupe radiale de racine, puis de calculer les trajectoires

de molécules d'eau (Figure 9). On reproduit qualitativement les mêmes observations que pour le modèle expérimental.

Figure 9 : illustration du modèle mathématique Eaudissect. Seul le quart supérieur droit de la coupe est représenté. Les couleurs correspondent à des potentiels hydrique différents, les tracés jaunes représentent les trajectoires calculées des molécules d'eau dans ce modèle



iii. Vers un changement de paradigme sur le trajet radial de l'eau ?

Au cours des dernières années, ce modèle a été exploré dans plusieurs directions. Sans développer ici tout ce qui a été réalisé, voici les éléments majeurs qui font l'objet d'un article en cours de rédaction avec les différents collaborateurs :

- En premier lieu, nous mettons en évidence que les valeurs absolues des conductivités des différents compartiments ont une incidence sur la quantité d'eau qui traverse la coupe radiale. En revanche, ce sont les rapports entre conductivités qui façonnent les trajets apoplastiques et/ou symplastiques,
- A la suite d'un plan de simulations visant à explorer des plages de conductivité englobant les valeurs réelles, nous pouvons affirmer qu'un trajet apoplastique pur n'existe pas concernant l'eau. Cette conclusion pourrait consister en un changement de paradigme majeur pour la nutrition hydrominérale des plantes car elle va à l'encontre de ce que l'on peut lire dans des livres ou revues (Steudle and Peterson, 1998; Marschner, 2012). Ce point de vue n'est cependant pas totalement nouveau et certains auteurs sont également arrivés à cette conclusion par d'autres approches (Knipfer and Fricke, 2010),
- La perméabilité des membranes semble jouer un rôle majeur dans la trajectoire empruntée par les molécules d'eau. Elles pourraient ainsi jouer le rôle de « péage » et « ouvrir » un trajet au travers du cytosol et de la vacuole, qui disposent de conductivités a priori bien plus élevées que l'apoplaste,
- Enfin, nous avons développé des versions annexes du modèle qui nous a permis d'étudier l'impact des plasmodesmes, des barrières apoplastiques (subérine et bande de Caspary) ou encore de l'agencement des cellules sur les flux d'eau entre cellule et la répartition des potentiels hydriques dans une coupe radiale de racine.

iv. Paramétrisation du modèle : vers une mesure automatisée de la perméabilité hydrique des cellules

Afin, notamment, de mieux répondre à la paramétrisation du modèle Eaudissect par des valeurs biologiques, j'ai cherché à développer un outil à « haut débit » de mesure de la perméabilité hydrique des cellules. En effet, il est important de pouvoir mesurer précisément la perméabilité des différents types cellulaires de la racine tout au long du trajet radial de l'eau : épiderme, cortex, endoderme,

péricycle et cellules du parenchyme xylémien notamment. L'équipe dispose actuellement de deux outils pour cela. Le premier est la sonde de pression cellulaire, qui permet de mesurer, dans une racine intacte, la pression de turgescence et la perméabilité des cellules corticales et épidermiques jeunes (Hüsken et al., 1978; Boursiac et al., 2008a). On ne peut cependant pas mesurer les perméabilités des autres types cellulaires, car de taille trop petite pour être correctement empalés avec la micropipette de la sonde. Le second outil est un système de gonflement de protoplastes, induit par un traitement hypo-osmotique et suivi par vidéo-microscopie (Ramahaleo et al., 1999). Ce système, déjà développé dans l'équipe pour différents types cellulaires de la feuille (Postaire et al., 2010; Prado et al., 2013; Grondin et al., 2015) reste techniquement délicat et d'un débit lent. Malgré la fabrication de protoplastes qui doit altérer certaines régulations, nous avons montré que des régulations de perméabilité hydrique par la lumière ou l'ABA sont conservées (cf. références précédentes). Cette dernière technique présente également l'avantage de pouvoir être mise en parallèle, c'est-à-dire que l'on pourrait enregistrer en une seule acquisition la cinétique de gonflement de plusieurs centaines de cellules.

De 2015 jusqu'à aujourd'hui, j'ai confié le développement d'un nouveau système de mesure de gonflement de protoplastes à des stagiaires, principalement issus de la filière DTEC Bio de l'Université de Montpellier, que j'ai encadrés ou co-encadrés avec des partenaires Montpellierains (Benoît Charlot, IES ; et Volker Backer, MRI) : Léo Flandin, Lan Azria, Laïna Sophie, Soukkaina Hajjaj puis Thomas Cazin et Léo Tellez-Arenas en BTS, M1 ou M2. Cet aspect a été porté par des financements du département BAP INRAE, du labex Numev et de la Mission pour l'Interdisciplinarité du CNRS. Les deux premiers étudiants ont permis d'identifier une solution microfluidique pour observer le gonflement de protoplastes en parallèle. Laïna, Soukkaina et Thomas ont ensuite cherché à améliorer les procédures d'obtention des protoplastes et de chargement de la puce microfluidique. A l'issue de ce stage, nous avons pu augmenter le nombre d'acquisitions de cinétiques d'un facteur 50 à 100. Le dernier stage de Léo a permis de mettre en place une procédure d'analyse des cinétiques grâce à une méthode de deep learning qui réduit le temps d'analyse d'un facteur 10 environ et surtout permet de l'automatiser (Figure 10).

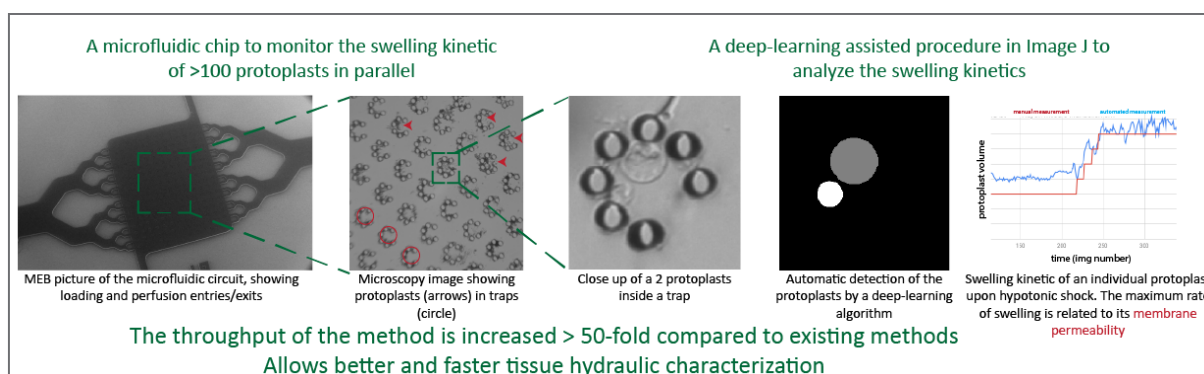


Figure 10: améliorations portés à la technique de mesure de la perméabilité hydrique des membranes par la technique de gonflement de protoplastes. Les différentes étapes, de la puce microfluidique à l'analyse d'automatique d'une cinétique de gonflement, sont illustrées.

Actuellement, ce travail se poursuit avec le recrutement de Fabrice Bauguet, en contrat post-doctoral sur le projet ANR Eaudissect, qui a pour objectif de résoudre les difficultés encore rencontrées et d'établir une procédure complète et standardisée de cette technique. Elle sera alors validée par la caractérisation de la perméabilité de protoplastes issus de racines de mutants *eskimo*, dont l'approche

de modélisation Hydroroot a prédit une valeur réduite par rapport aux plantes sauvages. Il s'agira ensuite d'adapter une imagerie de fluorescence au système que nous avons construit, ce qui nous permettra d'utiliser des lignées rapporteur exprimant des protéines fluorescentes, comme la GFP ou la mcherry, dans des types cellulaires spécifiques, afin de mesurer la perméabilité des différents tissus de la racine. Nous avons déjà obtenus des protoplastes issus de plantes transgéniques transformées avec les constructions pGLABRA::GFP, pCORTEX::GFP et pSCARECROW::GFP et qui expriment la GFP, respectivement, dans l'épiderme, le cortex, et l'endoderme.

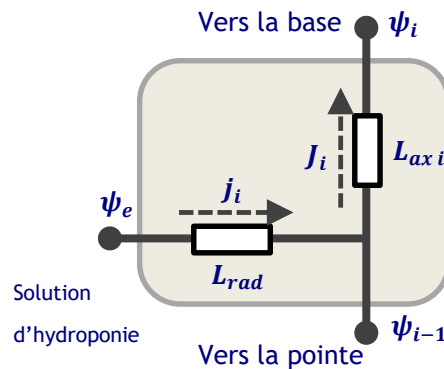
b) Hydroroot

L'objectif de ce volet est d'élaborer une modélisation hydraulique de la racine afin de tester et valider nos hypothèses sur le rôle des différents paramètres du transport d'eau dans la racine. Ce modèle, de type FSPM (fonctionnel-structural plant model) utilise des « unités hydrauliques locales », fragments de racine dont on définit les conductivités radiales et axiales, que l'on agence en série ou en parallèle afin de reconstituer un appareil racinaire complet.

Ce projet a été financé de 2012 à 2014 au travers du programme ANR Hydroroot (porté par C. Maurel) puis de 2019 à 2022 au travers du projet ERC Hyarchi (porté par C. Maurel). Il s'agit d'une collaboration entre notre équipe et Christophe Godin et Christophe Pradal à l'époque membres de l'équipe-projet Virtual Plant (INRIA-CIRAD, Montpellier), et a notamment vu la contribution de Fabrice Bauget et Stathis Delivorias. J'ai supervisé le travail de ce dernier lors de son séjour en tant qu'ATER dans notre équipe entre 2019 et 2021. Le modèle Hydroroot a été publié en 2022 dans la revue Plant Physiology (Boursiac et al., 2022a).

i. Agrégation des unités hydrauliques locales.

L'unité hydraulique locale se compose de deux trajets, radial et axial. Le modèle utilise des analogies électriques et se formalise, pour une unité donnée i , de la façon suivante :



$$L_i = ((L_{i-1} + L_{rad})^{-1} + L_{ax i}^{-1})^{-1}$$

où L_i représente la conductance hydraulique de l'élément i , L_{rad} est la conductance radiale de l'unité, et enfin L_{ax} est la conductance axiale de l'unité hydraulique. On peut calculer les flux radiaux j_i , et totaux J_i selon :

$$j_i = L_{rad} \times (\Psi_{i-1} - \Psi_e) \text{ et } J_i = j_i + J_{i-1}$$

où Ψ_e représente le potentiel hydrique extérieur et Ψ_i le potentiel hydrique de sortie de l'élément i (avec $\Psi_0 = \Psi_e$ et $\Psi_{\text{final}} = 0$, c.à.d. de l'eau libre)

Une première version du modèle a été créée en 2012 dans la plateforme Openalea, développée par nos collègues modélisateurs (Pradal et al., 2008). Elle comprend plusieurs hypothèses et choix :

- il s'agit de représenter le comportement des racines que nous pouvons mesurer en chambre à pression, c'est-à-dire cultivées en hydroponie et immergées dans une solution de potentiel hydrique homogène fixé à 400kPa,
- nous avons utilisé une simplification du trajet radial, en proposant une conductance radiale constante le long de la racine, et sous la forme :

$$L_{\text{radiale}} = \sum_{6 \text{ membranes}} Lp_{\text{cortex}}^{-1} \cdot A_{\text{epiderme}}^{-1}$$

En effet, seule la mesure de la conductivité hydraulique des cellules du cortex est mesurable actuellement au moyen des sondes de pression cellulaire. Il s'agit donc d'une première approximation qui sera gommée à mesure que les données seront disponibles (cf. 6.iii). En découle aussi que la surface considérée correspond à la surface d'un seul type cellulaire, en l'occurrence celle de l'épiderme pour plus de facilité de codage. Nous travaillons donc à conductance constante entre tissus, ce qui a été observé pour plusieurs tissus dans l'orge (Bramley et al., 2009).

- la conductance axiale est calculée à partir de la loi de Poiseuille, et est fonction de la longueur de l'unité hydraulique et du nombre et du diamètre des vaisseaux qui auront été mesurés à différents niveaux de la racine.

Les unités hydrauliques doivent ensuite être agrégées pour reconstituer une architecture racinaire, encodée sous un MTG (multi-tree graph) dans Openalea. Pour cela, nous avons eu deux options. Lors de son séjour post-doctoral dans notre équipe, M. Lucas a identifié certaines lois effectives permettant de relier la taille d'une racine au nombre de racines latérales portées et la longueur d'une racine latérale en fonction de sa position sur l'axe de sa racine parent. Ces deux lois simples, si l'on prend en compte un avortement partiel de certaines racines latérales, permettent de reconstituer des architectures virtuelles d'une racine d'Arabidopsis. La seconde option a été de reconstituer entièrement sous forme de MTG une racine mesurée, après l'avoir scannée puis reconstituée.

On peut, grâce à ce modèle, calculer la conductance totale de la racine, les potentiels hydriques pour chaque unité hydraulique, ainsi que les flux d'eau en tout point du système et de l'appareil racinaire entier.

ii. Principaux résultats

Une première utilisation du modèle nous a conduit à étudier la sensibilité des flux d'eau aux 3 grands paramètres du modèle : la conductivité axiale, la conductivité radiale, et l'architecture. Nous avons plus particulièrement identifié que, contrairement à l'idée majoritaire dans la communauté suite aux travaux antérieurs sur le maïs notamment, les vaisseaux peuvent être limitants dans le transport

total d'eau, au même titre que la conductivité radiale. Il semble qu'il y a un équilibre entre ces deux paramètres.

L'un de nos objectifs était de paramétrer Hydroroot avec le plus grand nombre de paramètres mesurés expérimentalement. Cela nous a conduit à développer une méthode, nommée « Cut & Flow » (Figure 11), dans lequel nous mesurons le flux d'eau sortant d'un appareil racinaire entier puis après des coupes successives des racines. Les vaisseaux restant ouverts après coupe, ces mesures court-circuitent le trajet radial et nous avons ainsi accès, de façon indirecte, à la conductance des vaisseaux. F. Bauguet a mis en place des algorithmes de reconstitution de l'architecture racinaire à partir des coupes et d'optimisation des paramètres hydrauliques, qui nous donnent accès à l'ensemble des paramètres d'Hydroroot capables de prédire nos mesures. Cette approche a notamment mis en lumière une conductivité plus faible des vaisseaux, ce qui renforce la conclusion ci-dessus.

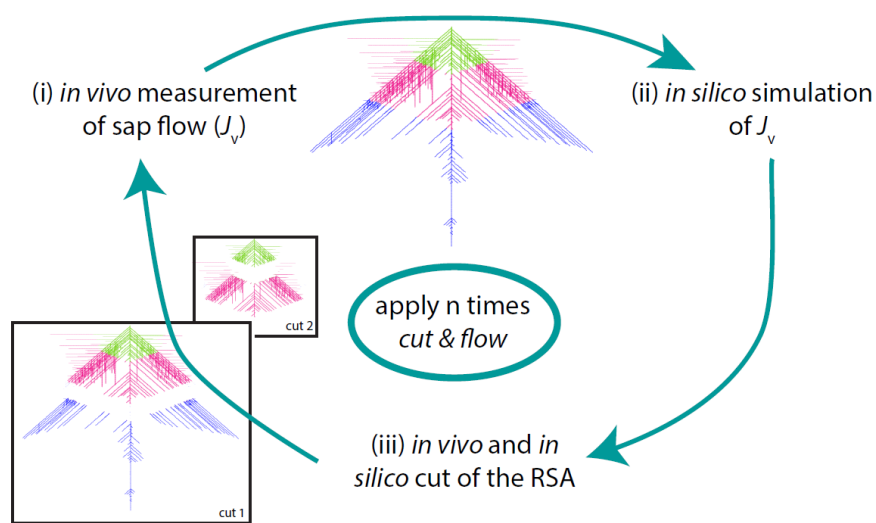


Figure 21: Principe de la mesure Cut & Flow. Le flux racinaire mesuré à l'occasion d'une série de coupes de la racine permet d'abonder une procédure d'optimisation des paramètres du modèle hydroroot, et d'en déduire les conductivité axiales et radiales de la racine mesurée.

Enfin, nous avons caractérisé les mutants *eskimo* par la technique du Cut & Flow. Comme attendu, la conductivité axiale de ces mutants est réduite dans ce génotype. Nous avons cependant observé que les deux autres composantes, l'architecture et la conductivité radiale, sont également affectées. Il semble donc y avoir entre toutes les composantes du transport d'eau (du moins celles explicitées dans le modèle Hydroroot), un équilibre et des phénomènes de compensation, qui permettent probablement à la plante de se développer au mieux.

iii. Les « intercepts » comme approximation de l'architecture racinaire

Le développement du modèle Hydroroot a nécessité de pouvoir travailler sur un grand nombre d'architectures racinaires. Une partie de celles-ci ont été obtenues par la digitalisation d'architectures réelles, par une procédure de traçage manuel ou semi-automatique extrêmement couteuse en temps. Nous avons également mis en place un « générateur d'architecture » sur la base des lois effectives initialement observées par M. Lucas. Dans ce dernier cas cependant, l'arrêt de croissance de certaines

racines latérales n'était pas pris en compte et les architectures simulées étaient, pour grande partie, très éloignées de la réalité. Nous avons proposé une mesure (ou un calcul) des « intercepts » comme un paramètre caractéristique d'une architecture donnée. Un intercept correspond au nombre d'axes racinaires que nous couperions à une distance donnée de la base de la racine. Une courbe d'intercepts peut être rapidement calculée sur les architectures simulées et peut également être obtenue relativement rapidement (quelques minutes) sur une architecture réelle. Ce paramètre semblait donc être un bon compromis entre la quantité d'informations relevées et le temps nécessaire à son obtention.

Nous avons proposé à Stathis Delivorias d'approfondir cet aspect lors de son séjour en tant qu'ATER dans l'équipe pendant 2 ans. Sans en expliciter le détail, il a montré qu'il est possible d'inférer la répartition des racines latérales d'ordre 1 et 2 à partir d'une courbe d'intercepts. Ces courbes permettent également de filtrer les architectures simulées et ont servi à expliciter des différences entre géotypes. Enfin, Stathis a montré que la courbe d'intercepts peut être efficacement ajustée par une courbe de Rayleigh, qui est entièrement décrite par 2 paramètres. Grâce à son travail, il serait donc possible de décrire relativement finement une architecture racinaire complexe comme celle d'*Arabidopsis* au travers de 2 paramètres issus d'une courbe rapide à obtenir. Un article issu de ce travail est en cours de rédaction.

4. Perspectives de l'axe

Le travail sur les barrières de diffusion apoplastiques et les autres candidats du transport d'eau a été pratiquement entièrement finalisé. Quelques collaborations sont encore en cours et certaines questions seront abordées si une occasion de collaboration et de financement se présente :

- Une attente importante serait la capacité à mesurer la conductivité hydraulique de couches natives de subérine et de lignine. Cette question nécessite des compétences en biochimie des polymères dont peu de laboratoires disposent. Cela permettrait de mieux quantifier leur rôle dans la régulation du transport racinaire d'eau et dans le trajet radial.
- Le rôle des plasmodesmes sur le transport d'eau n'a pas été clairement démontré. Une première caractérisation de mutants affectés dans leur ouverture n'a pas identifié de phénotype particulier mais des compensations ou effets secondaires sont envisageables. Il conviendrait de pousser un peu plus cet aspect (cartographie des plasmodesmes, complémentations spécifiques, mesure du trajet radial,)

Le projet ANR Eaudissect, qui court jusqu'en 2026, possède deux volets qui seront développés en collaboration avec nos partenaires :

- Un premier volet consiste à reprendre le modèle Eaudissect présenté plus haut et reconsidérer la modélisation de la membrane, qui entraîne un temps de calcul excessivement long et des problèmes numériques importants dans sa version actuelle. Un travail sur la création plus aisée de géométries à partir d'images de coupe de racine est également envisagé, afin de rapprocher le modèle d'une structure « réelle »,
- Le dernier volet du projet, plus risqué, consiste à mettre en évidence in vivo les trajets de l'eau prédits par le modèle. Les techniques actuelles n'autorisent pas les précisions temporelle et/ou spatiale requises, et les traceurs ne se comportent pas de la même façon que l'eau dans un système aussi complexe que la racine. Nous tenterons d'utiliser des rotors moléculaires

dont la fluorescence et la durée de vie dépendent de leur environnement physico-chimique. Des molécules BDPY ont été développées et appliquées avec succès à la racine d'*Arabidopsis* (Michels et al., 2020). Notre objectif est de réaliser ce type d'approche dans des conditions où nous pouvons mettre en évidence des différences de flux d'eau à l'échelle subcellulaire.

Concernant le projet Hydroot, ses dernières évolutions ont abouti à deux réalisations : la technique du « Cut-and-flow », que l'on peut considérer comme un outils de phénotypage assisté par un modèle mesurant simultanément les conductivités axiale et radiale d'une racine ramifiée, et un modèle hydraulique incorporant également le transport de solutés (Bauget et al., 2023). Ces deux aspects permettent une compréhension plus détaillée de l'architecture hydraulique racinaire, et seront proposés comme outil de phénotypage « évolué » dans l'équipe et à nos collaborateurs. Deux collaborations internationales sont en cours actuellement (M. Rosales, Séville, et G. Lobet, Allemagne).

Enfin, l'équipe dispose de plusieurs outils qui permettent de mesurer les transport d'eau ou les paramètres hydriques à différentes échelles. On compte notamment un poste d'expression hétérologue et de gonflement d'ovocytes porté par Colette Tournaire, IR INRAE, et un appareillage de spectrophotométrie en flux interrompu dédié aux microsomes et protéoliposomes géré par Lionel Verdoucq, CRCN CNRS. A cela s'ajoutent les chambres à pression semi-automatiques que j'ai développé et le poste de gonflement de protoplastes en cours de finalisation. Je souhaiterais que nous agrégions à moyen-terme ces appareillages et ce savoir-faire sous la forme d'un atelier de phénotypage hydraulique. Une telle structure permettrait l'amélioration de nombreux aspects importants pour notre activité : qualité et traçabilité des mesures, meilleure reconnaissance nationale et internationale, cadre plus clair de collaborations, suivi et entretien des appareils, ou encore veille et développements technologiques.

II. DU SIGNAL PHYSIQUE AU SIGNAL BIOLOGIQUE DE LA CONTRAINTE HYDRIQUE

Cet axe est moins avancé que le précédent, mais le travail présenté ci-dessous constitue le fondement de mes perspectives scientifiques. A ce jour trois personnes que j'ai encadré ont travaillé directement sur ce sujet (financé une première fois au travers du projet OpenScience du Labex Agro Watermarkers puis soutenu par une bourse CSC [Chinese Scholarship Council] entre 2019 et 2023) : Sandy Bergès, étudiante de L3 en 2014, sur la création de cartes spatiotemporelles de l'ABA en réponse à une contrainte hydrique, Amandine Crabos, en CDD IE pendant 6 mois en 2015, sur le développement de marqueurs moléculaires du potentiel hydrique, et Yunji Huang, étudiant en thèse de 2019 à 2023.

1. Contexte : Le Languedoc Roussillon et la contrainte hydrique

Dans le bassin Méditerranéen, et en particulier en Languedoc Roussillon, l'ensemble des modèles climatiques s'accorde sur une réduction de la pluviométrie et une augmentation des températures pour les décennies à venir (cf. rapports du GIEC). Plus précisément, on devrait assister à une alternance plus fréquente de périodes de sécheresse et de pluies intenses (les « épisodes Cévenols », modèle Arpège Climat de Météo-France). Ce scénario climatique a engagé ma réflexion sur la perception précoce et l'adaptation à des alternances entre environnements hydriques propices et défavorables.

On connaît bien les effets d'une contrainte hydrique sur le cycle de vie d'une plante. A long terme, trois types de comportements sont observés (expliqués dans (Harb et al., 2010)) : l'échappatoire, l'évitement et l'adaptation. L'échappatoire consiste à raccourcir la phase de développement végétative et accomplir le cycle de reproduction avant que les conditions environnementales ne soient trop sévères. Cela se traduit par une floraison et une sénescence précoces (Riboni et al., 2013). La stratégie d'évitement met en œuvre des réponses permettant de maintenir le statut hydrique de la plante, telle que la diminution de la croissance des parties aériennes avec maintien de la croissance racinaire (Sharp and LeNoble, 2002; Sharp et al., 2004), ainsi que la réduction des pertes d'eau par les stomates et la cuticule. Enfin, l'adaptation vise à permettre le bon fonctionnement de l'appareil végétatif malgré une réduction de sa teneur en eau (i.e. une réduction de son potentiel hydrique, voir plus bas). Cette réponse opère en particulier via la synthèse de protéines chaperonnes et d'osmoprotectants (Verslues and Bray, 2004), ou encore par activation de voies de détoxification (Miller et al., 2010).

En amont de ces réponses à long terme, des changements importants des profils d'expression des gènes (et des métabolismes) sont à l'œuvre, principalement sous le contrôle d'une hormone de stress majeure: l'acide abscissique, ou ABA (Harb et al., 2010; Jones, 2016). Les enzymes de biosynthèse de l'ABA sont exprimées dans tous les organes de la plante (pour revue voir (Boursiac et al., 2013)), et sont plus particulièrement actives en réponse à la contrainte hydrique (Nambara and Marion-Poll, 2005). Les voies de signalisation contrôlées par l'ABA sont également bien décrites, et ont soulevé un intérêt sans précédent lors de la découverte des récepteurs à l'ABA en 2009 (l'un des « Major Scientific Breakthrough » de 2009 selon la revue Science, pour revue voir (Cutler et al., 2010)). Certains mécanismes à moyen et long terme sont encore peu compris : historiquement, il a été considéré que l'ABA était synthétisé au niveau des racines puis exporté vers les parties aériennes (Sauter et al., 2001; Sauter et al., 2002; Wilkinson and Davies, 2002). Quelques études et la présence

des enzymes de synthèse d'ABA dans les parties aériennes remettent ce postulat en cause et suggèrent que l'ABA, y compris celui accumulé dans les racines, provient en majorité de la synthèse d'ABA dans les parties aériennes (Christmann et al., 2007; Bauer et al., 2013; Boursiac et al., 2013).

Les connaissances sur les processus situés en amont de la synthèse d'ABA ou liés à d'autres réponses à moyen terme sont nombreuses mais restent à intégrer dans des modèles cohérents. Certaines voies de signalisation ainsi que des messagers secondaires sont activés lors d'une contrainte hydrique, tels que les MAP Kinases, les voies dépendantes du calcium (voies CBL/CIPK et CPK) ou des espèces activées de l'oxygène (ROS)(Zhu, 2002; Galvez-Valdivieso et al., 2009; Monshausen et al., 2009). Ces processus de signalisation interviennent soit en amont, soit en aval de l'action de l'ABA. Par exemple, des variations de la concentration en calcium du cytosol ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) sont observées dans des suspensions cellulaires d'Arabidopsis dans les secondes qui suivent un choc osmotique (Knight et al., 1997) tandis que des signalisations calciques sont requises pour la réponse des stomates à l'ABA (Webb et al., 2001). Ou encore, la protéine CBL9, activée indirectement par le calcium, régule à la fois la biosynthèse de l'ABA et les réponses à cette hormone (Pandey et al., 2004). Les ROS sont également parmi les premiers messagers générés en réponse à une contrainte hydrique (Monshausen et al., 2009). Ils pourraient réguler la synthèse d'ABA (Zhao et al., 2001), et participent également à la réponse à cette hormone (pour revue voir (Miller et al., 2010)

Encore en amont des signalisations mentionnées ci-dessus, les premiers événements de perception – et leurs bases moléculaires - restent très hypothétiques. Il s'agit pourtant d'un enjeu majeur, aussi bien pour la recherche fondamentale qu'appliquée : comprendre comment convertir les aspects physiques de la contrainte hydrique en signal biologique. Il a été suggéré que l'histidine kinase HK1 fonctionne comme un senseur du potentiel osmotique (osmosenseur) chez les plantes et initie les réponses aux contraintes hydriques, que ce soit la sécheresse ou des traitements osmotiques (Urao et al., 1999; Tran et al., 2007). Ce rôle a cependant été remis en question et HK1 serait probablement en aval de la perception de la contrainte osmotique (Kumar et al., 2013). Des canaux anioniques, des conductances calciques ainsi que des protéines de type RLK (receptor like kinases), sont dits mécanosensibles car leur activité est modulée par les tensions de la membrane (Beauzamy et al., 2014; Haswell and Verslues, 2015; Hamant and Haswell, 2017; Scharwies and Dinneny, 2019) ou par l'association entre la membrane et la paroi. Ces tensions/associations changent lors d'une contrainte hydrique et d'une perte de turgescence. Toutefois, aucune de ces molécules ou activités candidates n'a été clairement impliquée dans la transduction et l'activation de voies de signalisation lors de la contrainte hydrique.

Une de mes hypothèses de travail est que l'identification des éléments précoces de perception et transduction de la contrainte hydrique nécessite avant tout des informations précises de sa mise en place dans la plante, aussi bien temporelles et spatiales que sur ses composantes. C'est un questionnement que l'on retrouve par ailleurs dans la littérature (Sack et al., 2018; Verslues et al., 2022). Autrement dit, où et quand la nature physico-chimique de la contrainte hydrique est-elle perçue puis convertie en signal biologique ? La direction prise pour de cet axe de mes recherches est d'établir des cartes spatio-temporelles de l'environnement physico-chimique de la racine et de ses cellules, et de les comparer à des cartes d'activation des réponses moléculaires précoces face à une contrainte hydrique. Il est à noter que pour accéder à la racine tout en la mettant en situation de déficit hydrique, nous sommes contraints d'utiliser des cultures in vitro ou en hydroponie et d'imposer le déficit sous forme de baisse du potentiel osmotique via des solutés.

2. Carte dynamique des signalisations précoces de la contrainte hydrique

Parmi les signalisations précoces supposées intervenir dans la réponse à la contrainte hydrique, nous avons considéré les signalisations calciques, ROS et ABA (Knight et al., 1997; Christmann et al., 2007; Monshausen et al., 2009; Christmann et al., 2013). Les deux premiers messagers répondent très rapidement, et de façon localisée, à des contraintes environnementales (Knight et al., 1997; Miller et al., 2009; Monshausen et al., 2009). Dans notre laboratoire, les ROS sont plus particulièrement étudiés en réponse à des traitements osmotiques après culture *in vitro* (Smokvarska et al., 2020). Christmann et ses collègues (Christmann et al., 2005; Christmann et al., 2007) ont mis au point un marqueur de l'accumulation d'ABA basé sur le promoteur du gène HB6 et la luciférase (LUC), qu'ils ont pu corrélérer à moyen terme au potentiel hydrique de solutions du milieu extérieur, et dont l'expression entre 6 et 24h traduit l'activation de réponses intégrées de la part de la plante. Au cours du stage L3 de Sandy Bergès (U. Montpellier) en 2014, nous avons jeté les premières bases de l'établissement d'une carte spatio-temporelle des signalisations de la contrainte hydrique en essayant de suivre l'accumulation d'ABA. Notre hypothèse est que l'observation de signaux systémiques d'ABA marque la fin de la période « précoce » de perception, qui serait celle qui transduit le signal physique en un signal biologique.

Lors du stage de Sandy, la construction pHB6 ::LUC nous a permis de tester plusieurs conditions expérimentales. Au final, cet outil se révèle relativement délicat à manier et il a fallu optimiser le protocole d'application de la contrainte. Le principal résultat du stage est que, sur des plantules cultivées *in vitro*, la feuille répond très rapidement et de façon transitoire à l'imposition d'une contrainte au niveau des racines (en moins de 1h). Puis la zone de racine n'étant pas au contact du milieu gélosé répond ensuite à la contrainte imposée par NaCl ou le mannitol. La feuille répond alors à nouveau, alors que la racine au contact du traitement ne répond pas. Il semblerait dès lors que la partie de la racine hors du milieu gélosé soit une « zone tampon » entre la racine et la feuille, qui initie une signalisation ABA avant qu'elle ne soit ensuite induite à nouveau dans les feuilles (Figure 12).

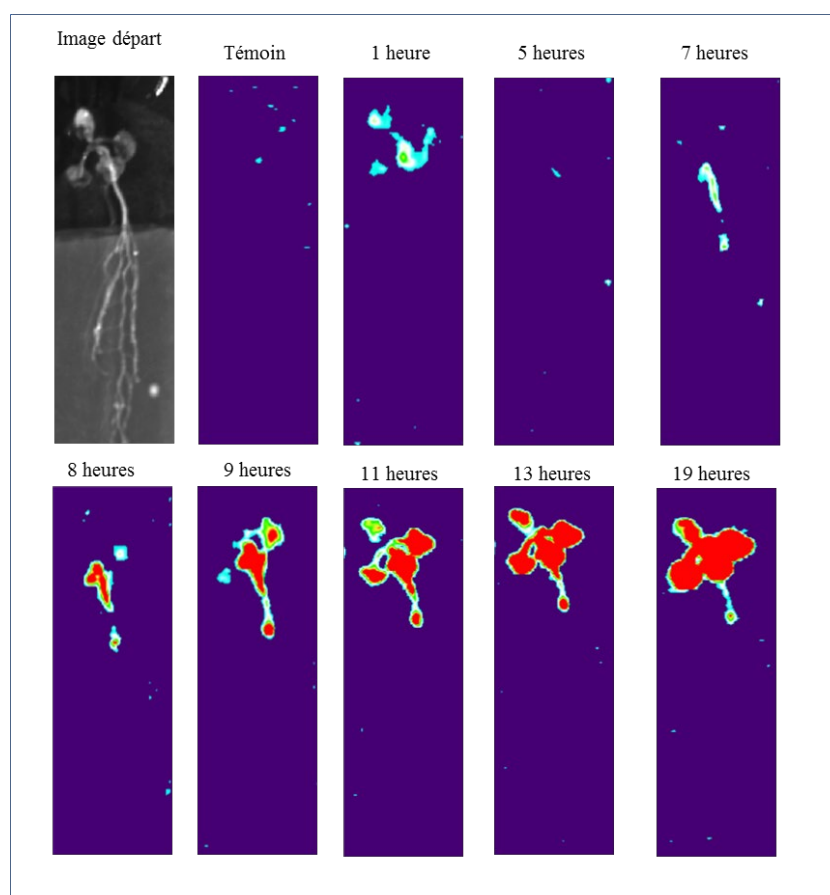


Figure 32: Cinétique d'accumulation d'ABA lors d'une contrainte osmotique appliquée à la racine d'Arabidopsis. Le signal luciférase émis par la construction rapporteur pHB6 ::LUC a été observé au cours d'une cinétique de plus 20h appliqué sur des plantules cultivées en « boîtes ».

Cet aspect doit encore être développé, et de nouveaux outils sont notamment disponibles pour étudier au niveau du tissu l'activation de signalisation ABA, comme par exemple les rapporteurs ABACUS et ABAléon (Waadt et al., 2014; Jones, 2016). Ces outils seront évalués.

Lors de mon premier stage post-doctoral, j'ai étudié la signalisation calcique et suivi les variations de calcium cytosolique ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) au cours de la germination de grains de pollen grâce à la technique Caméléon (Allen et al., 1999). Je dispose des clones et de l'expertise nécessaire pour suivre $[Ca^{2+}]_{cyt}$ dans la racine. D'autre part, les auteurs de certaines études citées ci-dessus nous ont procurés les outils (clones et plantes transformées) permettant de suivre des variations du statut redox des cellules -le marqueur pZAT12 ::LUC (Miller et al., 2009). Ces marqueurs sont également de bons candidats pour caractériser les signalisations biologiques dans la racine d'Arabidopsis au cours des phases précoces de la contrainte hydrique.

L'objectif est d'aboutir à une carte spatio-temporelle des signalisations précoces de la contrainte hydrique. Une attention toute particulière sera portée à la chronologie et donc à la hiérarchie des différents types de signalisation.

3. Projet WATERMARKERS

L'objectif premier de ce projet a été d'établir une carte spatio-temporelle des potentiels hydriques dans la racine lors d'une contrainte hydrique.

Plusieurs moyens de mesure du potentiel hydrique ou de ses composants hydrostatiques et osmotiques existent : mesure du potentiel hydrique d'organes entiers via un osmomètre, pression de turgescence avec une sonde de pression cellulaire, un indenteur ou des « picogauges », mesure de l'osmolarité d'un extrait cellulaire avec un osmomètre par exemple (Boursiac et al., 2022b). Ces techniques ne permettent cependant pas, ou très difficilement, d'accéder à tous les tissus de la racine, et sont assez lourdes à mettre en œuvre. Des techniques d'imagerie existent également, basées sur l'imagerie en proche infrarouge, ou NIR (De Bei et al., 2011), ou encore sur la résonance magnétique (Buy et al., 2018; Pascut et al., 2021). Ces techniques présentent des inconvénients à leur application à la racine d'Arabidopsis : incompatibilité avec une culture in vitro ou hydroponique, résolution spatiale ou temporelle insuffisante, nécessité d'une calibration au préalable notamment. Forts de l'exemple de développement d'un marqueur génétique de la température (Kumar and Wigge, 2010) et d'une approche de transcriptomique ayant montré chez le tournesol une relation entre l'expression de gènes et le statut hydrique de la plante (Marchand et al., 2013), nous avons emprunté cette voie et cherché à développer un tel marqueur concernant le potentiel hydrique et/ou ses composantes.

Cet aspect a été soutenu par le labex Agro dans le cadre du projet Open Science WaterMarkers, de Mars 2015 à Juin 2016 (30k€ dont 6 mois de CDD IE par Amandine Crabos). Ce projet est réalisé en collaboration avec Gabriel Krouk et Sandrine Ruffel, chercheurs au laboratoire IPSiM. Depuis 2019, il fait l'objet du travail de thèse de Yunji Huang, bénéficiant d'une bourse CSC. Actuellement, une publication est issue de ce travail (Crabos et al., 2023).

Amandine a, dans un premier temps, réalisé des mesures de la pression de turgescence des cellules corticales jeunes de la racine d'Arabidopsis pendant 30 min après imposition d'un choc osmotique. Ce pas de temps est suffisant pour observer des réponses transcriptionnelles, (Krouk et al., 2010). Diverses concentrations ne provoquant pas de plasmolyse en NaCl, polyéthylène glycol et mannitol ont montré la présence d'une stabilisation de la pression de turgescence après 10 minutes de traitement, à des niveaux corrélés à la concentration en osmoticum utilisé (cf. Figure 13). Nous avons également employé l'éthylène glycol, un soluté perméant qui abaisse le potentiel hydrique de la solution mais également celui des cellules, ce qui préserve en partie la pression de turgescence (Pierce and Raschke, 1980; Creelman and Zeevaart, 1985) et devrait permettre de découpler un effet sur la pression osmotique externe de celui sur la pression de turgescence. Ce traitement a mis en évidence une diminution moindre de P pour des concentrations élevées. Des transcriptomes à 15 minutes de traitement ont ensuite été réalisés, afin d'identifier les gènes dont le niveau d'expression est corrélé au potentiel ainsi imposé. Nous observons près d'un millier de gènes

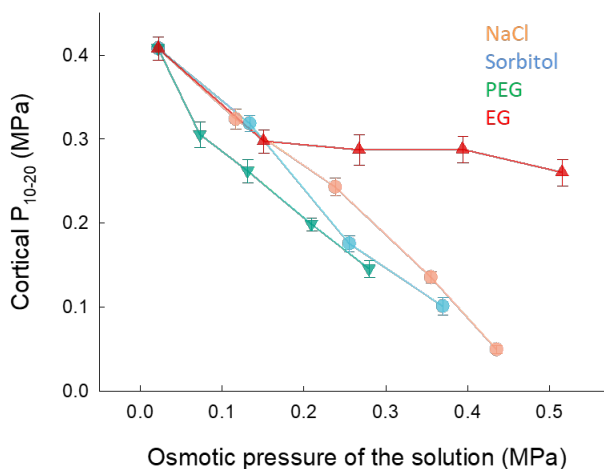


Figure 43: Effet de traitements osmotiques sur la pression de turgescence des cellules de racine. La valeur moyenne de P, mesurée à l'aide d'une sonde de pression cellulaire entre 12 à 17min après traitement, est rapportée à la pression osmotique des solutions, mesurée avec un osmomètre .

différentiellement exprimés dans nos conditions. Outre des gènes dont l'expression est spécifiquement régulée par un seul ou un petit groupe de traitements, nous identifions également :

- Des gènes dont l'accumulation de transcrits est corrélée (positivement comme négativement) au potentiel hydrique de la solution (Figure 14, Π -cluster)
- Des gènes dont l'accumulation de transcrits est corrélée (positivement comme négativement) à la pression de turgescence des cellules corticales jeunes (Figure 14, P-cluster)

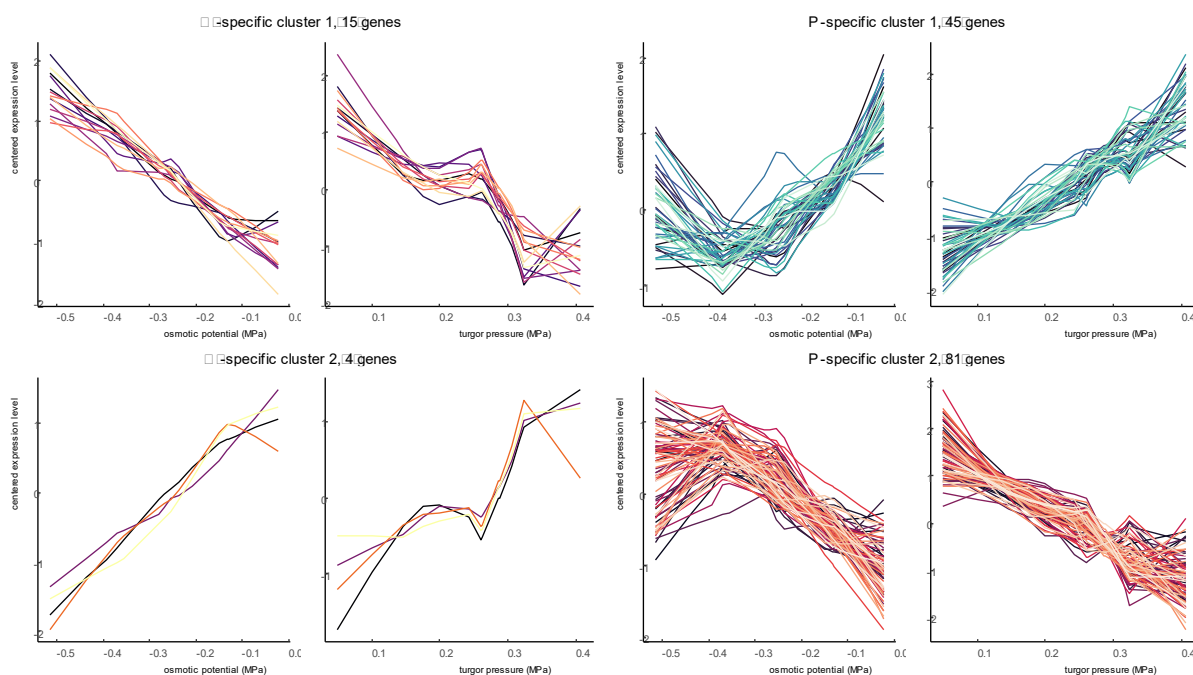


Figure 54: Gènes dont l'expression est corrélée à Π ou à P. Les gènes préférentiellement associés à Π montrent une corrélation meilleure avec Π qu'avec P, et inversement pour les gènes associés à P. Chaque classe a ensuite été séparée en 2 selon que les gènes sont surexprimés ou inhibés par les traitements.

On voit ainsi que plusieurs mécanismes de réponse transcriptionnelle existent dans la racine, certains découlant de la pression osmotique du milieu extérieur tandis que d'autres semblent être dépendants de la pression de turgescence des cellules. Le travail de thèse de Yunji Huang s'inscrit à la suite de ce travail. Il a confirmé, par RT-q-PCR, la régulation de l'expression de 10 gènes sur 12 testés. Ce travail a été publié récemment dans le Journal of Experimental Botany (Crabos et al., 2023).

Yunji s'est ensuite focalisé sur 2 candidats : le candidat 1 dont l'abondance des ARNm est la plus fortement corrélée à la pression de turgescence, et le candidat 2 dont l'expression augmente de façon corrélée à la pression osmotique (P_i) des traitements. Dans un premier temps, il a notamment montré, pour ces deux gènes, que leur dynamique de régulation s'inverse dès lors que les cellules du cortex entrent en plasmolyse. Il s'agit d'un résultat important pour la communauté car de nombreuses études ne tiennent pas suffisamment compte de l'intensité du traitement, ce qui peut rendre plus complexe l'interprétation des résultats.

Une cinétique d'expression du candidat 1 montre une très bonne corrélation avec les variations de P. L'abondance de ce gène est très rapidement diminuée en réponse à un traitement osmotique, et va progressivement revenir au niveau d'origine après 1 à 3h. L'étude de la réponse à la contrainte hydrique dans des fonds génétiques mutés, ainsi que l'utilisation de la cordycépine, un

inhibiteur de la transcription, a montré le rôle des voies de dégradation des ARNm dans la réponse de ce gène. Cependant, l'utilisation de la séquence promotrice et des régions 3' UTR pour contrôler une version à courte durée de vie de la luciférase (Kijima et al., 2018) ne permet pas de reproduire la régulation de l'abondance de l'ARNm natif. Il semble donc que la séquence propre du transcrit du candidat 1 joue un rôle important dans sa régulation. Actuellement, nous pensons qu'elle pourrait dépendre d'une séparation de phase liquide/liquide. Néanmoins, le promoteur peut quand même donner une information sur la localisation tissulaire du gène, et des fusions avec une séquence GFP-GUS identifie les régions après la zone de transition du méristème ainsi que quelques cellules proches du centre quiescent comme zone d'expression. Ces zones pourraient donc posséder les mécanismes de perception de la contrainte hydrique qui aboutissent à la régulation de notre premier candidat. Enfin, le rôle du candidat 1 dans la réponse à la contrainte osmotique n'a pas pu être étudié pendant la thèse de Yunji car nous n'avons pu obtenir de plantes KO pour ce gène.

Le second candidat voit son expression augmenter en réponse aux traitements osmotiques. Cependant, une analyse cinétique montre un délai de quelques 10-15min, et un niveau restant relativement haut au cours du temps, compatible avec une signalisation dépendante de la pression osmotique. Bien que montrant quelques phénotypes, la régulation de ce gène par les voies de dégradation des ARNm ne semble pas aussi prégnante que pour le premier candidat. En revanche, l'abondance des ARNm de la luciférase a durée de vie courte sous le contrôle du promoteur et du 3'UTR de ce candidat est très bien corrélée à celle des ARNm du gène endogène. Nous avons donc, avec ce type de construction, un bon rapporteur de la régulation du candidat 2. L'observation du signal luciférase (Sluc) au cours de traitements osmotiques montre que, dans les 30 à 60 premières minutes, celui-ci semble très bien corrélé à P si l'on prend en compte un délai de 20min environ. Une réponse significative est observée dès traitement par 50mM Sorbitol ou 25mM NaCl, ce qui en fait un rapporteur dix fois plus sensible que le rapporteur SED1 par exemple (Cuevas-Velazquez et al., 2021). A moyen terme, c'est-à-dire entre 1 et 3h, le signal Sluc semble être plutôt corrélé à la pression osmotique mais les réponses sont légèrement différentes selon l'osmoticum considéré. Ce rapporteur est sensible à l'ajout exogène d'ABA mais pas à celui d'autres hormones comme l'auxine ou le méthyl-jasmonate. Enfin, le traitement des racines induit une réponse similaire, bien que décalée en intensité de réponse, du rapporteur. Un essai sur feuilles détachées, se déshydratant au cours du temps, a montré que les feuilles sont autonomes pour la régulation du rapporteur, ce qui suggère fortement une signalisation hydraulique entre organes. Dans les feuilles, la réponse peut être observée en moins de 30 min, ce qui est beaucoup plus rapide que le rapporteur pHB6-LUC connu pour être dépendant de l'ABA et activé par la signalisation hydraulique (Christmann et al., 2007). En conclusion, nous avons développé un rapporteur de changements hydrauliques qui semble à la fois plus précoce et plus sensible que les outils existants. Un article sur le développement de ce que nous nommons « l'hydro-rapporteur » est en cours de finalisation.

4. Perspectives de l'axe

Plusieurs pistes s'ouvrent suite au travail ci-dessus, qui constitue un fondement à mes activités de recherche futures. Trois perspectives me semblent particulièrement ressortir. L'un des points forts de ces approches ne réside pas tant dans l'originalité des approches que dans notre capacité à finement comprendre, contrôler, et mesurer si nécessaire le déficit hydrique que nous appliquons. Les deux premiers aspects font l'objet de deux projets déposés en vue de l'obtention de financements de demi-bourses de thèse.

Il est à noter que nous étudions les perceptions précoces d'une variation des paramètres hydrauliques dans le contexte d'un déficit hydrique, mais des variations légères ou modérées existent également par ailleurs : re-irrigation, variations journalières ou saisonnières notamment. Il serait intéressant de tester si les signalisations que nous sommes en train d'identifier y sont également impliquées.

a) Marqueurs moléculaires du potentiel hydrique

Nous avons développé un rapporteur précoce de variations hydrauliques en utilisant les séquences promotrices et 3'UTR d'un gène candidat. Il s'agira d'identifier les éléments cis présents sur ces séquences par une étude poussée *in silico* des éléments régulateurs connus, puis par des constructions contenant des séquences supprimées ou modifiées. Nous ne restreindrons pas à une analyse binaire de la régulation car nous avons observé une variation continue de l'expression du gène en fonction de l'intensité du traitement osmotique. Il est probable que son expression résulte de la combinaison d'éléments cis, et nous utiliserons le même type d'analyse par facteurs combinés que nous avons employée pour l'analyse des transcriptomes à l'origine de ce travail (Crabos et al., 2023).

Nous tenterons alors de développer des rapporteurs transcriptionnels plus sensibles et d'une plus grande plage dynamique avec les éléments cis identifiés. L'objectif sera également de pouvoir exprimer cette construction dans des types cellulaires spécifiques afin de pouvoir cartographier finement la dimension spatiale de la perception de la contrainte hydrique.

Il sera ensuite possible de valider ces marqueurs dans d'autres espèces d'intérêt agronomique, dans une approche de biologie translationnelle. En effet, les plantes supérieures ont un très haut degré de conservation de leur génome et de leurs mécanismes de réponses aux contraintes environnementales. Des tests de détection précoce de la contrainte hydrique pourraient donc être rapidement mis au point et permettre de mieux comprendre comment un stress hydrique se met en place chez ces plantes, dans des environnements divers et montrant des mécanismes de tolérance ou d'adaptation variés.

b) Mécanismes précoces de perception de la contrainte hydrique

Les outils développés pendant la thèse de Yunji Huang préfigurent une approche sans *a priori* afin d'identifier les bases moléculaires impliquées dans la perception précoce de la contrainte hydrique dans la racine. Ce type d'approche a déjà été poursuivi avec succès pour la perception de la température chez *Arabidopsis* (Kumar and Wigge, 2010). Il s'agirait ici de réaliser un crible de mutants EMS de la lignée hydro-rapporteur afin de détecter des mutants qui expriment le rapporteur en conditions standards, ou qui ne l'expriment plus lors d'une contrainte hydrique. Cet aspect de génétique d'association permettrait la découverte de nouveaux mécanismes de perception de la contrainte hydrique, et est complémentaire de la recherche d'éléments régulateurs cis mentionné au paragraphe précédent.

Concernant le second candidat, nous émettons l'hypothèse que la régulation de son expression pourrait se dérouler au travers de condensats biomoléculaires créés par des séparations de phase liquide/liquide. Ces structures, dont les deux plus connues sont les « Processing bodies » (P-bodies) et les granules de stress (SG), délimitent des compartiments intracellulaires sans membrane. Trois aspects en font des candidats de choix pour la régulation concernée : ils regroupent protéines et

acides nucléiques, ils sont souvent associés à des régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles ; et leur formation dépend d'interactions faibles et de changements conformationnels variant en fonction de l'environnement physico-chimique de la cellule, comme cela pourrait être le cas pour P et Pi lors d'une contrainte hydrique (Emenecker et al., 2021; Cuevas-Velazquez et al., 2021; Solis-Miranda et al., 2023). La question de la sensibilité des condensats à des variations de pression de turgescence est d'ailleurs mentionnée comme question ouverte dans un article récent très éclairant sur le rôle de ces condensats dans l'homéostasie de la pression osmotique (Watson et al., 2023). Le modèle serait donc le regroupement des ARNm du candidat et des protéines de dégradation des ARN (decapping et exonucléases entre autres) dans les mêmes condensats, se formant lors d'une baisse de P. Il s'agit probablement de l'hypothèse la plus originale de mon travail, et qui pourrait expliquer à elle seule un mécanisme de perception du signal physique (la baisse de P ou Pi) et sa transduction en une réponse biologique (la régulation transcriptionnelle du candidat.

c) Modulation hydraulique des zones de perception

L'objectif de cette perspective sera de tester comment les paramètres hydrauliques des zones de perception peuvent influencer le déclenchement de la réponse à la contrainte hydrique. Pour cela, nous modulerons artificiellement le statut hydrique des zones de perception par l'altération localisée de la conductivité hydraulique cellulaire via l'activité d'aquaporines. L'aquaporine *PIP2;1* ainsi qu'un microARN antisens seront exprimés dans la racine pour, respectivement, augmenter et diminuer l'activité des aquaporines. Cette expression se fera sous le contrôle des mécanismes de régulation transcriptionnels que nous avons identifié plus haut. La protéine *PIP2;1*, dont l'activité de transport d'eau est étudiée dans l'équipe, sera exprimée sous sa forme dérégulée. Dans ce cas, des mutations ponctuelles rendent l'aquaporine plus active et moins sensible aux régulations post-traductionnelles (Prak et al., 2008; Pietro et al., 2013; Prado et al., 2013), et devraient augmenter la conductivité hydraulique des membranes. Le microARN antisens sera, quant à lui, dirigé principalement contre les aquaporines identifiées dans les zones de perception des contraintes. Sur la base de nos hypothèses, nous ciblerons les aquaporines majoritaires des racines (Boursiac et al., 2005; Pietro et al., 2013) : *PIP1;1*, *PIP1 ;2* et *PIP2;1* à *PIP2;4*. Cette dernière approche s'est révélée fructueuse pour diminuer la perméabilité hydrique de cellules végétales (collaboration avec N Sade, (Sade et al., 2014)). Au final, la modulation de la perméabilité des membranes devrait provoquer une modification de la carte des potentiels hydriques dans la racine. Nous espérons ainsi créer une boucle de rétro-contrôle de la contrainte hydrique, capable de moduler l'activation des signalisations calciques, ROS ou ABA. Concrètement, la présence d'aquaporines dérégulées au niveau des zones de perception devrait, en tant que facilitatrices des échanges d'eau, accélérer la diminution du potentiel hydrique des cellules concernées et accélérer l'activation des signalisations. L'expression d'un transcrit antisens devrait, au contraire ralentir la diminution du potentiel hydrique cellulaire et retarder l'activation des signalisations.

d) Modélisations de la contrainte hydrique

Les outils de modélisation mathématique que nous avons développés, détaillés dans la première partie du rapport, pourraient nous aider à mieux comprendre comment la contrainte hydrique s'établit et comment les réponses se mettent en place :

Le modèle Eaudissect permet de calculer précisément le potentiel hydrique en tout point d'une section de racine en conditions stationnaires. Deux développements majeurs seraient nécessaires pour son utilisation dans mes projets en conditions transitoires : la prise en compte de l'élasticité des parois afin de prédire les changements de géométrie de la racine lors d'un choc osmotique, et la détermination des pressions osmotiques et de turgescence. Les zones ou tissus touchés en premier par la contrainte hydrique pourraient être mieux identifiées, et nous pourrions mieux prédire l'impact des variations de perméabilité membranaire lors d'une contrainte hydrique.

Le modèle Hydroroot intègre les conductivités radiales, axiales, et l'architecture de la racine. Il permet notamment de calculer le potentiel hydrique du xylème en toute zone de la racine. L'ajout d'une « zone d'élongation » permettrait de prédire comment la répartition des potentiels hydriques et des flux d'eau à un instant t influence l'architecture du système racinaire à l'instant $t+1$, et ainsi de suite pendant le développement de la racine. Cet aspect pourrait être développé en interaction avec Philippe Nacry, DR INRAE dans l'équipe, dont les projets se focalisent sur la plasticité de l'architecture racinaire en réponse à la contrainte hydrique.

BIBLIOGRAPHIE

- Alexandersson E, Fraysse L, Sjövall-Larsen S, Gustavsson S, Fellert M, Karlsson M, Johanson U, Kjellbom P** (2005) Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Mol Biol* **59**: 469–484
- Allen GJ, Chu SP, Harrington CL, Schumacher K, Hoffmann T, Tang YY, Grill E, Schroeder JI** (2001) A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* **411**: 1053–1057
- Allen GJ, Kwak JM, Chu SP, Llopis J, Tsien RY, Harper JF, Schroeder JI** (1999) Cameleon calcium indicator reports cytoplasmic calcium dynamics in Arabidopsis guard cells. *Plant J* **19**: 735–747
- Asli S, Neumann PM** (2009) Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport. *Plant Cell Environ* **32**: 577–584
- Bauer H, Ache P, Lautner S, Fromm J, Hartung W, Al-Rasheid KAS, Sonnewald S, Sonnewald U, Kneitz S, Lachmann N, et al** (2013) The Stomatal Response to Reduced Relative Humidity Requires Guard Cell-Autonomous ABA Synthesis. *Curr Biol* **23**: 53–57
- Bauget F, Protto V, Pradal C, Boursiac Y, Maurel C** (2023) A root functional–structural model allows assessment of the effects of water deficit on water and solute transport parameters. *J Exp Bot* **74**: 1594–1608
- Baxter I, Hosmani PS, Rus A, Lahner B, Borevitz JO, Muthukumar B, Mickelbart MV, Schreiber L, Franke RB, Salt DE** (2009) Root Suberin Forms an Extracellular Barrier That Affects Water Relations and Mineral Nutrition in Arabidopsis. *PLoS Genet* **5**: e1000492
- Baxter I, Tchieu J, Sussman MR, Boutry M, Palmgren MG, Gribskov M, Harper JF, Axelsen KB** (2003) Genomic Comparison of P-Type ATPase Ion Pumps in Arabidopsis and Rice. *Plant Physiol* **132**: 618–628
- Beaudette PC, Chlup M, Yee J, Emery RJN** (2007) Relationships of root conductivity and aquaporin gene expression in *Pisum sativum*: diurnal patterns and the response to HgCl₂ and ABA. *J Exp Bot* **58**: 1291–1300
- Beauzamy L, Nakayama N, Boudaoud A** (2014) Flowers under pressure: ins and outs of turgor regulation in development. *Ann Bot* **114**: 1517–1533
- Bouchabke-Coussa O, Quashie M-L, Seoane-Redondo J, Fortabat M-N, Gery C, Yu A, Linderme D, Trouverie J, Granier F, Téoulé E, et al** (2008) ESKIMO1 is a key gene involved in water economy as well as cold acclimation and salt tolerance. *BMC Plant Biol* **8**: 125
- Boursiac Y, Boudet J, Postaire O, Luu D, Tournaire-Roux C, Maurel C** (2008a) Stimulus-induced downregulation of root water transport involves reactive oxygen species-activated cell signalling and plasma membrane intrinsic protein internalization. *Plant J* **56**: 207–218
- Boursiac Y, Chen S, Luu D-T, Sorieul M, van den Dries N, Maurel C** (2005) Early effects of salinity on water transport in Arabidopsis roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiol* **139**: 790–805

- Boursiac Y, Lee SM, Romanowsky S, Blank R, Sladek C, Chung WS, Harper JF** (2010) Disruption of the Vacuolar Calcium-ATPases in Arabidopsis Results in the Activation of a Salicylic Acid-Dependent Programmed Cell Death Pathway. *Plant Physiol* **154**: 1158–1171
- Boursiac Y, L eran S, Corratg -Faillie C, Gojon A, Krouk G, Lacombe B** (2013) ABA transport and transporters. *Trends Plant Sci* **18**: 325–333
- Boursiac Y, Pradal C, Bauget F, Lucas M, Delivorias S, Godin C, Maurel C** (2022a) Phenotyping and modeling of root hydraulic architecture reveal critical determinants of axial water transport. *Plant Physiol* **kiac281**
- Boursiac Y, Prak S, Boudet J, Postaire O, Luu D-T, Tournaire-Roux C, Santoni V, Maurel C** (2008b) The response of Arabidopsis root water transport to a challenging environment implicates reactive oxygen species- and phosphorylation-dependent internalization of aquaporins. *Plant Signal Behav* **3**: 1096–1098
- Boursiac Y, Protto V, Rishmawi L, Maurel C** (2022b) Experimental and conceptual approaches to root water transport. *Plant Soil* **478**: 349–370
- Bramley H, Turner NC, Turner DW, Tyerman SD** (2009) Roles of Morphology, Anatomy, and Aquaporins in Determining Contrasting Hydraulic Behavior of Roots. *Plant Physiol* **150**: 348–364
- Buy S, Le Floch S, Tang N, Sidiboulouar R, Zanca M, Canadas P, Nativel E, Cardoso M, Alibert E, Dupont G, et al** (2018) Flip-flop method: A new T1-weighted flow-MRI for plants studies. *PLOS ONE* **13**: e0194845
- Calvo-Polanco M, Ribeyre Z, Dauzat M, Reyt G, Hidalgo-Shrestha C, Diehl P, Frenger M, Simonneau T, Muller B, Salt DE, et al** (2021) Physiological roles of Casparian strips and suberin in the transport of water and solutes. *New Phytol* **232**: 2295–2307
- Christmann A, Grill E, Huang J** (2013) Hydraulic signals in long-distance signaling. *Curr Opin Plant Biol.* doi: 10.1016/j.pbi.2013.02.011
- Christmann A, Hoffmann T, Teplova I, Grill E, M uller A** (2005) Generation of Active Pools of Abscisic Acid Revealed by In Vivo Imaging of Water-Stressed Arabidopsis. *Plant Physiol* **137**: 209–219
- Christmann A, Weiler EW, Steudle E, Grill E** (2007) A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *Plant J* **52**: 167–174
- Cochard H, Venisse J-S, Barigah TS, Brunel N, Herbette S, Guillot A, Tyree MT, Sakr S** (2007) Putative role of aquaporins in variable hydraulic conductance of leaves in response to light. *Plant Physiol* **143**: 122–133
- Couvreur V, Faget M, Lobet G, Javaux M, Chaumont F, Draye X** (2018) Going with the Flow: Multiscale Insights into the Composite Nature of Water Transport in Roots. *Plant Physiol* **178**: 1689–1703
- Crabos A, Huang Y, Boursat T, Maurel C, Ruffel S, Krouk G, Boursiac Y** (2023) Distinct early transcriptional regulations by turgor and osmotic potential in the roots of Arabidopsis. *J Exp Bot* **74**: 5917–5930

- Creelman RA, Zeevaart JAD** (1985) Abscisic Acid Accumulation in Spinach Leaf Slices in the Presence of Penetrating and Nonpenetrating Solutes. *Plant Physiol* **77**: 25–28
- Cuevas-Velazquez CL, Velloso T, Guadalupe K, Schmidt HB, Yu F, Moses D, Brophy JAN, Cosio-Acosta D, Das A, Wang L, et al** (2021) Intrinsically disordered protein biosensor tracks the physical-chemical effects of osmotic stress on cells. *Nat Commun* **12**: 5438
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR** (2010) Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 651–679
- Dalton FN, Raats P a. C, Gardner WR** (1975) Simultaneous Uptake of Water and Solutes by Plant Roots. *Agron J* **67**: 334–339
- Darcy H** (1856) Les fontaines publiques de la ville de Dijon. Exposition et application des principes à suivre et des formules à employer dans les questions de distribution d'eau: ouvrage terminé par un appendice relatif aux fournitures d'eau de plusieurs villes au filtrage des eaux et à la fabrication des tuyaux de fonte, de plomb, de toile et de bitume. Dalmont
- De Bei R, Cozzolino D, Sullivan W, Cynkar W, Fuentes S, Damberg R, Pech J, Tyerman S** (2011) Non-destructive measurement of grapevine water potential using near infrared spectroscopy. *Aust J Grape Wine Res* **17**: 62–71
- Doblas VG, Geldner N, Barberon M** (2017) The endodermis, a tightly controlled barrier for nutrients. *Curr Opin Plant Biol* **39**: 136–143
- Fiscus EL** (1975) The Interaction between Osmotic- and Pressure-induced Water Flow in Plant Roots. *Plant Physiol* **55**: 917–922
- Flexas J, Ribas-Carbó M, Hanson DT, Bota J, Otto B, Cifre J, McDowell N, Medrano H, Kaldenhoff R** (2006) Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO₂ in vivo. *Plant J* **48**: 427–439
- Galvez-Valdivieso G, Fryer MJ, Lawson T, Slattery K, Truman W, Smirnov N, Asami T, Davies WJ, Jones AM, Baker NR, et al** (2009) The High Light Response in Arabidopsis Involves ABA Signaling between Vascular and Bundle Sheath Cells. *Plant Cell Online* **21**: 2143–2162
- Geisler M, Frangne N, Gomes E, Martinoia E, Palmgren MG** (2000) The ACA4 Gene of Arabidopsis Encodes a Vacuolar Membrane Calcium Pump That Improves Salt Tolerance in Yeast. *Plant Physiol* **124**: 1814–1827
- Groncin A, Rodrigues O, Verdoucq L, Merlot S, Leonhardt N, Maurel C** (2015) Aquaporins Contribute to ABA-Triggered Stomatal Closure through OST1-Mediated Phosphorylation. *Plant Cell* tpc.15.00421
- Hamant O, Haswell ES** (2017) Life behind the wall: sensing mechanical cues in plants. *BMC Biol* **15**: 59
- Harb A, Krishnan A, Ambavaram MMR, Pereira A** (2010) Molecular and Physiological Analysis of Drought Stress in Arabidopsis Reveals Early Responses Leading to Acclimation in Plant Growth. *Plant Physiol* **154**: 1254–1271
- Haswell ES, Verslues PE** (2015) The ongoing search for the molecular basis of plant osmosensing. *J Gen Physiol* **145**: 389–394

- Hofer R, Briesen I, Beck M, Pinot F, Schreiber L, Franke R** (2008) The Arabidopsis cytochrome P450 CYP86A1 encodes a fatty acid ω -hydroxylase involved in suberin monomer biosynthesis. *J Exp Bot* **59**: 2347–2360
- Hüsken D, Steudle E, Zimmermann U** (1978) Pressure Probe Technique for Measuring Water Relations of Cells in Higher Plants. *Plant Physiol* **61**: 158–163
- Javot H, Lauvergeat V, Santoni V, Martin-Laurent F, Guclu J, Vinh J, Heyes J, Franck KI, Schaffner AR, Bouchez D, et al** (2003) Role of a Single Aquaporin Isoform in Root Water Uptake. *Plant Cell* **15**: 509–522
- Jones AM** (2016) A new look at stress: abscisic acid patterns and dynamics at high-resolution. *New Phytol* **210**: 38–44
- Kawano T, Kadono T, Fumoto K, Lapeyrie F, Kuse M, Isobe M, Furuichi T, Muto S** (2004) Aluminum as a specific inhibitor of plant TPC1 Ca²⁺ channels. *Biochem Biophys Res Commun* **324**: 40–45
- Kedem O, Katchalsky A** (1958) Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to non-electrolytes. *Biochim Biophys Acta* **27**: 229–246
- Kijima T, Eguchi T, Neckers L, Prince TL** (2018) Monitoring of the Heat Shock Response with a Real-Time Luciferase Reporter. *In* SK Calderwood, TL Prince, eds, *Chaperones Methods Protoc.* Springer, New York, NY, pp 35–45
- Knight H, Trewavas AJ, Knight MR** (1997) Calcium signalling in Arabidopsis thaliana responding to drought and salinity. *Plant J* **12**: 1067–1078
- Knipfer T, Fricke W** (2010) Root pressure and a solute reflection coefficient close to unity exclude a purely apoplastic pathway of radial water transport in barley (*Hordeum vulgare*). *New Phytol* **187**: 159–170
- Krouk G, Mirowski P, LeCun Y, Shasha DE, Coruzzi GM** (2010) Predictive network modeling of the high-resolution dynamic plant transcriptome in response to nitrate. *Genome Biol* **11**: R123
- Kumar MN, Jane W-N, Verslues PE** (2013) Role of the Putative Osmosensor Arabidopsis Histidine Kinase1 in Dehydration Avoidance and Low-Water-Potential Response. *Plant Physiol* **161**: 942–953
- Kumar SV, Wigge PA** (2010) H2A.Z-Containing Nucleosomes Mediate the Thermosensory Response in Arabidopsis. *Cell* **140**: 136–147
- Lee SM, Kim HS, Han HJ, Moon BC, Kim CY, Harper JF, Chung WS** (2007) Identification of a calmodulin-regulated autoinhibited Ca²⁺-ATPase (ACA11) that is localized to vacuole membranes in Arabidopsis. *FEBS Lett* **581**: 3943–3949
- Lefebvre V, Fortabat M-N, Ducamp A, North HM, Maia-Grondard A, Trouverie J, Boursiac Y, Mouille G, Durand-Tardif M** (2011) ESKIMO1 Disruption in Arabidopsis Alters Vascular Tissue and Impairs Water Transport. *PLoS ONE* **6**: e16645
- Léran S, Garg B, Boursiac Y, Corratgé-Faillie C, Brachet C, Tillard P, Gojon A, Lacombe B** (2015) AtNPF5.5, a nitrate transporter affecting nitrogen accumulation in Arabidopsis embryo. *Sci Rep* **5**: 7962

- Liang Y-K, Xie X, Lindsay SE, Wang YB, Masle J, Williamson L, Leyser O, Hetherington AM** (2010) Cell wall composition contributes to the control of transpiration efficiency in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **64**: 679–686
- Marchand G, Mayjonade B, Varès D, Blanchet N, Boniface M-C, Maury P, Andrianasolo FN, Burger P, Debaeke P, Casadebaig P, et al** (2013) A biomarker based on gene expression indicates plant water status in controlled and natural environments. *Plant Cell Environ* **36**: 2175–2189
- Marschner P** (2012) Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. doi: 10.1016/C2009-0-63043-9
- Maurel C** (1997) Aquaporins and Water Permeability of Plant Membranes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 399–429
- Maurel C, Boursiac Y, Luu D-T, Santoni V, Shahzad Z, Verdoucq L** (2015) Aquaporins in Plants. *Physiol Rev* **95**: 1321–1358
- McKhann HI, Camilleri C, Bérard A, Bataillon T, David JL, Reboud X, Corre VL, Caloustian C, Gut IG, Brunel D** (2004) Nested core collections maximizing genetic diversity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **38**: 193–202
- Mehra P, Pandey BK, Melebari D, Banda J, Leftley N, Couvreur V, Rowe J, Anfang M, De Gernier H, Morris E, et al** (2022) Hydraulic flux-responsive hormone redistribution determines root branching. *Science* **378**: 762–768
- Michels L, Gorelova V, Harnvanichvech Y, Borst JW, Albada B, Weijers D, Sprakel J** (2020) Complete microviscosity maps of living plant cells and tissues with a toolbox of targeting mechanoprobes. *Proc Natl Acad Sci* **117**: 18110–18118
- Miller G, Schlauch K, Tam R, Cortes D, Torres MA, Shulaev V, Dangl JL, Mittler R** (2009) The Plant NADPH Oxidase RBOHD Mediates Rapid Systemic Signaling in Response to Diverse Stimuli. *Sci Signal* **2**: ra45
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R** (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ* **33**: 453–467
- Monshausen GB, Bibikova TN, Weisenseel MH, Gilroy S** (2009) Ca²⁺ Regulates Reactive Oxygen Species Production and pH during Mechanosensing in *Arabidopsis* Roots. *Plant Cell Online* **21**: 2341–2356
- Monshausen GB, Haswell ES** (2013) A force of nature: molecular mechanisms of mechanoperception in plants. *J Exp Bot* **ert204**
- Nambara E, Marion-Poll A** (2005) Abscisic Acid Biosynthesis and Catabolism. *Annu Rev Plant Biol* **56**: 165–185
- Naseer S, Lee Y, Lapierre C, Franke R, Nawrath C, Geldner N** (2012) Casparian strip diffusion barrier in *Arabidopsis* is made of a lignin polymer without suberin. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 10101–10106
- Overmyer K, Brosché M, Kangasjärvi J** (2003) Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends Plant Sci* **8**: 335–342

- Pandey GK, Cheong YH, Kim K-N, Grant JJ, Li L, Hung W, D'Angelo C, Weinl S, Kudla J, Luan S** (2004) The Calcium Sensor Calcineurin B-Like 9 Modulates Abscisic Acid Sensitivity and Biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 1912–1924
- Pascut FC, Couvreur V, Dietrich D, Leftley N, Reyt G, Boursiac Y, Calvo-Polanco M, Casimiro I, Maurel C, Salt DE, et al** (2021) Non-invasive hydrodynamic imaging in plant roots at cellular resolution. *Nat Commun* **12**: 4682
- Pei ZM, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klüsener B, Allen GJ, Grill E, Schroeder JI** (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406**: 731–734
- Péret B, Li G, Zhao J, Band LR, Voß U, Postaire O, Luu D-T, Ines OD, Casimiro I, Lucas M, et al** (2012) Auxin regulates aquaporin function to facilitate lateral root emergence. *Nat Cell Biol* **14**: 991–998
- Petrášek Z, Eckert H-J, Kemnitz K** (2009) Wide-field photon counting fluorescence lifetime imaging microscopy: application to photosynthesizing systems. *Photosynth Res* **102**: 157–168
- Pierce M, Raschke K** (1980) Correlation between loss of turgor and accumulation of abscisic acid in detached leaves. *Planta* **148**: 174–182
- Pietro M di, Vialaret J, Li G-W, Hem S, Prado K, Rossignol M, Maurel C, Santoni V** (2013) Coordinated Post-translational Responses of Aquaporins to Abiotic and Nutritional Stimuli in Arabidopsis Roots. *Mol Cell Proteomics* **12**: 3886–3897
- Postaire O, Tournaire-Roux C, Grondin A, Boursiac Y, Morillon R, Schaffner AR, Maurel C** (2010) A PIP1 Aquaporin Contributes to Hydrostatic Pressure-Induced Water Transport in Both the Root and Rosette of Arabidopsis. *Plant Physiol* **152**: 1418–1430
- Pradal C, Dufour-Kowalski S, Boudon F, Fournier C, Godin C** (2008) OpenAlea: a visual programming and component-based software platform for plant modelling. *Funct Plant Biol* **35**: 751
- Prado K, Boursiac Y, Tournaire-Roux C, Monneuse J-M, Postaire O, Ines OD, Schaffner AR, Hem S, Santoni V, Maurel C** (2013) Regulation of Arabidopsis Leaf Hydraulics Involves Light-Dependent Phosphorylation of Aquaporins in Veins. *Plant Cell* **25**: 1029–1039
- Prak S, Hem S, Boudet J, Viennois G, Sommerer N, Rossignol M, Maurel C, Santoni V** (2008) Multiple phosphorylations in the C-terminal tail of plant plasma membrane aquaporins: role in subcellular trafficking of AtPIP2;1 in response to salt stress. *Mol Cell Proteomics MCP* **7**: 1019–1030
- Ramahaleo T, Morillon R, Alexandre J, Lassalles J-P** (1999) Osmotic Water Permeability of Isolated Protoplasts. Modifications during Development. *Plant Physiol* **119**: 885–896
- Ranathunge K, Schreiber L** (2011) Water and solute permeabilities of Arabidopsis roots in relation to the amount and composition of aliphatic suberin. *J Exp Bot* **62**: 1961–1974
- Rentel MC, Lecourieux D, Ouaked F, Usher SL, Petersen L, Okamoto H, Knight H, Peck SC, Grierson CS, Hirt H, et al** (2004) OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in Arabidopsis. *Nature* **427**: 858–861

- Riboni M, Galbiati M, Tonelli C, Conti L** (2013) GIGANTEA Enables Drought Escape Response via Abscisic Acid-Dependent Activation of the Florigens and SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1. *Plant Physiol* **162**: 1706–1719
- Sack L, John GP, Buckley TN** (2018) ABA Accumulation in Dehydrating Leaves Is Associated with Decline in Cell Volume, Not Turgor Pressure. *Plant Physiol* **176**: 489–495
- Sade N, Shatil-Cohen A, Attia Z, Maurel C, Boursiac Y, Kelly G, Granot D, Yaaran A, Lerner S, Moshelion M** (2014) The role of plasma membrane aquaporins in regulating the bundle sheath-mesophyll continuum and leaf hydraulics. *Plant Physiol* **166**: 1609–1620
- Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF** (2002) Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* **14 Suppl**: S401-417
- Santoni V, Vinh J, Pflieger D, Sommerer N, Maurel C** (2003) A proteomic study reveals novel insights into the diversity of aquaporin forms expressed in the plasma membrane of plant roots. *Biochem J* **373**: 289
- Sauter A, Davies WJ, Hartung W** (2001) The long-distance abscisic acid signal in the droughted plant: the fate of the hormone on its way from root to shoot. *J Exp Bot* **52**: 1991–1997
- Sauter A, Dietz K-J, Hartung W** (2002) A possible stress physiological role of abscisic acid conjugates in root-to-shoot signalling. *Plant Cell Environ* **25**: 223–228
- Scharwies JD, Dinneny JR** (2019) Water transport, perception, and response in plants. *J Plant Res* **132**: 311–324
- Schiøtt M, Romanowsky SM, Baekgaard L, Jakobsen MK, Palmgren MG, Harper JF** (2004) A plant plasma membrane Ca²⁺ pump is required for normal pollen tube growth and fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9502–9507
- Schreiber L, Franke R, Hartmann K-D, Ranathunge K, Steudle E** (2005) The chemical composition of suberin in apoplastic barriers affects radial hydraulic conductivity differently in the roots of rice (*Oryza sativa* L. cv. IR64) and corn (*Zea mays* L. cv. Helix). *J Exp Bot* **56**: 1427–1436
- Shahzad Z, Canut M, Tournaire-Roux C, Martinière A, Boursiac Y, Loudet O, Maurel C** (2016) A Potassium-Dependent Oxygen Sensing Pathway Regulates Plant Root Hydraulics. *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.068
- Sharp RE, LeNoble ME** (2002) ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *J Exp Bot* **53**: 33–37
- Sharp RE, Poroyko V, Hejlek LG, Spollen WG, Springer GK, Bohnert HJ, Nguyen HT** (2004) Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *J Exp Bot* **55**: 2343–2351
- Simon M, Loudet O, Durand S, Berard A, Brunel D, Sennesal F-X, Durand-Tardif M, Pelletier G, Camilleri C** (2008) Quantitative Trait Loci Mapping in Five New Large Recombinant Inbred Line Populations of *Arabidopsis thaliana* Genotyped With Consensus Single-Nucleotide Polymorphism Markers. *Genetics* **178**: 2253–2264

- Smokvarska M, Francis C, Platre MP, Fiche J-B, Alcon C, Dumont X, Nacry P, Bayle V, Nollmann M, Maurel C, et al** (2020) A Plasma Membrane Nanodomain Ensures Signal Specificity during Osmotic Signaling in Plants. *Curr Biol* **30**: 4654-4664.e4
- Steudle E, Frensch J** (1996) Water transport in plants: Role of the apoplast. *Plant Soil* **187**: 67–79
- Steudle E, Peterson C** (1998) Review article. How does water get through roots? *J Exp Bot* **49**: 775–788
- Sutka M, Li G, Boudet J, Boursiac Y, Doumas P, Maurel C** (2011) Natural Variation of Root Hydraulics in Arabidopsis Grown in Normal and Salt-Stressed Conditions. *Plant Physiol* **155**: 1264–1276
- Tang N, Shahzad Z, Lonjon F, Loudet O, Vailliau F, Maurel C** (2018) Natural variation at XND1 impacts root hydraulics and trade-off for stress responses in Arabidopsis. *Nat Commun* **9**: 3884
- Tournaire-Roux C, Sutka M, Javot H, Gout E, Gerbeau P, Luu D-T, Bligny R, Maurel C** (2003) Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature* **425**: 393–397
- Tran L-SP, Urao T, Qin F, Maruyama K, Kakimoto T, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2007) Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci* **104**: 20623–20628
- Turner SR, Somerville CR** (1997) Collapsed Xylem Phenotype of Arabidopsis Identifies Mutants Deficient in Cellulose Deposition in the Secondary Cell Wall. *Plant Cell* **9**: 689–701
- Uehlein N, Otto B, Hanson DT, Fischer M, McDowell N, Kaldenhoff R** (2008) Function of Nicotiana tabacum aquaporins as chloroplast gas pores challenges the concept of membrane CO₂ permeability. *Plant Cell* **20**: 648–657
- Urao T, Yakubov B, Satoh R, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M, Hirayama T, Shinozaki K** (1999) A Transmembrane Hybrid-Type Histidine Kinase in Arabidopsis Functions as an Osmosensor. *Plant Cell Online* **11**: 1743–1754
- Vander Willigen C, Postaire O, Tournaire-Roux C, Boursiac Y, Maurel C** (2006) Expression and inhibition of aquaporins in germinating Arabidopsis seeds. *Plant Cell Physiol* **47**: 1241–1250
- Verslues PE, Bailey-Serres J, Brodersen C, Buckley TN, Conti L, Christmann A, Dinneny JR, Grill E, Hayes S, Heckman RW, et al** (2022) Burning questions for a warming and changing world: 15 unknowns in plant abiotic stress. *Plant Cell* koac263
- Verslues PE, Bray EA** (2004) LWR1 and LWR2 Are Required for Osmoregulation and Osmotic Adjustment in Arabidopsis. *Plant Physiol* **136**: 2831–2842
- Waadts R, Hitomi K, Nishimura N, Hitomi C, Adams SR, Getzoff ED, Schroeder JI** (2014) FRET-based reporters for the direct visualization of abscisic acid concentration changes and distribution in Arabidopsis. *eLife* **3**: e01739
- Wang P, Calvo-Polanco M, Reyt G, Barberon M, Champeyroux C, Santoni V, Maurel C, Franke RB, Ljung K, Novak O, et al** (2019) Surveillance of cell wall diffusion barrier integrity modulates water and solute transport in plants. *Sci Rep* **9**: 4227

- Watson JL, Seinkmane E, Styles CT, Mihut A, Krüger LK, McNally KE, Planelles-Herrero VJ, Dudek M, McCall PM, Barbiero S, et al** (2023) Macromolecular condensation buffers intracellular water potential. *Nature* 1–11
- Webb AAR, Larman MG, Montgomery LT, Taylor JE, Hetherington AM** (2001) The role of calcium in ABA-induced gene expression and stomatal movements. *Plant J* **26**: 351–362
- Wilkinson S, Davies WJ** (2002) ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant Cell Environ* **25**: 195–210
- Xin Z, Browse J** (1998) eskimo1 mutants of Arabidopsis are constitutively freezing-tolerant. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 7799–7804
- Zhang WH, Tyerman SD** (1991) Effect of Low O₂ Concentration and Azide on Hydraulic Conductivity and Osmotic Volume of the Cortical Cells of Wheat Roots. *Funct Plant Biol* **18**: 603–613
- Zhao Z, Chen G, Zhang C** (2001) Interaction between reactive oxygen species and nitric oxide in drought-induced abscisic acid synthesis in root tips of wheat seedlings. *Funct Plant Biol* **28**: 1055–1061
- Zhu J-K** (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 247–273
- Zimmermann HM, Hartmann K, Schreiber L, Steudle E** (2000) Chemical composition of apoplastic transport barriers in relation to radial hydraulic conductivity of corn roots (*Zea mays* L.). *Planta* **210**: 302–311

RESUME

Les recherches en biologie végétale, même les plus fondamentales, doivent dès aujourd'hui se saisir d'enjeux importants pour le futur. Il s'agit de répondre aux besoins nutritionnels croissants de la population mondiale, dans un contexte de limitation des ressources. Ce problème concerne tout particulièrement l'eau, dont la qualité aussi bien que la quantité disponible pour l'agriculture vont de plus en plus être mises en défaut. Améliorer l'efficacité d'utilisation de l'eau par les plantes représente ainsi un défi important adressé aux chercheurs. Comprendre comment l'eau circule dans la plante constitue l'un des fondements de cette démarche.

Pour l'étude des flux d'eau en conditions stationnaires, j'ai développé des projets de biologie fonctionnelle et intégrative dans laquelle nous avons pu tester l'implication de candidats dans la capacité de transport d'eau d'une racine, notamment les barrières de diffusion apoplastique que sont les bandes de Caspary et la subérine. Ce travail a été enrichi par des approches de modélisation, à l'échelle de tissus ou de l'organe, qui ont permis de mieux comprendre comment les structures racinaires (architecture, vaisseaux, anatomie) influencent le transport d'eau.

L'évolution de mes projets ira vers une vision plus dynamique des flux d'eau. Des conditions transitoires apparaissent notamment dans des contextes de contrainte hydrique, et se pose alors la question de la perception des variations des paramètres physico-chimiques de l'environnement (les composantes du potentiel hydrique pour l'eau), et de leur transduction en une réponse biologique. Nos travaux récents montrent que les cellules de plantes répondent, de façon transcriptionnelle, à deux paramètres distincts lors d'une contrainte hydrique : les variations de leur turgescence et celles de la pression osmotique. L'étude plus poussée de deux candidats régulés par ces paramètres met en évidence l'implication de mécanismes complexes, dont les voies de dégradation des ARNm dans ces réponses. Nous avons pu développer un rapporteur transcriptionnel sensible et rapide des variations de l'environnement hydraulique de la racine, que nous nommons « hydro-rapporteur ». L'étude des signalisations impliquées dans la régulation de ces gènes permettra de mieux appréhender les phases précoces de perception de la contrainte hydrique chez les plantes.

L'originalité de mes travaux repose sur un couplage fort entre expérimentation et modélisation, et notre capacité relativement unique à mesurer finement les paramètres hydrauliques des cellules et des organes de plantes.

Physiological roles of Casparian strips and suberin in the transport of water and solutes

Monica Calvo-Polanco^{1,2} , Zoe Ribeyre³ , Myriam Dauzat³ , Guilhem Reyt⁴ ,
Christopher Hidalgo-Shrestha⁵ , Patrick Diehl⁵ , Marc Frenger⁵, Thierry Simonneau³ , Bertrand Muller³ ,
David E. Salt⁴ , Rochus B. Franke⁵ , Christophe Maurel¹  and Yann Boursiac¹ 

¹BPMP, Univ Montpellier, CNRS, INRAE, Institut Agro, 34060 Montpellier, France; ²Excellence Unit AGRIENVIRONNEMENT, CIALE, University of Salamanca, 37185 Salamanca, Spain;

³LEPSE, Univ Montpellier, INRAE, Institut Agro, 34060 Montpellier, France; ⁴Future Food Beacon of Excellence and the School of Biosciences, University of Nottingham, Nottingham,

LE15 2RD, UK; ⁵Institute of Cellular and Molecular Botany, University of Bonn, 53115 Bonn, Germany

Summary

Author for correspondence:

Yann Boursiac

Email: yann.boursiac@inrae.fr

Received: 9 February 2021

Accepted: 2 August 2021

New Phytologist (2021)

doi: 10.1111/nph.17765

Key words: apoplastic barriers, aquaporins, *Arabidopsis thaliana*, Casparian strips, root hydraulic conductivity, solutes diffusion, suberin, water transport.

- The formation of Casparian strips (CS) and the deposition of suberin at the endodermis of plant roots are thought to limit the apoplastic transport of water and ions. We investigated the specific role of each of these apoplastic barriers in the control of hydro-mineral transport by roots and the consequences on shoot growth.
- A collection of *Arabidopsis thaliana* mutants defective in suberin deposition and/or CS development was characterized under standard conditions using a hydroponic system and the Phenopsis platform.
- Mutants altered in suberin deposition had enhanced root hydraulic conductivity, indicating a restrictive role for this compound in water transport. In contrast, defective CS directly increased solute leakage and indirectly reduced root hydraulic conductivity. Defective CS also led to a reduction in rosette growth, which was partly dependent on the hydro-mineral status of the plant. Ectopic suberin was shown to partially compensate for defective CS phenotypes.
- Altogether, our work shows that the functionality of the root apoplastic diffusion barriers greatly influences the plant physiology, and that their integrity is tightly surveyed.

Introduction

As sessile organisms, plants strongly depend on the ability of their root system to cope with variable and possibly stressing soil conditions. Roots have evolved as plastic organs (Gruber *et al.*, 2013), able to operate water and nutrient uptake in a wide spectrum of conditions going from deficiency to excess or toxicity. This capacity depends on multiple mechanisms, including the tuning of root system architecture, the regulation of membrane transporters and channels (Maurel *et al.*, 2015), as well as alterations in root anatomical structures, such as the exodermis and endodermis (Líška *et al.*, 2016). The radial transport of water and solutes from the soil to the root xylem vessels is considered as a major site of control (Steudle & Peterson, 1998). Radial transport can occur through the nonselective apoplastic pathway, or from cell-to-cell whereby membrane transporters and channels exert variable resistance and selectivity (Maurel *et al.*, 2015). In contrast to the exodermis, which is lacking in certain species such as *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*), the endodermis is ubiquitous among the angiosperms and acts as the main apoplastic barrier. Two types of structures can be found in the fully developed endodermis: Casparian strips (CS) and suberin lamellae. The CS form a longitudinal belt encircling all endodermal cells, while

suberin lamellae covers them, except for passage cells (Andersen *et al.*, 2018). The CS result from a coordinated and localized impregnation of the primary cell wall by lignin (Naseer *et al.*, 2012). This process is regulated by the MYB36 transcription factor (Kamiya *et al.*, 2015), and its integrity surveyed by the SCHENGEN3/CIF1&2 receptor/ligand complex (Doblas *et al.*, 2017b; Nakayama *et al.*, 2017). Suberin is a heterogeneous biopolymer primarily composed of aliphatic monomers and some minor aromatic moieties. It is deposited around endodermal cells, eventually coating the entire endodermal cell surface (Haas & Carothers, 1975) and progressing into a suberized periderm from the pericycle (Campilho *et al.*, 2020). Suberin is thought to create a diffusion barrier for water, gases and solutes (Enstone *et al.*, 2002; Franke *et al.*, 2012).

The function of endodermal CS and suberin as barriers to the radial transfer of water and solutes has been extensively questioned, notably over the last 25 yr (Peterson *et al.*, 1993; Steudle *et al.*, 1993; Frensch *et al.*, 1996, and references cited therein; for recent reviews see: Geldner, 2013; Nawrath *et al.*, 2013; Doblas *et al.*, 2017a). A brief historical overview shows, however, that this issue is not settled yet. In 1993, mechanical disruption of maize endodermis led authors to conclude that this cell layer is not a barrier to water but to solutes, although roots were not

suberized in their studies (Peterson *et al.*, 1993; Steudle *et al.*, 1993). In 1996, Frensch *et al.* concluded, also from studies in maize roots, that the suberized endodermis impedes both solute and water flow (Frensch *et al.*, 1996). However, no clear distinction between the role of suberin and CS was made until 2000, when it was shown that suberin is a barrier to water while CS influence solute transport in maize roots (Zimmermann *et al.*, 2000). But this conclusion was restricted to root exodermis while no role of the endodermis was found in this study. The role of suberin as a barrier to root water transport was assessed later through genetic alteration of its deposition or composition in the *horst-1* and *esb1* mutants (Ranathunge & Schreiber, 2011). At this time though, the *esb1* mutant was characterized for an enhanced suberin accumulation at the endodermis (Baxter *et al.*, 2009), and it was only later that its primary defect in CS formation was established (Hosmani *et al.*, 2013; Pfister *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2017). Thorough phenotypic characterization of *sgn3* mutants also pointed to the specific role of CS in altering water and solute relations (Pfister *et al.*, 2014). However, we added to this representation that hydraulic alterations can be induced through a signaling process induced by damaged CS towards aquaporin activity (Wang *et al.*, 2019). Therefore, a comprehensive study addressing the impact of CS and suberin on both water and solute transports at the root level would help integrate, and possibly reconcile, current knowledge. Such a study has become possible thanks to the large collection of CS and suberin-defective mutants which is now available.

Due to the importance of CS and suberin in the control of plant water transport and mineral nutrition, variations in these structures are expected to impact shoot development. Accordingly, Baxter *et al.* (2009); Hosmani *et al.* (2013); Pfister *et al.* (2014); Kamiya *et al.* (2015); Barberon *et al.* (2016) and Rey *et al.* (2020) showed that genotypes with CS and/or suberin disorders have both alterations in shoot ionome and shoot development. However, the causal links between modifications of the endodermal barriers and changes in shoot growth still hold many questions. In particular, are growth alterations due to disorders in water supply and/or ion provision?

The objectives of the present study were (1) to clarify the specific roles of the CS and endodermal suberin in water and/or solute transport in roots, and (2) to assess their long-term effects on shoot growth and development. For this purpose, we used *Arabidopsis* wild-type (WT) and a group of 17 *Arabidopsis* mutants that we classified into five distinctive groups based on standard CS and suberin characterizations.

Materials and Methods

Hydroponic experiments

Plant materials and growth conditions *Arabidopsis* accession Col-0 and 17 mutants with defects in CS and/or suberin (Supporting Information Table S1), were surface sterilized and sowed into clear polystyrene culture plates containing a 1/2 Murashige and Skoog (MS) medium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Plates were kept for 2 d at 4°C, then incubated vertically for 10 d

under environmentally-controlled conditions: 60% relative humidity, 16 h d⁻¹ of 250 μmol photons m⁻² s⁻¹, 20°C. Plants were then transferred on 35 cm × 35 cm plastic plates floating over a basins filled with 8 l of hydroponic solution (1.25 mM KNO₃, 0.75 mM MgSO₄, 1.5 mM, Ca(NO₃)₂, 0.5 mM KH₂PO₄, 50 μM FeEDTA, 50 μM H₃BO₃, 12 μM MnSO₄, 0.70 μM CuSO₄, 1 μM ZnSO₄, 0.24 μM MoO₄Na₂, 100 μM Na₂SiO₃). Physiological and molecular determinations were done after 10–11 d of hydroponic culture (i.e. on 20–21 d-old plants). Previously unpublished mutants are T-DNA insertions provided by the Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC): *gelp51-2*, GK_016A11; *anac038-1*, SALK_103716; *anac038-2*, WiscDsLoxHS007-11H (Fig. S1).

Casparian strip permeability and suberin quantification Propidium iodide (PI) staining was performed as previously described (Alassimone *et al.*, 2010) on 21 d-old plants with a 1 h incubation period. Root suberin was extracted and quantified using gas chromatography following the procedures explained in Franke *et al.* (2005). Despite Fluorol Yellow being the standard dye for suberin staining, we faced issues when working with more mature and bigger root systems. Auramine O staining was therefore performed instead, as described in Ursache *et al.* (2018), on 21 d-old plants.

Root hydraulics and root balancing pressure Root hydraulic conductance (K_r) was determined in de-topped plants using a set of pressure chambers filled with hydroponic solution (Boursiac *et al.*, 2005). Excised roots were subjected to 350 kPa for 10 min, followed by successive measurements at 320, 160, and 240 kPa. The value of K_r was calculated as the slope of the flow to pressure relationship. The hydrostatic hydraulic conductivity (L_{p-r-h}) was calculated by dividing K_r by the root dry weight. Osmotic hydraulic conductivity (L_{p-r-o}) was determined using the free-exudation method. The plants were de-topped with a razor blade and the sectioned hypocotyl immediately introduced into a 100 μl micro capillary. Dental paste (Coltène/Whaledent s.a.r.l., Lezennes, France) was used to ensure a proper seal between the hypocotyl and the capillary. The sap exuded for the first 10 min was discarded, and the sap exuded over the next 45 min was collected and analyzed. Its osmolality (as well as osmolality of the bath medium) was measured using a Vapro 5520 osmometer (Wescor, Logan, UT, USA). The value of L_{p-r-o} was obtained by dividing the exudation rate by the root dry weight and osmotic potential gradient between the exuded sap and the bath. The contribution of the aquaporin-related pathway to L_p was tested by the application of 1 mM sodium azide (NaN₃), a plant respiration inhibitor known to induce the gating of aquaporins (Tournaire-Roux *et al.*, 2003).

The passive leakage of solutes into the root was approximated by determining the root balancing pressure (P_{jv0}) after 1 h treatment with 100 mM sodium chloride (NaCl). The value of P_{jv0} is the extrapolated intercept with the pressure axis ($J_v = 0$) of the flow/pressure relationship obtained from pressure chamber measurements. It is related to the selectivity of the root to solutes, or reflection coefficient σ_{sr} , as explained in Boursiac *et al.* (2005).

Active solutes pumping by root cells, which is responsible for the free exudation of the root, may impair this measurement by mimicking solutes leakage (Knipfer & Fricke, 2010). However, we usually observed a free exudation in the range of 1/20th to 1/30th of the flow obtained under pressurization, making its influence negligible.

Total RNA isolation and aquaporin expression RNA was isolated from 30 to 50 mg frozen roots using the RNA Isolation Kit Z3100 and DNase kit from Promega (Promega Corp., Madison, WI, USA). Total RNA was quantified by optical density measurements at 280/260 nm and stored at -80°C until use. Transcript abundance was determined by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR), using the sequences of primer pairs corresponding to the 13 Arabidopsis PIPs described in Sutka *et al.* (2011). For each gene, relative quantification was made by the Delta cycle threshold method with correction for PCR efficiency. The reference genes tested were those described in Sutka *et al.* (2011), of which TIP41-like, PP2A3, and SFP were selected as the most stable ones among the different mutants.

Phenopsis experiment conditions

Plant material and growth conditions Plant phenotyping was realized using the Phenopsis platform (Granier *et al.*, 2006). Seeds were surface sterilized and sown in pots as prescribed. The pots were filled with a loamy soil. Soil water content was automatically adjusted by replacing the water lost by evapotranspiration twice a day during 18 additional days, with a total duration of the experiment of 5 wk. Climatic conditions in the chamber were 20.5°C temperature, 65% relative humidity and 200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ with a photoperiod of 12 h.

Physiological determinations Five weeks after sowing, the rosettes (which were close to bolting stage, $n=7$) were detached from the root and were weighted prior to and after oven-drying at 65°C for 72 h, to determine their fresh weight (FW) and dry weight (DW).

Leaves were frozen at -20°C for 2 d, pending extraction of the cellular medium with a centrifuge (8 min \times 1000 g). Next, 10 μl of the extract was transferred to an absorbent paper disc and measured using a vapor pressure osmometer (Vapro 5520; Wescor).

Whole plant transpiration was determined in seven plants with the soil covered by a plastic sheet to prevent evaporation (Granier *et al.*, 2006). Pot weights were monitored six times a day during 2 d. Day/night transpiration per unit rosette area was determined as the slope of the pot weight loss over time ($\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$). The rosette area was calculated based on the photographs taken at the end of the transpiration period.

Shoot elemental analysis Briefly, 30 mg of ground dried tissue from young and old leaves of five plants per treatment and genotype ($n=5$), were digested in 1 ml of 48.75% nitric acid (HNO_3) and 7.5% hydrogen peroxide (H_2O_2) in a quartz tube at 110°C for 2 h. Cations were determined with an atomic absorption

spectrophotometer (SpectrAA 220; Varian, Palo Alto, CA, USA). Results were expressed in $\text{mg g}^{-1} \text{DW}$.

Statistical analyses

All data, except for the regression analyses, were analyzed using one-way ANOVA with the R software (R Core Team, 2020). Tukey's *post hoc* adjustment was used to test mean differences between treatments at $\alpha=0.05$. Spearman's correlation analyses were performed in order to elucidate the relations between L_p and aquaporin expression.

For the experiment at the Phenopsis platform, plants were set-up in a random block design that was analyzed using a two-way ANOVA together with Tukey's adjustment at $\alpha=0.05$ with R.

Results

Presentation of the mutant collection

In order to study the physiological role of CS and suberin while avoiding pitfalls related to single-mutant studies, we gathered a collection of Arabidopsis mutants that aimed at covering various combinations of alterations. The chosen genotypes were (Table S1): (1) mutants known for their alterations in CS and the formation of ectopic suberin: *myb36-1* and *myb36-2* (Kamiya *et al.*, 2015), *esb1-1* and *esb1-2* (Baxter *et al.*, 2009), *casp1-1* *casp3-1* (Roppolo *et al.*, 2011; Pfister *et al.*, 2014). (2) Mutants with altered CS and with unaffected suberin content: *sgn3-3* *esb1-1*, *sgn3-3* (Pfister *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2019), and *sgn3-4* (Tsuwamoto *et al.*, 2008). (3) Mutants with reduced or altered suberin but no information on the functionality of CS: *horst-1* and *horst-2* (Hofer *et al.*, 2008), and the double mutant *horst-1* *ralph-1* (present work). We added to this group a plant line expressing the *CDEF1* cutinase under the control of the *CASP1* promoter (*pCASP1::CDEF1*), which has reduced content in suberin but functional CS (Naseer *et al.*, 2012). (4) Mutants with altered suberin composition and no differences in total suberin content: *ralph-1* and *ralph-2* (Compagnon *et al.*, 2009). (5) A set of new, not yet described mutants, with potentially modified suberin content and unknown properties of the CS (present work). These included *gelp51-2*, an insertion mutant in a GDSL-type esterase/lipase family (GELP), and *anac038-1* and *anac038-2*, insertion mutants in a NAC transcription factor gene family member. Genes encoding the latter mutants were identified based on strong *in silico* coexpression using suberin biosynthetic genes such as RALPH as a 'bait' in the ATTEDBII analysis tool (Obayashi *et al.*, 2007) and *in silico* expression data showing a expression in the root endodermis (Fig. S1).

Casparian strip mutants maintain barrier defects in mature root systems

The functionality of the CS was assessed through monitoring of PI penetration into the stele (Alassimone *et al.*, 2010). PI diffuses through the apoplast where it binds to the carboxyl groups of the cell wall homogalacturonans (Rounds *et al.*, 2011) and thereby

stains the vessels if not blocked by the CS. Assays with PI on 7 d-old seedlings have previously revealed a defective CS in *myb36-1* and *myb36-2* (Kamiya *et al.*, 2015), *esb1-1* and *casp1-1casp3-1* (Baxter *et al.*, 2009; Hosmani *et al.*, 2013), and *sgn3-3* (Pfister *et al.*, 2014). We performed our experiment on more mature and complex root systems of 21 d-old plants grown for 10 d *in vitro* and 11 d in hydroponics. Observations were made at various zones along the root: zone of first root hairs formation, lateral root primordia (LRP) at stages I and II, first lateral root emergence, an intermediate zone, and a zone close to the base, on the primary root and lateral roots (Figs 1a, S2). While xylem or proto-xylem vessels were stained by PI in the root hairs zone in almost all genotypes, no more staining could be observed after the stages I and II LRP in WT plants (Fig. 1b). This was observed for all genotypes but *myb36-1*, *esb1-1*, *casp1-1casp3-1*, *sgn3-3* and *sgn3-3esb1-1* (Fig. 1c). Impermeability of the stele to PI was occasionally observed at later stages in those genotypes though. In the basal zone, no PI could penetrate in the root of any genotype (Fig. S2). Additional staining could be observed at the corners of the endodermal cells in *myb36-1* and *esb1-1* (Fig. 1c), which may relate to the deposition of ectopic cell wall, as observed in Kamiya *et al.* (2015). Noticeably, this ectopic cell wall material does not restore the impermeability of the stele to PI. Altogether, our analyses indicate that all the genotypes have the same high PI permeability at the root hairs zone and low PI permeability after the periderm formation. They differ in between stages I and II lateral root and intermediate zones, where the CS become fully impermeable to PI – thereafter considered as ‘functional’ – for all genotypes besides *myb36*, *esb1*, *casp1casp3*, *sgn3* and *sgn3esb1*.

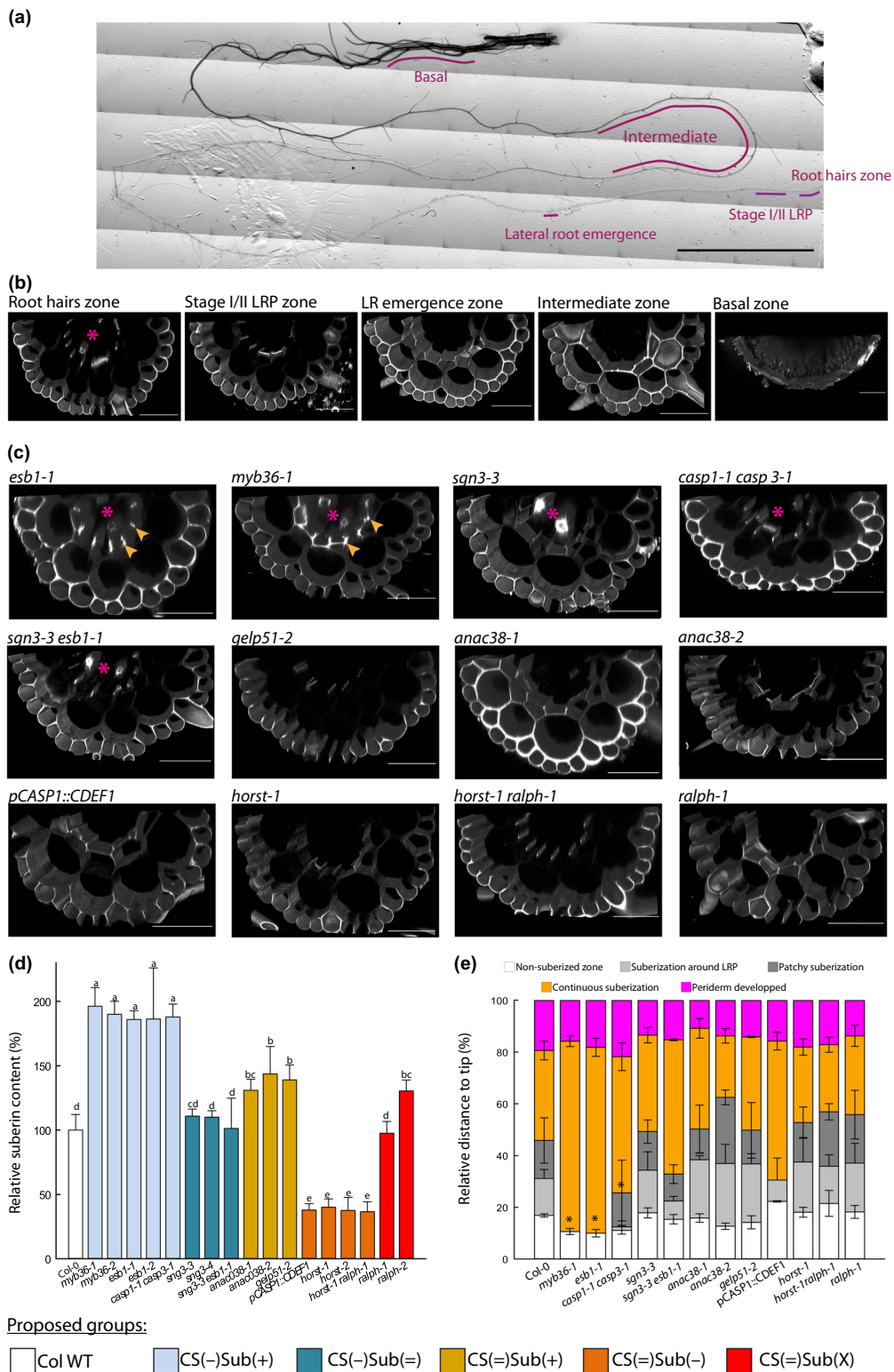
Suberin quantity and/or development in the mutant collection

Quantitative chemical analysis of suberin in 21 d-old hydroponically grown plants of *myb36-1*, *myb36-2*, *esb1-1*, *esb1-2* and *casp1-1casp3-1*, that are mutants with ectopic suberin, confirmed an approximate 1.9-fold increase in their root content with respect to Col-0, while *sgn3-3esb1-1* and *sgn3-3* were similar to Col-0 (Fig. 1d). The group composed of *gelp51-2*, *anac038-1* and *anac038-2* was characterized by an increase in total root suberin content by 30 to 50% compared to Col-0. Within the group with unaltered CS, *horst-1*, *horst-2*, *horst-1ralph-1*, and

pCASP1::CDEF1 exhibited a suberin reduction of about 60% with respect to Col-0, while *ralph-1* and *ralph-2* showed no significant change or a slight increase in total suberin content, respectively. Auramine-O staining was used to locate the deposition of suberin and score its development along the primary root. Although this dye stains both lignin and suberin (Ursache *et al.*, 2018), a combination of stereo microscopy and confocal observations, as well as co-imaging auramine-O signal with the suberin synthesis reporter pGPAT5::NLS-RFP was performed (Fig. S3). Since the deconvoluted Auramine O signal resembled the expression pattern of suberin genes and the staining pattern of FY during development (Beisson *et al.*, 2007; Barberon *et al.*, 2016), our approach allowed us to clearly distinguish between these compounds in the younger region of the roots, where periderm has not formed yet. In WT plants, a signal corresponding to suberin was first visible around the LRP, at about 20% from the tip (relative to the total root length). Further from the root tip, in between 30 and 45% of the total root length, the signal became patchy, but not necessarily around the LRP. It then evolved into a continuous signal up to 80% of the total root length where the root eventually developed a periderm (Figs 1e, S3). Similar patterns of suberin development could be observed for most of the genotypes tested (Fig. 1e). By contrast, noticeable differences were observed in *myb36-1*, *esb1-1* and *casp1-1casp3-1*, where the zones of suberization around the LRP and patchy suberized zones were absent or significantly reduced. Despite having significantly more (*gelp51-2*, *anac38-1*, *anac038-2*) or less (*horst-1*, *horst-2*, *horst-1ralph-1*) suberin, several mutants did not exhibit any major change in their suberin pattern along the primary root axis (Fig. 1e). This result indicates that the timing of suberin deposition was unaltered in these mutants and no evidence of ectopic deposition could be found.

Based on CS functionality and suberin characterization, we therefore propose a classification of our mutant collection into five groups, each comprising at least two independent members, and named as follows. CS(–)Sub(+) comprises mutants with disrupted CS, ectopic cell wall deposition, and enhanced suberin content: *myb36-1*, *myb36-2*, *esb1-1*, *esb1-2*, and *casp1-1casp3-1*. CS(–)Sub(=) gathers genotypes with disrupted CS and similar suberin content as Col-0: *sgn3-3*, *sgn3-4*, and *sgn3-3esb1-1*. CS(=)Sub(+) comprises mutants with functional CS but with higher suberin content than Col-0: *gelp51-2*, *anac038-1* and *anac38-2*. CS(=)Sub(–) comprises plants with functional CS and reduced

Fig. 1 Characterization of Casparian strip permeability and suberin development. (a) Reconstituted picture of a 21 d-old primary root, and the zones that were monitored for propidium iodide (PI) permeability. Bar, 1 cm. (b) Confocal cross-sections of a 21 d-old plants, PI stained, Arabidopsis root from Col-0 at various zones: root hairs, stages I and II lateral root primordium (LRP), first lateral root (LR) emergence, intermediate, and basal. Bars, 50 μ m. (c) Confocal cross-section of PI staining in roots of 21 d-old plant at stages I and II LRP development. Arrows highlight the staining related to ectopic deposition of cell wall polymers at the cell corners, stars indicate when the vessels are stained and hence, PI was able to penetrate through the stele. Bars, 50 μ m. (d) Relative suberin content related to wild-type Arabidopsis plants (Col-0) of 17 Casparian strips (CS) and/or suberin mutants of 21 d-old plants. Suberin was analyzed using gas chromatography after release by transesterification using boron trifluoride in methanol from solvent extracted root cell walls. Bars represent mean values in μ g per mg dry weight \pm SE ($n = 3-5$). *Suberin content taken from literature *esb1-2* (Baxter *et al.*, 2009), *pCASP1::CDEF1* (Barberon *et al.*, 2016), *horst-1*, *horst-2* (Hofer *et al.*, 2008), *ralph-1*, *ralph-2* (Compagnon *et al.*, 2009). (e) Scoring of the suberin stages along the root, as a relative position from the tip \pm SE, after staining with the lignin/suberin dye Auramine-O ($n = 3-5$). Method detailed in Supporting Information Fig. S2. Asterisks indicate significant difference ($P < 0.05$) to Col-0 plants. Colors patterns of (c) allow to visually identify the groups that are defined in the first section of the results. They are reproduced similarly over all the figures.



suberin content: *horst-1*, *horst-2*, *horst-1 ralph-1*, *pCASP1::CDEF1*. Finally, CS(=)Sub(X) is formed by *ralph-1* and *ralph-2* which differ from Col-0 in their suberin composition but not necessarily in their content. From our assays, no difference in periderm development nor periderm permeability could be

identified within our mutants. Altogether, we define here a collection of genotypes that covers multiple combinations of CS and suberin defects (Table S1). Although with sometimes a limited number of alleles, such as *gelp51-2* in the CS(=)Sub(+) group, we would like to point out that the primary objective of this

collection is not to determine the function of each gene. Rather, we anticipate that extracting the most salient features of each group will allow us to conclude on the role of these apoplastic barriers.

Specific effects of CS and endodermal suberin on root water transport

Root water transport capacity was characterized by measurement of root hydraulic conductivity (L_p) on detopped plants using the pressure chamber and exudation techniques, yielding hydrostatic L_p (L_{p-r-h}) and osmotic L_p (L_{p-r-o}) conductivity, respectively (Fig. 2). Thus, L_{p-r-h} varied among mutants by -73% to $+48\%$ compared to Col-0 (Fig. 2a). A significant linear correlation was observed between L_{p-r-o} and L_{p-r-h} throughout the overall set of genotypes with the exception of *sgn3-3 esb1-1* (Fig. 2b). Variation in L_p was mostly consistent with the classification of mutants according to their CS and suberin characteristics, though with very few exceptions. Mutants of the CS(-)Sub(+) group showed a significant reduction in L_p (although not statistically significant for *casp1-1 casp3-1*). CS(-)Sub(=) (*sgn3-3*, *sgn3-4* and *sgn3-3 esb1-1*) and CS(=)Sub(+) (*gelp51-2*, *anac38-1*, *anac038-2*) genotypes showed no difference in L_p to Col-0, although L_{p-r-o} , but not L_{p-r-h} , was lower for *sgn3-3 esb1-1*. Finally, CS(=)Sub(-) and CS(=)Sub(X) mutants (*horst-1*, *horst-1 ralph-1*, *pCASP1::CDEF1*, *ralph-1* and *ralph-2*) showed higher L_p except for *horst-2*.

Based on these results, and with the exception of three genotypes out of 16 (*casp1-1 casp3-1*, *sgn3-3 esb1-1* and *horst-2*), the most important reduction in root water transport capacity occurs in plants with enhanced suberin but with defective CS. Conversely, the most important increase in root water transport

capacity is found in plants with reduced or altered suberin (*horst-1*, *horst-1 ralph-1*, *pCASP1::CDEF1*, *ralph-1*, *ralph-2*) and non-defective CS. Defective CS were associated to both reduced and similar L_p in our collection. Thus, suberin quantity and composition seem to influence water transport as a barrier, while CS, *per se*, do not.

Reduction of L_{p-r-h} in Casparian strip defective mutants is mediated by concomitant changes in aquaporin activity

Water transport in Arabidopsis roots is considered to be mainly contributed by aquaporins (Tournaire-Roux *et al.*, 2003). Possible interactions between endodermal barriers and aquaporin functionalities were analyzed by comparing Col-0 and a subset of mutants representing the five groups identified earlier. Excised root systems were treated with NaN_3 , an inhibitor of aquaporin activity (Tournaire-Roux *et al.*, 2003; Sutka *et al.*, 2011). By contrast to all other groups, and with the exception of *casp1-1 casp3-1*, CS(-)Sub(+) mutants only showed a slight inhibition of L_p upon NaN_3 addition, indicating a low contribution of aquaporins, as was already shown for *esb1-1* (Wang *et al.*, 2019) (Fig. 3). The residual L_{p-r-h} , insensitive to NaN_3 , was similar to that of Col-0. Thus, the low L_{p-r-h} in this group would mainly originate from downregulation of aquaporins rather than from direct physical effects of increased suberin deposition. However, mutants from the CS(=)Sub(-) and CS(=)Sub(X) groups showed an increased absolute inhibition to NaN_3 , together with a significantly higher residual L_{p-r-h} , suggesting that their higher L_{p-r-h} results from both an upregulation of aquaporins and alteration in suberin deposition or composition (Fig. 3). Finally, mutants from the CS(=)Sub(+) and CS(-)Sub(=) groups, besides *sgn3-3 esb1*, behaved similarly to Col-0.

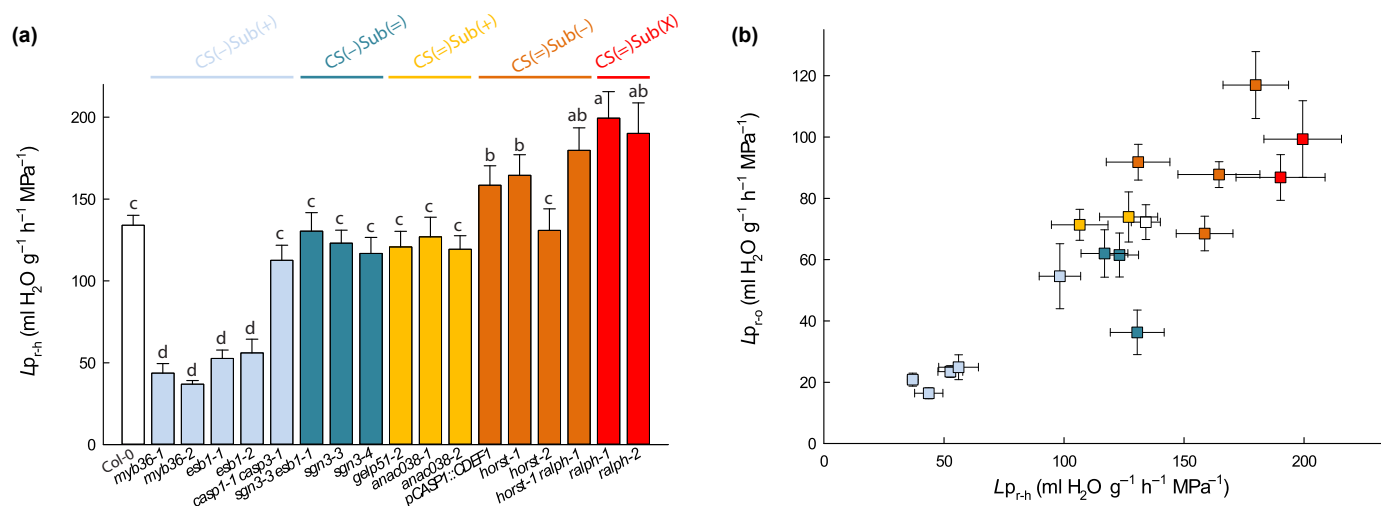


Fig. 2 Hydrostatic root hydraulic conductivity (L_{p-r-h}) (a), and its relation with the osmotically root hydraulic conductivity (L_{p-r-o}) (b) in Col-0, and in a collection of 16 Casparian strips (CS) and/or suberin mutants in Arabidopsis. The plants that were grown hydroponically for 19 to 21 d under environmental controlled conditions, and measured using pressure chambers (L_{p-r-h}) (means \pm SE, $n = 15-20$, $n = 3$) or by the exudation method (L_{p-r-o}) (means \pm SE, $n = 20-25$, $n = 3$). In (a), *anac038-2* is presented at a 'virtual L_p ' of 119.38 with respect to a wild-type (WT) value of $134.08 \text{ ml g}^{-1} \text{h}^{-1} \text{MPa}^{-1}$, when 'real values' obtained during a dedicated experiment were of 205.0 and $230.2 \text{ ml g}^{-1} \text{h}^{-1} \text{MPa}^{-1}$, respectively. One-way ANOVA and Tukey's test were used to determine significant differences ($\alpha = 0.05$). Data of L_{p-r-h} for *pCASP1::CDEF1* are the same as in Wang *et al.* (2019).

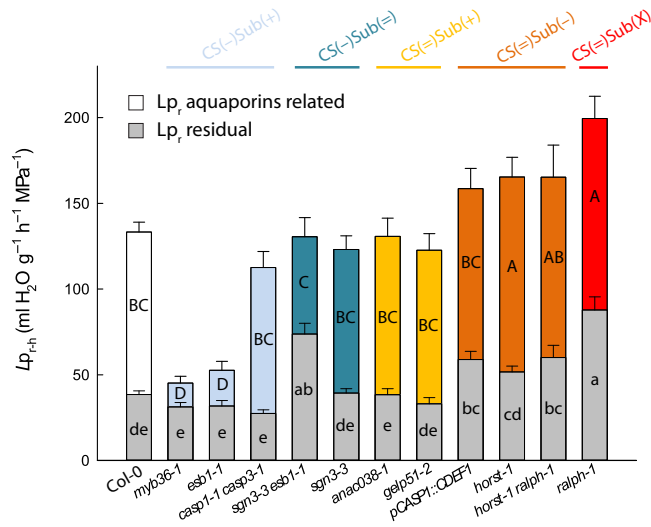


Fig. 3 Effects of sodium azide (NaN_3) on root hydraulic conductivity and effects of root barrier mutations on residual water transport. Measurements were performed in a collection of 19 to 21 d-old Arabidopsis Col-0 and 11 Casparian strips (CS) and/or suberin mutants (means \pm SE, $n = 15\text{--}20$, $n = 3$). The aquaporin-dependent pathway (colored bar) was derived from the subtraction of xylem sap flow before (full bar) and after 40 min (residual- L_{p_r} , gray bars) of a NaN_3 treatment. Uppercase and lowercase letters inside the bars indicate significant differences. Data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey's test at $\alpha = 0.05$.

Aquaporin regulation triggered by the loss of integrity of root endodermal barriers was further investigated by testing, in roots of nine of the 17 genotypes, the relationship between the messenger RNA (mRNA) abundance of 13 *PIP* aquaporin genes and L_{p_r-h} . Figure 4 shows that L_{p_r-h} was positively correlated with the expression of *AtPIP1;5* ($\rho = 0.7$, $P = 0.03$) whereas it was negatively correlated with the expression of *AtPIP2;1* ($\rho = -0.86$, $P = 2.10^{-7}$). No correlation was observed with expression of other *PIP* genes (Fig. S4). These results indicate that modifications in

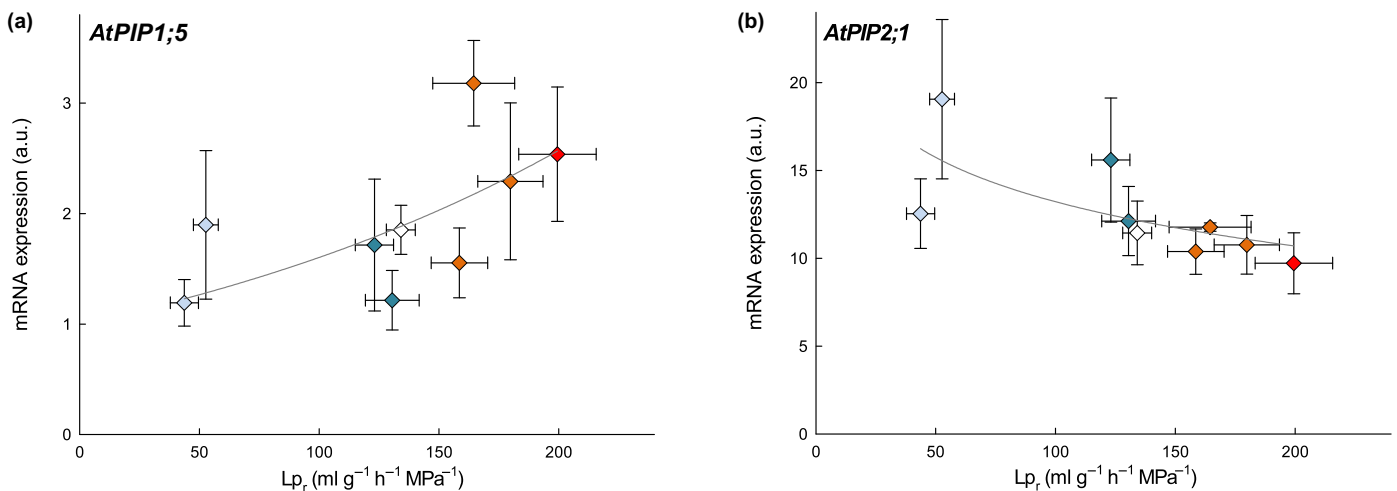


Fig. 4 Correlations between root hydraulic conductivity (L_{p_r-h}) and aquaporins *AtPIP1;5* (a) or *AtPIP2;1* (b) expression levels in Col-0 and a collection of seven Arabidopsis mutants with alterations in endodermal Casparian strips (CS) and/or suberin. Spearman's correlations are statistically significant for each gene ($P < 3 \times 10^{-2}$ and 2×10^{-7} , respectively). Plants were grown hydroponically for 19 to 21 d (means \pm SE, $n = 3$).

root apoplastic barriers can be accompanied with changes in expression of aquaporin genes, but which cannot simply explain their hydraulic phenotype.

Altogether, these results indicate that the two apoplastic structures at the endodermis do not simply act as physical barriers for root water or solute transport, but also functionally interact with the aquaporin-dependent pathway. Our results are in line with the results of Wang *et al.* (2019), where CS deficiency downregulates aquaporins activity and the deposition of ectopic suberin through a CIFs/SGN3 pathway (Doblas *et al.*, 2017b). By contrast, the mechanism that possibly links a decrease in suberin content and/or composition with an upregulation in aquaporin activity or expression remains unknown.

Permeability to solutes at the endodermis is determined by the CS

Root permeability to solutes was determined for a subset of genotypes from each group, by supplying NaCl to detopped plants and measuring L_{p_r-h} and root balancing pressure (P_{jv0}). The value of P_{jv0} is the hydrostatic pressure required to counteract the osmotic gradient existing between the root culture medium and the xylem sap and was taken as a proxy for root selectivity to solutes. The application of 100 mM NaCl for 1 h to the root medium typically reduces L_{p_r-h} in WT plants (Boursiac *et al.*, 2005). Our mutant collection followed this behavior except for the CS(-)Sub(+) group (*myb36-1*, *myb36-2*, *esb1-1* and *esb1-2*), where no major variation of the constitutively low L_{p_r-h} could be detected (Fig. S5). We next determined P_{jv0} (Fig. 5). The leakier the root to solutes, the lower the osmotic gradient across the root, and so is P_{jv0} . Hence, P_{jv0} under NaCl treatment can be considered as an indicator of the root selectivity to Na^+ and Cl^- (Boursiac *et al.*, 2005). Only mutants with defective CS showed a marked difference in P_{jv0} compared to Col-0, with a reduction in the CS(-)Sub(+) group even more marked in the CS(-)Sub(=) group. In the CS(=) groups, only two genotypes (*anac38-1* and

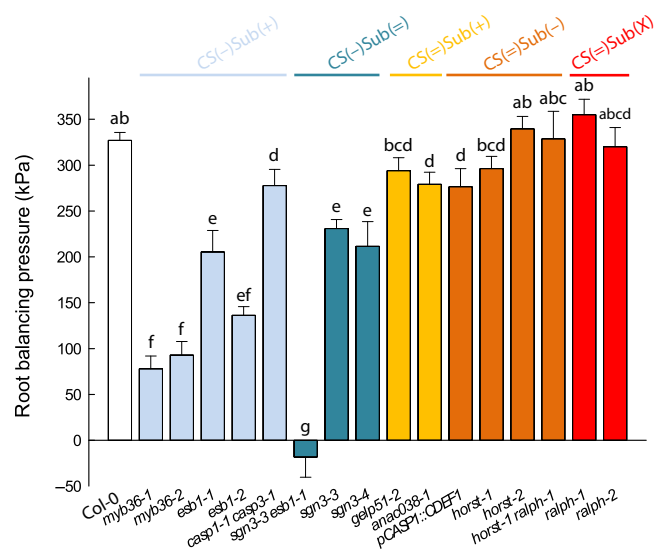


Fig. 5 Root balancing pressure (P_{jv0}) in Col-0 and in a collection of 16 Casparian strips (CS) and/or suberin mutants in Arabidopsis that were grown hydroponically for 19 to 21 d (means \pm SE, $n = 15$ –20, $n = 3$). The measurements were performed using pressure chambers at a constant pressure (320 kPa) and after subjecting the roots to 100 mM sodium chloride (NaCl) for 1 h. Letters above the bars indicate significant differences among means after one-way ANOVA and *post hoc* Tukey's test ($\alpha = 0.05$).

pCASp1::CDEF1 out of eight showed a significant reduction compared to Col-0. (Fig. 5). Our results highlight a clear link between defective CS and solute leakage into the root xylem. The role of suberin is less trivial since various configuration led to slight modifications in P_{jv0} , the most robust being that the increase in suberin content in CS(-)Sub(+) provided an apparent decrease in the root selectivity. Other structural factors such as suberin macromolecular structure, crosslinking or suberin associated waxes also contribute to root selectivity. An in depth analysis of the suberin associated waxes and their physical properties would shed light on this paradox.

Rosette growth is affected by the status of CS and suberin at the endodermis, and involves hydromineral nutrition

We aimed at analyzing how the defects in root endodermal barriers affect the development of the shoots under control conditions. For this purpose, a subset of mutants was selected for each group in addition to Col-0: *myb36-1* and *esb1-1* from CS(-)Sub(+); *sgn3-3 esb1-1* and *sgn3-3* from CS(-)Sub(=); *anac038-1* and *gelp51-2* from CS(=)Sub(+); *horst-1* and *horst-1 ralph-1* from CS(=)Sub(-); and *ralph-1* from CS(=)Sub(X). Plants were soil-grown in the Phenopsis platform (Granier *et al.*, 2006) for 5 wk until harvest. Plant rosette expansion as well as rosette biomass at harvest were determined (Figs 6, S6a). Shoot DW was lower than in Col-0 in the groups of mutants with altered CS, CS(-)Sub(+) and CS(-)Sub(=), while mutants with altered suberin from the CS(=)Sub(+) and CS(=)Sub(-) groups reached shoot DW similar to Col-0 (Fig. 6). Rosette area confirmed these results (Fig. S6a). It has to be noted that rosette growth after 5 wk does

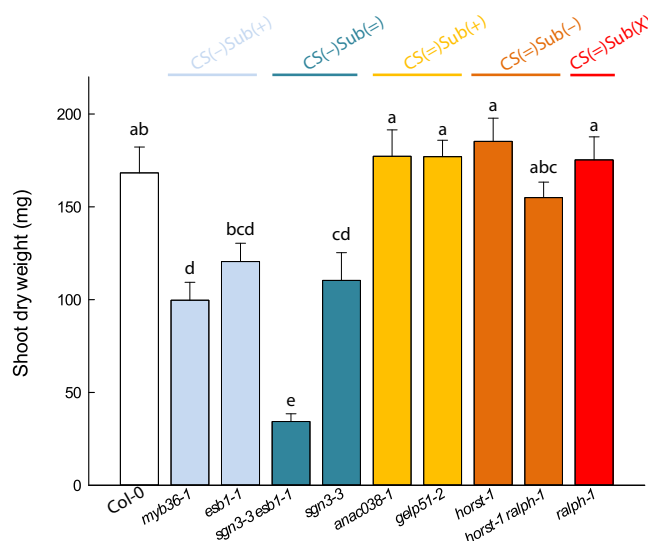


Fig. 6 Relative shoot growth in Col-0 and a collection of nine Casparian strips (CS) and/or suberin Arabidopsis mutants in control conditions. Plants were grown for 5 wk in a Phenopsis phenotyping platform under controlled environmental conditions (means \pm SE, $n = 7$). Letters above the bars indicate significant differences among means after one-way ANOVA and *post hoc* Tukey's test ($\alpha = 0.05$).

not predict the final rosette size, since it also depends on the cycle duration. Nevertheless, these data indicate that, under our normal soil conditions, the functionality of CS is necessary for a proper development of the aerial parts, while that of suberin layers is not.

Since both permeability to solutes and water transport capacity in roots are compromised in the CS(-) mutants with reduced growth, we aimed at identifying which one is the most influential on rosette growth and development. Previous studies showed that a change in root hydraulic conductance (K_r) translates into a similar change in transpiration and growth rate in the shoot of maize or peach tree (Solari & DeJong, 2006; Ehlerl *et al.*, 2009). Similarly, the rosette FW measured at harvest in our mutant collection under control conditions varied in parallel to K_r (Fig. 7a). However, transpiration rate was not different from Col-0 under our low evaporative demand conditions (Fig. S6b). Such a reduction in leaf growth without change in transpiration had been reported in maize plants, where K_r was downregulated using pharmacological aquaporin inhibition, provided that the evaporative demand was kept low (Ehlerl *et al.*, 2009). In the present work, we might face a similar scenario, where reduced growth of the CS(-) groups after 5 wk originates from the downregulation of K_r although without provoking a major rebalancing of plant water relations.

Additionally, there was a positive correlation between rosette osmotic potential (Π_{leaf}) and growth across mutants in our experiments (Fig. 7b). As cell turgor is expected to vary inversely to Π_{leaf} (the more negative Π_{leaf} , the more positive turgor for a given total water potential), it is unlikely that variation in Π_{leaf} was responsible for variation in growth through changes in turgor. We therefore examined whether variation in Π_{leaf} was rather indicative of ionome disorders which could have caused variation

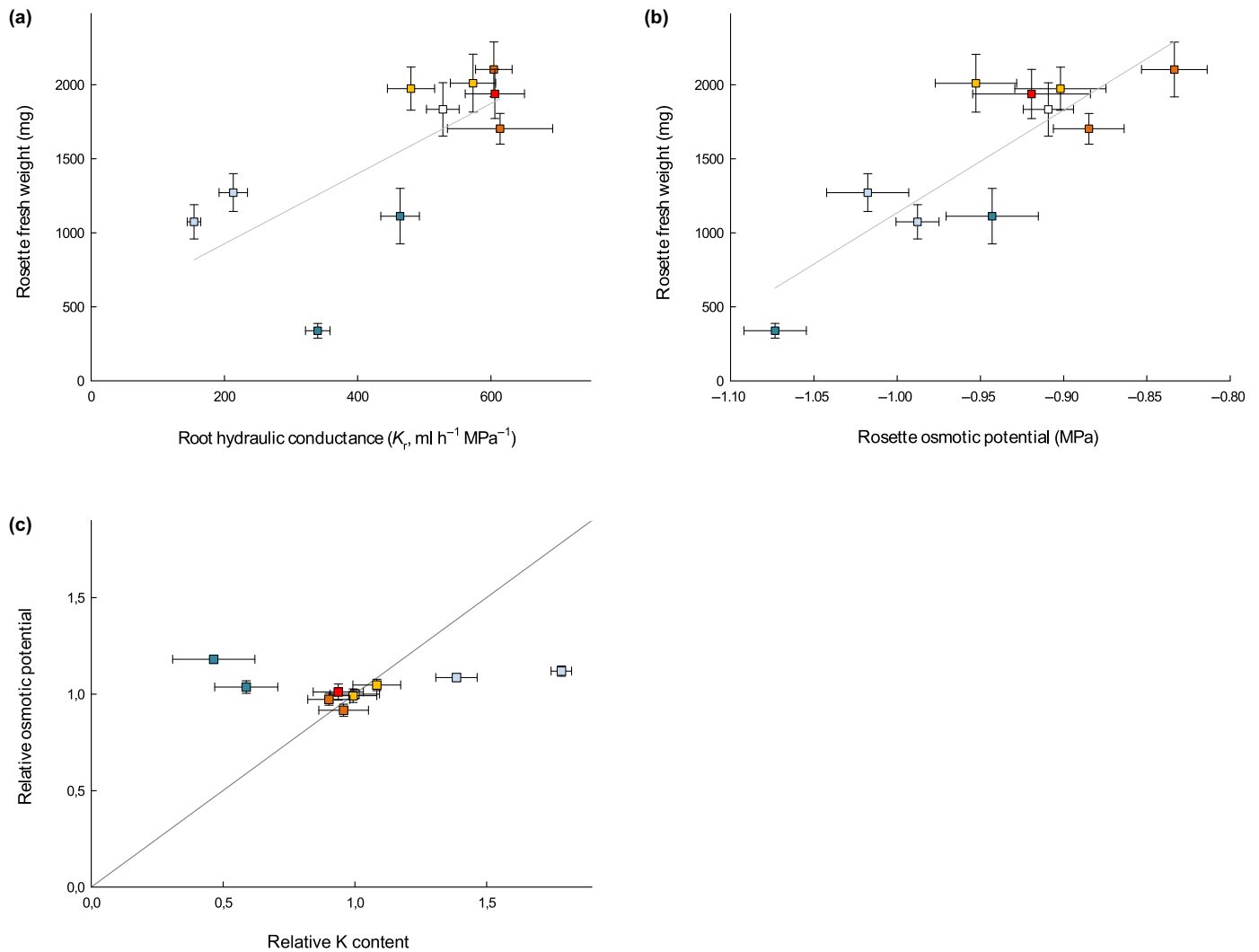


Fig. 7 Relationship between rosette fresh weight (FW) and root hydraulic conductance (K_r) (a) and rosette osmotic potential (\pm SEM) from elongating leaves (b) in a collection of nine Casparian strips (CS) and/or suberin Arabidopsis mutants and Col-0 grown in soil for 5 wk in a Phenopsis phenotyping platform under controlled environmental conditions ($n = 7$). Pearson correlation coefficients are 0.69 (P -value < 0.05) and 0.84 (P -value < 0.01), for FW vs K_r and FW vs shoot osmotic potential, respectively. (c) Rosette osmotic potential vs potassium (K) content for mutants grown under control conditions, relatively to Col-0.

in growth. CS(-) mutants, which showed a reduced shoot growth, also exhibited ionic differences compared to Col-0, with higher potassium (K) and lower calcium (Ca), as referenced in previous reports for *esb1-1* and *myb36-1* (CS(-)Sub(+)) group (Baxter *et al.*, 2009; Kamiya *et al.*, 2015), and a reduced K and Ca content in *sgn3-3* and *sgn3-3 esb1-1* (CS(-)Sub(=)) group (Pfister *et al.*, 2014), still in agreement with previous studies (Table S2). By comparison, none of the suberin mutants (CS(=)Sub(+) and CS(=)Sub(-) groups), which did not show any growth phenotype, had any alteration in their ionome profile (Table S2), similarly to the previously described *ralph-1* (group CS(=)Sub(-)) (Compagnon *et al.*, 2009). Moreover, the relationship between K and Π_{leaf} , which usually derives from the major role played by this mineral on the osmotic potential in cells, was not conserved across mutants (Fig. 7c). Thus, in our growth conditions, alteration of CS function provoked a

reduction in rosette growth possibly associated to ionome variations, but not caused by the resulting change in Π_{leaf} , the latter not being driven by K content.

Discussion

The present study aimed at investigating the specific role and impact on the whole plant, of each of the two main apoplastic diffusion barriers of the root: the CS and the suberin layers. For this, we used a unique collection of Arabidopsis mutants, which we categorized according to the permeability of the CS to PI and the amount and location of suberin (Figs 1, S2, S3). The characterization of multiple mutants per group ruled out the drawbacks inherent to single-mutant analyses that could come from unforeseen genetic compensation (El-Brolosy & Stainier, 2017). The *casp1-1 casp3-1* double mutant typically fits into this category,

being an outlier to the other members of the CS(−)Sub(+) group for many of the root parameters that were measured. Our results support the following conclusions.

Casparian strips do not directly block apoplastic water transport while suberin does. Yet, both act on aquaporin activity

Characterization of *esb1-1* revealed that CIF/SGN3 dependent signaling, which inhibits aquaporin activity, is its primary cause of L_p downregulation (Wang *et al.*, 2019). We generalized this observation and revealed a complex interaction between apoplastic barriers and aquaporin activity and/or expression (Figs 3, 4, S4) to regulate L_p (Fig. 2): CS do not directly block water transport while suberin does, but alteration of both acts on aquaporin activity. Our conclusions are based on three sets of measurements.

First, functional CS were associated with higher L_p – a paradox if we only consider CS as hydrophobic barriers – while we found a correlation between suberin alteration and L_p in CS(=)Sub(−) and CS(=)Sub(X) mutants. Specifically, a substantial reduction in suberin (*pCASPI::CDEF1*, *horst-1*, *horst-1ralph-1*), or a qualitative change in suberin composition (*ralph-1*), potentially affecting hydrophobicity (Schreiber *et al.*, 2005; Kreszies *et al.*, 2019) or crosslinking and structure (Molina *et al.*, 2009), allowed for an increased L_p . These results extend the previous characterization of the *pCASPI::CDEF1* line, for which we then observed only a trend (Wang *et al.*, 2019). They confirm the importance of studying multiple independent mutants in a reverse genetic approach. Suberin would therefore act as a barrier to water transport. Enhanced suberin deposition, which appeared not ectopic in the CS(=)Sub(+) group, had no further effect on L_p . This suggests that regular suberin deposition already blocks efficiently the water path in WT. *In vitro* measurement of the water permeability of thin layers of purified suberin would help confirming such effects.

Second, from the use of the aquaporin blocker NaN_3 (Fig. 3), we derived an ‘aquaporin-mediated L_p ’, and a ‘residual L_p ’. The former refers to the activity of aquaporins in the root, but the latter has to be interpreted with caution since it surely reflects more than apoplastic barriers, and includes transport through lipid membranes, vessels, or communication between the radial transport pathways (Stuedle, 2000; Sack *et al.*, 2004). We found significant differences in aquaporin-mediated L_p in our collection, that confirmed a regulation of aquaporins linked to the apoplastic barrier status (see later). Qualitatively speaking, we found no difference in residual L_p in four out of six CS mutants, while mutants with a lower suberin content or different suberin compositions (CS(=)Sub(−), CS(=)Sub(X)) had a higher residual L_p . We concluded that, within the root zone altered in our mutant collection, the CS is not a major barrier for water transport while suberin physically restricts this transport. In the context of disturbed CS (CS(−)Sub(+) and CS(−)Sub(=)), the comparison between *esb1-1*, where ectopic suberin content can be seen as a compensatory mechanism for CS deficiency, and *sgn3-3 esb1-1*, which lacks this response, further reinforces this

conclusion. The role of suberin as a hydrophobic barrier in roots has already been highlighted by previous studies in *Arabidopsis* (Ranathunge & Schreiber, 2011) and other species (Frensch *et al.*, 1996; Freundl *et al.*, 2000; Stuedle, 2000; Zimmermann *et al.*, 2000; Ranathunge *et al.*, 2016). The originality of our work resides in the fact that, in the root of *Arabidopsis*, we were able to separate the role of suberin from that of the CS, and described a complementary regulation of root aquaporins. We note that the periderm defines a zone where the organization of suberin layers and lignified cell walls would challenge our interpretations. However, the initial characterization did not reveal any difference in periderm development or permeability in our collection.

Third, we found positive correlation between L_p and *AtPIP1;5* mRNA abundance. This could fit with a putative role of this isoform in root water transport, which has yet to be proven. The function of *AtPIP2;5*, whose expression negatively correlated to L_p , has not been described either. In contrast, the negative correlation between L_p and the mRNA abundance of *AtPIP2;1*, which is among the most abundant aquaporins in roots (Boursiac *et al.*, 2005; Monneuse *et al.*, 2011) and acts on osmotically-driven root water flow (Javot *et al.*, 2003; Péret *et al.*, 2012), is contradictory to a major contribution of this aquaporin to water transport. Hence, our results highlight links between apoplastic barrier functionality and aquaporin expression and function, with a complex interplay between isoforms that remains to be elucidated. Future studies will have to take into account distinct cell-specific expression patterns of isoforms (Hachez *et al.*, 2006a,b), their regulation at the protein level, and their possible functional interactions, at the endodermis in particular (Chauumont & Tyerman, 2014).

Casparian strips are the primary barriers against passive solutes diffusion in roots, while suberin acts as a distinctive, compensatory barrier

Previous studies (Pfister *et al.*, 2014; Barberon *et al.*, 2016; Doblas *et al.*, 2017b; Wang *et al.*, 2019) have concluded that CS exerts a main barrier role in ion transport. With respect to these studies, the present work was carried out in a broader collection of mutants of different origin, and relied on quantitative measurements of balancing pressure (P_{jv0} , Fig. 5). Although not strictly equivalent, this parameter is indicative of the reflection coefficient (σ_{sr}) of the root. Measurements of σ_{sr} of Col-0, *esb1-1* and *sgn3-3 esb1-1* were reported by Wang *et al.* (2019) and agree with the alterations in P_{jv0} described here. In the present study, Col-0 plants and mutants from groups with functional CS (CS(=)Sub(+), CS(=)Sub(−) and CS(=)Sub(X)) showed very consistent P_{jv0} , in the range 0.57–0.73 of the total osmotic force due to NaCl, which fits with σ_{sr} values commonly in a 0.4–0.8 range (Boursiac *et al.*, 2005; Fritz & Ehwald, 2011; Ranathunge & Schreiber, 2011; Ranathunge *et al.*, 2017). Mutants with altered CS (CS(−)Sub(+) and CS(−)Sub(=)), exhibited a reduction in P_{jv0} , down to 0–0.47 of the total osmotic force due to NaCl (with the exception of *caspi-1 caspi-3*) which confirms that the CS act as the primary barrier against solute permeation towards

inner tissues. With regard to mutants with deficient CS, the higher P_{jv0} of CS(-)Sub(+) members (*esb1-1* and *myb36-1*) compared to *sgn3-3 esb1-1* (CS(-)Sub(=)) suggests that deposition of ectopic suberin partially compensates for the lack of CS. This result parallels those of NaCl selectivity for *esb1-1* and *pCASPI::CDEF1 esb1-1* genotypes characterized in Wang *et al.* (2019). Altogether, these results indicate that CS are the main barriers to the free diffusion of solutes through the apoplast, while suberin can act secondarily as a barrier when deposited ectopically as in *esb1* and *myb36*.

Under standard conditions, root diffusional barriers exert direct and indirect impacts on shoot development

Under control conditions, mutants of the altered CS(-) groups showed lower rosette DW and reduced surface development (Figs 6, S5). Both root hydraulic conductance and shoot solutes accumulation were correlated to rosette DW in our experiments (Fig. 7a,b). Thus, both a hydraulic defect and an alteration in solute selectivity appeared as plausible causes of the reduction in shoot growth rate.

However, the observation that plants with the lower osmotic potential are those with the lower growth rate raises an apparent paradox. Indeed, in well-watered soil conditions and with no differences in transpiration (Fig. S6), it can be assumed that the leaf water potential is similar among the genotypes tested. Hence the lower osmotic potential in the CS(-) groups should translate into an increase in the average leaf turgor pressure. According to Lockhart's model for plant cell expansion (Lockhart, 1965), this would increase the growth rate in the CS(-) groups, for which we observed exactly the converse (Figs 6, S5). Our results therefore suggest that other parameters involved in plant cell expansion are altered when CS are not functional, namely the yield and/or the extensibility of the cell wall.

Furthermore, we looked in more details at the elemental composition of the growing rosettes of the mutant collection in order to look for the origin of the variations in osmotic potential. Our results are in accordance with previous reports (Hosmani *et al.*, 2013; Pfister *et al.*, 2014; Kamiya *et al.*, 2015), and highlight that mutants of the CS(-)Sub(+) and CS(-)Sub(=) groups had opposite phenotypes with respect to K accumulation (Table S2). This implies that the significant variations in shoot osmotic potential, while related to a reduction in shoot growth in both groups, could not be attributed to K (Fig. 7c). We therefore conclude that defective CS do not limit shoot growth through K nutrition. Quantification of other osmotic potential such as NO_3^- , sugars, and organic acids would be required to find the origin of such osmotic potential variations.

Overall, the control of shoot growth by CS and suberin functionality is not simply mediated by variations in major nutrients or osmotic control of turgor in growing cells, but by indirect effects on other growth characteristics like cell wall mechanical properties. For example, Wang *et al.* (2019) identified that activation of the CIF/SGN3 signaling pathway in roots of CS deficient plants translates into an abscisic acid (ABA) dependent signaling in shoots, and such signaling

could be at the origin of the growth inhibition highlighted in our study.

In conclusion, study of CS and suberin deficient mutants in *Arabidopsis* highlights that, in roots, suberin acts physically as a barrier to water transport while CS prevent the passive leakage of solutes into the stele. However, the two components appear to control aquaporin activity. In the shoots, defect in CS provokes a reduction in growth not only via an alteration in hydromineral nutrition but also via signaling, including the CIF/SGN pathway, and perhaps also via so far undiscovered pathways.

Acknowledgements

The authors acknowledge support from the ERA-NET Coordinating Action in Plant Sciences program project ERACAPS13.089_RootBarriers, the German Research Foundation (DFG; grant FR 1721/2-1 to R.B.F), the AgreenSkills+ fellowship to MC-P which has received funding from the EUs Seventh Framework Program under grant agreement no. FP7-609398 (AgreenSkills+ contract) and FEDER-Junta de Castilla y León, CLU-2018-04. Results have also been achieved within the framework of the Transnational Cooperation within the PLANT-KBBE Initiative, with funding from the German Federal Ministry of Education to RBF. The authors want to thank Prof. Marie Barberon (University of Geneva) and Prof. Niko Geldner (University of Lausanne) for kindly providing plants expressing the pGPAT5::NLS-RFP construct, the SAME platform from BPMP for elemental analyses, as well as Carine Alcon and the MRI imaging facility, member of the national infrastructure France-BioImaging supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04, «Investments for the future»).

Author contributions

Design of the research: YB, CM, DES, RBF, TS, BM; data analysis: MC-P, YB, BM, TS; performance of the research: MC-P, ZR, MD, GR, C-HS, RBF, YB; resources: PD, MF, GR; writing-original draft: MC-P, YB; writing-review and editing: CM, BM, TS, DES, RBF, YB.

ORCID

Yann Boursiac  <https://orcid.org/0000-0002-9545-9003>
Monica Calvo-Polanco  <https://orcid.org/0000-0002-0813-0921>
Myriam Dauzat  <https://orcid.org/0000-0001-7846-7397>
Patrick Diehl  <https://orcid.org/0000-0003-3922-8419>
Rochus B. Franke  <https://orcid.org/0000-0003-2269-7390>
Christopher Hidalgo-Shrestha  <https://orcid.org/0000-0002-0727-9388>
Christophe Maurel  <https://orcid.org/0000-0002-4255-6440>
Bertrand Muller  <https://orcid.org/0000-0001-6387-9460>
Guilhem Rey  <https://orcid.org/0000-0003-0545-2500>
Zoe Ribeyre  <https://orcid.org/0000-0003-4162-0858>
David E. Salt  <https://orcid.org/0000-0003-0283-0991>
Thierry Simonneau  <https://orcid.org/0000-0001-5636-9534>

References

- Allassimone J, Naseer S, Geldner N. 2010. A developmental framework for endodermal differentiation and polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 107: 5214–5219.
- Andersen TG, Naseer S, Ursache R, Wybouw B, Smet W, De Rybel B, Vermeer JEM, Geldner N. 2018. Diffusible repression of cytokinin signalling produces endodermal symmetry and passage cells. *Nature* 555: 529–533.
- Barberon M, Vermeer J, De Bellis D, Wang P, Naseer S, Andersen T, Humbel B, Nawrath C, Takano J, Salt D *et al.* 2016. Adaptation of root function by nutrient-induced plasticity of endodermal differentiation. *Cell* 164: 447–459.
- Baxter I, Hosmani PS, Rus A, Lahner B, Borevitz JO, Muthukumar B, Mickelbart MV, Schreiber L, Franke RB, Salt DE. 2009. Root suberin forms an extracellular barrier that affects water relations and mineral nutrition in Arabidopsis. *PLoS Genetics* 5: e1000492.
- Beisson F, Li Y, Bonaventure G, Pollard M, Ohlrogge JB. 2007. The acyltransferase GPAT5 is required for the synthesis of suberin in seed coat and root of Arabidopsis. *Plant Cell* 19: 351–368.
- Boursiac Y, Chen S, Luu D-T, Sorieul M, van den Dries N, Maurel C. 2005. Early effects of salinity on water transport in Arabidopsis roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiology* 139: 790–805.
- Campilho A, Nieminen K, Ragni L. 2020. The development of the periderm: the final frontier between a plant and its environment. *Current Opinion in Plant Biology* 53: 10–14.
- Chaumont F, Tyerman SD. 2014. Aquaporins: highly regulated channels controlling plant water relations. *Plant Physiology* 164: 1600–1618.
- Compagnon V, Diehl P, Benveniste I, Meyer D, Schaller H, Schreiber L, Franke R, Pinot F. 2009. CYP86B1 is required for very long chain ω -hydroxyacid and α,ω -dicarboxylic acid synthesis in root and seed suberin polyester. *Plant Physiology* 150: 1831–1843.
- Doblas VG, Geldner N, Barberon M. 2017a. The endodermis, a tightly controlled barrier for nutrients. *Current Opinion in Plant Biology* 39: 136–143.
- Doblas VG, Smakowska-Luzan E, Fujita S, Allassimone J, Barberon M, Madalinski M, Belkhadir Y, Geldner N. 2017b. Root diffusion barrier control by a vasculature-derived peptide binding to the SGN3 receptor. *Science* 355: 280–284.
- Ehlert C, Maurel C, Tardieu F, Simonneau T. 2009. Aquaporin-mediated reduction in maize root hydraulic conductivity impacts cell turgor and leaf elongation even without changing transpiration. *Plant Physiology* 150: 1093–1104.
- El-Brolosy MA, Stainier DYR. 2017. Genetic compensation: a phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genetics* 13: e1006780.
- Enstone DE, Peterson CA, Ma F. 2002. Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment. *Journal of Plant Growth Regulation* 21: 335–351.
- Franke R, Briesen I, Wojciechowski T, Faust A, Yephremov A, Nawrath C, Schreiber L. 2005. Apoplastic polyesters in Arabidopsis surface tissues – a typical suberin and a particular cutin. *Phytochemistry* 66: 2643–2658.
- Franke RB, Dombrink I, Schreiber L. 2012. Suberin goes genomics: use of a short living plant to investigate a long lasting polymer. *Frontiers in Plant Science* 3: 1–4.
- Frensch J, Hsiao TC, Steudle E. 1996. Water and solute transport along developing maize roots. *Planta* 198: 348–355.
- Freundl E, Steudle E, Hartung W. 2000. Apoplastic transport of abscisic acid through roots of maize: effect of the exodermis. *Planta* 210: 222–231.
- Fritz M, Ehwald R. 2011. Mannitol permeation and radial flow of water in maize roots. *New Phytologist* 189: 210–217.
- Geldner N. 2013. The endodermis. *Annual Review of Plant Biology* 64: 531–558.
- Granier C, Aguirrezabal L, Chenu K, Cookson SJ, Dautaz M, Hamard P, Thioux J-J, Rolland G, Bouchier-Combaud S, Lebaudy A *et al.* 2006. PHENOPSIS, an automated platform for reproducible phenotyping of plant responses to soil water deficit in *Arabidopsis thaliana* permitted the identification of an accession with low sensitivity to soil water deficit. *New Phytologist* 169: 623–635.
- Gruber BD, Giehl RFH, Friedel S, von Wirén N. 2013. Plasticity of the Arabidopsis root system under nutrient deficiencies. *Plant Physiology* 163: 161–179.
- Haas DL, Carothers ZB. 1975. Some ultrastructural observations on endodermal cell development in *Zea mays* roots. *American Journal of Botany* 62: 336–348.
- Hachez C, Moshelion M, Zelazny E, Cavez D, Chaumont F. 2006a. Localization and quantification of plasma membrane aquaporin expression in maize primary root: a clue to understanding their role as cellular plumbers. *Plant Molecular Biology* 62: 305–323.
- Hachez C, Zelazny E, Chaumont F. 2006b. Modulating the expression of aquaporin genes in planta: a key to understand their physiological functions? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1758: 1142–1156.
- Hofer R, Briesen I, Beck M, Pinot F, Schreiber L, Franke R. 2008. The Arabidopsis cytochrome P450 CYP86A1 encodes a fatty acid ω -hydroxylase involved in suberin monomer biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 59: 2347–2360.
- Hosmani PS, Kamiya T, Danku J, Naseer S, Geldner N, Guerinet ML, Salt DE. 2013. Dirigent domain-containing protein is part of the machinery required for formation of the lignin-based Casparian strip in the root. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 110: 14498–14503.
- Javot H, Lavergeat V, Santoni V, Martin-Laurent F, Güçlü J, Vinh J, Heyes J, Franck KI, Schäffner AR, Bouchez D *et al.* 2003. Role of a single aquaporin isoform in root water uptake. *Plant Cell* 15: 509–522.
- Kamiya T, Borghi M, Wang P, Danku JMC, Kalmbach L, Hosmani PS, Naseer S, Fujiwara T, Geldner N, Salt DE. 2015. The MYB36 transcription factor orchestrates Casparian strip formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 112: 10533–10538.
- Knipfer T, Fricke W. 2010. Root pressure and a solute reflection coefficient close to unity exclude a purely apoplastic pathway of radial water transport in barley (*Hordeum vulgare*). *New Phytologist* 187: 159–170.
- Kreszies T, Shellakkutti N, Osthoff A, Yu P, Baldauf JA, Zeisler-Diehl VV, Ranathunge K, Hochholdinger F, Schreiber L. 2019. Osmotic stress enhances suberization of apoplastic barriers in barley seminal roots: analysis of chemical, transcriptomic and physiological responses. *New Phytologist* 221: 180–194.
- Li B, Kamiya T, Kalmbach L, Yamagami M, Yamaguchi K, Shigenobu S, Sawa S, Danku JMC, Salt DE, Geldner N *et al.* 2017. Role of LOTR1 in nutrient transport through organization of spatial distribution of root endodermal barriers. *Current Biology* 27: 758–765.
- Liška D, Martinka M, Kohanová J, Lux A. 2016. Asymmetrical development of root endodermis and exodermis in reaction to abiotic stresses. *Annals of Botany* 118: 667–674.
- Lockhart JA. 1965. An analysis of irreversible plant cell elongation. *Journal of Theoretical Biology* 8: 264–275.
- Maurel C, Boursiac Y, Luu D-T, Santoni V, Shahzad Z, Verdoucq L. 2015. Aquaporins in plants. *Physiological Reviews* 95: 1321–1358.
- Molina I, Li-Beisson Y, Beisson F, Ohlrogge JB, Pollard M. 2009. Identification of an Arabidopsis feruloyl-coenzyme A transferase required for suberin synthesis. *Plant Physiology* 151: 1317–1328.
- Monneuse J-M, Sugano M, Becue T, Santoni V, Hem S, Rossignol M. 2011. Towards the profiling of the *Arabidopsis thaliana* plasma membrane transportome by targeted proteomics. *Proteomics* 11: 1789–1797.
- Nakayama T, Shinohara H, Tanaka M, Baba K, Ogawa-Ohnishi M, Matsubayashi Y. 2017. A peptide hormone required for Casparian strip diffusion barrier formation in Arabidopsis roots. *Science* 355: 284–286.
- Naseer S, Lee Y, Lapierre C, Franke R, Nawrath C, Geldner N. 2012. Casparian strip diffusion barrier in Arabidopsis is made of a lignin polymer without suberin. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 109: 10101–10106.
- Nawrath C, Schreiber L, Franke RB, Geldner N, Reina-Pinto JJ, Kunst L. 2013. Apoplastic diffusion barriers in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book* 11: e0167.
- Obayashi T, Kinoshita K, Nakai K, Shibaoka M, Hayashi S, Saeki M, Shibata D, Saito K, Ohta H. 2007. ATTED-II: a database of co-expressed genes and cis elements for identifying co-regulated gene groups in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research* 35: D863–D869.
- Péret B, Li G, Zhao J, Band LR, Voß U, Postaire O, Luu D-T, Da Ines O, Casimiro I, Lucas M *et al.* 2012. Auxin regulates aquaporin

- function to facilitate lateral root emergence. *Nature Cell Biology* 14: 991–998.
- Peterson CA, Murrmann M, Steudle E. 1993. Location of the major barriers to water and ion movement in young roots of *Zea mays* L. *Planta* 190: 127–136.
- Pfister A, Barberon M, Alassimone J, Kalmbach L, Lee Y, Vermeer JEM, Yamazaki M, Li G, Maurel C, Takano J *et al.* 2014. A receptor-like kinase mutant with absent endodermal diffusion barrier displays selective nutrient homeostasis defects. *eLife* 3: e03115.
- R Core Team. 2020. *R: a language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Ranathunge K, Kim YX, Wassmann F, Kreszies T, Zeisler V, Schreiber L. 2017. The composite water and solute transport of barley (*Hordeum vulgare*) roots: effect of suberized barriers. *Annals of Botany* 119: 629–643.
- Ranathunge K, Schreiber L. 2011. Water and solute permeabilities of Arabidopsis roots in relation to the amount and composition of aliphatic suberin. *Journal of Experimental Botany* 62: 1961–1974.
- Ranathunge K, Schreiber L, Bi Y-M, Rothstein SJ. 2016. Ammonium-induced architectural and anatomical changes with altered suberin and lignin levels significantly change water and solute permeabilities of rice (*Oryza sativa* L.) roots. *Planta* 243: 231–249.
- Reyt G, Chao Z, Flis P, Salas-González I, Castrillo G, Chao D-Y, Salt DE. 2020. Uclacyanin proteins are required for lignified nanodomain formation within Casparian strips. *Current Biology* 30: 4103–4111.
- Roppolo D, De Rybel B, Tendon VD, Pfister A, Alassimone J, Vermeer JEM, Yamazaki M, Stierhof Y-D, Beeckman T, Geldner N. 2011. A novel protein family mediates Casparian strip formation in the endodermis. *Nature* 473: 380–383.
- Rounds CM, Lubeck E, Hepler PK, Winship LJ. 2011. Propidium iodide competes with Ca²⁺ to label pectin in pollen tubes and Arabidopsis root hairs. *Plant Physiology* 157: 175–187.
- Sack L, Streeter CM, Holbrook NM. 2004. Hydraulic analysis of water flow through leaves of sugar maple and red oak. *Plant Physiology* 134: 1824–1833.
- Schreiber L, Franke R, Hartmann K-D, Ranathunge K, Steudle E. 2005. The chemical composition of suberin in apoplastic barriers affects radial hydraulic conductivity differently in the roots of rice (*Oryza sativa* L. cv. IR64) and corn (*Zea mays* L. cv. Helix). *Journal of Experimental Botany* 56: 1427–1436.
- Solari LI, DeJong TM. 2006. The effect of root pressurization on water relations, shoot growth, and leaf gas exchange of peach (*Prunus persica*) trees on rootstocks with differing growth potential and hydraulic conductance. *Journal of Experimental Botany* 57: 1981–1989.
- Steudle E. 2000. Water uptake by plant roots: an integration of views. *Plant and Soil* 226: 45–56.
- Steudle 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* 103: 335–349.
- Steudle E, Peterson C. 1998. Review article. How does water get through roots? *Journal of Experimental Botany* 49: 775–788.
- Sutka M, Li G, Boudet J, Boursiac Y, Dumas P, Maurel C. 2011. Natural variation of root hydraulics in Arabidopsis grown in normal and salt-stressed conditions. *Plant Physiology* 155: 1264–1276.
- Tournaire-Roux C, Sutka M, Javot H, Gout E, Gerbeau P, Luu D-T, Bligny R, Maurel C. 2003. Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature* 425: 393–397.
- Tsuwamoto R, Fukuoka H, Takahata Y. 2008. GASSHO1 and GASSHO2 encoding a putative leucine-rich repeat transmembrane-type receptor kinase are essential for the normal development of the epidermal surface in Arabidopsis embryos. *The Plant Journal* 54: 30–42.
- Ursache R, Andersen TG, Marhavý P, Geldner N. 2018. A protocol for combining fluorescent proteins with histological stains for diverse cell wall components. *The Plant Journal* 93: 399–412.
- Wang P, Calvo-Polanco M, Reyt G, Barberon M, Champeyroux C, Santoni V, Maurel C, Franke RB, Ljung K, Novak O *et al.* 2019. Surveillance of cell wall diffusion barrier integrity modulates water and solute transport in plants. *Scientific Reports* 9: 4227.
- Zimmermann HM, Hartmann K, Schreiber L, Steudle E. 2000. Chemical composition of apoplastic transport barriers in relation to radial hydraulic conductivity of corn roots (*Zea mays* L.). *Planta* 210: 302–311.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Fig. S1 New mutants genotyping and expression information.

Fig. S2 Propidium iodide penetration in the root of 21 d-old Casparian strips (CS) and suberin mutants.

Fig. S3 Deconvolution of the Auramine O signal in 21 d hydroponically grown plants enables the detection and quantification of endodermal and peridermal suberin.

Fig. S4 Expression of aquaporins genes in the mutant collection.

Fig. S5 Effect of sodium chloride (NaCl) on the root hydraulic conductivity (L_{pR-h}) of Col-0 and of a collection of 16 Casparian strips (CS) and suberin mutants.

Fig. S6 Kinetics of rosette development transpiration rates in Col-0 and in a selection of Casparian strips (CS) and suberin mutants grown under environmentally controlled conditions for 5 wk.







Table S1 Table summarizing the different mutants analyzed in the present study.

Table S2 Ionic comparisons of the shoots of Casparian strips (CS) and suberin deficient mutants.

Please note: Wiley Blackwell are not responsible for the content or functionality of any Supporting Information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the *New Phytologist* Central Office.



Phenotyping and modeling of root hydraulic architecture reveal critical determinants of axial water transport

Yann Boursiac ^{1,§}, Christophe Pradal ^{2,3,4,§}, Fabrice Bauget,^{1,#} Mikaël Lucas ^{1,t,#},
Stathis Delivorias ¹, Christophe Godin ^{3,†} and Christophe Maurel ^{1,*}

- 1 Institute for Plant Sciences of Montpellier (IPSiM), Univ Montpellier, CNRS, INRAE, Institut Agro, Montpellier 34060, France
- 2 CIRAD, UMR AGAP Institut, Montpellier 34398, France
- 3 Inria Project-team Virtual Plants, UMR AGAP, Univ Montpellier, INRIA, CIRAD, INRAE, Montpellier 34398, France
- 4 Inria and LIRMM, Univ Montpellier, CNRS, Montpellier 34095, France

*Author for correspondence: christophe.maurel@cnrs.fr

[†]Present address: UMR DIADE, Univ Montpellier, IRD, Montpellier, France.

[‡]Present address: Laboratoire Reproduction et Développement des Plantes, Univ Lyon, ENS de Lyon, UCB Lyon 1, CNRS, INRAE, Inria, Lyon, France.

[§]Y.B. and C.P. contributed equally as first authors.

[#]F.B., and M.L. contributed equally but not as first authors.

Y.B. contributed to model coding, developed the cut-and-flow and root intercept approaches, and contributed to phenotyping characterizations. C.P. supervised the coding of the HydroRoot model and contributed to data analyses. F.B. finalized model coding, performed sensitivity analyses, and contributed to cut-and-flow analyses. M.L. developed the first HydroRoot model version and performed root anatomy analyses. S.D. performed the analysis of root intercept numbers. C.M. and C.G. designed the study which was regularly discussed with Y.B. and C.P. C.M. wrote the article with contributions of all the authors.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (<https://academic.oup.com/plphys/pages/General-Instructions>) is: Christophe Maurel (christophe.maurel@cnrs.fr).

Abstract

Water uptake by roots is a key adaptation of plants to aerial life. Water uptake depends on root system architecture (RSA) and tissue hydraulic properties that, together, shape the root hydraulic architecture. This work investigates how the interplay between conductivities along radial (e.g. aquaporins) and axial (e.g. xylem vessels) pathways determines the water transport properties of highly branched RSAs as found in adult *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) plants. A hydraulic model named HydroRoot was developed, based on multi-scale tree graph representations of RSAs. Root water flow was measured by the pressure chamber technique after successive cuts of a same root system from the tip toward the base. HydroRoot model inversion in corresponding RSAs allowed us to concomitantly determine radial and axial conductivities, providing evidence that the latter is often overestimated by classical evaluation based on the Hagen–Poiseuille law. Organizing principles of *Arabidopsis* primary and lateral root growth and branching were determined and used to apply the HydroRoot model to an extended set of simulated RSAs. Sensitivity analyses revealed that water transport can be co-limited by radial and axial conductances throughout the whole RSA. The number of roots that can be sectioned (intercepted) at a given distance from the base was defined as an accessible and informative indicator of RSA. The overall set of experimental and theoretical procedures was applied to plants mutated in *ESKIMO1* and previously shown to have xylem collapse. This approach will be instrumental to dissect the root water transport phenotype of plants with intricate alterations in root growth or transport functions.

Introduction

Water uptake by roots represents a key adaptation of plants to aerial life. Taking place at the plant–soil interface, this process is highly dependent on the root system architecture (RSA). Most root systems are highly complex, branched structures with, for instance, thousands of ramifications and a cumulated length of several hundreds of meters for a single maize (*Zea mays*) plant. These systems are also highly dynamic. In particular, water availability interferes with the orientation and rate of primary root growth and the frequency and symmetry of root branching thereby promoting water resource foraging (Klein et al., 2020; Maurel and Nacry, 2020). The ability of root systems to reach deep soil layers at reduced cost was proposed to be a key trait for acclimation to water-deprived environments (Lynch, 2013). Yet, a comprehensive view of how elementary water transport processes occur in root tissues and integrate within the RSA, thereby shaping the root hydraulic architecture, is needed to fully comprehend the water uptake capacity of plants.

Water uptake and its subsequent transport within the plant are determined by the gradient of water potentials throughout the soil–plant–atmosphere–continuum (Steudle, 2001; Draye et al., 2010). Following radial transport across peripheral cell layers (epidermis, cortex, and endodermis), soil water reaches the stele and xylem vessels where it is transported axially to the plant aerial parts. These radial and axial processes, that are often presented sequentially, actually operate simultaneously and throughout the whole RSA. In most physiological studies of root water transport, axial conductance was inferred from xylem vessel size using the Hagen–Poiseuille law (Steudle and Peterson, 1998; Lefebvre et al., 2011; Klein et al., 2020). Because it is the site for formation of xylem vessels, the root tip was identified as the main resistive place for axial water transport whereas axial limitation was supposedly negligible in older root segments due to the presence of large metaxylem vessels (Steudle and Peterson, 1998). In contrast, radial transport which is often represented as a combination of cell-to-cell and cell wall (apoplastic) paths running in parallel, was proposed to explain fundamental hydraulic properties of the whole root (Steudle and Peterson, 1998; Barrowclough et al., 2000; Knipfer and Fricke, 2011).

Several types of numerical hydraulic models have been developed to address the complexity of root water uptake, and radial transport in particular. Whereas early models integrated concentric hydraulic resistances within a root radial section (Steudle and Jeschke, 1983; Jones et al., 1988; Bramley et al., 2009), modeling was recently applied to a more precise, cell-based view of the root radial anatomy (Couvreur et al., 2018; Heymans et al., 2021). Biophysical models have also addressed water transport at whole root level. With respect to models that describe the functioning of root segments (Frensch and Steudle, 1989; Zwieniecki et al., 2003; Zarebanadkhouki et al., 2014) or use a simplified representation of root system hydraulics (Knipfer and Fricke,

2011), Doussan et al. integrated an explicit description of RSA with hydraulics. To be linked to soil water transfer, hydraulic functioning of the root had, however, to be reduced to simplified radial and axial processes (Doussan et al., 1998a, 1998b). Since then, there have been several attempts to refine the hydraulic functioning of elementary root segments at the whole root level (Zwieniecki et al., 2003; Draye et al., 2010; Javaux et al., 2013; Foster and Miklavcic, 2016; Bouda et al., 2018). More recently, Meunier et al. (2017b, 2017c) developed a hybrid analytical–numerical model of root water uptake with increased computational efficiency.

Despite these efforts, the respective limitations of axial and radial conductances and their precise contribution to whole root hydraulics remain key and as yet unresolved issues. Based on a porous pipe representation of unitary roots, Zwieniecki et al. (2003) showed that axial hydraulic limitation can lead to saturation of root conductance meaning that long roots do not provide any additional advantage in terms of overall flux intensity (Zwieniecki et al., 2003; Meunier et al., 2017a, 2018). This view was recently extended to entire root networks which, however, remained theoretical in nature (Bouda et al., 2018). While these modeling approaches point to key hydraulic properties of root systems, most of them were assessed with scarce or heterogeneous experimental data.

With respect to native, soil-imbedded root systems, roots excised from hydroponically grown plants are more easily amenable to accurate hydraulic measurements. In *Arabidopsis thaliana* in particular, the pressure chamber technique has proved efficient for addressing fundamental root hydraulics properties in various genotypes or environmental conditions (Postaire et al., 2010; Sutka et al., 2011; Di Pietro et al., 2013). More specifically, this technique provides access to the whole root system hydraulic conductivity (L_p) and allows to take into account the contribution of fragile lateral roots.

Here, we used pressure chamber measurements coupled with a modeling approach to investigate how the interplay between radial and axial conductivities determines the water transport properties of complex and realistic RSAs. By combining experimental and computational modeling procedures, this work shows how radial and axial conductivities can be concomitantly determined and reveals contexts in which axial conductance can be limiting. The overall approach can also help dissect the root water transport phenotype of plants with complex alterations in root growth or transport functions.

Results

Mapping hydraulic properties on realistic models of RSAs

We first explored a set of 10 3-week-old, hydroponically grown Columbia-0 (Col-0) plants for which root water transport capacity was measured by the pressure chamber technique and RSA was captured by image analysis

(Figure 1A). The root systems of these plants exhibit a substantial complexity with total length up to 2.1 m, and up to 354 root extremities corresponding to a primary root carrying two orders of lateral roots (Table 1). We described quantitatively the individual RSAs by constructing dynamical multi-scale tree graphs (MTGs) (Godin and Caraglio, 1998). The graph nodes represented plant segments of $100\ \mu\text{m}$ (equivalent to the range of a cell length) and contained information on the position of the different branching points (Godin et al.,

1999; Danjon and Reubens, 2008; Lobet et al., 2015; Figure 1B). Microscopic observations indicated that diameters of the primary and lateral roots were fairly homogeneous within each branching order but were reduced by 30%–40% between successive orders, varying from $188 \pm 22\ \mu\text{m}$ ($\pm\text{SD}$; $n = 64$) in the primary root to as low as $69\ \mu\text{m}$ in second order lateral roots. Thus, external root surfaces were calculated in the MTGs, assuming that root diameter was constant for a given root order, with a 30% decrease between successive root orders.

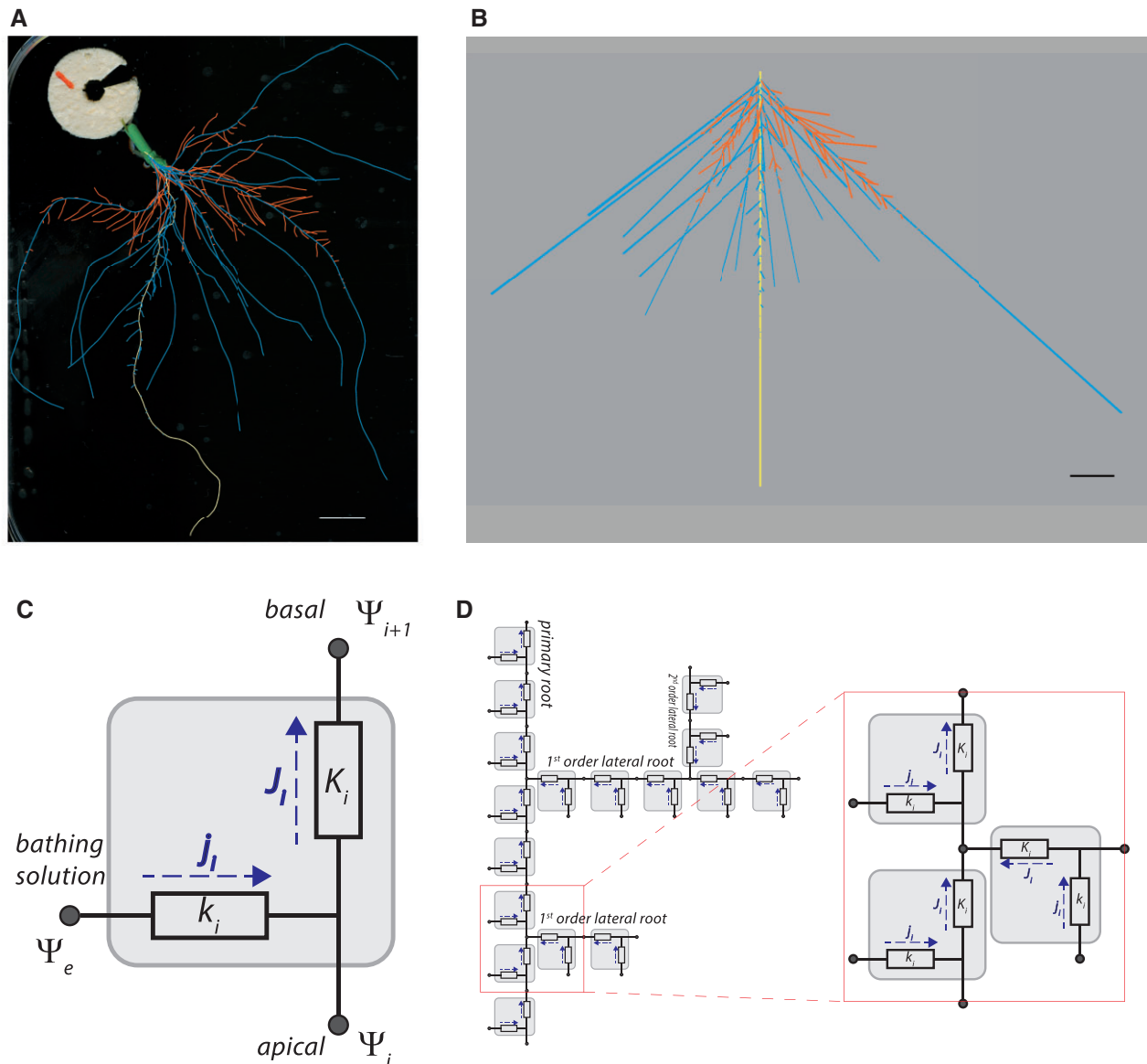


Figure 1 Modeling water transport in real RSAs. A, Representative RSA of a 21-day-old Arabidopsis plant grown in hydroponics. The excised root system was spread out in a petri dish and scanned. For clarity, the primary root, the first order, and second-order lateral roots are shown in yellow, light blue, and red, respectively. Scale bar: 10 mm. B, Bi-dimensional representation of the same digitized RSA. Note that the emergence angle of root segments is arbitrarily set. Same color conventions as in (A). Scale bar: 10 mm. C, Schematic representation of an elementary root segment of rank i consisting of a derivative microcircuit containing both radial (k_i) and axial (K_i) hydraulic conductances. Each segment is connected with the root bathing solution (exterior, at Ψ_e water potential) and basal and apical neighboring segments (at Ψ_i and Ψ_{i+1} water potentials, respectively, except for the last segments). Combination of k_i and $\Psi_e - \Psi_i$, or K_i and $\Psi_i - \Psi_{i+1}$ yield segment water uptake (j_i) and overall flow through the segment (J_i), respectively. D, Elementary root segments are inserted into a dynamical MTG builder of RSA to yield the HydroRoot model. The inset shows the specific case of a root ramification.

Table 1 Measured architectural parameters and calculated elementary hydraulic radial conductance (k) of individual root systems

Plant number	Total length (m)	Surface area (10^{-4} m ²)	Calculated k (10^{-8} m s ⁻¹ MPa ⁻¹)
#1	1.63	4.63	3.39
#2	1.88	5.18	7.08
#3	1.60	4.48	8.70
#4	0.71	2.20	5.59
#5	1.88	5.10	13.12
#6	1.12	3.36	8.30
#7	2.13	6.03	19.22
#8	2.11	6.05	22.13
#9	0.76	2.49	12.76
#10	0.78	2.59	4.03

Water flow was measured using the pressure chamber technique in excised root systems from the indicated individual plants (two biological replicates). RSAs were then exhaustively analyzed. The table summarizes integrated parameters from these measurements and the k values calculated using HydroRoot to match the measured water flows. The axial conductance was calibrated according to Hagen–Poiseuille law, and the same lowess fit profile, as shown in Supplemental Figure S1, was used for all RSAs.

Based on these detailed RSA representations, we developed a hydraulic model to simulate water fluxes in the corresponding segment network. In this model, called HydroRoot (<https://github.com/openalea/hydroroot>), each elementary root segment is associated with a derivative microcircuit containing both radial (k) and axial (K) hydraulic conductances. While the former (k) accounts for all pathways mediating radial water flow, the latter (K) represents the conductances of the segment xylem vessels (Figure 1C). Accordingly, each elementary root segment is connected with the root bathing solution, and with basal and apical neighboring segments (Figure 1C). Overall, an individual root is represented as a series of elementary units while root branching is considered as a derivation in the global circuit (Figure 1D). Moreover, root tips are considered as terminal segments, with an elementary radial flow that feeds into the axial flow of the neighboring segment. In addition, endogenous osmotic driving forces were not taken into account since spontaneous exudation was close to 0 in our conditions (Boursiac et al., 2005). Thus, the boundary variables of the hydraulic model are either imposed experimentally [homogeneous water potential (hydrostatic pressure) in the bathing solution; root base at equilibrium with atmospheric pressure] or are measured (outgoing water flow: $J_v(P)$). Based on these principles, HydroRoot can be run through a two-pass algorithm throughout the RSA, as previously described on aerial branching structures (Prusinkiewicz et al., 2007): equivalent conductances of the different branches are first computed in a backward pass (from root tips to base), followed by a forward pass (from root base to tips) computing the water potentials at each point of the root system. Due to the lack of capacitive components, water fluxes entering each elementary unit through radial or axial transport are equilibrated by the out-going axial flux toward the root base. The set of model parameters is recapitulated in Supplemental Table S1.

Parameterization of axial conductance (K) for deduction of root radial conductivity (k)

To parameterize axial conductances, xylem vessel number and size were sampled along the axis of primary, first and second-order lateral roots of five independently grown Col-0 plants. Supplemental Figure S1A shows typical xylem differentiation patterns from root tip to base. Xylem conductance was computed according to Hagen–Poiseuille law applied to the general case of elliptic conduits and implemented according to vessel number and size in each elementary unit, thereby providing a conductance profile along the root axis (Supplemental Figure S1B). Because it is linked to the fourth power of vessel radius, K shows a dramatic increase (>600-fold) from root tip to base. We found no clear distinction between K profiles, in terms of shape and magnitude, among different root orders and plants. Thus, a unique K profile derived from experimental data by locally weighted scatterplot smoothing (lowess) was applied along all root axes (Supplemental Figure S1B).

The direct determination of k is, at present, experimentally not achievable in species with highly branched and tiny roots such as Arabidopsis, as it would require to measure radial flows in root segments between consecutive branching points (~2 mm in the present case) (Meunier et al., 2018). We therefore estimated radial conductance values by inverse modeling, using the RSA and outgoing water flow [$J_v(P)$] data determined in the 10 plants described above. Considering that k is constant from the root base to tips, its value was determined in individual plants, as presented in Table 1, and ranged from 3.4 to 22.1 10^{-8} m s⁻¹ MPa⁻¹, with an average of 10.4 ± 2.0 10^{-8} m s⁻¹ MPa⁻¹ (\pm SE).

Concomitant determination of axial and radial conductances by model inversion

Although based on well-established physical principles, the calculation of K presented above overlooks the finite length of xylem vessels and neglects possible hydraulic limitations occurring during water passage between adjacent vessels or at root branching sites (Shane et al., 2000). Previous authors have also found discrepancies between calculated and measured axial conductance (Frensch and Steudle, 1989; Tixier et al., 2013; Bouda et al., 2018). Here, we refined our approach to simultaneously determine axial and radial conductances by model inversion in individual and real RSAs. For this, we characterized root systems that were sequentially sectioned at a given distance from their bases. The overall procedure is illustrated in Supplemental Figure S2A. Figure 2, A and B, illustrates a series of pressure chamber measurements obtained after successive cuts of a same root system from the tip toward the base. The successive cuts create direct hydraulic connections between the cell bath and xylem lumen, and thereby $J_v(P)$ increases although overall root surface area progressively decreases (Supplemental Figure S2C and Figure 2, A and B). For reference, control intact roots systems that underwent the same successive

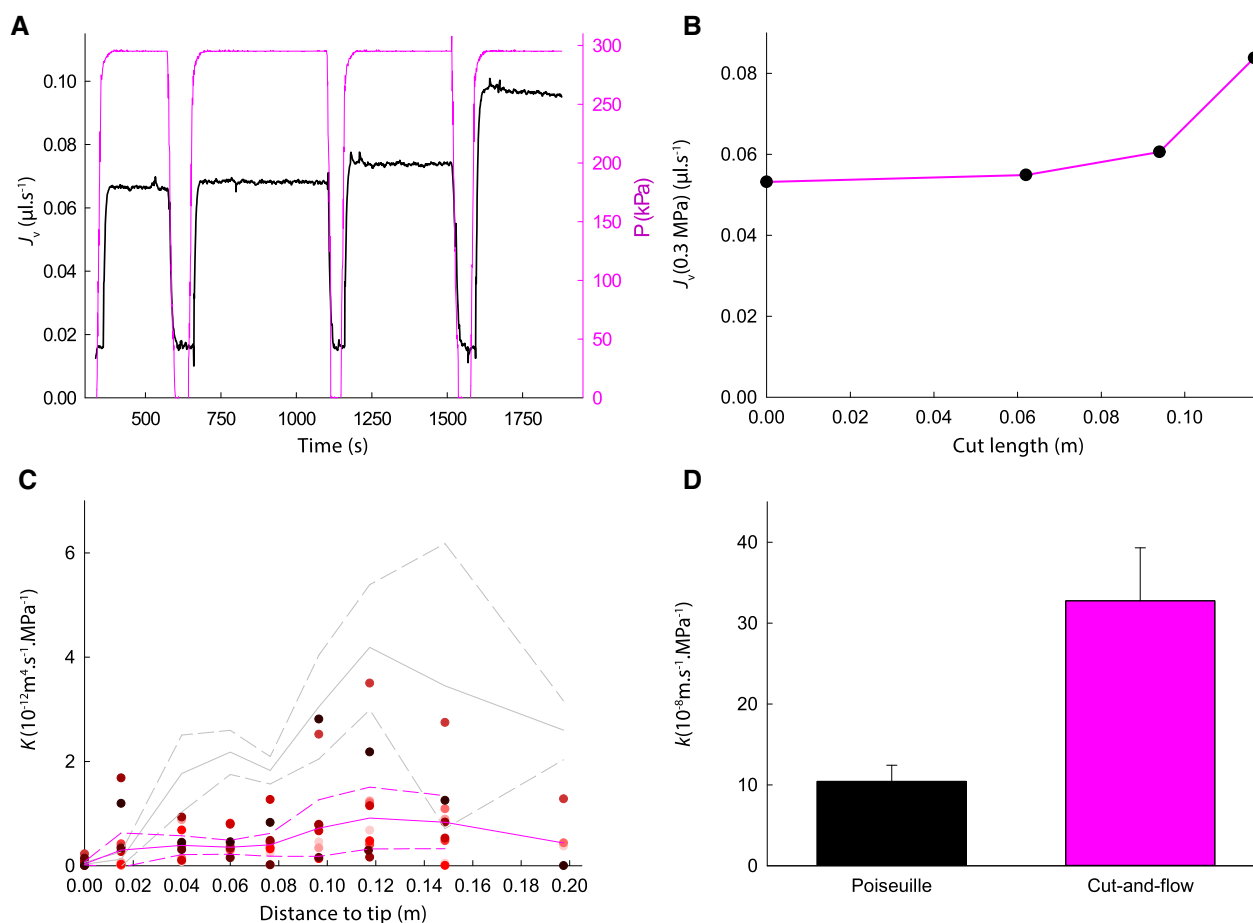


Figure 2 Determination of axial and radial conductances using cut-and-flow experiments. A, Kinetic measurement of pressure-induced sap flow (J_v) during a representative cut-and-flow experiment. J_v (black trace) was measured at constant pressure (magenta trace; $P = 0.3$ MPa). The intermittent drops in pressure (P) correspond to the maneuvers for opening the chamber and partial ablation of the root system. B, Corresponding plot of J_v as a function of the root length that was cut from the primary root tip. C, Profile of axial conductance (K) along the root axis as determined after parameter adjustment in cut-and-flow experiments. Data from 10 individual Col-0 plants, each being identified by a specific color. The figure shows (in magenta) the median K curve (solid line) and the 95% confidence interval (dashed lines). For reference, the lowest K profile and corresponding 95% confidence interval, as determined using Hagen–Poiseuille law (see Supplemental Figure S1B), are drawn in gray solid and dotted lines, respectively. D, Mean values of radial conductance ($k \pm \text{SE}$, $n = 10$) as determined by model inversion, using Hagen–Poiseuille law or cut-and-flow experiments for evaluation of K . The two values are statistically different (Student t test; $P < 0.01$).

pressurization cycles showed a constant $J_v(P)$ (Supplemental Figure S2B). Unlike previous analyses performed on elementary root segments (Frensch and Steudle, 1989; Meunier et al., 2018), the present experimental procedure results in a complex mix of sections of various root orders, made at the same distance from the root base, but at varying distances from their respective tip (Supplemental Figure S2). Thus, we used a parameter adjustment procedure on HydroRoot running with digitized architectures, either intact or with the indicated sections, to infer k (set constant over the overall RSA) and K (as a piecewise linear function of the distance to tip, see “Materials and methods”). The robustness of the multi-parameter adjustment procedure for K , almost independent of the first guess parameter values, is displayed in Supplemental Figure S3. When applied to 10 individual RSAs, this so-called cut-and-flow approach confirmed the variability in K profile previously observed between plants (Figure 2C). Most importantly, it pointed to adjusted

K values that were markedly lower than those calculated using Hagen–Poiseuille law, by a factor of 4–6. In relation to these new K estimates, k values inferred from the cut-and-flow approach were higher (mean value \pm SE: $32.8 \pm 6.5 \cdot 10^{-8} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{MPa}^{-1}$) than when using the first inversion method described above (Figure 2D).

Since a constant radial conductivity (k) represents a strong assumption of our model, we also investigated roots in which k was set constant in root tips but, due to suberization, dropped to a three times lower plateau value in the differentiated zone (Doussan et al., 1998b; Ranathunge and Schreiber, 2011; Heymans et al., 2021). Using such k profile and cut-and-flow data from the same 10 plants as above, we obtained a slightly but nonsignificantly reduced average plateau value of k (Supplemental Figure S4A). Moreover, this nonuniform k profile did not significantly modify the variation of K along the root axis (Supplemental Figure S4B). We interpret this to mean that the increase in $J_v(P)$

observed upon successive cuts of the RSA, and opening of vessels, is much more powerful to capture spatial variations of axial conductance (K) than k .

A general model of Arabidopsis RSA

In order to explore the combined impacts of k , K , and RSA on root water transport, we went on to apply the HydroRoot model to an extended, yet realistic, set of simulated RSAs. Our first step was therefore to develop a general model of Arabidopsis RSA.

To do this, we first explored the organizing principles of Col-0 RSA by observing primary and first and second order lateral roots in a set of 13 individual plants. When looking at the distribution of root branching, we observed that this process was always initiated between 8 and 40 mm from the root tip, and then developed at a relatively stable rate, which was similar between the primary root and the lateral roots (Figure 3A). Thus, the cumulated number of lateral

roots that have emerged at a given distance of any root tip can be described by a linear relationship defined by a nude tip length and a slope determined by the average internode length.

Next, we investigated the length of lateral roots with respect to their position along the parental axis. The scattered data indicated a progressive but stochastic growth of laterals on the bearing axis (Figure 3B). Yet, first-order lateral roots showed a more pronounced growth than second-order lateral roots at a same distance of their respective parental root tip. We, therefore, established distinct length laws for the two orders of lateral roots.

These observations allowed us to deduce the parameters of a root model that can be used to generate RSAs. Using realistic ranges of nude tip length (between 5 and 35 mm) and average internode length (1–2.75 mm), we modeled the stochastic process of lateral root branching by a first-order Markov chain on growing root axes

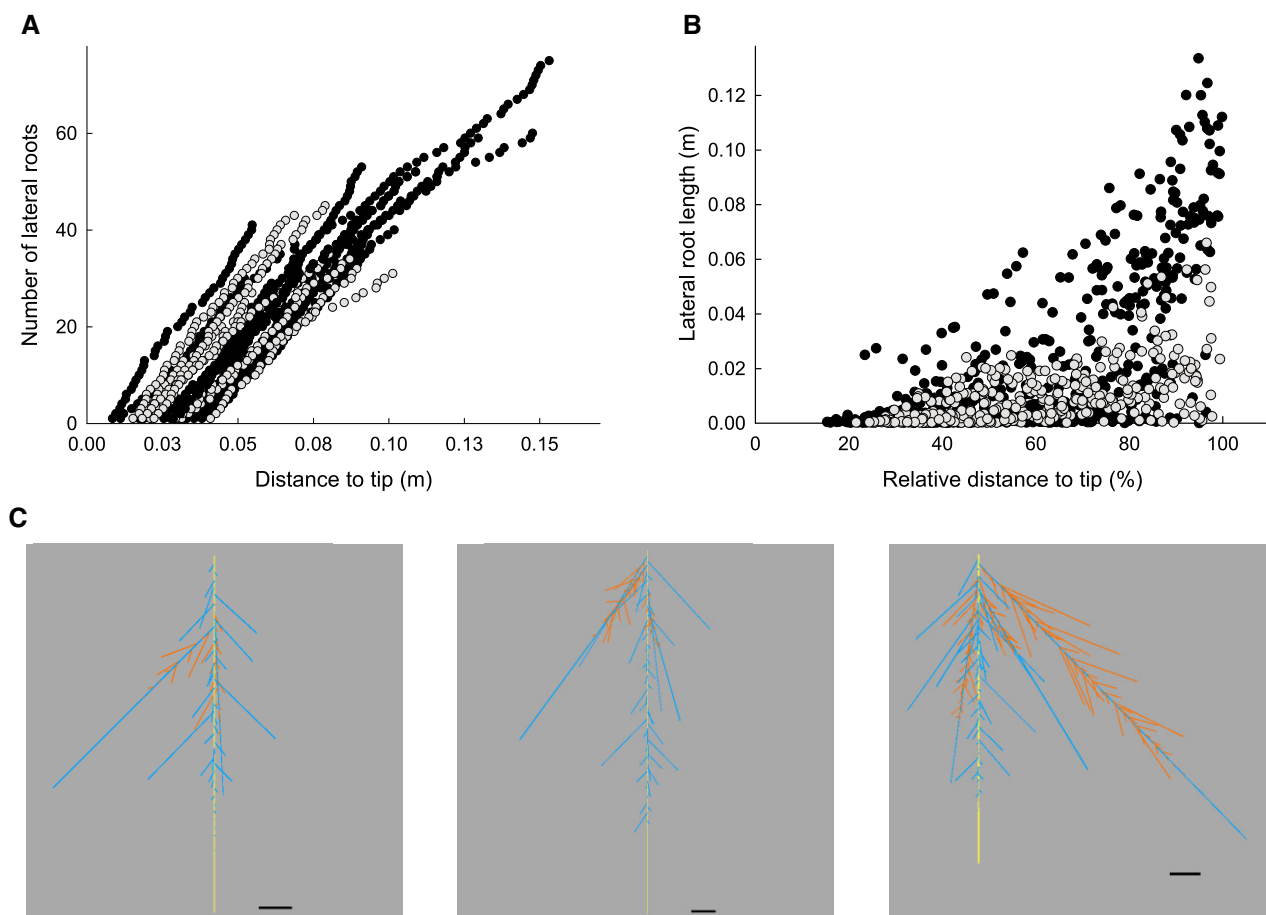


Figure 3 Organizing principles of Col-0 RSA. A, Profile of lateral formation along the parental root axis. The dots show the cumulated number of lateral roots formed at the indicated distance from the root tip, in individual primary (black) and first order lateral (gray) roots. B, Length of lateral root as a function of distance to tip of parental root. We observed that the absolute lengths of first order lateral roots (i.e. carried by the primary root) were very similar between plants of a same age, despite the variations in length shown by the primary root. Thus, plotting lateral root length as a function of the relative distance to the tip of the bearing axis provides a comprehensive description of lateral root length repartition. This representation was conserved in second order lateral roots, whose length was referred to the longest first-order lateral. (A) and (B) show cumulated data from 13 individual primary roots (black) and 9 first-order lateral roots (gray). C, Representative examples of simulated RSAs in (from left to right) the 25 percentile, median, and 75 percentile of total root length. Same color code for the primary root, the first order, and second order lateral roots as in Figure 1.

(Lucas et al., 2008). In addition, the length of simulated lateral roots was determined by fitting lateral root length along parental root axes (Figure 3B). Root diameters were set for each root order as indicated above. Setting the primary root length between 4 and 20 cm, we generated 9,520 RSAs that spanned the whole range of input parameters. Figure 3C illustrates the diversity of RSAs that can be generated using this pipeline.

Capturing features of RSAs using patterns of intercepted roots

In line with the cut-and-flow approach, we noted that phenotyping real RSAs by counting the number of roots that can be sectioned (intercepted) at six distances from their base (e.g. 80, 60, 45, 30, 20, 10 mm) was at least five times as fast as a full RSA reconstruction. The latter needs determining the nude tip length, position, and length of all lateral roots. By comparison, the number of intercepted roots at a few given distances from the base seems to be a more accessible yet informative indicator of RSA. Figure 4A illustrates intercept number curves derived from discrete cuts in real RSAs or from digitized Col-0 RSAs. These curves are overlapping with analogous intercept number curves, but derived from simulated RSAs.

Analysis of the full data set showed that cumulated intercepts were significantly correlated to architectural parameters of the root, such as the total root length (Supplemental Figure S5A). Another feature of these curves is that they cumulate intercept distributions of first and second-order lateral roots thereby capturing a key aspect of root branching (Figure 4B).

Finally, we wondered about the capacity of a determined intercept number profile to distinguish between markedly different RSAs. Supplemental Figure S5B shows a set of simulated RSAs that share intercept number profiles similar to those of reference real RSAs. The simulated RSAs were indeed very close, although with some variation, in their total root length (Figure 4C). The overall data establish that intercept number profiles allow to capture some fundamental features of RSAs.

Sensitivity analysis of root water transport to architecture and hydraulic parameters

Next, we applied the HydroRoot model to calculate the sap flow at a driving pressure of 0.3 MPa [$J_v(0.3 \text{ MPa})$] in our collection of simulated RSAs using three distinct, yet realistic hydraulic configurations. For this, we selected three contrasting but uniform k values, all derived from cut-and-flow experiments, and applied a varying multiplying factor (ax) to the median axial conductivity (K) profile determined in the same approach (see Figure 2C). Thus, in addition to an intermediate hydraulic configuration (mean k value: $32.8 \cdot 10^{-8} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$; $ax = 1$), we defined a low hydraulic (minimal k : $9.9 \cdot 10^{-8} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$; $ax = 0.5$) and a high hydraulic (maximal k : $71.4 \cdot 10^{-8} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$; $ax = 2$) setting. The three sets of simulations derived from

these settings show a large range of $J_v(0.3 \text{ MPa})$ values for RSAs of varying size (surface) and encompass the 20 experimentally determined $J_v(0.3 \text{ MPa})$ values (Figure 5A).

The whole set of simulated RSA was used to explore the overall sensitivity of root water flow to elementary input architectural parameters. A dependency of $J_v(0.3 \text{ MPa})$ on primary root length (Figure 5B) and average internode length (Figure 5C) can be observed whereas nude tip length (Figure 5D) had no impact on simulated flow. In the latter case, this means that the presence or absence of relatively short lateral roots close to the tip has a negligible impact on $J_v(0.3 \text{ MPa})$. Finally, when the intermediate hydraulic setting was used, the variation range of all input architectural parameters was responsible for a variation of $J_v(0.3 \text{ MPa})$ by about one order of magnitude.

$J_v(0.3 \text{ MPa})$ was also dependent on variations in hydraulic parameters (Figure 6). Using the set of 9,520 simulated RSAs described above, we observed a positive and slightly saturating relationship between $J_v(0.3 \text{ MPa})$ and k (Figure 6, A and B and Supplemental Figure S6A). A similar behavior was observed when varying ax values were applied to the whole axial conductivity (K) profile (Figure 6, A and C and Supplemental Figure S6B). These behaviors were not independent since sensitivity of $J_v(0.3 \text{ MPa})$ to k or ax was higher and the saturation plateau was more pronounced when reference ax or k parameters were set to lower values (Figure 6A and Supplemental Figure S6). Thus, $J_v(P)$ seems to be co-limited by the radial and axial conductivity in a large range of values.

The strong dependence of K on vessel diameter, as indicated by Hagen–Poiseuille law, is usually interpreted to mean that the small vessels present at root tips are by far the most limiting (Steudle and Peterson, 1998). To examine this point in detail, we inspected the spatial variation of sap flow when a constant reducing factor ($ax < 1$) was applied throughout the K profile. Supplemental Figure S7 illustrates this approach on a representative RSA. Figure 6D summarizes the results, showing the relative variation of primary root axial flow at the indicated distance from root tip, under varying ax values. Although flow sensitivity was the highest close to root tip, we observed, for moderate axial limitations ($0.5 < ax < 1$), a pronounced and somewhat comparable impact of ax variation on axial flow all along the root. Thus, limitation of axial conductivity appears to be distributed over the whole primary root length. Since converging flows in a highly branched architecture may create marked hydraulic constraints in basal root sections, we also considered the simpler case of a cylindrical root harboring the same K profile as above (dashed lines, Figure 6D). Although axial flow was less sensitive to axial limitation ($ax < 1$) than in highly branched roots, a flow limitation along the whole root axis was also observed. These results emphasize the functional relevance of profiles with increasing K along the whole root axis, as determined by the cut-and-flow approach (Figure 2C).

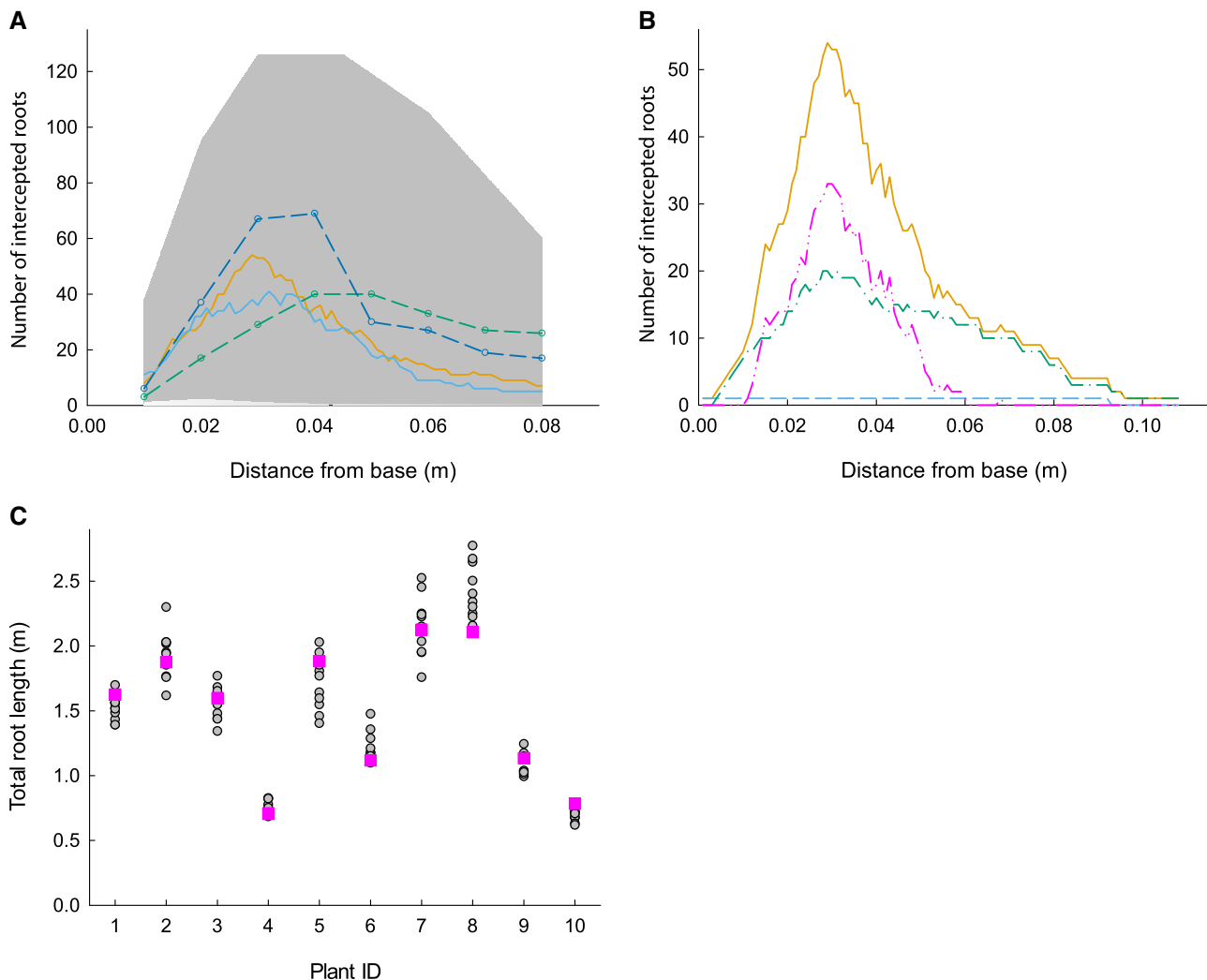


Figure 4 Intercept number profiles in real and simulated RSAs. A, Total number of intercepted roots at the indicated distance from the root base. Continuous lines correspond to experimental measurements of two real RSAs entirely digitized while dashed lines correspond to discrete measurements of two other real RSAs. The gray area delineates the whole set of intercept number curves derived from 9,520 simulated RSAs. Data are presented in a limited range of distances from tip (10–80 mm), to match the discrete experimental measurements. B, Profiles of first and second order intercepted lateral roots. Data from a RSA digitized from a real plant showing that the total intercept number curve (orange, continuous) can be decomposed into three curves representing the primary root (blue, dashed), and the first (green, dashed, one dot) and second (magenta, dashed two dots) order lateral roots. C, Relationship between total root length in 10 individual real plants (pink squares) and their close simulated RSAs (gray circles), screened by an absolute normalized difference in the intercepts at 10, 20, 30, 45, 60, and 80 mm from the tip. See example in [Supplemental Figure S3B](#).

We then investigated possible interactions between hydraulic and architectural parameters in determining root water transport capacity ([Supplemental Figure S8](#)). For comparison of different hydraulic settings, corresponding $J_v(0.3 \text{ MPa})$ flow values were centered using a normalizing factor. In such analyses, the relative response of $J_v(0.3 \text{ MPa})$ to architectural input parameters was very similar between high ($k = 71.4 \cdot 10^{-8} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$; $ax = 5$) and low ($k = 9.9 \cdot 10^{-8} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$; $ax = 0.01$) hydraulic settings ([Supplemental Figure S8](#)).

Finally, we investigated the preferential sites of water uptake predicted in a whole root placed in a pressure chamber. [Figure 6E](#) represents a heatmap of simulated radial inflow (j_r , [Figure 1C](#)) throughout a typical RSA. Under intermediate

hydraulic conditions ($k = 32.8 \cdot 10^{-8} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$; $ax = 1$), the highest radial flow is observed at the vicinity of the root base, in the primary root as well as the first-order lateral roots ([Figure 6E](#), middle). A similar pattern is observed after increasing two-fold the axial conductance ($ax = 2$; [Figure 6E](#), right). In contrast, water uptake by first-order lateral roots and downstream roots was strongly reduced under lower axial conductance ($ax = 0.125$; [Figure 6E](#), left). When a non-uniform k profile was used (k was the highest in root tips and dropped three times to a lower plateau value in the differentiated zone; see above), radial inflow was enhanced in root tips but the remaining spatial pattern was comparable to that with uniform k ([Supplemental Figure S4C](#)). Overall, these analyses illustrate how the axial conductance can

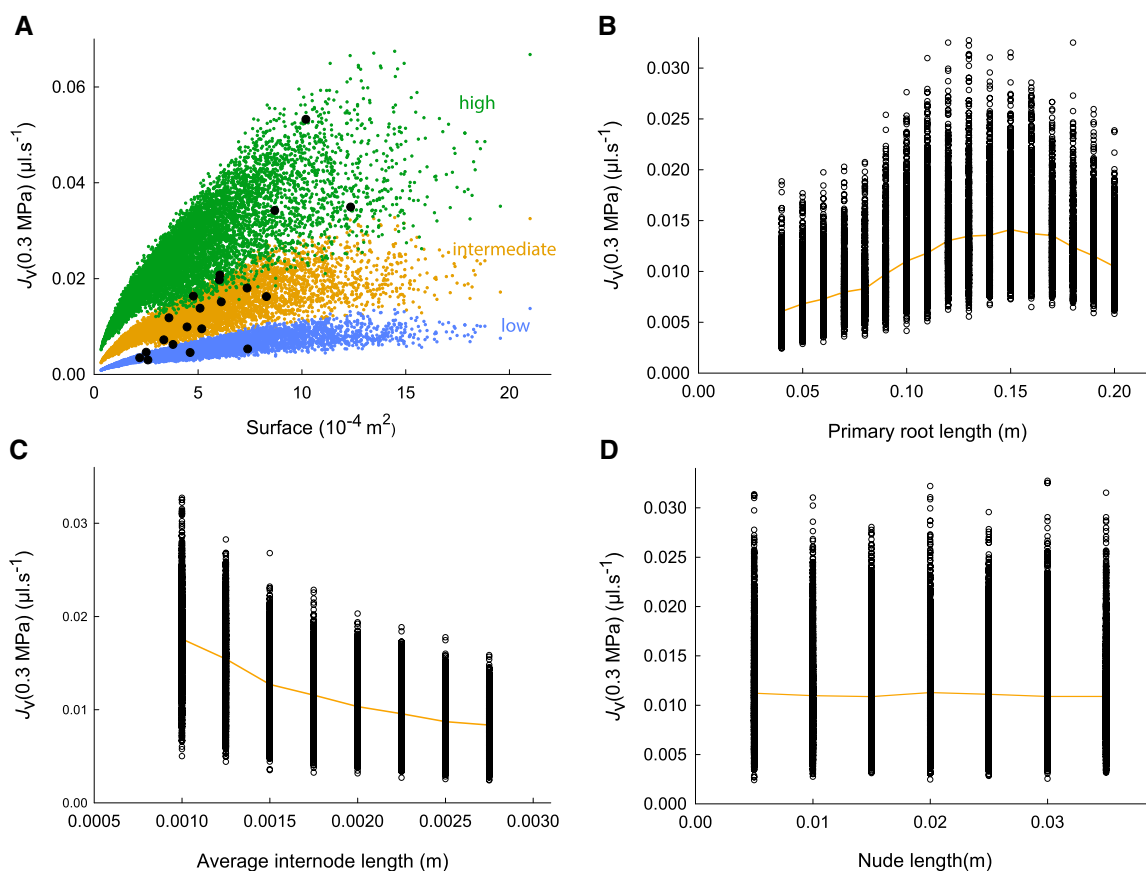


Figure 5 Sensitivity analysis of pressure-induced sap flow to RSA parameters. A, Root surface-to-flow relationship. The figure shows pressure-induced flow simulations ($J_v(0.3 \text{ MPa})$) for 9,520 RSAs harboring three distinct hydraulic configurations derived from cut-and-flow experiments (i) low (blue): minimal experimental k ($9.86 \cdot 10^{-8} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$) and all values of median K profile reduced two-fold ($\alpha = 0.5$) (ii) intermediate (brown), mean k value ($32.76 \cdot 10^{-8} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$) and median K profile (iii) high (green): maximal experimental k ($71.43 \cdot 10^{-8} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$) and all values of median K profile enhanced two-fold ($\alpha = 2$). $J_v(0.3 \text{ MPa})$ and root surface measured in 20 real RSAs (Table 1 and Figure 2D) are shown as black dots. B, Primary root length-to-flow relationship in 9,520 simulated RSAs harboring a mean k value ($32.76 \cdot 10^{-8} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$) and median K profile. The median response curve is shown as a solid orange line. C, Dependency of $J_v(0.3 \text{ MPa})$ on average internode length. Same procedures and conventions as in (B). D, Relationship between nude tip length and $J_v(0.3 \text{ MPa})$. Same procedures and conventions as in (B).

influence the whole root hydraulic architecture and determine the relative contribution of the root basal and distal parts to whole root water uptake.

Dissecting the root hydraulic architecture of *esk1* mutants

ESKIMO1 (ESK1) is a xylan-specific *O*-acetyltransferase (Yuan et al., 2013) which interferes with cellulose fibril organization and deposition of plant secondary cell walls. As a consequence, *esk1* mutants exhibit an irregular xylem (*irx*) syndrome (Lefebvre et al., 2011). Here, we decided to re-examine the hydraulic defects observed in these mutants (Lefebvre et al., 2011) with a comprehensive analysis of their root hydraulic architecture, based on the numerical approach developed above. Morphological inspection of real plants of two allelic mutants of *ESK1* (*esk1-1*, *esk1-5*) showed root growth alterations. While primary root growth was not different between genotypes, the intercept number profiles based on digitized RSAs of seven *esk1-1* plants and seven *esk1-5* plants highlighted, with respect to Col-0, a clear

reduction in root density in the 25–75 mm range from the base (Figure 7, A and B). This is attributable to a reduction in length of first-order laterals which translates into a deficit in second order laterals. Lefebvre et al. (2011) hypothesized from discrete anatomical cuts of the root that axial conductance might be reduced in *esk1*. We then used cut-and-flow experiments assisted by the HydroRoot model developed above to further characterize the hydraulic properties of *esk1* roots. The analyses indicated that the median K of *esk1-1* and *esk1-5* was markedly reduced compared to Col-0 by factors from 1.6 up to 19.1 along the primary root axis (Figure 7C). The cut-and-flow approach also allowed us to estimate k , which, by comparison to Col-0, appeared to be reduced by 55%–33% in *esk1-1* and *esk1-5*, respectively (Figure 7D) and by 40% ($P = 0.11$; Student's *t* test) in cumulated data from *esk1-1* and *esk1-5*. Thus, in complement of an earlier report (Lefebvre et al., 2011), our results suggest that the loss of *ESK1* function impacts not only xylem conductance, but also other determinants of root water transport capacity. More generally, this study shows how our

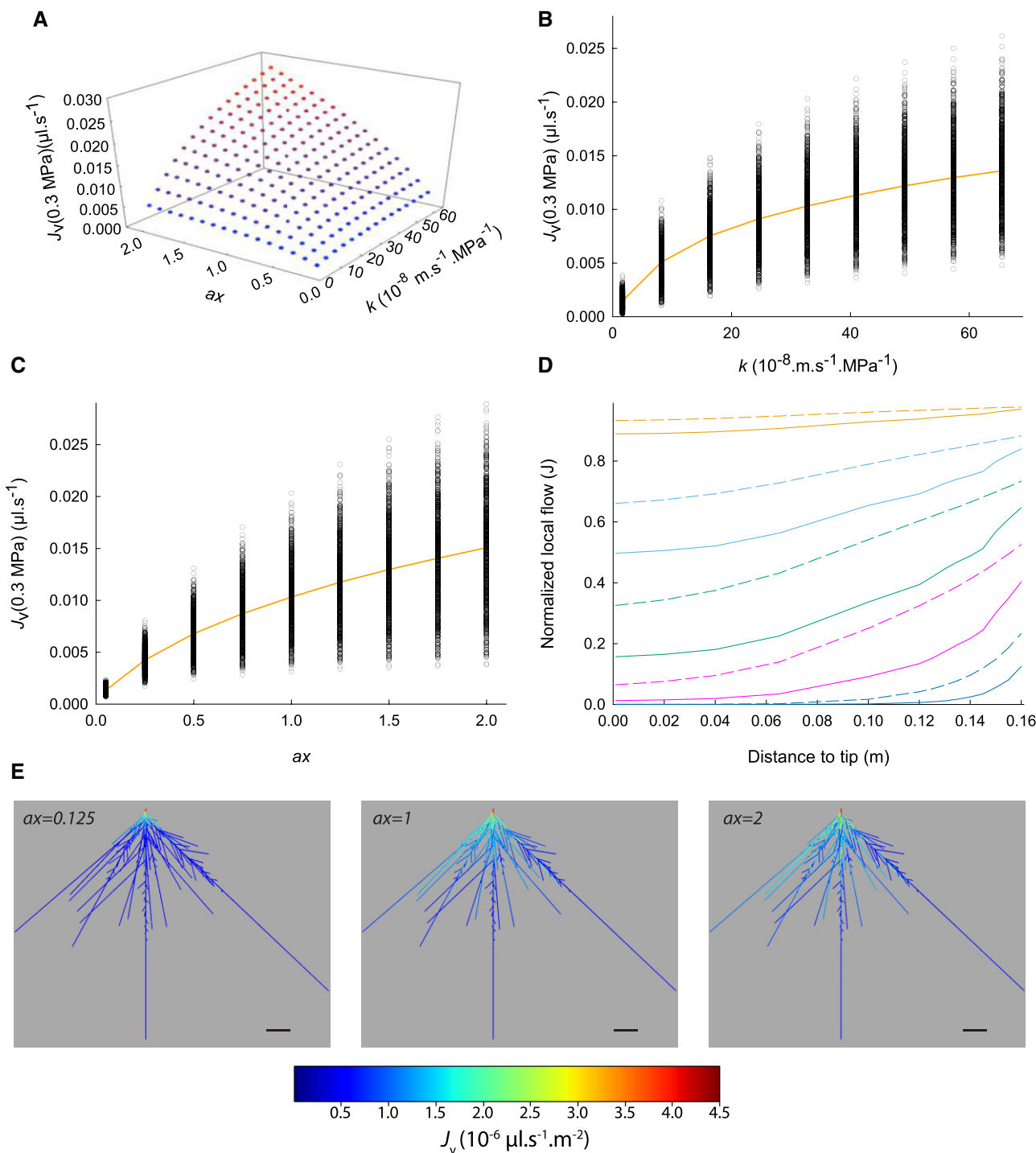


Figure 6 Sensitivity analysis of pressure-induced sap flow to hydraulic parameters. **A**, Dual dependency of $J_v(0.3 \text{ MPa})$ on radial (k) and axial conductance (K). The latter is expressed as a multiplying factor (ax) applied to the median K profile. The figure shows $J_v(0.3 \text{ MPa})$ variations in a representative RSA. **B**, Dependency of $J_v(0.3 \text{ MPa})$ on k in a set of 9,520 RSAs, with fixed K ($ax = 1$). The median response curve is shown as a solid orange line. **C**, Dependency of $J_v(0.3 \text{ MPa})$ on axial conductance (ax) in a same set of 9,520 RSAs, with fixed k ($32.76 \cdot 10^{-8} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{MPa}^{-1}$). **D**, Effects of varying axial conductance profiles (ax) on primary root axial flow (J) at the indicated distance from root tip. The figure shows simulations for the same RSA as in (A) (solid lines) or an unbranched (cylindric) root (dotted lines). Orange: $ax = 0.95$; light blue: $ax = 0.75$; green: $ax = 0.5$; magenta: $ax = 0.25$; blue: $ax = 0.05$. All flow values are normalized with respect to the local flow observed in the same root and same position at $ax = 1$. **E**, Heat map representation of local radial flows for three levels of axial conductance (ax).

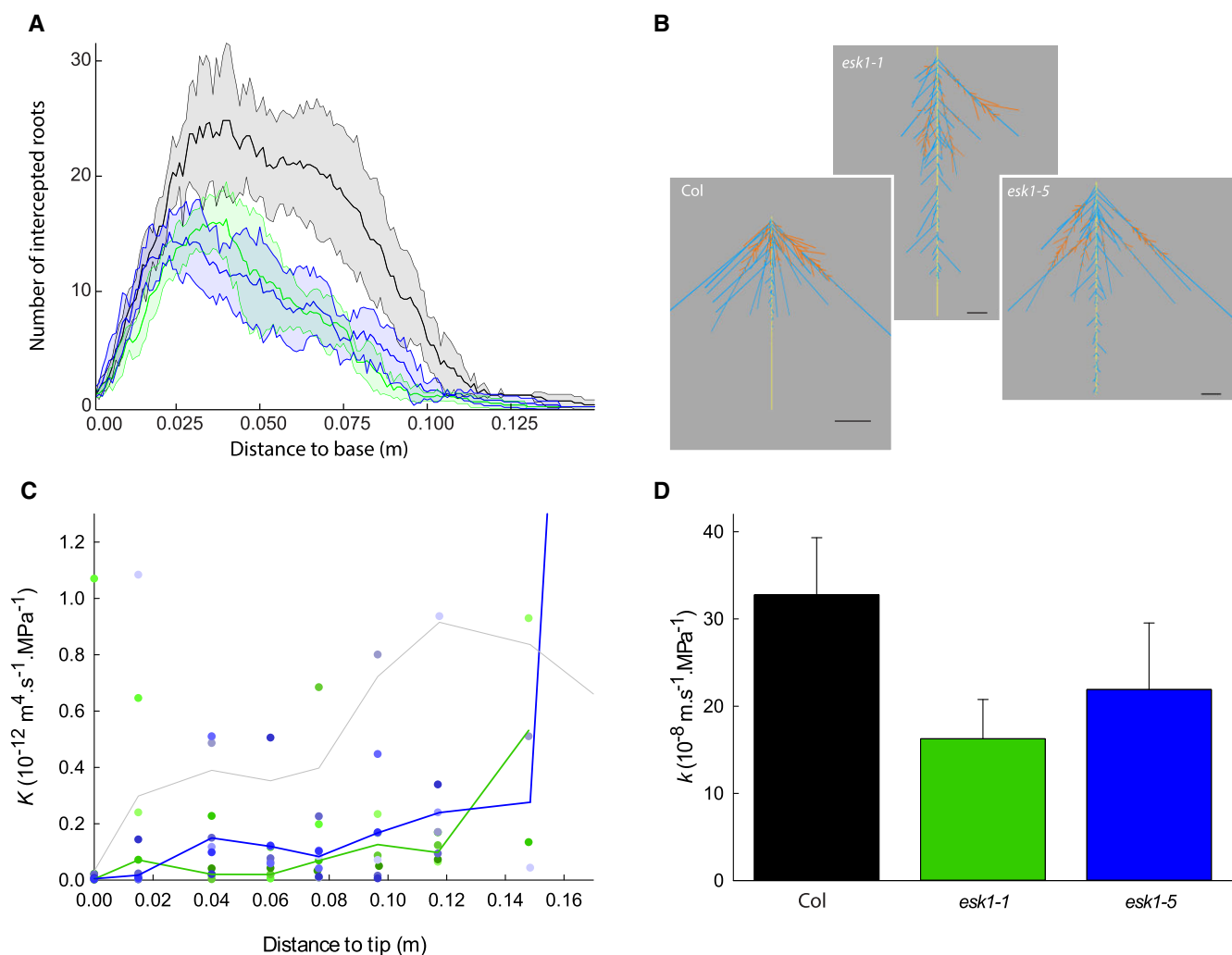


Figure 7 Root architecture and hydraulic phenotyping of *esk1* mutants. A, Total number of intercepted roots at the indicated distance from root base in Col-0 (black, $n = 6$), *esk1.1* (green, $n = 7$), and *esk1.5* (blue, $n = 7$). The figure shows, for each genotype, the mean curve and the envelope delineated by the 95% confidence interval for the number of intercepts at every mm. B, Representative RSAs of Col-0, *esk1.1* and *esk1.5* plants. The primary root, the first order and second order lateral roots are shown in blue, green, and red, respectively. C, Profile of axial conductance (K) along the root axis as determined from cut-and-flow experiments in *esk1.1* (green, $n = 5$) and *esk1.5* (blue, $n = 7$). The figure shows, for each genotype, measurements on individual plants and the corresponding median curve. The median curve of Col-0 (gray) is redrawn from Figure 2C. D, Corresponding radial conductivity values ($k \pm \text{SE}$) (Col-0: $n = 10$; *esk1-1*: $n = 5$; *esk1.5*: $n = 7$).

model assisted phenotyping allows to dissect the Arabidopsis root hydraulic architecture into three major components (RSA, radial, and axial conductivities), and analyze their interplay in various genotypes.

Discussion

Investigating Arabidopsis root hydraulic architecture

Over the last two decades, the Arabidopsis root has emerged as a model of choice to address molecular and physiological aspects of aquaporin regulation (Boursiac et al., 2008; Lee et al., 2012), and more recently, to dissect plant tissue hydraulics by means of quantitative genetics (Shahzad et al., 2016; Tang et al., 2018). Although produced in adult plants, the data were interpreted using a simplified

representation of the root as a single, continuous barrier between two homogeneous compartments: the soil solution and the xylem sap (Javot et al., 2003). Thus, the complexity and organizing principles of RSA in these plants, and their impacts on the root uptake capacity have not yet been addressed. By comparison, more elaborate root hydraulic models exist in other plant species such as maize and lupine (*Lupinus albus*) (Zarebanadkouki et al., 2016; Meunier et al., 2018), which are indeed more amenable than Arabidopsis to root water transport assays and anatomical dissection. With respect to these high-yielding crops, the wild species Arabidopsis exhibits moderate growth but comparable transpiration rates (Hosy et al., 2003; Yang et al., 2012; Macho-Rivero et al., 2017). Thus, it has been unclear whether its system of thin, highly branched roots is also hydraulically optimized for high water flows.

Here, we have investigated the organizing principles of Arabidopsis root hydraulic architecture, using interplay between experimental and computational modeling approaches. To ensure a maximal physiological meaning, experimental measurements and numerical simulations were performed at a water potential gradient (i.e. 0.3 MPa) consistent with water flows driven by transpiration under standard growth conditions. In addition, starting from a fine characterization of wild-type (Col-0) plants, our study was extended to possibly encompass a large panel of accessions and genotypes.

Our major concern was to understand the relative impact of elementary axial and radial hydraulic parameters on sap flow. Whereas confrontation of theoretical and experimental data through model sensitivity analysis remains the most common approach, there is a restricted number of studies whereby hydraulic parameters were deduced from inverse modeling and integration of architectural components (Doussan et al., 1998b, 2006; Zarebanadkouki et al., 2016; Meunier et al., 2018; Pascut et al., 2021;). While these earlier studies relied on functional analyses of individual axial roots of maize, lupine or Arabidopsis, we describe here a procedure based on cut-and-flow measurements for simultaneous determination of axial and radial conductance in highly branched root systems.

Assessing radial conductance

A direct experimental dissection of radial conductance components is, at present, not achievable. It would require an exact knowledge of the water potential across the root section and the experimental determination of elementary hydraulic conductivities corresponding to different transport pathways. Even though cell membrane permeability can be measured using cell pressure probe or protoplast swelling assays (Hüsken et al., 1978; Ramahaleo et al., 1999), all cell types are not amenable to these experimentations. Furthermore, the permeability of other components of radial water transport, such as the apoplast, has not been clearly determined yet (Buttersack and Basler, 1991). The present HydroRoot model proposes to synthesize the overall radial pathway through a single radial conductance (k) value. Here, we used an inverse modeling scheme similar to those developed in Arabidopsis and maize (Couvreur et al., 2018; Pascut et al., 2021) to determine k from RSA, $J_v(P)$, and K . In a simplified representation of Arabidopsis root anatomy, the outer tissues can be reduced to three concentric cylinders (cell layers) corresponding to the epidermis, cortex, and endodermis, with six cellular membranes in series. Cell pressure probe measurements in Col-0 cortical cells have given a cell membrane hydraulic conductivity of $1\text{--}4 \cdot 10^{-6} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ (Boursiac et al., 2008; Sutka et al., 2011). We note that the order of magnitude of k determined in this work by inverse modeling ($3 \cdot 10^{-7} \text{ m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$) fits with one-sixth of this range, in agreement with the idea that radial water transport in the Arabidopsis root is predominantly mediated through cell membranes (aquaporins) (Tournaire-Roux et al., 2003).

Another line of simplification of HydroRoot is that, in most of our simulations, k was set constant from the root tip to base. Besides its simplicity, this hypothesis is supported by several studies, including a hydraulic dissection of developing maize roots through segment analysis (Frensch et al., 1996) and a hydraulic model inversion approach (Meunier et al., 2018) in young lateral and seminal roots of maize and lateral roots of lupine. Yet, plant roots show a progressive development of endodermal and peridermal barriers (Ranathunge and Schreiber, 2011; Doblas et al., 2017; Campilho et al., 2020; Calvo-Polanco et al., 2021) and longitudinal variations in aquaporin gene expression (Gambetta et al., 2013). Measurements of water uptake profiles in lupine or maize roots have also suggested a steady decrease of k over root length (Doussan et al., 1998b; Zarebanadkouki et al., 2016). Here, we investigated a two-step radial conductivity profile with a constant value of $3k$ from tip to the appearance of full suberization and a value of k beyond. Our simulations indicate that this more realistic k representation does not impact the main conclusions on axial conductance (see below) drawn from HydroRoot running with uniform k values.

Assessing axial conductance

Most often, axial conductance is roughly evaluated using the Hagen–Poiseuille law and there are only a few instances where the axial conductance of roots was experimentally determined (Bramley et al., 2009; Frensch and Steudle, 1989; Meunier et al., 2018). The overall literature data indicate that the axial conductance can show a steep increase, from the root tip along the root axis, and most importantly varies between plant species, by up to five orders of magnitude (Meunier et al., 2018).

Here, we investigated the importance of axial conductance in the context of highly branched root systems. One first challenge was to develop a method for measuring K profiles throughout such complex root systems, where axial flow measurements in individual thin root axes are not feasible. However, microscopic observations suggested that K profile may be similar between root orders. This allowed us to reduce the problem to only one K profile. The cut-and-flow approach provided an efficient method, where the impact of multiple sections in roots of different orders was analyzed through a complex parameter optimization. We note that, because of its design, the cut-and-flow approach preferentially captures the features of axial transport and not radial transport. This is due to the fact that the progressive increase in sap flow observed upon successive cuts, which result in a progressive decrease in root surface, essentially reflects xylem vessel opening and suppression of resistance of corresponding root tips.

Surprisingly, the experimentally determined K profile indicated values that were up to 10 times lower than concomitant estimates using anatomical measurements together with Hagen–Poiseuille law. Frensch and Steudle (1989) and Sanderson et al. (1988) also found that the measured values were two to three times lower than the calculated ones, in

maize and barley (*Hordeum vulgare*) roots, respectively. Thus, it is likely that Hagen–Poiseuille estimates of single vessel conductance overlook the resistance due to connections between finite vessel elements, to possible vascular constrictions at the sites of root ramifications, or xylem surface properties (Sanderson et al., 1988; Shane et al., 2000). As elegantly modeled by Bouda et al. (2019), the failure of Hagen–Poiseuille estimates may also be due to the functioning of xylem as a network integrating resistive connections between functional vessels of distinct sizes.

Here, we further explored the importance of root axial conductance in a set of RSAs that were built, by extension, on well-defined parameters captured in real plants. Our analyses which extend the theoretical study of Bouda et al. (2018) show that highly branched root systems can show pronounced axial limitation for water transport. First, $J_v(P)$ showed a typical saturation in long root systems (with primary root length > 14 cm) (Figure 5B) which somewhat reflects the plateau shown by K along root length (Figure 2C). Increased root branching, while increasing the root surface to the same extent as root length, may not necessarily reveal an axial limitation in the first place (Figure 5C). However, spatially defined sensitivity analysis showed that hydraulic limitation due to xylem transport can occur along the whole root axis (Figure 6D). This may typically happen at the base of highly branched RSAs which convey converging flows from multiple root axes. Thus, although root tips truly represent particular sites for hydraulic limitation, our analyses show that the hydraulic load is somewhat spread over the whole root architecture. In other terms, the large metaxylem vessels present at root bases are not as oversized as initially claimed (Steudle and Peterson, 1998). A trade-off likely occurs on this trait as big vessels typically increase vulnerability of vascular tissues to cavitation (Tyree et al., 1994).

The conceptualization of water transport through sequential radial and axial water transport has somewhat led to independent estimates and functional analyses of the two processes. This approach may be misleading as this and a previous study show that water transport is actually co-limited by radial and axial conductances (Figure 6A; Zarebanadkouki et al., 2016). As a consequence, experimental determination of either one of these components strongly depends on the accuracy by which the other component is evaluated or truly measured. In physiological terms, our work indicates that real root systems can act on multiple cues to alter their water capacity. Interestingly, conductivity of the radial pathway can be adjusted over short or medium term through aquaporin regulation or root suberization whereas changes in RSA or vascular structures occur during much longer (days) adaptive responses of the root. Yet, these distinct traits have surely to be coordinately regulated, to ensure that root hydraulic architecture properly matches the plant's environmental conditions and developmental stages. Abscisic acid (ABA) was recently shown

to play such a coordinating role under water stress (Rosales et al., 2019).

Deciphering complex root phenotypes

Another major focus of our work was to work out the organizing principles of fully grown Arabidopsis root systems and dissect their branching properties. First, we showed that steady-state lateral root formation on a parent axis occurs over time and space in pretty well determined patterns that can be characterized using two constant parameters, nude tip length, and average internode length. Yet, the growth and arrest of lateral roots appeared as a highly stochastic process. Overall, this process was encapsulated in specific length laws thereby defining a complex pattern comprising several orders of lateral roots. In addition, our data set allowed to generate a set of virtual RSAs that covers real RSAs of distinct Arabidopsis genotypes. Conversely, it was critical for us to develop tools that would allow identifying the branching profiles of specific genotypes. Here, we show that intercept number profiles allow such kind of rapid and discriminative overview of RSA organization.

Earlier work has shown that defect in ESKIMO1 function results in xylem collapse. This phenotype was tentatively associated with a reduced L_p (Lefebvre et al., 2011). Since then, ESKIMO1 was shown to function as a xylan-specific *O*-acetyl transferase during secondary cell wall synthesis (Yuan et al., 2013; Grantham et al., 2017). Due to pleiotropic effects of cell wall alteration, *esk1* mutants also show enhanced ABA accumulation (Lefebvre et al., 2011) and constitutive defense responses (Escudero et al., 2017), which could both interfere with tissue hydraulics. Here, we chose *esk1* genotypes as typically complex cases and used our full set of hydraulic and architectural phenotyping and modeling approaches to revisit their root water uptake properties. In agreement with early anatomical work on xylem defects in this genotype, our study provides a quantitative estimate of reduction in axial conductance. Our analysis also pointed to a probable decrease in radial conductance (Figure 7D) and profound changes in root architecture (Figure 7, A and B). Thus, the reduced water uptake capacity of *esk1* results from more complex root alterations than initially thought. This example emphasizes the power of model-assisted hydraulic phenotyping which will prove extremely valuable in support of quantitative genetic analyses of root hydraulics (Shahzad et al., 2016; Tang et al., 2018). Along these lines, the MECHA model was recently used to infer distinct radial hydraulic profiles present in maize roots, either wild-type or with deregulated plasma membrane intrinsic protein 2;5 (Ding et al., 2020).

In conclusion, we have developed a model-assisted pipeline for accurate dissection of root hydraulic architectures in complex, highly branched root systems. While much emphasis has been put so far on aquaporin-mediated control of radial transport, our approach points to the complementary importance of axial hydraulic conductance. Drawbacks in inferring this conductance from anatomical measurements and the common idea that it is only limiting in root tips

have led to underestimating its importance. As a consequence, RSA is most often analyzed as the root foraging capacity for water whereas it can be associated with true hydraulic limitations. More generally, we have developed here a toolbox that can be used for dissecting the multiple root alterations that may interfere with root uptake capacity, in different genotypes (this work) and, by extension, in various environmental conditions. In particular, our study brings key tools to investigate, in *Arabidopsis* and possibly other species, the impact on root hydraulic architecture of environmental factors (e.g. drought) or hormones (e.g. ABA) acting on xylem differentiation (Ramachandran et al., 2020).

Materials and methods

Plant culture

Arabidopsis (*A. thaliana*) seeds were surface sterilized (7 min incubation in 86% [v/v] ethanol and 0.03% [v/v] chlorine followed by four washes with 70% [v/v] ethanol) and germinated onto a half-strength Murashige and Skoog medium with 0.9% (w/v) agar in square petri plates. Plates were incubated in a growth chamber with 70% humidity, 16-h light, 21°C for germination, and kept vertical for 10 days. Seedlings were then transferred to a hydroponic culture medium (1.25 mM KNO₃, 0.75 mM MgSO₄, 1.5 mM, Ca(NO₃)₂, 0.5 mM KH₂PO₄, 50 μM FeEDTA, 50 μM H₃BO₃, 12 μM MnSO₄, 0.70 μM CuSO₄, 1 μM ZnSO₄, 0.24 μM MoO₄Na₂, and 100 μM Na₂SiO₃) for 9–10 additional days in the same growth chamber. Col-0 (N70000), *eskimo1-1* (Xin and Browse, 1998), and *eskimo1-5* (SALK_089531) (Bouchabke-Coussa et al., 2008) plants were used in this study.

Digitalizing of root architectures

Excised root systems were spread out in a Petri dish containing a thin film of water and gently brushed prior to being digitized at 600–900 ppi with a desktop scanner. Images were analyzed with ImageJ software. For a given axis, internodes and lateral roots were traced back with straight or segmented lines, which were then saved in the ROI manager. This procedure was applied for the primary root as well as each lateral root carrying lateral roots, which resulted in a table containing the internodes and lateral roots length for each branched root.

Hagen–Poiseuille law estimate of axial conductance

The axial conductance along a root axis was estimated from direct observations of xylem vessels, using the Hagen–Poiseuille law applied to elliptic conduits. Root segments from the primary root, and first and second-order lateral roots were sampled every 2 cm, embedded in 7% (w/v) low-melting agarose and sliced with a vibratome. Slices were imaged under an optical microscope and xylem vessel dimensions were measured (Supplemental Figure S1A). Since vessel sections were not always circular but possibly oblong, vessel conductance (in m⁴ s⁻¹ MPa⁻¹) was computed according to the general formula for elliptic conduit conductance (Lewis and Boose, 1995):

$$K = \frac{(\pi \times a^3 \times b^3)}{64 \times \eta \times (a^2 + b^2)},$$

where a and b are long and short axis diameters (m), respectively, and η is the viscosity of water (1.10⁻³ Pa s at 20°C). In all cases, a was less than two times b .

Root water transport measurements

Root water transport was measured on de-topped plants with a set of pressure chambers, as in Javot et al. (2003). The hypocotyl of an excised root system was inserted into an adapter and sealed within the pressure chamber lid seal with silicone (Coltene Whaledent, France). The root was then placed into the pressure chamber in a container filled with filtered (20 μm) hydroponic solution. The adapter was connected to a flowmeter (Bronkhorst, France) in order to record the flow of sap from the hypocotyl. After a first pressurization of 10 min at 0.35 MPa, three successive flow measurements were taken at 0.32, 0.16, and 0.24 MPa. A linear fit of the flow-to-pressure relationship (with 0.92 < r² < 0.99) was used to deduce the sap flow at 0.3 MPa [J_v(0.3 MPa)].

Modeling principles

The HydroRoot model was developed in a Python programming language, as a component of the OpenAlea platform (Pradal et al., 2008, 2015). HydroRoot uses a MTG (Godin and Caraglio, 1998) to represent root hydraulic architecture, which consists of the topology of a root system (branching positions, root lengths, root radii, etc.) and its hydraulic structure (local radial and axial conductivities). The RSML format (Lobet et al., 2015) is used to import and export the data to/from the HydroRoot model. The model is open source and available through its public repository (<https://github.com/openalea/hydroroot>).

The hydraulic aspects of HydroRoot consisted in two main components: the radial water flow between the bathing solution and the xylem vessels and the axial transport through the xylem vessels. Following Doussan et al. (1998a, 1998b), the root was discretized as a network of elementary segments consisting of a microcircuit containing both radial (k_i) and axial (K_i) hydraulic conductances (Figure 1C). The local radial flux was written as $j_i = k_i(\psi_{e_i} - \psi_i)S_i$ and the local axial flow as $J_i = K_i(\psi_{\text{out}} - \psi_i)/L_i$, S_i and L_i being the surface area and the length of the elementary segments, respectively. By analogy with Ohm's law, both $1/(k_i S_i)$ and L_i/K_i may be modeled as electric resistances, and the hydraulic architecture may be assimilated to an electrical network (Doussan et al., 1998a; Prusinkiewicz et al., 2007). According to the boundary conditions (uniform pressure around the root and atmospheric pressure at its base), we are able to calculate the equivalent resistance of the network and then calculate the outflow rate. In brief, let us consider an elementary segment i , with $R_i = L_i/K_i$ and $r_i = 1/(k_i S_i)$ as axial and radial resistances, respectively. Its equivalent resistance R_{eq_i} is calculated as follows,

assuming that the apical equivalent resistance $R_{eq_{i-1}}$ is known:

$$\frac{1}{R_{eq_i}} = \frac{1}{R_{eq_{i-1}} + r_i} + \frac{1}{R_i}.$$

By implementing this equation, step by step from the tips, and by considering a branched root as a parallel network, we end up with an equivalent resistance for the whole network, and as a consequence, an equivalent hydraulic conductance K_{eq} (Prusinkiewicz et al., 2007; Albasha et al., 2019). The basal outgoing flux (J_v) is then calculated according to

$$J_v = K_{eq}(\psi_e - \psi_{base}).$$

Cut-and-flow experiments

An entire root system was excised and inserted into a pressure chamber, and water transport was measured as explained above, to check for the linearity of the flow-to-pressure relationship, but with a 10 μ m filtered solution. If correct, the pressure was set to 0.3 MPa and the sap flow was recorded. After 3–5 min, the pressure was released and the root system was taken out of the pressure chamber and laid onto a 12 \times 12 cm Petri dish filled with filtered hydroponic solution. All roots were stretched and aligned thereby allowing all longest root tip segments to be sectioned with a fresh razor blade, at 1–3 cm from the tip of the longest root. The remaining root system was put back in the pressure chamber at 0.3 MPa and flow measurement resumed for another 3–5 min. These steps (Supplemental Figure S2) were repeated three to eight times with the remaining tip segments of the root system being cut each time according to the same principle. Sap flow measured at 0.3 MPa for each cut step was then averaged and plotted against the cut position on the primary root (see Figure 2B as an example).

At each step, the released root segments and the remaining basal part of the root were digitized and processed to reconstruct the initial architecture of the measured root (Supplemental Figure S2). For each cut, roots segments were sorted in decreasing order of their total length (segment length plus the sum of its lateral root length, if any) and positioned accordingly on the primary root. Due to its diameter, the primary root was easily identified and could be attributed correctly for each cut. This allowed us to determine the position of each cut along the primary axis, and therefore reconstruct the whole RSA.

The final step of the whole procedure consisted in adjusting radial (k) and axial (K) conductances, to fit the sap flow measured after each cut. As mentioned above, K varies along each root axis with the distance to the tip. Here, K was represented as a linear piecewise function of nine points for an axis length up to 19.75 cm which corresponds to the longest root among those analyzed for anatomical data (Figure 2C). K was therefore represented by up to nine parameters. The radial conductivity k , which is set uniform

in our model, represented an additional parameter. Consequently, up to 10 parameters had to be adjusted from a data set of four to nine measurements. The system being underdetermined, we constrained the first derivative of K between two consecutive points to a minimum of $-3.10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$. This negative value represents the minimum observed on the lowest smoothing (Figure 2C). The fit was then performed by minimizing the sum of square of the residuals. The averaged radial conductivity from ten Col-0 plants (Table 1), k_{ini} and the nine axial conductance data points from the lowest fit (Figure 2C), K_{ini} were set as initial parameters. The most effective procedure was obtained following these steps:

- k_1 and K_1 were first estimated by adjusting two multiplying factors, ax and ar , with lower bounds of 10^{-20} , such that $k_1 = ar \times k_{ini}$ and $K_1 = ax \times K_{ini}$;
- keeping k_1 , the axial conductance points were then adjusted (with the constraint above and with a nonnegative lower bound) from K_1 , leading to K_2 ;
- keeping K_2 , the radial conductivity was then adjusted from k_1 without bounds or constraint, leading to k_2 ;
- the k and K adjustment loop (steps 2 and 3) was repeated until the variation in radial conductivity falls below $10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$.

We used the function `optimize.minimize` of the SciPy Python library to perform these minimizations. The minimizations 1 and 2 were done with the default solver according to bounds and constraints whereas the minimization of the radial conductivity (step 3) was done with the “Nelder-Mead” solver. The robustness of the fitting procedure was eventually tested by starting from different initial parameters (Supplemental Figure S3).

Statistical analysis

All data sets were obtained in at least four independent biological repeats (plant cultures) with the indicated total number of plants. Pairwise comparisons of model parameters were performed using a Student t test ($P < 0.05$).

Accession numbers

Accession number of *ESK1* is At3g55990.

Supplemental data

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

Supplemental Figure S1. Parameterization of root axial conductance using Hagen–Poiseuille law.

Supplemental Figure S2. Experimental details on the cut-and-flow procedure.

Supplemental Figure S3. Robustness of axial conductance curve estimation procedure.

Supplemental Figure S4. Influence of a two-step radial conductivity profile on simulated root water uptake.

Supplemental Figure S5. Relationship between cumulated number of intercepts and integrative properties of RSA.

Supplemental Figure S6. Dual dependency of $J_v(P)$ on radial (k) and axial conductance (K).

Supplemental Figure S7. Effects of varying axial conductance profiles (ax) on local axial flow (J).

Supplemental Figure S8. Sensitivity analysis of $J_v(0.3\text{ MPa})$ to RSA parameters in two distinct hydraulic settings.

Supplemental Table S1. Parameters of HydroRoot model.

Funding

This work was supported in part by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-BSV6-018) and the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation program (Grant Agreement ERC-2017-ADG-788553).

Conflict of interest statement. None declared.

References

- Albasha R, Fournier C, Pradal C, Chelle M, Prieto JA, Louarn G, Simonneau T, Lebon E** (2019) HydroShoot: a functional-structural plant model for simulating hydraulic structure, gas and energy exchange dynamics of complex plant canopies under water deficit—application to grapevine (*Vitis vinifera*). *In Silico Plants* **1**: diz007
- Barrowclough DE, Peterson CA, Steudle E** (2000) Radial hydraulic conductivity along developing onion roots. *J Exp Bot* **51**: 547–557
- Bouchabke-Coussa O, Quashie ML, Seoane-Redondo J, Fortabat MN, Gery C, Yu A, Linderme D, Trouverie J, Granier F, Téoulé E, et al.** (2008) ESKIMO1 is a key gene involved in water economy as well as cold acclimation and salt tolerance. *BMC Plant Biol* **8**: 125
- Bouda M, Brodersen C, Saiers J** (2018) Whole root system water conductance responds to both axial and radial traits and network topology over natural range of trait variation. *J Theor Biol* **456**: 49–61
- Bouda M, Windt CW, McElrone AJ, Brodersen CR** (2019) In vivo pressure gradient heterogeneity increases flow contribution of small diameter vessels in grapevine. *Nat Commun* **10**: 5645
- Boursiac Y, Boudet J, Postaire O, Luu DT, Tournaire-Roux C, Maurel C** (2008) Stimulus-induced downregulation of root water transport involves reactive oxygen species-activated cell signalling and plasma membrane intrinsic protein internalization. *Plant J* **56**: 207–218
- Boursiac Y, Chen S, Luu DT, Sorieul M, van den Dries N, Maurel C** (2005) Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiol* **139**: 790–805
- Bramley H, Turner NC, Turner DW, Tyerman SD** (2009) Roles of morphology, anatomy, and aquaporins in determining contrasting hydraulic behavior of roots. *Plant Physiol* **150**: 348–364
- Buttersack C, Basler W** (1991) Hydraulic conductivity of cell walls in sugar beet tissue. *Plant Sci* **76**: 229–237
- Calvo-Polanco M, Ribeyre Z, Dauzat M, Rey T, Hidalgo-Shrestha C, Diehl P, Frenger M, Simonneau T, Muller B, Salt DE, et al.** (2021) Physiological roles of Casparian strips and suberin in the transport of water and solutes. *New Phytol* **232**: 2295–2307
- Campilho A, Nieminen K, Ragni L** (2020) The development of the periderm: the final frontier between a plant and its environment. *Curr Opin Plant Biol* **53**: 10–14
- Couvreur V, Faget M, Lobet G, Javaux M, Chaumont F, Draye X** (2018) Going with the flow: multiscale insights into the composite nature of water transport in roots. *Plant Physiol* **178**: 1689–1703
- Danjon F, Reubens B** (2008) Assessing and analyzing 3D architecture of woody root systems, a review of methods and applications in tree and soil stability, resource acquisition and allocation. *Plant Soil* **303**: 1–34
- Di Pietro M, Vialaret J, Li G, Hem S, Rossignol M, Maurel C, Santoni V** (2013) Coordinated post-translational responses of aquaporins to abiotic and nutritional stimuli in *Arabidopsis* roots. *Mol Cell Proteomics* **12**: 3886–3897
- Ding L, Milhiet T, Couvreur V, Nelissen H, Meziane A, Parent B, Aesaert S, Van Lijsebettens M, Inze D, Tardieu F, et al.** (2020) Modification of the expression of the aquaporin *ZmPIP2;5* affects water relations and plant growth. *Plant Physiol* **182**: 2154–2165
- Doblas VG, Geldner N, Barberon M** (2017) The endodermis, a tightly controlled barrier for nutrients. *Curr Opin Plant Biol* **39**: 136–143
- Doussan C, Pages L, Vercambre G** (1998a) Modelling of the hydraulic architecture of root systems: an integrated approach to water absorption—model description. *Ann Bot* **81**: 213–223
- Doussan C, Pierret A, Garrigues E, Pages L** (2006) Water uptake by plant roots: II—modelling of water transfer in the soil root-system with explicit account of flow within the root system—comparison with experiments. *Plant Soil* **283**: 99–117
- Doussan C, Vercambre G, Pages L** (1998b) Modelling of the hydraulic architecture of root systems: an integrated approach to water absorption—distribution of axial and radial conductances in maize. *Ann Bot* **81**: 225–232
- Draye X, Kim Y, Lobet G, Javaux M** (2010) Model-assisted integration of physiological and environmental constraints affecting the dynamic and spatial patterns of root water uptake from soils. *J Exp Bot* **8**: 2145–2155
- Escudero V, Jorda L, Sopena-Torres S, Melida H, Miedes E, Munoz-Barrios A, Swami S, Alexander D, McKee LS, Sanchez-Vallet A, et al.** (2017) Alteration of cell wall xylan acetylation triggers defense responses that counterbalance the immune deficiencies of plants impaired in the beta-subunit of the heterotrimeric G-protein. *Plant J* **92**: 386–399
- Foster KJ, Miklavcic SJ** (2016) Modeling root zone effects on preferred pathways for the passive transport of ions and water in plant roots. *Front Plant Sci* **7**: 914
- Frensch J, Hsiao TC, Steudle E** (1996) Water and solute transport along developing maize roots. *Planta* **198**: 348–355
- Frensch J, Steudle E** (1989) Axial and radial hydraulic resistance to roots of maize (*Zea mays* L.). *Plant Physiol* **91**: 719–726
- Gambetta GA, Fei J, Rost TL, Knipfer T, Matthews MA, Shackel KA, Walker MA, McElrone AJ** (2013) Water uptake along the length of grapevine fine roots: developmental anatomy, tissue-specific aquaporin expression, and pathways of water transport. *Plant Physiol* **163**: 1254–1265
- Godin C, Caraglio Y** (1998) A multiscale model of plant topological structures. *J Theor Biol* **191**: 1–46
- Godin C, Costes E, Sinoquet H** (1999) A method for describing plant architecture which integrates topology and geometry. *Ann Bot* **84**: 343–357
- Grantham NJ, Wurman-Rodrich J, Terrett OM, Lyczakowski JJ, Stott K, Iuga D, Simmons TJ, Durand-Tardif M, Brown SP, Dupree R, et al.** (2017) An even pattern of xylan substitution is critical for interaction with cellulose in plant cell walls. *Nat Plants* **3**: 859–865
- Heymans A, Couvreur V, Lobet G** (2021) Combining cross-section images and modeling tools to create high-resolution root system hydraulic atlases in *Zea mays*. *Plant Direct* **5**: e334
- Hosy E, Vavasseur A, Mouline K, Dreyer I, Gaymard F, Poree F, Boucherez J, Lebaudy A, Bouchez D, Very AA, et al.** (2003) The

- Arabidopsis outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 5549–5554
- Hüsken D, Steudle E, Zimmermann U** (1978) Pressure Probe Technique for Measuring Water Relations of Cells in Higher Plants. *Plant Physiol* **61**: 158–163
- Javaux M, Couvreur V, Vanderborgh J, Vereecken H** (2013) Root water uptake: from three-dimensional biophysical processes to macroscopic modeling approaches. *Vadose Zone J* **12**: 1–16
- Javit H, Lauvergeat V, Santoni V, Martin-Laurent F, Guclu J, Vinh J, Heyes J, Franck KI, Schäffner AR, Bouchez D, et al.** (2003) Role of a single aquaporin isoform in root water uptake. *Plant Cell* **15**: 509–522
- Jones H, Leigh RA, Jones RGW, Tomos AD** (1988) The integration of whole-root and cellular hydraulic conductivities in cereal roots. *Planta* **174**: 1–7
- Klein SP, Schneider HM, Perkins AC, Brown KM, Lynch JP** (2020) Multiple integrated root phenotypes are associated with improved drought tolerance. *Plant Physiol* **183**: 1011–1025
- Knipfer T, Fricke W** (2011) Water uptake by seminal and adventitious roots in relation to whole-plant water flow in barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Exp Bot* **62**: 717–733
- Lee SH, Chung GC, Jang JY, Ahn SJ, Zwiazek JJ** (2012) Overexpression of PIP2;5 aquaporin alleviates effects of low root temperature on cell hydraulic conductivity and growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **159**: 479–488
- Lefebvre V, Fortabat MN, Ducamp A, North HM, Maia-Grondard A, Trouverie J, Boursiac Y, Mouille G, Durand-Tardif M** (2011) ESKIMO1 disruption in *Arabidopsis* alters vascular tissue and impairs water transport. *PLoS ONE* **6**: e16645
- Lewis AM, Boose ER** (1995) Estimating volume flow rates through xylem conduits. *Am J Bot* **82**: 1112–1116
- Lobet G, Pound MP, Diener J, Pradal C, Draye X, Godin C, Javaux M, Leitner D, Meunier F, Nacry P, et al.** (2015) Root system markup language: toward a unified root architecture description language. *Plant Physiol* **167**: 617–627
- Lucas M, Guedon Y, Jay-Allemand C, Godin C, Laplaze L** (2008) An auxin transport-based model of root branching in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* **3**: e3673
- Lynch JP** (2013) Steep, cheap and deep: an ideotype to optimize water and N acquisition by maize root systems. *Ann Bot* **112**: 347–357
- Macho-Rivero MA, Camacho-Cristobal JJ, Herrera-Rodriguez MB, Muller M, Munne-Bosch S, Gonzalez-Fontes A** (2017) Abscisic acid and transpiration rate are involved in the response to boron toxicity in *Arabidopsis* plants. *Physiol Plant* **160**: 21–32
- Maurel C, Nacry P** (2020) Root architecture and hydraulics converge for acclimation to changing water availability. *Nat Plants* **6**: 744–749
- Meunier F, Couvreur V, Draye X, Vanderborgh J, Javaux M** (2017a) Towards quantitative root hydraulic phenotyping: novel mathematical functions to calculate plant-scale hydraulic parameters from root system functional and structural traits. *J Math Biol* **75**: 1133–1170
- Meunier F, Couvreur V, Draye X, Zarebanadkouki M, Vanderborgh J, Javaux M** (2017b) Water movement through plant roots—exact solutions of the water flow equation in roots with linear or exponential piecewise hydraulic properties. *Hydrol Earth Syst Sci* **21**: 6519–6540
- Meunier F, Draye X, Vanderborgh J, Javaux M, Couvreur V** (2017c) A hybrid analytical-numerical method for solving water flow equations in root hydraulic architectures. *Appl Math Model* **52**: 648–663
- Meunier F, Zarebanadkouki M, Ahmed MA, Carminati A, Couvreur V, Javaux M** (2018) Hydraulic conductivity of soil-grown lupine and maize unbranched roots and maize root-shoot junctions. *J Plant Physiol* **227**: 31–44
- Pascut FC, Couvreur V, Dietrich D, Leftley N, Reyt G, Boursiac Y, Calvo-Polanco M, Casimiro I, Maurel C, Salt DE, et al.** (2021) Non-invasive hydrodynamic imaging in plant roots at cellular resolution. *Nat Commun* **12**: 4682
- Postaire O, Tournaire-Roux C, Grondin A, Boursiac Y, Morillon R, Schäffner T, Maurel C** (2010) A PIP1 aquaporin contributes to hydrostatic pressure-induced water transport in both the root and rosette of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **152**: 1418–1430
- Pradal C, Dufour-Kowalski S, Boudon F, Fournier C, Godin C** (2008) OpenAlea: a visual programming and component-based software platform for plant modelling. *Funct Plant Biol* **35**: 751–760
- Pradal C, Fournier C, Valduriez P, Cohen-Boulakia S** (2015) OpenAlea: scientific workflows combining data analysis and simulation. In G Amarnath, R Susan, eds, *Proceedings of the 27th International Conference on Scientific and Statistical Database Management* (San Diego, USA). ACM, New York, Article 11, pp 1–6
- Prusinkiewicz P, Allen M, Escobar-Gutierrez A, DeJong TM** (2007) Numerical methods for transport-resistance sink-source allocation models. *Frontis* **22**: 123–137
- Ramachandran P, Augstein F, Nguyen V, Carlsbecker A** (2020) Coping with water limitation: hormones that modify plant root xylem development. *Front Plant Sci* **11**: 570
- Ramahaleo T, Morillon R, Alexandre J, Lassalles J-P** (1999) Osmotic Water Permeability of Isolated Protoplasts. *Modifications during Development*. *Plant Physiol* **119**: 885–896
- Ranathunge K, Schreiber L** (2011) Water and solute permeabilities of *Arabidopsis* roots in relation to the amount and composition of aliphatic suberin. *J Exp Bot* **62**: 1961–1974
- Rosales MA, Maurel C, Nacry P** (2019) Abscisic acid coordinates dose-dependent developmental and hydraulic responses of roots to water deficit. *Plant Physiol* **180**: 2198–2211
- Sanderson J, Whitbread FC, Clarkson DT** (1988) Persistent xylem cross-walls reduce the axial hydraulic conductivity in the apical 20 cm of barley seminal root axes—implications for the driving force for water-movement. *Plant Cell Environ* **11**: 247–256
- Shahzad Z, Canut M, Tournaire-Roux C, Martinière A, Boursiac Y, Loudet O, Maurel C** (2016) A potassium-dependent oxygen sensing pathway regulates plant root hydraulics. *Cell* **167**: 87–98
- Shane MW, McCully ME, Canny MJ** (2000) Architecture of branch-root junctions in maize: structure of the connecting xylem and the porosity of pit membranes. *Ann Bot* **85**: 613–624
- Steudle E** (2001) The cohesion-tension mechanism and the acquisition of water by plant roots. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 847–875
- Steudle E, Jeschke WD** (1983) Water transport in barley roots—measurements of root pressure and hydraulic conductivity of roots in parallel with turgor and hydraulic conductivity of root cells *Planta* **158**: 237–248
- Steudle E, Peterson CA** (1998) How does water get through roots? *J Exp Bot* **49**: 775–788
- Sutka M, Li G, Boudet J, Boursiac Y, Dumas P, Maurel C** (2011) Natural variation of root hydraulics in *Arabidopsis* grown in normal and salt stress conditions. *Plant Physiol* **155**: 1264–1276
- Tang N, Shahzad Z, Lonjon F, Loudet O, Vaillau F, Maurel C** (2018) Natural variation at *XND1* impacts root hydraulics and trade-off for stress responses in *Arabidopsis*. *Nat Commun* **9**: 3884
- Tixier A, Cochard H, Badel E, Dusotoit-Coucaud A, Jansen S, Herbette S** (2013) *Arabidopsis thaliana* as a model species for xylem hydraulics: does size matter? *J Exp Bot* **64**: 2295–2305
- Tournaire-Roux C, Sutka M, Javit H, Gout E, Gerbeau P, Luu DT, Bigny R, Maurel C** (2003) Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature* **425**: 393–397
- Tyree MT, Davis SD, Cochard C** (1994) Biophysical perspectives of xylem evolution: is there a tradeoff of hydraulic efficiency for vulnerability to dysfunction? *IAWA J* **15**: 335–360

- Xin Z, Browse J** (1998) *Eskimo1* mutants of *Arabidopsis* are constitutively freezing-tolerant. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7799–7804
- Yang Z, Sinclair TR, Zhu M, Messina CD, Cooper M, Hammer GL** (2012) Temperature effect on transpiration response of maize plants to vapour pressure deficit. *Environ Exp Bot* **78**: 157–162
- Yuan Y, Teng Q, Zhong R, Ye ZH** (2013) The *Arabidopsis* DUF231 domain-containing protein ESK1 mediates 2-O- and 3-O-acetylation of xylosyl residues in xylan. *Plant Cell Physiol* **54**: 1186–1199
- Zarebanadkouki M, Kroener E, Kaestner A, Carminati A** (2014) Visualization of root water uptake: quantification of deuterated water transport in roots using neutron radiography and numerical modeling. *Plant Physiol* **166**: 487–499
- Zarebanadkouki M, Meunier F, Couvreur V, Cesar J, Javaux M, Carminati A** (2016) Estimation of the hydraulic conductivities of lupine roots by inverse modelling of high-resolution measurements of root water uptake. *Ann Bot* **118**: 853–864
- Zwieniecki MA, Thompson MV, Holbrook NM** (2003) Understanding the hydraulics of porous pipes: tradeoffs between water uptake and root length utilization. *J Plant Growth Regul* **21**: 315–323

RESEARCH PAPER

Distinct early transcriptional regulations by turgor and osmotic potential in the roots of *Arabidopsis*

Amandine Crabos^{1,†}, Yunji Huang^{1,†}, Thomas Boursat^{1,2}, Christophe Maurel¹, Sandrine Ruffel¹, Gabriel Krouk¹, and Yann Boursiac^{1,*}

¹ Institute for Plant Sciences of Montpellier (IPSiM), Univ Montpellier, CNRS, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France

² Laboratoire de Mécanique et Génie Civil (LMGC), Univ Montpellier, CNRS, Montpellier, France

† These authors contributed equally to this work.

* Correspondence: yann.boursiac@inrae.fr

Received 11 June 2023; Editorial decision 26 July 2023; Accepted 28 July 2023

Editor: Bjorn Usadel, Forschungszentrum Jülich, Germany

Abstract

In a context of climate change, deciphering signaling pathways driving plant adaptation to drought, changes in water availability, and salt is key. A crossing point of these plant stresses is their impact on plant water potential (Ψ), a composite physico-chemical variable reflecting the availability of water for biological processes such as plant growth and stomatal aperture. The Ψ of plant cells is mainly driven by their turgor and osmotic pressures. Here we investigated the effect of a variety of osmotic treatments on the roots of *Arabidopsis* plants grown in hydroponics. We used, among others, a permeating solute as a way to differentiate variations on turgor from variations in osmotic pressure. Measurement of cortical cell turgor pressure with a cell pressure probe allowed us to monitor the intensity of the treatments and thereby preserve the cortex from plasmolysis. Transcriptome analyses at an early time point (15 min) showed specific and quantitative transcriptomic responses to both osmotic and turgor pressure variations. Our results highlight how water-related biophysical parameters can shape the transcriptome of roots under stress and provide putative candidates to explore further the early perception of water stress in plants.

Keywords: Ethylene glycol, NaCl, osmotic pressure, PEG, sorbitol, transcriptional response, turgor pressure, water potential.

Introduction

How the environment is perceived by plants is of major importance for their life cycle. This is particularly true for water deficit (Maurel and Nacry, 2020; Verslues *et al.*, 2023) which can be summarized as an imbalance between the plant's requirement and loss of water and its uptake capacity. Water deficit directly impacts the plant water status. One of the ways in which plant water status is assessed is via plant water potential

(Ψ), a composite variable which, in plant cells, integrates the turgor potential (or turgor pressure, P) and the osmotic potential (II) (Haswell and Verslues, 2015). When considering the soil/plant/atmosphere continuum, Ψ can also be influenced by gravity and matric potentials. Ψ gradients allow evaluation of the motive forces that generate net flows of water between different compartments of this continuum. Together with the

Abbreviations: DEG, differentially expressed gene; DEP, differentially expressed probe; EG, ethylene glycol; P, turgor pressure (MPa); PEG, polyethylene glycol; IT, osmotic pressure (MPa); Ψ , water potential (MPa).

viscoelastic properties of the cell wall, P is responsible for the elongation of cells and organs, and for the rigidity of stems and leaves, allowing them to act against gravity and optimize light interception, among others. Π is related to the concentration of solutes in a compartment. The presence of a Π gradient across a semi-permeable barrier causes osmosis: a net directional flow of water, even in the absence of any hydrostatic pressure difference (Bowler, 2017). Π influences biochemical reactions, and can be directly regulated by the cell through osmoticum accumulation, synthesis, and transport (Beauzamy *et al.*, 2014).

A critical issue in plant biology is to understand which physico-chemical parameters are perceived by plants. Terms such as osmosensing and mechanosensing are employed to describe phenomena related to perceiving the plant water status (Beauzamy *et al.*, 2014; Haswell and Verslues, 2015; Hamant and Haswell, 2017; Scharwies and Dinneny, 2019). Many molecular players, such as mechanosensitive channels and protein kinases from multiple families (detailed in the reviews cited above), are thought to be involved in this perception or are contributing to associated phenomena. However, we lack a clear picture of the early perception of water deficit. One difficulty is that water deficit translates into multiple variations in the cell status. It is still discussed, for example, whether Π or P changes are directly sensed by plants or whether it is rather their impact on cell processes, cell wall status, or cell volume (Sack *et al.*, 2018; Verslues *et al.*, 2023).

Another difficulty is that the links between the intensity of the stress causing the water deficit and cell parameters is hard to establish. Measuring plant physico-chemical parameters under physiological conditions is indeed difficult at cell-scale resolution. Π or P can be measured using a combination of challenging, low-throughput, and/or indirect techniques such as pressure chambers and pico-osmometers, cell pressure probes, picogauges, or indenters (Beauzamy *et al.*, 2014; Knoblauch *et al.*, 2014; Boursiac *et al.*, 2022). Thus, there is a real need for improved tools and non-destructive techniques using, for example, chemical probes, protein reporters, or marker genes.

Here, we addressed the early stages of water deficit perception by considering that the drop in external Ψ would primarily provoke a change in either Π or P. Using hydroponically grown *Arabidopsis* plants that were osmotically challenged with permeating and non-permeating solutes, we first evaluated the impact of a drop in external Ψ on the P of root cortical cells. We then investigated root transcriptional regulations as a readout, to test whether Π or P can trigger specific and quantitative responses, a first step into the question of whether Π or P can be genuinely perceived by plant cells.

Materials and methods

Plant material and culture conditions

All experiments were performed using *Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0. Seeds were surface-sterilized and kept at 4 °C in the dark until sowing

on 1/2 Murashige and Skoog (MS) basal salt medium agar plates [2.2 g Γ^{-1} MS (Sigma), 1% sucrose (Euromedex), 0.05% MES (Euromedex), and 0.7% agar (Sigma), pH 5.7 adjusted using KOH]. For pre-germination, plates were incubated vertically in growth chamber under long-day conditions (16 h/8 h, 21 °C, 60% humidity). After 10 d, seedlings were transferred to a hydroponic medium [1.25 mM KNO₃, 0.75 mM MgSO₄, 1.5 mM Ca(NO₃)₂, 0.5 mM KH₂PO₄, 50 μ M Fe-EDTA, 50 μ M H₃BO₃, 12 μ M MnSO₄, 0.70 μ M CuSO₄, 1 μ M ZnSO₄, 0.24 μ M MoO₄Na₂, 100 μ M Na₂SiO₃] and further grown under the same culture conditions. Cell pressure probe measurements, transcriptomic analyses, and treatments for quantitative PCR (qPCR) analysis were performed at 4–8, 6, or 6–11 d after transfer, respectively.

Osmotic treatments

Osmotic stress treatments were performed using a hydroponic solution containing either 25, 50, 75, or 100 mM NaCl (Sigma); 50, 100, or 150 mM sorbitol (Sigma); 75, 100, 125, or 150 g^{-1} polyethylene glycol (PEG) 8000 (Sigma); or 50, 100, 550, and 200 mM ethylene glycol (EG; Sigma). Table 1 recapitulates the solutions and their respective osmotic potential.

Cell pressure probe measurements

Cell pressure probe measurements were performed as described previously (Javot *et al.*, 2003). Our device uses a pulled and beveled glass microcapillary (tip external diameter: 4–8 μ m), filled with mineral oil and mounted onto a pressure probe. Primary root tip segments of ~2–3 cm were excised from *Arabidopsis* seedlings and laid on a filter paper perfused with hydroponic or treatment solution. Measurements were performed within a distance of 1 cm from the elongation of the first root hairs. Data were recorded using a specially designed software (Pfloek; Department of Plant Ecology, University of Bayreuth, Germany). Due to the dead volume of the system and the maximal speed of the peristaltic pump, it took ~2 min to fully change the perfusion solution around the root.

Transcriptomic analyses

Osmotic treatments were performed by transferring plants for 15 min into a hydroponic or treatment solution. The whole roots were harvested after 15 min of treatment and immediately frozen in liquid nitrogen. Each sample was a pool of three plants, and two sets of plants were treated independently. Frozen samples were ground using an MM 400 mixer mill (Retsch). Total RNA was extracted using TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc.), DNA contamination was removed by digestion with DNase I (Promega), and further purification of the RNAs was performed using the MinElute Cleanup Kit (Qiagen), all according to the manufacturers' instructions. Concentration and purity of the RNAs were assessed by spectrophotometry, and integrity was confirmed using RNA 6000 Nanochips with a 2100 Bioanalyzer (Agilent). Gene expression measurements were performed using *Arabidopsis* Affymetrix Gene1.1 ST array strips (Affymetrix). For each sample, 100 ng of total RNA was processed using the GeneChip WT PLUS Reagent Kit (Affymetrix) following the manufacturer's instructions. Hybridization on array strips was performed for 16 h at 48 °C. The arrays were washed, and stained, using GeneAtlas Hybridization, Wash and Stain Kit for WT Array Strips following the manufacturer's instructions. Array strips were scanned on the GeneAtlas system.

Microarray raw data were processed with GCRMA available in the Expression Console Software package developed by Affymetrix. The Affymetrix Microarrays data have been deposited in the National Center for Biotechnology Information's Gene Expression Omnibus in

Table 1. Summary of the osmotic treatments applied to the roots, and the factors of the ANOVA model

Solute	Concentration (mM, g l ⁻¹ for PEG)	Π	P _{cort}	NaCl _{factor}	Sorbitol _{factor}	PEG _{factor}	EG _{factor}
None	0	0.021	0.41	0	0	0	0
NaCl	25	0.117	0.32	25	0	0	0
	50	0.238	0.25	50	0	0	0
	75	0.355	0.14	75	0	0	0
	100	0.425	0.05	100	0	0	0
	150	0.516	0.01	150	0	0	0
Sorbitol	50	0.134	0.32	0	50	0	0
	100	0.255	0.18	0	100	0	0
	150	0.370	0.1	0	150	0	0
PEG 8000	75	0.073	0.31	0	0	75	0
	100	0.131	0.26	0	0	100	0
	125	0.209	0.2	0	0	125	0
	150	0.280	0.14	0	0	150	0
EG	50	0.151	0.3	0	0	0	50
	100	0.268	0.29	0	0	0	100
	150	0.394	0.29	0	0	0	150
	200	0.516	0.26	0	0	0	200

Solutes were dissolved in the hydroponic solution. The osmotic potential of the solution was measured at 20 °C with an osmometer (Wescor); three digits after the decimal point are shown. The osmotic potential is the opposite of the osmotic pressure.

compliance with Minimum Information about Microarray Experiment standards (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) and are accessible through Gene Expression Omnibus Series accession no. GSE223207.

Transcriptomic data analyses

The multi-way type II ANOVA model and one-way ANOVA analyses for gene expression correlation to Π and P were run in R (v.4.2.0). Thresholds for the selection of differentially expressed probes (DEPs) were adjusted by comparison of the *P*-values versus false discovery rate (FDR)-corrected *P*-values and their frequency. A general cut-off of FDR <0.2 was ruled out, which yielded non-adjusted *P*-value thresholds of 0.001 for the solutes (NaCl, sorbitol, PG, and EG), and 0.0004 and 0.0012 for Π and P, respectively. A few genes were removed from the Π- and P-specific lists since they were associated with at least two probes and gave inconsistent ANOVA test results. Those removed from 'Π-specific genes' were At1g72850, At1g78270, At2g24540, At2g33810, At4g13920, At4g24410, At4g25880, and At4g26490; and those removed from 'P-specific genes' were At1g07130, At1g07725, At1g08590, At1g51640, At1g56240, At1g72850, At2g11851, At2g22960, At3g22070, At3g54630, At3g56770, At4g24410, At4g28650, At4g36030, At4g38210, At4g38550, and At5g59730.

Treatment clustering was obtained in RStudio (RStudio 2022.07.1 + 554) by calculating the Euclidean distance between treatments using the function `dist()`, then the clusters obtained by `hclust()` were plotted using `plot()`, with default values. Venn diagrams were elaborated with the `nVennR` package (Pérez-Silva *et al.*, 2018).

Semantic analysis of the clusters was performed using Genecloud (Krouk *et al.*, 2015) from the `m2sb.org` webpage with an FDR threshold set to 1%. Gene Ontology (GO) enrichment was performed in R using ClusterProfiler v.4.4.2 (Wu *et al.*, 2021) and `org.At.tair.db` (v3.15.1) for the Arabidopsis genome-wide annotation database (Carlson, 2017). Overlaps scores of lists were obtained using the Genesect algorithm from the Virtual Plant platform (Katari *et al.*, 2010).

Quantitative reverse transcription-PCR (RT-qPCR)

RNA extraction was performed by using the Direct-zol RNA Miniprep Plus Kits from Zymo Research (No. 2072). cDNA solution was

synthesized from 1 µg of RNA and oligo-DT₁₅, dNTPs, and M-MLV (Promega) according to the manufacturer's protocol. At1g13320 (PDF2) and At4g34270 (TIP41-like) were selected as internal normalizing genes, because of their stability in roots under abiotic stresses (Czechowski *et al.*, 2005). RT-qPCR primers were designed by using the primer3 online website (version 4.1.0, Supplementary Table S1). RT-qPCRs were performed according to the procedure recommended by the manufacturer (Takara) [0.5 µl of H₂O, 0.25 µl of forward/reverse primers, 4 µl of cDNA, and 5 µl of TAKARA SYBR premix Ex Taq at 95 °C for 30 s; 95 °C for 5 s, 60 °C for 30 s (40 cycles)]. RStudio software was used to calculate gene expression according to Vandesompele's method (Vandesompele *et al.*, 2002).

mRNA decay analysis

The half-life time of mRNAs ($T_{1/2}$) was calculated from data available in Sorenson *et al.* 2018. It is based on the decay rate (α) modeled from RNA-seq data upon cordycepin treatment on *sov* mutant seedlings (i.e. Col 0), and is calculated as $T_{1/2} = \ln(2)/\alpha$ (Sorenson *et al.*, 2018). The $T_{1/2}$ values of each mRNA from genes in the clusters are presented individually and as boxplots. The values above the boxplots correspond to a non-parametric estimation of the *P*-value of the $T_{1/2}$ of a given cluster being smaller than that of the whole genome. In this bootstrap-based approach, the median $T_{1/2}$ of the cluster is compared with the median $T_{1/2}$ of a sample (of the same size) from the whole-genome data. The number of occurrences where the genome sample median $T_{1/2}$ is smaller than the cluster median $T_{1/2}$ divided by the number of tests realized (10^4 tests), namely the frequency, is reported.

Results

Turgor response of root cortical cells to osmotic challenges

We determined the P of root cortical cells with a cell pressure probe (Boursiac *et al.*, 2022) upon root perfusion with

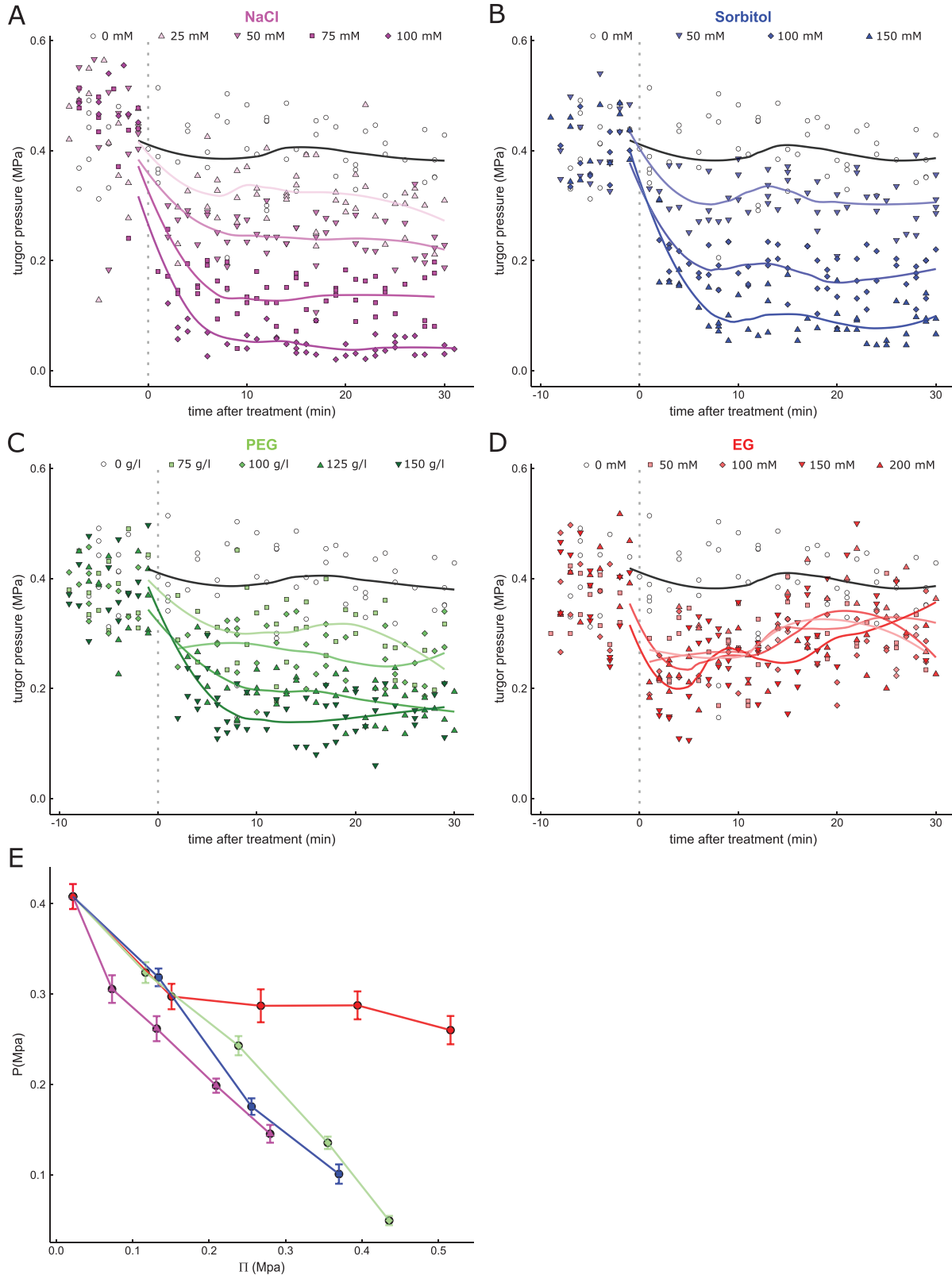


Fig. 1. Osmotic treatments reduce the P of root cortical cells in Arabidopsis. A portion of ~3 cm of root of 21-day-old plants, laid on a perfused Whatman paper, was treated with various solutes at different concentrations. Cortical cell P was measured with a cell pressure probe. (A–D) Measurement kinetics performed on plants treated with NaCl at concentrations of 0, 25, 50, 75, and 100 mM (the darker the color, the more concentrated; $n > 2$ for each treatment), sorbitol at 50, 100, and 150 mM, PEG 8000 at 75, 100, 125, and 150 g l⁻¹, and EG at 50, 100, 150, and 200 mM.

200 mM, respectively. Zero on the time axis indicates the change in perfusion from hydroponic solution to the same solution complemented with treatments. A loess smoothing was added in order to highlight the general behavior of P after each treatment. (E) Plot recapitulating the measurements of P within the 10–20 min time frame as a function of the osmotic pressure of the solution (average value \pm SEM, $n \geq 2$, blue, sorbitol; pink, NaCl; green, PEG; red, EG).

a standard hydroponic solution, or the same solution supplemented with various concentrations of distinct solutes: NaCl, sorbitol, PEG 8000, or EG (Table 1). In contrast to others, the latter solute can significantly diffuse through cell membranes. Thus, EG is expected to concomitantly reduce the Ψ of the solution and cells, without significantly changing the Ψ gradients between compartments (Creelman and Zeevaert, 1985). Figure 1A–D shows cortical cell pressure measurements over the course of ~ 30 min of a perfusion with various concentrations of NaCl, sorbitol, PEG, and EG. For all treatments, we observed a progressive reduction in P , which reached a minimal value within 10 min. P remained stable for at least an additional 10 min for most conditions except EG treatments, where a partial restoration of P was eventually observed. We averaged P within 10–20 min of treatment and represented it as a function of Π of the bathing solution (Fig. 1E). For all solutes except EG, we observed a linear and relatively similar relationship between Π of the solution and cortical cell P . In the 10–20 min time range, EG provoked a reduction in P of ~ 0.1 MPa, independently of its concentration, and thereby of Π . Note that treatments were designed so that P remained positive in cortical cells, and hence cortical cells were not plasmolysed. These results suggest that root cortical cells behave as osmometers with the solutes except EG, and show no major osmotic regulation within the time frame of the experiment. The 15 min time point, which corresponds to a mostly stable P , seems to be well adapted to studying the early molecular events triggered by osmotic challenges.

Transcriptional response of roots osmotically challenged for 15 min

We treated Arabidopsis plants for 15 min using the various conditions tested above, and performed transcriptomic analyses on RNA extracted from their roots. This genome-wide investigation of gene expression in response to 15 distinct osmotic challenges (plus a control condition in which plants were transferred into an identical hydroponic solution, Table 1) was recorded using Affymetrix *A. thaliana* genome arrays (Gene1.1 ST array strip, two independent biological experiments). We used the probe data from the genome array to perform a hierarchical classification of the osmotic challenges, and explore their convergence in transcriptional control (Fig. 2A). A general feature is that most of the challenges were grouped by the nature of the solute (NaCl, sorbitol, PEG, or EG), suggesting that it represents a main determinant of whole-genome transcriptional status. EG treatments were clustered next to the hydroponic condition, which echoes the limited effect of this

solute on P . Treatments with the two highest PEG concentrations were also separate from the other challenges, which suggests that these conditions trigger responses of yet another type.

The datasets were then modeled through ANOVA with the following linear model:

$$Y_i = \alpha \cdot \text{NaCl}_{\text{factor}} + \beta \cdot \text{sorbitol}_{\text{factor}} + \gamma \cdot \text{PEG}_{\text{factor}} + \delta \cdot \text{EG}_{\text{factor}}$$

where Y_i is the signal intensity of an ATH1 probe, α , β , γ , and δ are coefficients representing the effect of each of the factors, respectively, and $\text{NaCl}_{\text{factor}}$, $\text{sorbitol}_{\text{factor}}$, $\text{PEG}_{\text{factor}}$, and $\text{EG}_{\text{factor}}$ are factors indicating the concentration of each treatment (Table 1; full results are provided in Supplementary Dataset S1) (Ristova *et al.*, 2016). Note that this model uses partial regressions against factors that are derived from the concentration of the solutes. Importantly, the factors are set to 0 when another solute is used as a treatment and, as a consequence, are negatively impacting the score of genes which could be regulated by common underlying processes (such regulations are addressed in the next section). Note also that all solutes are included in the model, despite the fact that no co-treatment was performed and thus no interaction is investigated, in a bid to increase the statistical power. We then considered a probe as differentially expressed if its ANOVA P -value was significantly different at $P < 0.001$ (FDR < 0.2) for any of the four factors. A total of 526 DEPs, corresponding to 436 differentially expressed genes (DEGs), were retrieved with this analysis. In order to estimate the amplitude of the transcriptomic regulation, we first separated and sorted the DEPs according to the conditions in which they were regulated (Fig. 2B). Probes regulated specifically by one solute only were the most represented. PEG was the solute with the most specific impact, with 182 DEPs (159 DEGs). NaCl, sorbitol, and EG treatments resulted in 127 (92), 68 (60), and 14 (12) specific DEPs (DEGs), respectively. The remaining 135 DEPs were regulated significantly in ≥ 2 solute treatments (Fig. 2B). Because DEGs could be either up- or down-regulated by the treatments, we separated the genes regulated by each specific solute in two clusters based on their averaged, centered, expression signal. Figure 2C visually confirms that the DEGs identified by this approach indeed exhibit a quantitative transcriptional regulation mostly for a particular solute.

Do Π or P trigger specific gene regulations?

Because all treatments share a common osmotic component (Table 1), the transcriptional response can also be observed

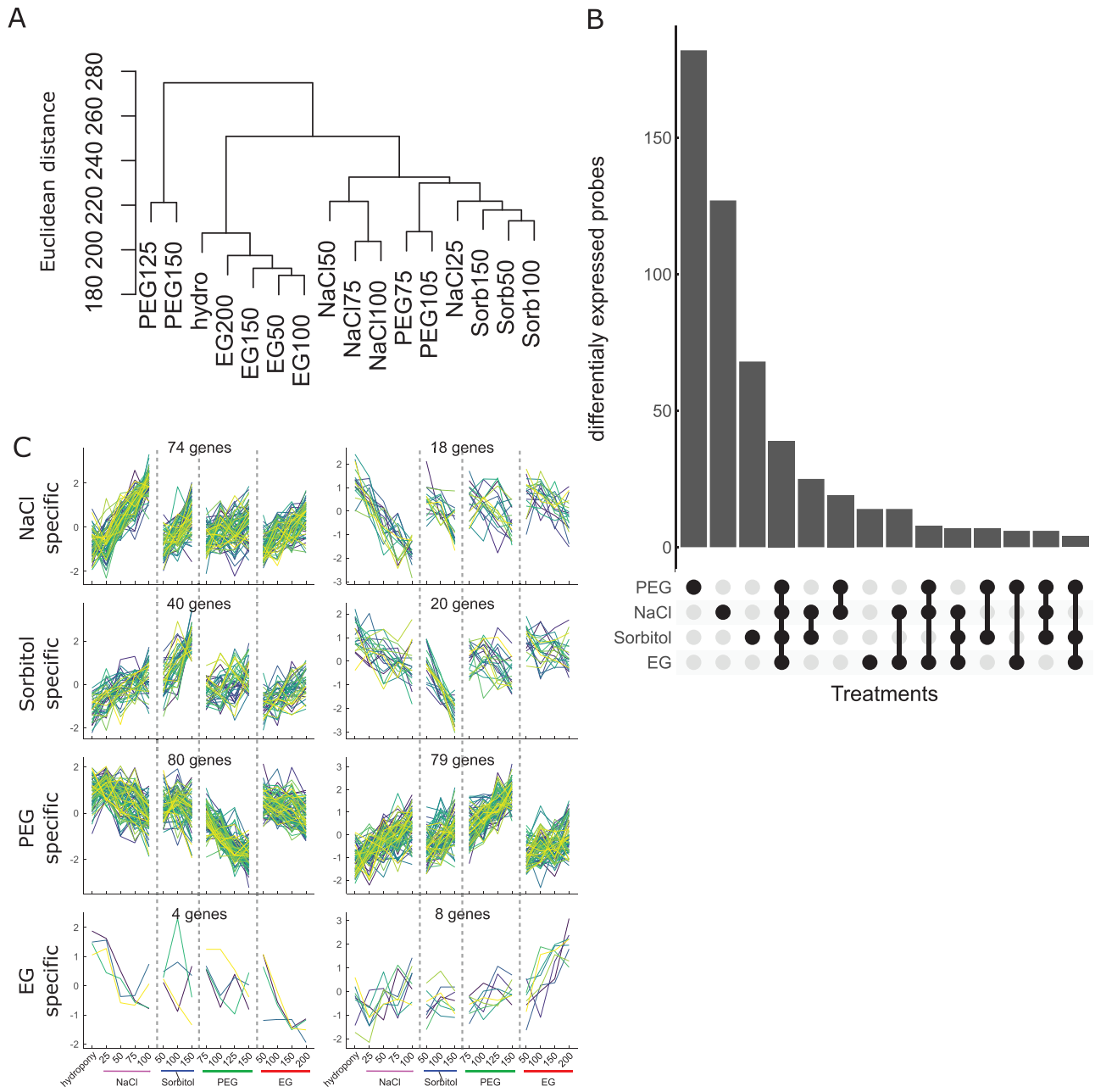


Fig. 2. Features of the early transcriptomic response to osmotic treatments. (A) Dendrogram illustrating the effects of the solute nature and concentration on the regulation of gene expression. (B) Number of DEPs classified according to the solute used for the treatment. The matrix below indicates if those DEPs were found for a single or for various solute(s). (C) Gene expression signals in the different treatments. Genes regulated by one solute only were selected from (B) and split into two clusters. The average, centered, expression value for each gene is plotted against the combination of solutes and concentrations used in the transcriptomic approach.

with the prism of a dose-dependent response to osmotic pressure. We therefore performed a one-way ANOVA on our transcriptomic data, using Π as the explanatory, continuous, variable (Supplementary Dataset S1). This analysis retrieved 72 DEGs. EG was also used for its capacity to reduce the Ψ of the solution; however, at variance with the other treatments, it provoked only a limited reduction in P (Fig. 1D, E). With the aim of differentiating the effect of

an osmotic treatment on the transcriptome through either the osmotic potential or its impact on P, we performed a similar one-way ANOVA of the 15 min transcriptomic response to the treatments, but with P as the explanatory variable (Supplementary Dataset S1). This analysis resulted in 179 DEGs. While 53 DEGs were identified in both Π and P response (see the Discussion), 19 and 126 DEGs were specific for Π and P, respectively (Fig. 3A). Each group of Π

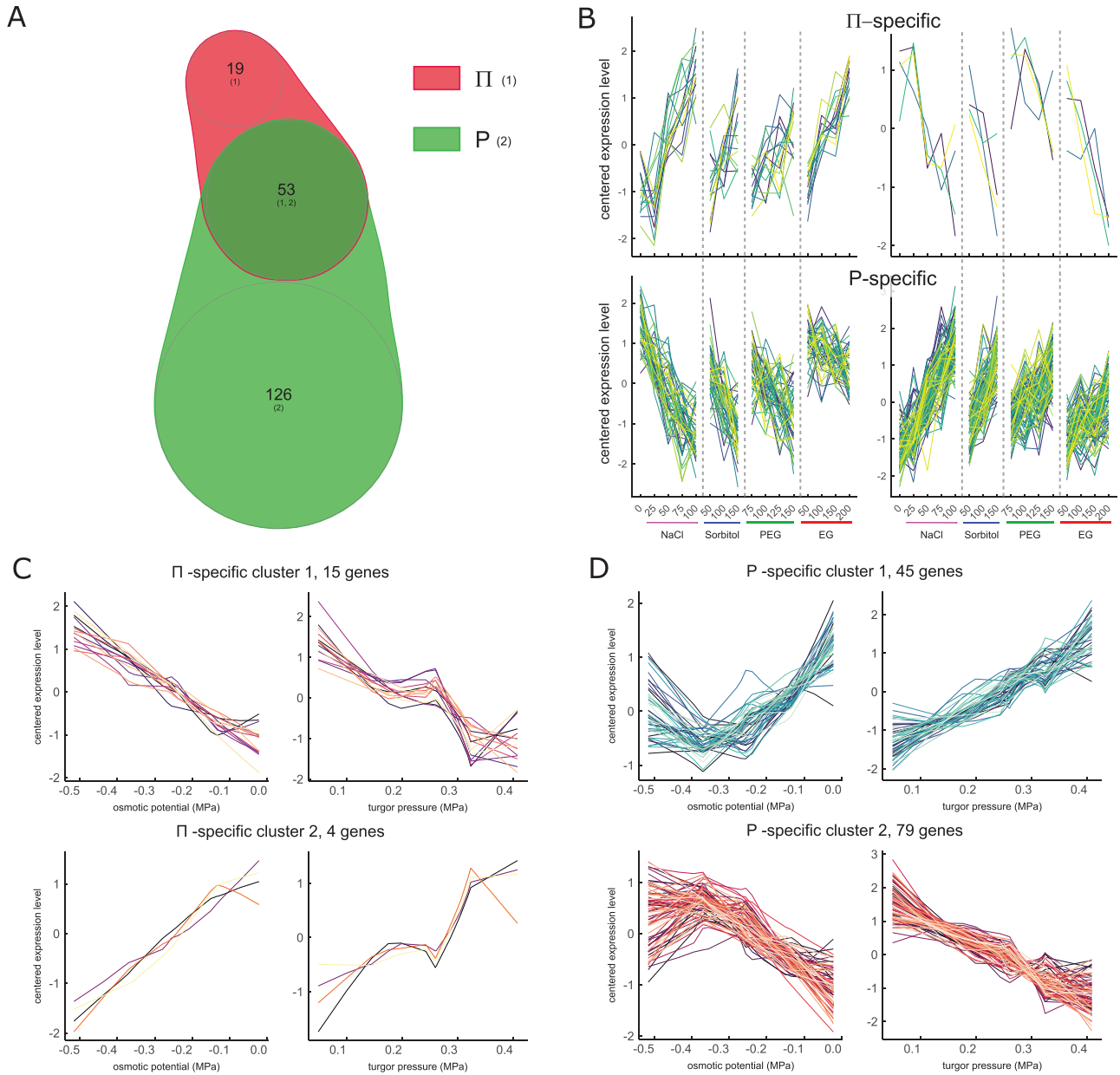


Fig. 3. Correlations between gene expression and osmotic or turgor pressure. (A) Venn diagram showing the number of genes, in the same transcriptomic approach as in Fig. 2, whose expression is significantly correlated to Π , P, or both. (B) The 19 ' Π -specific' genes and 126 ' P -specific' genes were split into two clusters each, and their average centered expression is expressed as a function of the solute/treatment combination corresponding to the biological assays of the transcriptome approach. (C) The 19 ' Π -specific' genes were separated into two clusters and their average centered expression is expressed as a function of the osmotic potential of the solution of treatment, or the cortical cell turgor pressure. (D) The same representation as in (C) but for the 126 ' P -specific' genes.

or P DEGs was split into two clusters, in order to account for potential up- and down-regulation. For the Π -specific genes, the mRNA abundance of the DEGs appeared to be regulated quantitatively for all solutes employed (Fig. 3B, upper panels), while a similar regulation for NaCl, sorbitol, and PEG, but not EG, was observed for the P-specific genes (Fig. 3B, lower panels). Most importantly, a clear quantitative

correlation to Π or P was confirmed for the Π -specific (Fig. 3C) and P-specific (Fig. 3D) DEGs, respectively. Altogether, our transcriptomic approach suggests that while cells remain turgid, at least two components of the osmotic treatment, P and the Π of the bathing solution, are able to provoke specific quantitative responses of the transcriptome, resulting in both up- and down-regulations.

Are promoter activity and mRNA decay pathways involved in the Π or P transcriptional regulation?

The 1 kb promoter regions of the DEGs were analyzed using the MEME suite (Bailey *et al.*, 2015; Grant and Bailey, 2021, Preprint). Both new and already known (O'Malley *et al.*, 2016) enriched motifs were considered for Π -cluster 1 or the P-specific clusters (with only four genes, Π -cluster 2 was not analyzed, Supplementary Datasets S2, S3A–C). All clusters showed an enrichment in motifs (or similar motifs) known to bind ABI3VP1 transcription factors (TFs). All other motifs were found enriched in one cluster only: REM, C2C2dof, and BBRBPC-binding elements for P-cluster 2; C2H2 and ZFHD-binding motifs for P-cluster 1; and an ARID-binding motif for Π -cluster 1.

We also considered whether the regulation of the mRNA abundance of the DEGs could be post-transcriptional, and in particular due to their degradation. Using the transcription inhibitor cordycepin and a model-assisted RNAseq approach, Sorenson *et al.* (2018) performed a global evaluation of mRNA decay rates in Arabidopsis and evaluated the implication of the three main decay pathways. As a first hint of this type of regulation for the DEGs identified herein, we used the mRNA decay rates obtained in the above-mentioned study, for the *sov* Col genotype, to calculate the mRNA half-life of our genes of interest in their growth conditions ($T_{1/2}$). The median $T_{1/2}$ of all mRNAs detected in this study was ~ 101 min. The median $T_{1/2}$ calculated for genes of the Π -specific clusters and P-specific cluster 2 were significantly lower, with values of 56, 23, and 69 min, respectively (Fig. 4), and was not different for genes of P-specific cluster 1.

A short list of Π - or P-correlated genes

In a bid to confirm the robustness of the microarray approach, and select potentially good candidates that could serve as

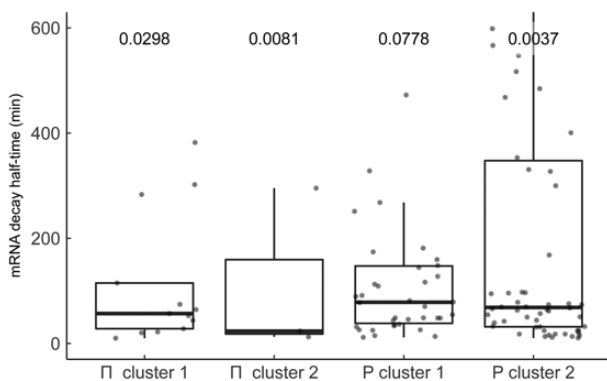


Fig. 4. mRNA half-life time is reduced in three clusters in control conditions. The half-life time of mRNAs ($T_{1/2}$) was calculated from Sorenson *et al.* (2018) based on the decay rate (α) modeled upon cordycepin treatment on *sov* mutant seedlings [i.e. Col 0, $T_{1/2} = \ln(2)/\alpha$]. $T_{1/2}$ values of each mRNA from genes in the clusters are presented individually and as boxplots. The numbers above the boxplots correspond to the P-value of a bootstrap-based test of $T_{1/2}$ of the cluster being smaller than the whole-genome median $T_{1/2}$ (see the Materials and methods).

markers of P or Π , we ranked genes of the four categories (Π - or P-specific, up- or down-regulated) according to three parameters: the adjusted R^2 of a linear fit of their averaged centered expression as a function of Π or P; the slope of the linear fit; and the average expression level in control conditions (Supplementary Dataset S4). We randomly selected a few genes, among the best ranked of each list, to confirm their regulation by RT-qPCR, upon 15 min NaCl, sorbitol, and EG treatments, and in three new, independent, biological replicates. Figure 5 shows plots of the comparison between the means of the microarray signals and of the signals obtained by RT-qPCR. Ten genes out of 12 displayed a significant correlation between both signals, thus globally confirming the results obtained by the microarray approach. The Π -specific cluster 2 showed poor reliability, with only one gene out of three having a similar behavior upon confirmation by RT-qPCR and in new biological replicates. The P-specific cluster 1 exhibited the highest rate of confirmation, in both the P-value of the correlation and the R^2 of the relationship. Among them, At1g64640 stood out, with a correlation P-value $< 1e-3$ and an $R^2 > 0.9$. The expression of this gene is therefore robustly and quantitatively correlated to P, at 15 min after an osmotic challenge.

What are the gene functions altered by Π or P?

A semantic analysis of the gene annotation present in the four clusters (Π - or P-specific, up- or down-regulated) using Genecloud (Krouk *et al.*, 2015) revealed that the Π -specific clusters do not show any particular semantic enrichment. Arabinogalactan, Cys/His-rich proteins, 'protein kinase C', and TF-related terms were detected in cluster 1 of P-specific genes (Fig. 6A, left). Cluster 2 of P-specific genes showed enrichments in terms related to ethylene-dependent and other types of transcriptional regulation, as well as defense responses (Fig. 6A, right).

A GO enrichment analysis was also performed. The Π -specific cluster 1 was found to be specifically enriched in genes associated with defense responses and the cell wall (Fig. 6B, left). Results for P-specific clusters were quite consistent with the semantic analysis. P-specific cluster 1 was enriched in 'anchored components' which echoes the arabinogalactan term above. P-specific cluster 2 was enriched in terms associated with ethylene and defense responses. In a bid to sharpen the above-mentioned GO analysis, we also evaluated the overlap between our gene lists and the GO list 'response to NaCl' (GO:0009651) as well as two of the upstream terms: 'response to abiotic stress' (GO:0009628) and 'response to stimulus' (GO:0050896) (Fig. 6C). The two up-regulated clusters, Π -specific cluster 1 and P-specific cluster 2, showed a significant overlap with the genes in the categories 'response to stimulus' and 'response to abiotic stress', but not with 'response to salt stress', indicating the convergence of our approach with existing knowledge. Because the specificity of the response might not prevail under short-term treatment, and a general stress response (GSR) may rather

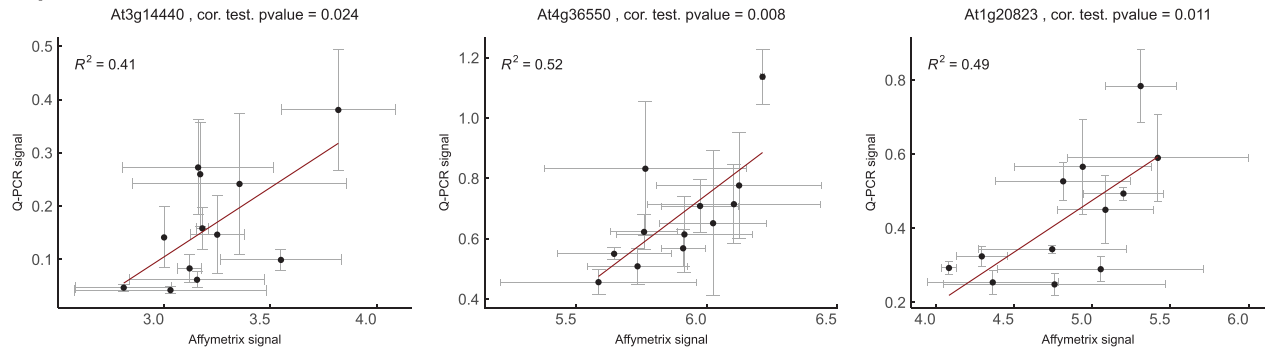
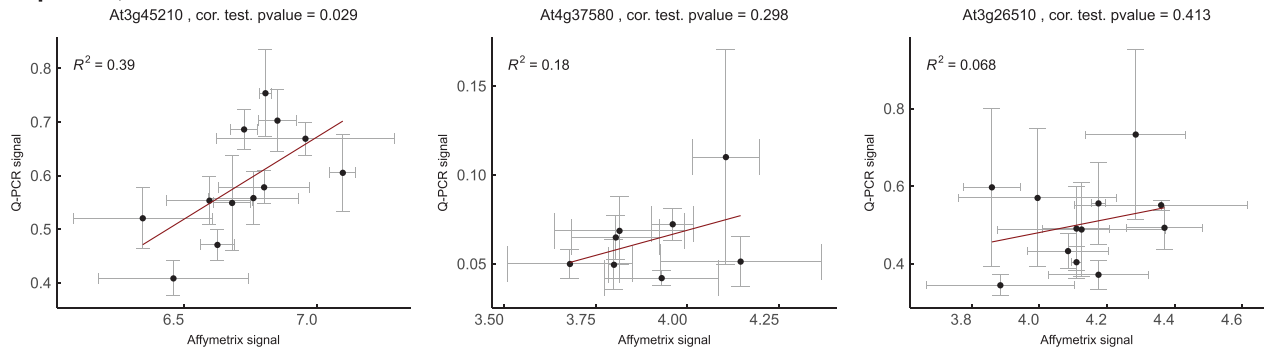
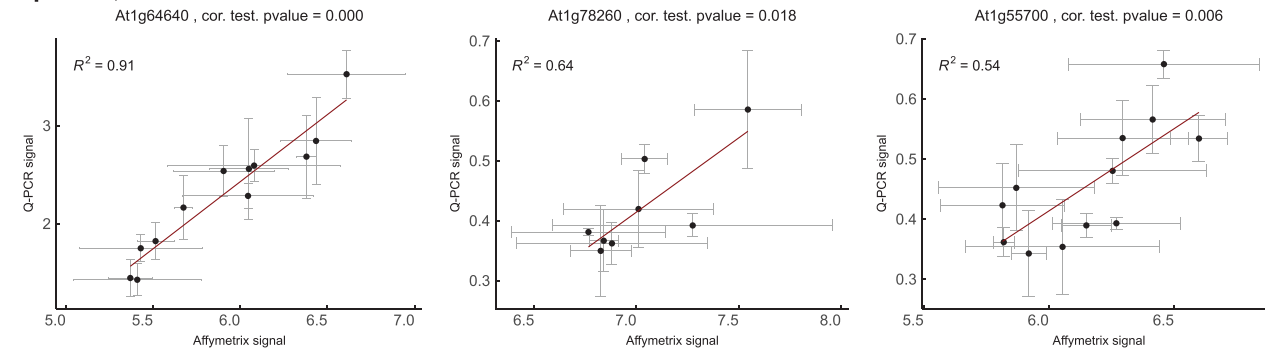
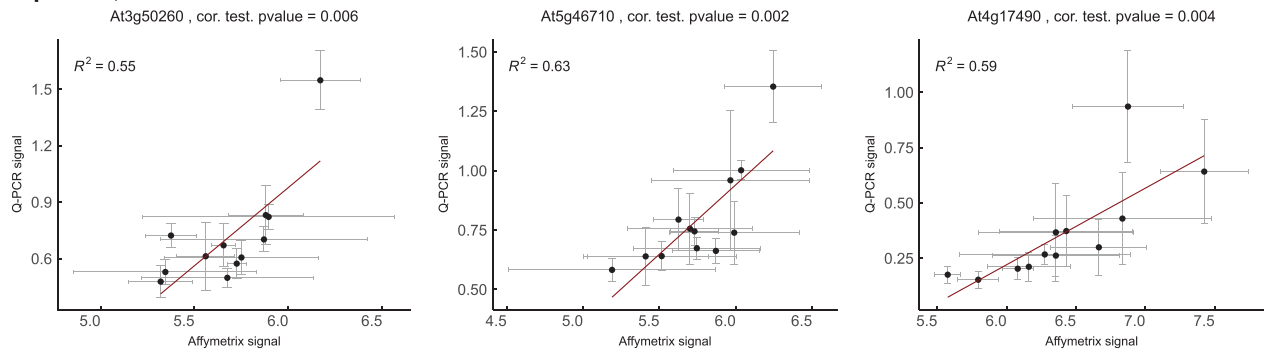
Π -specific, cluster 1 **Π -specific, cluster 2****P-specific, cluster 1****P-specific, cluster 2**

Fig. 5. RT-qPCR validation of osmotic or turgor pressure clusters. The expression of three candidates per list: Π or P, clusters 1 and 2 were investigated by RT-qPCR in three independent biological replicates. The plants were harvested 15 min after transfer into a hydroponic solution, or the solution complemented with 25, 50, 75, or 100 mM NaCl, 50, 100, or 150 mM sorbitol, or 50, 100, 150, or 200 mM EG. For each gene, the normalized RT-qPCR signal (\pm SEM) is expressed as a function of the averaged signal (\pm SEM) obtained from the transcriptome analysis. The *P*-value of a correlation test (Pearson) as well as the linear fit (with its R^2 value) between the average values are indicated for each gene.

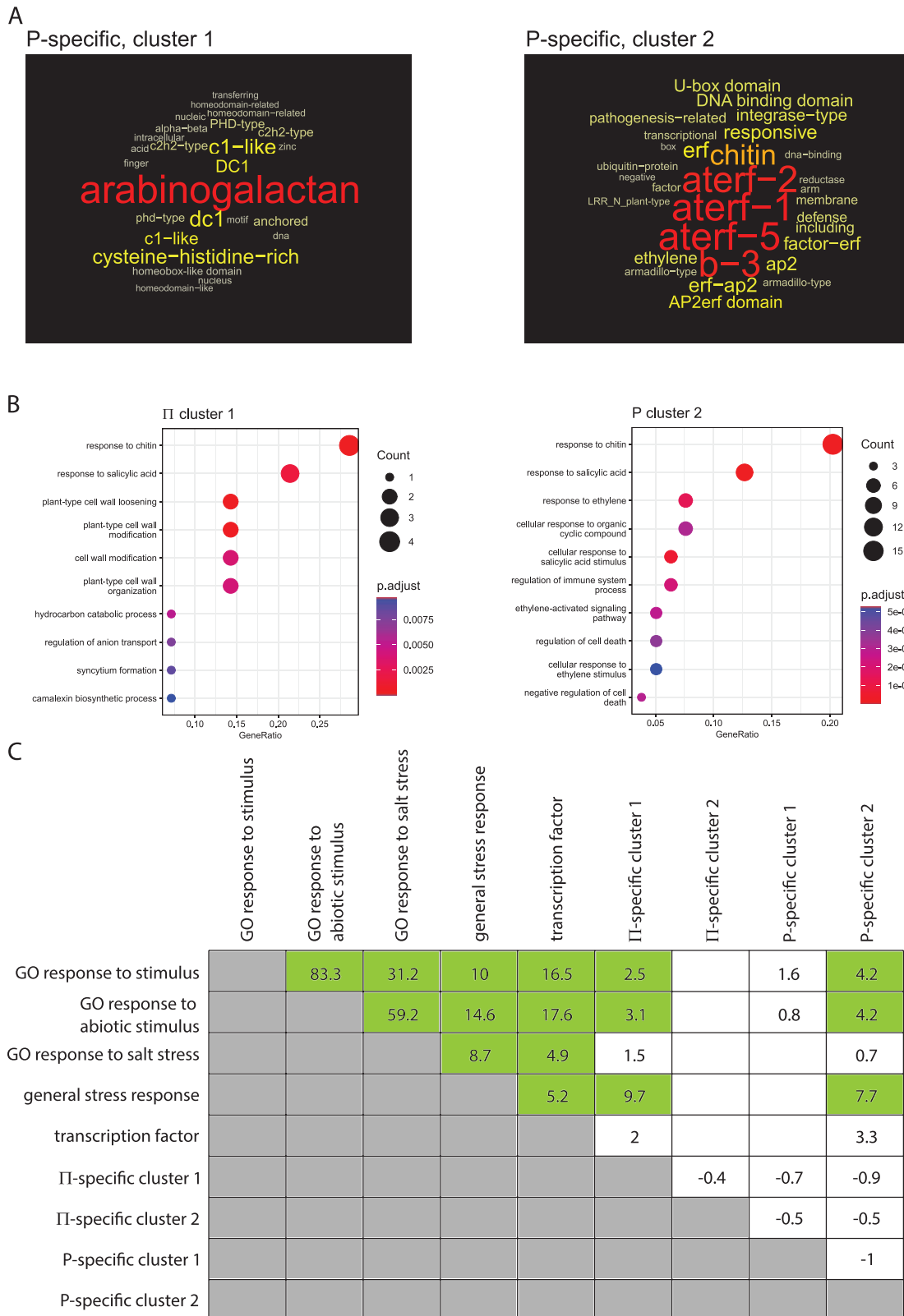


Fig. 6. Classification of the II- and P-correlated genes. (A) Output of the Genecloud semantic analysis for the two clusters showing a significant enrichment. (B) Output of a Gene Ontology analysis for the two clusters showing significant enrichments in GO terms. The GO terms, gene counts for each GO term, and adjusted *P*-value of the enrichment are presented. (C) Degree of overlap (Z-score) between our gene lists and public gene lists related to osmotic stress, the general stress response, and a list of transcription factors, using the Genesect algorithm.

be activated (Bjornson *et al.*, 2021), we also compared our lists with the genes identified as GSR from the work of Ma and Bohnert (2007). In this study, the authors analyzed a collection of transcriptome profiles of plants under various treatments, and highlighted a stress-dependent cluster that could represent cell-level stress responses (Ma and Bohnert, 2007). Π -specific cluster 1 and P-specific cluster 2 showed a significant overlap with the GSR genes, with a greater Z-score than for the previous comparisons (Fig. 6C). This analysis suggests that some of the up-regulated genes that are quantitatively (and inversely) correlated to Π or P belong to a common and early response to stresses.

Finally, our candidates were also compared with a list of genes encoding TFs (Pruneda-Paz *et al.*, 2014), and this showed no significant enrichment in this category of genes (Fig. 6C).

Discussion

This study was designed to improve our comprehension of which component of a water deficit can be perceived by plant roots. For this, we considered both the Π of the bathing solution and the P of root cells as possible input signals (Fig. 1) and used whole-genome transcriptional responses as a readout. The approach was meant to unravel any quantitative relationship between the input signals and responses.

Parameters at the origin of the transcriptional responses

In addition to solute-specific transcriptional responses (Fig. 2D), our study revealed 72 genes whose expression correlated to Π , independently of the solute used (Π -specific clusters, Fig. 3A, C). These results suggest that plant cells have the capacity to sense and transduce the external osmotic potential. Measurement with a cell pressure probe allowed us to also look for correlations between gene expression and the P of root cortical cells. In this approach, the use of EG as a permeating osmoticum was critical to make a distinction between the effects of the solutes on P and Π (Fig. 1E). A total of 179 genes were found to be correlated to P (P clusters 1 and 2; Fig. 3A, D) and suggest that plant cells also have the capacity to specifically sense and respond to the internal pressure. Due to the experimental design and variability, 53 genes could not be assigned to a Π - or P-specific response (Fig. 3A) and would deserve more investigation, in particular with the use of other permeating solutes. Nevertheless, the identification of genes whose expression is quantitatively correlated to all possible combinations (Π or P, up- or down-regulation) highlights the multiplicity of water deficit responses in plant cells. Since we uncovered potentially distinct regulatory mechanisms, our results will help in clarifying studies on mechano- and osmosensing as well as our understanding of plant response to water deficit. For example, turgor recovery upon plant adaptation to low external water potential by solute synthesis/accumulation necessarily implies an uncoupling between P and Π .

Π or P may not be the exact physico-chemical parameters that are genuinely perceived by plants. It has been suggested that, in leaves, accumulation of abscisic acid (ABA) is triggered by a drop in relative water content (RWC) rather than variations in P or Π (Jia *et al.*, 2001; Sack *et al.*, 2018). This distinction was made possible by experiments of leaf dehydration beyond the turgor point loss. In our experiments, turgor was preserved because we anticipated that plasmolysis could trigger distinct responses and, on a crude assumption, the relative change in cell volume ($\Delta V/V$) is linearly correlated to the variation in P (ΔP) according to $\Delta P = \epsilon \cdot \Delta V/V$ where ϵ stands for the cell wall elastic modulus (Hüsken *et al.*, 1978). Thus, we cannot differentiate P or RWC and may use them interchangeably in our interpretations. It would also be interesting to establish whether the internal (intracellular) osmotic potential (Π_{int}) can be sensed and trigger specific transcriptional responses. Because cells behave as osmometers in the presence of NaCl, sorbitol, and PEG, Π_{int} can be expressed, at equilibrium as $\Pi_{\text{int}} = \Pi + P$. Since the effects on Π and P were close (Fig. 1E), those solutes do not allow us to distinguish Π_{int} from Π . EG flux was not completely equilibrated after a 15 min treatment (Fig. 1D), and Π_{int} could be calculated based on equations that describe P variations in cells perfused with a permeating solute (Steudle, 1989). However, experimental variations did not allow us to achieve a sufficient resolution of the hydraulic and solute relaxation phases in cells under EG treatment. Thus, our current study cannot conclude on the ability of root cells to respond to changes in Π_{int} .

Finally, we would like to point out other avenues for interpreting our data. Firstly, Π changes are isotropic in the hydroponic solution, so that all root parts were somewhat homogeneously challenged. In contrast, P, which was only measured in resting cortical cells, close to the root tip, may be different in other cell types. For example, epidermal cells of Arabidopsis roots usually show a P that is ~ 0.1 MPa lower than that of cortical cells (Javot *et al.*, 2003). This difference translates into a shift in the response curve of P to Π and could eventually lead to plasmolysis, in a limited number of cell types, and under the most severe osmotic challenges. Secondly, gene expression data were obtained from a whole-root mRNA extraction, and could mask cell type-specific regulations which are known to exist (Ma and Bohnert, 2007; Dinneny *et al.*, 2008). Finally, the transcriptome status at 15 min is the consequence of regulatory mechanisms that were activated within the first 10 min, where turgor pressure was in a transient status. A more detailed kinetic analysis of the early events would shed light on the gene regulatory networks (Krouk *et al.*, 2010) activated very early by Π or P variations. All these aspects deserve more investigations at the cell, gene, and genome levels, for which our current work provide a well-defined framework.

Mechanisms of mRNA abundance regulation by Π or P

In this study, mRNA abundance, as monitored by microarrays or RT-qPCR, was employed as a readout of water deficit signaling. We realize that changes in abundance of an mRNA

can be due to many molecular aspects acting on their synthesis or decay. We gathered information for two of them: the corresponding promoter activity and its RNA degradation.

We first analyzed the promoters of genes in the Π - or P-specific clusters for the presence of binding sites for putative TFs that could regulate their expression at the transcriptional level (Supplementary Datasets S3, S4). We mostly identified binding sites for TFs belonging to the C2C2dof, ABI3VP1, BBR/BPC, C2H2, ZFHD, and REM families. Members of these families have been involved in a broad range of processes but are not specific for water deficit (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006; Coutand *et al.*, 2009; Noguero *et al.*, 2013; Mantegazza *et al.*, 2014; Taylor-Teeple *et al.*, 2015; Perrella *et al.*, 2018; Lai *et al.*, 2021; Yan *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022). This result corroborates the idea that a multiplicity of TFs can regulate each gene. It also indicates that the short-term responses to both Π and P probably occur through transcriptional regulation, for which we could not identify representative motifs or the critical role of specific TFs.

To address a possible role for mRNA degradation, we referred to a previous work that studied mRNA decay, but under control conditions (Sorenson *et al.*, 2018). With a median $T_{1/2}$ of >100 min at the whole-genome level, we hypothesized that a short $T_{1/2}$ in resting conditions might be a prerequisite for genes we identified as down-regulated within 15 min by the osmotic treatments (Π cluster 2 and P cluster 1; Figs 3, 4). Indeed, the relatively short $T_{1/2}$ calculated for genes of Π -specific cluster 2, together with a promoter activity arrest, is compatible with the regulation we observed. Conversely, this may not be the case for genes of P cluster 1 which showed a median $T_{1/2}$ similar to that of the whole genome. Here, we speculate that on top of a down-regulation of their promoter activity, a reduction in their $T_{1/2}$ should be induced by the osmotic challenges, thereby leading to their rapid down-regulation. Indeed, phosphorylation of proteins of the mRNA decapping complex is regulated by osmotic stresses (Sieburth and Vincent, 2018). The multiplicity of Π or P responses that we identified therefore seems to translate into a similar complexity of mRNA regulation mechanisms, and provides an interesting avenue for further investigation.

Functions regulated by Π or P

Our approach could possibly identify genes which function in Π or P signaling. Semantic and GO enrichments were performed on the gene lists and identified complementary terms. Generic terms retrieved by this approach were mainly associated with transcriptional regulation, responses to abiotic or biotic stimuli, and the cell wall (Fig. 6A, B). It is difficult to extract any precise signaling pathway here since many annotations of these genes are inferred, and some of the terms define diverse functions. For example, arabinogalactan proteins are involved in many processes in roots, including biotic and abiotic responses (Hromadová *et al.*, 2021), and genes of the C1-like

domain superfamily have been associated with various biological/developmental processes, including root epidermal cell differentiation (Bruex *et al.*, 2012). It is also somehow surprising to extract terms related to biotic stresses and defense responses. However, this may result from genes whose annotation originates from, but is not necessarily restricted to, 'biotic' conditions, or whose function was only indirectly inferred. Indeed, our approach uncovers genes associated with the 'short-term', less specific, general stress response (Fig. 6C) (Bjornson *et al.*, 2021). Importantly, we introduce here the notion that there is a quantitative relationship between the mRNA abundance of these genes and physico-chemical parameters (Fig. 3C).

Quantitative responses to physico-chemical parameters

Our study integrates into earlier works focused on the perception of the physico-chemical conditions of cells. We investigated here the dose-dependent effects of physico-chemical parameters on the root transcriptome. Such an approach has been successfully applied in poplar, where it was shown that the abundance of ZFP2 mRNA is correlated to the sum of strains upon stem bending (Coutand *et al.*, 2009), and which initiated great advances on the understanding of thigmomorphogenesis. With respect to water, a study was performed in sunflower where a generalized linear model fed by the expression level of three genes was developed in order to compute integrated parameters such as the pre-dawn water potential or the soil water content (Marchand *et al.*, 2013). There is a gap between obtaining correlations between physico-chemical parameters and gene expression—such as what we present here—and creating biomarkers or biosensors (Jones, 2014). Nevertheless, the genes identified in the four clusters could serve as molecular reporters to investigate the perception and signaling of Π or P. Indeed, this has been successfully achieved for temperature sensing, where the promoter of HSP70 was used as a quantitative reporter of ambient temperature, and allowed discovery of the role of H2A.Z proteins in the temperature-dependent modulation of transcription (Kumar and Wigge, 2010).

Conclusion

Thanks to a combination of physiological techniques and a transcriptome approach, we showed the existence of rapid, specific transcriptional responses to water-related physico-chemical parameters. We propose herein a list of early responsive genes whose mRNA abundance is quantitatively correlated to external Π or to cell P. This list provides potential reporter genes that could serve to elaborate biomarkers of the plant cell water status. This study also paves the way for future dissection of the molecular perception of water deficit in plants, through the identification of how their mRNA abundance is regulated.

Supplementary data

The following supplementary data are available at [JXB online](#).

Table S1. Primer sequences for the RT-qPCR analysis.

Dataset S1. *P*-values of the ANOVAs and probe/AGI correspondence for the Gene1.1 ST array.

Dataset S2. Summary of TF-binding site enrichment in the Π and P clusters.

Dataset S3. Output of the promoter analysis for each cluster.

Dataset S4. Gene list of each cluster, highlighting the genes that were tested further by RT-qPCR.

Acknowledgements

We thank Alexandre Martinière, François Parcy, and François Tardieu for helpful discussions, and Cécile Fizames for help in the promoter analysis. We thank two anonymous reviewers for helping us improve this manuscript.

Authors contributions

YB and GK: conceptualization; AC and YH: performing the research with contributions from TB for physiological measurements; YH, GK, and YB: data analysis with contributions from SR and CM; YB: writing the article with insights from CM. All authors contributed to reviewing the manuscript and agreed to its content.

Conflict of interest

None declared.

Funding

This project was funded through Labex AGRO 2011-LABX-002, project number 1403-012 to YB, in the I-Site Muse framework, coordinated by Agropolis Fondation, and by the CNRS through the MITI interdisciplinary programs ('Turgomap' to YB). YH is supported by the China Scholarship Council. TB is supported by the LabEx NUMEV (ANR-10-LABX-0020) within the I-Site MUSE (ANR-16-IDEX-0006) and by Region Occitanie.

Data availability

The transcriptomic data that support the findings of this study are openly available in Gene Expression Omnibus Series (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) GSE223207.

The code and source files (besides transcriptomic data) used to analyze the data and/or to generate Figs 1–5 can be downloaded from https://github.com/ybinrae/Watermarker_paper1.git.

References

Bailey TL, Johnson J, Grant CE, Noble WS. 2015. The MEME Suite. *Nucleic Acids Research* **43**, W39–W49.

Beauzamy L, Nakayama N, Boudaoud A. 2014. Flowers under pressure: ins and outs of turgor regulation in development. *Annals of Botany* **114**, 1517–1533.

Bjornson M, Pimprikar P, Nürnberger T, Zipfel C. 2021. The transcriptional landscape of *Arabidopsis thaliana* pattern-triggered immunity. *Nature Plants* **7**, 579–586.

Boursiac Y, Protto V, Rishmawi L, Maurel C. 2022. Experimental and conceptual approaches to root water transport. *Plant and Soil* **478**, 349–370.

Bowler MG. 2017. The physics of osmotic pressure. *European Journal of Physics* **38**, 055102.

Bruex A, Kainkaryam RM, Wieckowski Y, et al. 2012. A gene regulatory network for root epidermis cell differentiation in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics* **8**, e1002446.

Carlson M. 2017. Genome wide annotation for *Arabidopsis*. R package version 3.8.2. org.At.tair.db.

Coutand C, Martin L, Leblanc-Fournier N, Decourteix M, Julien J-L, Mouliat B. 2009. Strain mechanosensing quantitatively controls diameter growth and PtaZFP2 gene expression in poplar. *Plant Physiology* **151**, 223–232.

Creelman RA, Zeevaart JAD. 1985. Abscisic acid accumulation in spinach leaf slices in the presence of penetrating and nonpenetrating solutes. *Plant Physiology* **77**, 25–28.

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

Dinneny JR, Long TA, Wang JY, Jung JW, Mace D, Pointer S, Barron C, Brady SM, Schiefelbein J, Benfey PN. 2008. Cell identity mediates the response of *Arabidopsis* roots to abiotic stress. *Science* **320**, 942–945.

Grant CE, Bailey TL. 2021. XSTREME: comprehensive motif analysis of biological sequence datasets. *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2021.09.02.458722>. [Preprint].

Hamant O, Haswell ES. 2017. Life behind the wall: sensing mechanical cues in plants. *BMC Biology* **15**, 59.

Haswell ES, Verslues PE. 2015. The ongoing search for the molecular basis of plant osmosensing. *Journal of General Physiology* **145**, 389–394.

Hromadová D, Soukup A, Tylová E. 2021. Arabinogalactan proteins in plant roots—an update on possible functions. *Frontiers in Plant Science* **12**, 674010.

Hüsken D, Steudle E, Zimmermann U. 1978. Pressure probe technique for measuring water relations of cells in higher plants. *Plant Physiology* **61**, 158–163.

Javot H, Lauvergeat V, Santoni V, et al. 2003. Role of a single aquaporin isoform in root water uptake. *The Plant Cell* **15**, 509–522.

Jia W, Zhang J, Liang J. 2001. Initiation and regulation of water deficit-induced abscisic acid accumulation in maize leaves and roots: cellular volume and water relations. *Journal of Experimental Botany* **52**, 295–300.

Jones HG. 2014. The use of indirect or proxy markers in plant physiology. *Plant, Cell & Environment* **37**, 1270–1272.

Katari MS, Nowicki SD, Aceituno FF, et al. 2010. VirtualPlant: a software platform to support systems biology research. *Plant Physiology* **152**, 500–515.

Knoblauch J, Mullendore DL, Jensen KH, Knoblauch M. 2014. Pico gauges for minimally invasive intracellular hydrostatic pressure measurements. *Plant Physiology* **166**, 1271–1279.

Krouk G, Carré C, Fizames C, Gojon A, Ruffel S, Lacombe B. 2015. GeneCloud reveals semantic enrichment in lists of gene descriptions. *Molecular Plant* **8**, 971–973.

Krouk G, Mirowski P, LeCun Y, Shasha DE, Coruzzi GM. 2010. Predictive network modeling of the high-resolution dynamic plant transcriptome in response to nitrate. *Genome Biology* **11**, R123.

Kumar SV, Wigge PA. 2010. H2A.Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in *Arabidopsis*. *Cell* **140**, 136–147.

- Lai W, Zhu C, Hu Z, Liu S, Wu H, Zhou Y.** 2021. Identification and transcriptional analysis of Zinc Finger-Homeodomain (ZF-HD) family genes in cucumber. *Biochemical Genetics* **59**, 884–901.
- Ma S, Bohnert HJ.** 2007. Integration of *Arabidopsis thaliana* stress-related transcript profiles, promoter structures, and cell-specific expression. *Genome Biology* **8**, R49.
- Mantegazza O, Gregis V, Mendes MA, Morandini P, Alves-Ferreira M, Patreze CM, Nardeli SM, Kater MM, Colombo L.** 2014. Analysis of the arabidopsis REM gene family predicts functions during flower development. *Annals of Botany* **114**, 1507–1515.
- Marchand G, Mayjonade B, Varès D, et al.** 2013. A biomarker based on gene expression indicates plant water status in controlled and natural environments. *Plant, Cell & Environment* **36**, 2175–2189.
- Maurel C, Nacry P.** 2020. Root architecture and hydraulics converge for acclimation to changing water availability. *Nature Plants* **6**, 744–749.
- Noguero M, Atif RM, Ochatt S, Thompson RD.** 2013. The role of the DNA-binding One Zinc Finger (DOF) transcription factor family in plants. *Plant Science* **209**, 32–45.
- O'Malley RC, Huang SC, Song L, Lewsey MG, Bartlett A, Nery JR, Galli M, Gallavotti A, Ecker JR.** 2016. Cistrome and epicistrome features shape the regulatory DNA landscape. *Cell* **165**, 1280–1292.
- Pérez-Silva JG, Araujo-Voces M, Quesada V.** 2018. nVenn: generalized, quasi-proportional Venn and Euler diagrams. *Bioinformatics* **34**, 2322–2324.
- Perrella G, Davidson MLH, O'Donnell L, Nastase A-M, Herzyk P, Breton G, Pruneda-Paz JL, Kay SA, Chory J, Kaiserli E.** 2018. ZINC-FINGER interactions mediate transcriptional regulation of hypocotyl growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **115**, E4503–E4511.
- Pruneda-Paz JL, Breton G, Nagel DH, Kang SE, Bonaldi K, Doherty CJ, Ravelo S, Galli M, Ecker JR, Kay SA.** 2014. A genome-scale resource for the functional characterization of *Arabidopsis* transcription factors. *Cell Reports* **8**, 622–632.
- Ristova D, Carré C, Pervent M, et al.** 2016. Combinatorial interaction network of transcriptomic and phenotypic responses to nitrogen and hormones in the *Arabidopsis thaliana* root. *Science Signaling* **9**, rs13.
- Sack L, John GP, Buckley TN.** 2018. ABA accumulation in dehydrating leaves is associated with decline in cell volume, not turgor pressure. *Plant Physiology* **176**, 489–495.
- Scharwies JD, Dinneny JR.** 2019. Water transport, perception, and response in plants. *Journal of Plant Research* **132**, 311–324.
- Sieburth LE, Vincent JN.** 2018. Beyond transcription factors: roles of mRNA decay in regulating gene expression in plants. *F1000Research* **7**, F1000 Faculty Rev-1940.
- Sorenson RS, Deshotel MJ, Johnson K, Adler FR, Sieburth LE.** 2018. *Arabidopsis* mRNA decay landscape arises from specialized RNA decay substrates, decapping-mediated feedback, and redundancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **115**, E1485–E1494.
- Steudle E.** 1989. Water flow in plants and its coupling to other processes: an overview. *Methods in Enzymology* **174**, 183–225.
- Taylor-Teeple M, Lin L, de Lucas M, et al.** 2015. An *Arabidopsis* gene regulatory network for secondary cell wall synthesis. *Nature* **517**, 571–575.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F.** 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3**, research0034.1.
- Verslues PE, Bailey-Serres J, Brodersen C, et al.** 2023. Burning questions for a warming and changing world: 15 unknowns in plant abiotic stress. *The Plant Cell* **35**, 67–108.
- Wang Z, Wong DCJ, Chen Z, Bai W, Si H, Jin X.** 2022. Emerging roles of plant DNA-binding with one finger transcription factors in various hormone and stress signaling pathways. *Frontiers in Plant Science* **13**, 844201.
- Wu T, Hu E, Xu S, et al.** 2021. clusterProfiler 4.0: a universal enrichment tool for interpreting omics data. *The Innovation* **2**, 100141.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 781–803.
- Yan J, Liu Y, Yang L, He H, Huang Y, Fang L, Scheller HV, Jiang M, Zhang A.** 2021. Cell wall β -1,4-galactan regulated by the BPC1/BPC2-GALS1 module aggravates salt sensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant* **14**, 411–425.