

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE MONTPELLIER SUPAGRO

En Biologie Intégrative, Diversité et Amélioration des Plantes

École doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau

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

Étude des facteurs de transcription impliqués dans la signalisation de l'azote/nitrate

Présentée par Alaeddine SAFI

Le 27 mars 2018

Sous la direction de Benoit LACOMBE & Gabriel KROUK

Devant le jury composé de

Mme Gwyneth INGRAM , DR CNRS, RDP Lyon
M. Andreas NIEBEL , DR , CNRS, LIPM Toulouse
Mme Anne KRAPP , DR , INRA, IJPB Versailles
M. Loïc LEPINIEC , DR , INRA, IJPB Versailles
M. Benoit LACOMBE , DR , CNRS, B&PMP Montpellier
M. Gabriel KROUK , CR , CNRS, B&PMP Montpellier

Rapporteuse
Rapporteur
Examinatrice
Président du jury
Directeur de thèse
Codirecteur de thèse



Remerciements

J'adresse mes remerciements à tous qui ont contribué de près ou de loin à ce travail, en particulier à :

Benoit Lacombe, mon directeur de thèse, de m'avoir accueilli au sein de l'équipe et d'avoir suivi mon parcours de doctorant pendant 3 ans, merci pour les conseils et le soutien.

Gabriel Krouk, d'avoir pensé à moi quand j'étais à Sfax et de m'avoir proposé de réaliser cette thèse sous sa codirection, merci pour ta confiance en moi, ton encouragement et pour les discussions enrichissantes que j'ai pu avoir avec toi.

Tous les membres qui ont participé à mes comités de thèse : Frédéric Gaymard, Christophe Perin, Hatem Rouached et Stéphane Mari.

Anne Krapp, d'avoir été un membre permanent de mon comité de thèse et d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Gwyneth Ingram, Andreas Niebel et Loïc Lepiniec, d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Anna, de m'avoir appris les bonnes pratiques du labo pendant mon M2 et pour son aide durant ma thèse.

Arthur et Mushtak, d'avoir partagé les bons et les mauvais moments de la thèse et pour les longues discussions qu'on a pu avoir.

Tous les membres de l'équipe HoNuDe : Chanchan, Sandrine, Wojciech, Mélanie, Nadia, Eléonore, Amandine, Virginia, Émilie, David...

Jérémy, Rön, Gabriella, Toucheu et aux autres thésards et jeunes et du labo, pour les bons moments passés pendant les pauses du midi.

Alex et Carine, pour leur aide et conseils dans mes manips de microscopie.

Tous les autres collègues de B&PMP.

Boutheina, pour son soutien durant toute la période de la thèse, d'avoir été toujours serviable et disponible, et surtout de m'avoir supporté durant la période de rédaction de m'avoir aidé à faire les figures de la thèse et même des présentations.

Mahdi, Mohamed, Houssein et Mohsen pour les moments partagés, et surtout Alaeddine pour son soutien durant la période de rédaction.

Bilel, Chams, Nibras, Yassin, Lassâad, Hamed, Moez, Marwa et Ines... pour leur encouragement.

Toute ma famille, notamment mes parents, merci pour votre soutien, merci d'être aussi proches que possible.

Liste des abréviations

Chapitre 1 : Introduction bibliographique	1
1. La nutrition azotée des plantes	2
1.1. Importance de l'azote : enjeux agronomiques et écologiques	2
1.2. Prélèvement de l'azote par les plantes, considérations physiologiques	4
1.3. Les transporteurs de nitrate	5
1.4. Assimilation et métabolisme de l'azote	8
1.5. Adaptation des plantes à la variation en N	9
1.6. Les acteurs moléculaires dans les voies de signalisation	11
1.6.1. Les acteurs moléculaires de la réponse primaire au nitrate (PNR)	11
1.6.2. Les acteurs de la réponse à la carence en N (NSR)	14
2. Interaction des signaux N et P	16
2.1. La nutrition phosphatée des plantes	16
2.2. L'interaction N/P	17
3. Les espèces réactives de l'oxygène	19
3.1. Généralités	19
3.2. Les sièges de production des ROS	19
3.3. Systèmes antioxydants et stress oxydatif	20
3.4. Le rôle signalétique des ROS	21
4. Les facteurs de transcription	23
4.1. Généralités	23
4.2. La famille GARP	24
4.3. Études des facteurs de transcription: détails sur le TARGET	44
5. Objectifs du travail	45
5.1. Objectifs de l'étude du rôle des NLPs dans la transduction du signal nitrate	45
5.2. Objectifs de l'étude des facteurs de transcription de la sous-famille HRS1/HHO	46
5.2.1. Étude de l'interaction SPX/HRS1, un carrefour entre la voie de transduction du phosphate et celle du nitrate?	46
5.2.2. Rôle des facteurs de transcription de la famille HHO dans la réponse des plantes au N	46
5.2.3. Quel rôle pour la forme non nucléaire d'HRS1?	47

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes	48
1. Lignées et souches utilisés	49
2. Constructions moléculaires pour l'obtention des plantes transgéniques	49
2.1. Clonage	49
2.2. Oméga PCR	50
2.3. Transformation des bactéries	50
2.4. Extraction des plasmides et séquençage	50
2.5. Transformation des plantes	51
2.6. Croisement des plantes	51
2.7. Extraction de l'ADN génomique	51
2.8. PCR	52
3. Conditions de culture et traitements	52
3.1. Culture en serre	52
3.2. Cultures hydroponiques	52
3.3. Cultures <i>in vitro</i>	53
3.3.1 Culture en Phytatrays™ (hydroponie stérile)	53
3.3.2. Culture en boîtes de Pétri	53
4. Mesure de l'influx racinaire de NO ₃ ⁻	54
4.1. Marquage au ¹⁵ NO ₃	54
4.2. Mesure du ¹⁵ N par spectrométrie de masse	54
5. Analyse de l'expression des gènes	55
5.1. Extraction des ARN totaux	55
5.2. Rétro-transcription des ARN messagers	55
5.3. Quantification de l'accumulation des transcrits par q-PCR	56
6. Extraction des protéines racinaires et analyse par western blot	56
7. Dosage enzymatique des ROS	57
8. TARGET	57
8.1. Construction et purification du vecteur pBeaconRFP_GR-FT sur gradient de CsCl	57
8.2. Isolement des protoplastes	58
8.3. Transformation des protoplastes	59
8.4. Traitements des protoplastes et tri cellulaire	59
8.5. Marquage des ARNs et hybridation des puces	59

8.6. Analyse bioinformatique et statistique	60
8.6.1. <i>Analyse du transcriptome</i>	60
8.6.2. <i>GeneCloud</i>	60
9. Production et purification des protéines recombinantes	60
9.1. Cultures bactériennes	60
9.2. Lyse des bactéries et extraction des protéines	61
9.3. Purification de la protéine recombinante	61
9.4. Analyse des protéines sur gel de polyacrylamide dénaturant SDS-PAGE	62
10. Retard sur gel ou EMSA	62
10.1. Choix et hybridation des oligonucléotides	62
10.2. Analyses de retard sur gel	62
11. Observation microscopique d'HRS1-GFP et ses lignées dérivées	63
11.1. Criblage	63
11.2. Co-localisation	63
12. Outils bioinformatiques	64
Chapitre 3: Étude de l'interaction SPX/HRS1, un carrefour entre la voie de transduction du phosphate et celle du nitrate?	65
1. Introduction	66
2. Résultats et discussion	67
3. Conclusion et perspectives	69
Chapitre 4: Rôle des facteurs de transcription de la famille HHO et des ROS dans la réponse des plantes à la carence en azote	71
1. Introduction et contexte	72
2. Résultats et discussion	73
Article	73
3. Conclusion et perspectives	109
Chapitre 5: HRS1 est-il un FT qui régule à la fois des gènes nucléaires et des gènes plastidiaux?	110
1. Introduction et contexte	111
2. Résultats et discussion	113
3. Conclusion et perspectives	118

Chapitre 6: Conclusion générale	119
1. Vers un contrôle “à la carte” des transporteurs via l'édition de genes?	120
2. Un rôle fondamental des ROS dans le contrôle de la nutrition?	123
Annexe	126
1. Liste des cibles directes d'HRS1 liées aux ROS (Medici et al., 2015).	126
2. Liste des cibles directes d'HRS1 liées aux ROS (Safi, submitted).	128
Bibliographie	131
Résumé	152
Abstract	153

Liste des abréviations

$^1\text{O}_2$: oxygène singulet

3'-UTR : 3' -Untranslated Transcribed Region

β -ME : β -mercaptoéthanol

λ : longueur d'onde

A : Adénine

ABA : acide abscissique

ABI : Abscissic Acid-Insensitive

ACT : actine

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AGI : Arabidopsis Genome Initiative

ALMT : Aluminum-activated Malate Transporters

AMT : ammonium transporter

Amplex Red : 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxasine

ANR1 : Arabidopsis Nitrate Regulated 1

APL : Altered Phloem Development

APRR2 : Arabidopsis Pseudo-Response Regulator 2

APX : Ascorbate Peroxydase

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

Asn : Asparagine

ASN1 : Asparagine Synthase 1

ATXR5 : Arabidopsis Trithorax-Related Protein 5

NSR : Nitrate Starvation Response

ASPGA1 : Asparaginase A1

ASPG1 : Asparaginase B1

ATP : adénosine triphosphate

BET : Bromure d'éthidium

BSA : Bovine Serum Albumin

BTB : Born To Bind

BT : BTB and TAZ domain protein
bZIP1 : basic leucine-ZIPPER 1
C : Carbone / Cytosine
CaMV : Cauliflower Mosaic Virus
CAT : catalase
CBL : calcineurin B-like protein
CCD : coupled charged device
CDT1 : Cdc10-Dependent Transcript 1
cHATS : constitutive HATS
ChIP- seq : Chromatin immunoprecipitation- sequencing
CHL1 : Chlorate Resistant 1
CHX : Cycloheximide
CIPK : CBL- Interacting Protein Kinase
Cl⁻ : chlorure
CLA : clathrine
cLATS : constitutive LATS
CLC : Chloride Channel Family
Col : Ecotype Colombia
Cp : crossing point
CPK : calcium-dependent protein kinase
CPSF30-L : Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor 30
CRE : Cis-Regulatory Element
CT: Chloroplast Targeting
Cyt : cytochrome
DAP-seq : DNA Affinity Purification-sequencing
DCFDA : 2, 7 –Dichlorofluorescein Diacetate
DEX : Dexaméthasone
DHAR : Déhydroascorbate réductase
DHE : Dihydroethidium
DNase : Désoxyribonucléase
dNTP : désoxyribonucléotide Triphosphate
DMF : Diméthylformamide
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DO : Densité Optique

DTT : Dithiothreitol

DPI : DiPhenylene Iodonium

E. coli : *Escherichia coli*

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique

EMSA : Electrophoretic Mobility Shift Assay

F : Forward strand

FACS : Fluorescent Activated Cell Sorter

FAD : Flavine adénine dinucléotide

FITC : Fluorescein Isothiocyanate

FT : Facteur de Transcription

G : Guanine

G6PD : glucose-6-phosphate-déshydrogénase

GARP : GOLDEN2, ARR-B, Psr1

GDH : glutamate déshydrogénase

GDPD1 : Glycerophosphodiester phosphodiesterase 1

GFP : Green Fluorescent Protein

GLK : Golden2-Like

Gln : glutamine

Glu : glutamate

G^{me} : Guanine méthylée

GOGAT : Glutamine oxoglutarate aminotransferase

GPT2 : Glucose-6-Phosphate/Phosphate Translocator 2

GPX : Glutathion Peroxydase

GS : glutamine synthase

GSNO : S-nitrosoglutathion

GST : Glutathion-S-Transférase

GTP : guanosine triphosphate

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HATS : High Affinity Transport System

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HHO : HRS1 HOmologous

HOCl : Acide hypochloreux

HPF : Hydroxyphenyl Fluorescein

HRP : Horseradish Peroxidase

HRS1 : Hypersensitive to low Pi-elicited primary Root Shortening 1
HSF : Heat Shock Factor
HSP : Heat Shock Protein
IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
iHATS : inducible HATS
iLATS : inducible LATS
IPS1 : Induced by Phosphate Starvation 1
IPT3 : Isopentenyl Transferase 3
KI : Iodure de Potassium
KO : Knock-Out
LATS : Low Affinity Transport System
LB : Lisogeny Broth
LBD : LoB Domain-containing protein
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases
MDHAR/ MDAR : monodéhydroascorbate réductase
MES : acide 2-(N-morpholino)-propane sulfonide
MEP : methylammonium permease
MFP1 : Mar Binding Filament-Like Protein 1
miR : micro RNA
MS : Murashige et Skoog
mut-ATG : mutation du codon ATG
MYR : Myb-Related Protein
N : azote
 N_2 : diazote
 Na^+ : sodium
 NAD^+ : nicotinamide adénine dinucléotide
 $NADP^+$: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NAXT1 : Nitrate Excretion Transporter1
NAR2 : Nitrate Assimilation Related 2
NBT : Nitro Blue-Tetrazolium
NFYA : Nuclear Transcription Factor Y Subunit Alpha
 NH_3 : ammoniac
 NH_4^+ : ammonium
NIGT1 : Nitrate-Inducible, GARP-type Transcriptional Repressor 1

NiR : nitrite réductase
NIM1 : Non-Inducible IMMunity 1
NLA : Nitrogen Limitation Adaptation
NLP : Nin Like Protein
NLS : Nuclear Localization Signal
 NO_2^- : nitrite
 NO_3^- : nitrate
NOS : oxyde nitrique synthase
NPF : NRT1/PTR Family
NPR1 : Nonexpresser of PR genes 1
NR : nitrate réductase
NRE : Nitrate-Responsive cis-Element
NRG2 : Nitrate Regulatory Gene 2
NRT : Nitrate transporter
NSR : Nitrogen Starvation Response
NUE : Nitrogen Use Efficiency
OST1 : Open Stomata 1
P : Phosphore
P1BS : PHR1-Binding Site
PAGE : Polyacrylamide gel electrophoresis
PAL : Phénylalanine AmmoniaLyase
pb : paire de bases
PBS : Phosphate Buffered Saline
PCR : Polymerase chain reaction
PEG : Polyéthylène Glycol
pH : potentiel Hydrogène
PHL1 : PHR1-Like 1
PHO2 : PHOSPHATE 2
PHR1 : Phosphate Starvation Response 1
pHRS1 : promoteur d'HRS1
PHT : PHosphate Transporter
Pi : Phosphate
PNR : Primary Nitrate Response
 PO_4^{3-} : Phosphate

PP2A : Protein Phosphatase 2A
PP2CA : Protein Phosphatase 2CA
PR : Pathogenesis-Related
PrxR : Peroxiredoxin
PSI : Photosystème I
PSII : Photosystème II
PSR : Phosphate Starvation Response
Psr1 : Phosphorus starvation response 1
PTM : PHD Type Transcription Factor with Transmembrane Domains
PTR : Peptide Transporter
PTS : Plastid Targeting Sequence
PVDF : PolyVinylidene Fluoride
q-PCR : PCR quantitative
R : Reverse strand
RBOH : Respiratory Burst Oxidase Homolog Protein
RE : Réticulum Endoplasmique
RFP : Red Fluorescent Protein
Rh : Rhesus
ROH : aliphatic alkoxyl radical
ROOH : d'hydroperoxyde
ROS : Reactive Oxygen Species
RNase : Ribonucléase
RT-PCR : Reverse transcription polymerase chain reaction
S.meliloti : *Sinorhizobium meliloti*
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
SLAC : Slow Anion Associated Channel
SLAH : Slow Anion Associated Channel Homolog
SNO : S-Nitrosothiol
 SO_4^{2-} : Sulfate
SOC : Super Optimal broth with Catabolite repression
SOD : superoxyde dismutase
SPL9 : Squamosa Promoter-binding-Like protein 9
SPX : SYG1/Pho81/XPR1
SSC : Saline Sodium Citrate

STEP1 : Single-Stranded Telomere-Binding Protein 1

T : Thréonine/Thymine

T101 : Thréonine 101

TAE : Tris, Acétate, EDTA

TARGET : Transient Assay Reporting Genome-wide Effects of Transcription factors

TB : Terrific Broth

TBE : Tris, Borate, EDTA

TCP : Teosinte branched 1, Cycloidea, PCF

TE : Tris-EDTA

TGA : TGACG-BINDING FACTOR

TGS : Tris-Glycine-SDS

TGE : Tris-Glycine-Ethanol

Tm : melting temperature

Tris : tris-(hydroxymethyl)-aminoéthane

UPB1 : UPBEAT1

UV : ultra-violet

Y1H : Yeast one-Hybrid

Chapitre 1 : Introduction bibliographique

1. La nutrition azotée des plantes

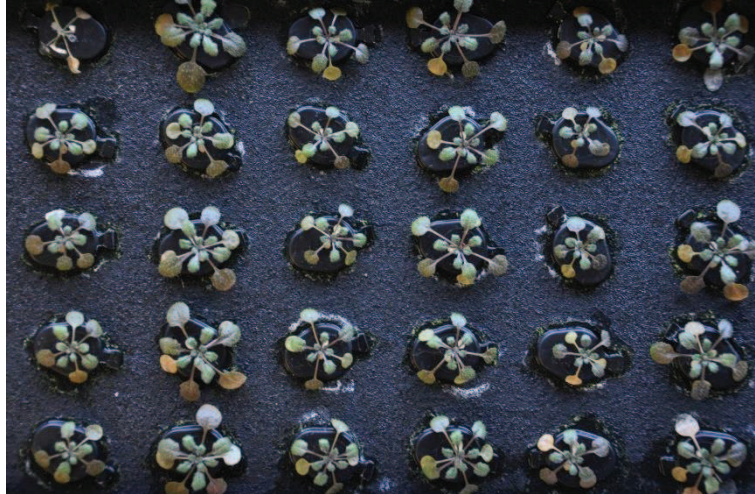
1.1. Importance de l'azote : enjeux agronomiques et écologiques

L'azote (N) est un macronutriment essentiel aux êtres vivants puisqu'il est un élément majeur de la matière organique. Il entre dans la structure d'importantes molécules telles que : les acides nucléiques (ADN, ARN, ...), les protéines, les alcaloïdes, les coenzymes ($\text{NADH,H}^+/\text{NAD}^+$, $\text{NADPH,H}^+/\text{NADP}^+$, $\text{FADH}_2/\text{FAD}..$), les molécules de transfert d'énergie (ATP, GTP..), les vitamines, les hormones et neurotransmetteurs (cytokinines, thyroxine, dopamine..), les polyamines (spermine, spermidine..) ou encore les molécules hémiques (hémoglobine, chlorophylles..). Les plantes étant la voie principale d'entrée de l'azote dans les chaînes alimentaires, il est donc crucial d'étudier leur nutrition azotée pour comprendre une étape clé de notre nutrition et de notre survie.

Le diazote (N_2) est la source de N la plus abondante dans la nature. Ce gaz représente 78 % du volume de l'atmosphère terrestre. Malheureusement, le N_2 n'est utilisé que par quelques espèces de procaryotes appelées bactéries diazotrophes. Ces dernières ont la capacité de transformer le N_2 en NH_3 (rapidement réduit en NH_4^+) grâce à un complexe enzymatique appelé complexe nitrogénase (Rees and Howard, 2000). Seulement les plantes capables d'entrer en symbiose avec ces bactéries fixatrices d'azote, peuvent bénéficier de cette source d'azote. Cette relation symbiotique fait intervenir plusieurs couples de symbiotes dont le plus connu est le couple Rhizobium-Légumineuses (Bauer, 1981).

Chez la grande majorité des plantes, l'azote peut représenter jusqu'à 8-9 % de la matière sèche. Elles sont capables d'utiliser plusieurs sources d'N organiques (urée, acides aminés, acides nucléiques, peptides) (Nasholm et al., 2009; Paungfoo-Lonhienne et al., 2008) et minérales (nitrate, ammonium) (von Wirén et al., 1997). La plupart des espèces végétales utilisent le nitrate (NO_3^-) et l'ammonium (NH_4^+) du sol comme source majeure d'azote (Crawford and Glass, 1998). Ils représentent ensemble plus de 80 % des ions minéraux prélevés du sol (Marschner, 2012). Si l' NH_4^+ constitue la forme d'azote privilégiée pour les plantes ligneuses, il est cependant toxique (syndrome ammoniacal) pour la majorité des plantes herbacées s'il est fourni seul (Morot-Gaudry, 1997). Une combinaison de NH_4^+ et de NO_3^- constitue alors une solution alternative pour une croissance optimale des plantes (Salsac et al., 1987) et une meilleure efficacité d'utilisation d'azote (NUE) (Kronzucker et al., 1999). Contrairement au NH_4^+

A



B



Figure 1.1. Effet de la disponibilité de l'azote sur la croissance des plantes.

Plantules d'*Arabidopsis* cultivées en hydroponie pendant 6 semaines **(A)** en absence ou **(B)** en présence de 0,5 mM NH_4NO_3 .

qui est souvent adsorbé aux colloïdes argileux, le NO_3^- est généralement beaucoup plus disponible dans la solution du sol (von Wiren et al., 2000). Ceci fait donc du NO_3^- la principale source d'azote pour les plantes herbacées (Crawford and Glass, 1998). Cependant, cette propriété fait du nitrate un élément très mobile et facilement lessivable par les eaux de pluie. D'où la fluctuation spatio-temporelle de sa disponibilité dans les sols qui se traduit par de grandes variabilités de la concentration du sol en NO_3^- , entre 10 μM et 10 mM (Miller et al., 2007). Ces variations de la nature et de la disponibilité des différentes sources d'azote, constituent donc un facteur limitant de la croissance des plantes. En effet une privation d'azote plus ou moins longue peut conduire à un défaut de croissance, des phénomènes de chloroses, voire à la sénescence de la plante (Tschoep et al., 2009) (Figure 1.1).

Ainsi, l'homme a compris depuis des siècles la nécessité de fournir de l'azote pour augmenter la productivité et la rentabilité des produits agricoles. Pour cela, il a eu recours aux engrais basés essentiellement sur les déchets animaux et végétaux (fumier, compost...). Ce n'est qu'en 1909 que Fritz Haber et Carl Bosch ont réussi à révolutionner le cycle de l'azote sur la planète en permettant la fixation industrielle du diazote atmosphérique. Le procédé Haber-Bosch a permis ainsi une production massive d'engrais azoté. Il est considéré comme une des plus grandes inventions du XX^{ème} siècle (Smil, 1999). Le mécanisme consiste à réduire le N_2 en NH_3 par catalyse chimique puis en NH_4^+ avant d'être oxydé en acide nitrique. Depuis, le mélange de ces deux dernières formes d'azote (NH_4^+ et NO_3^-) constitue l'engrais le plus utilisé en agriculture (Morot-Gaudry, 1997).

On estime que, grâce à cette nouvelle technologie, la production mondiale en céréales a doublé entre 1960 et 2000, tandis que l'utilisation des engrais azotés a été multipliée par huit (Tilman et al., 2002). Un rapport du FNDAE (Fonds National pour le Développement des Adductions d'Eau potable) affirme que 2 500 000 tonnes/an d'engrais azotés sont répandues sur les cultures en France (Ratel, 2002). Comme, la teneur en azote des récoltes n'a augmenté que légèrement, une bonne partie des engrais qui ne sont pas assimilés par les plantes sera lessivée dans les nappes phréatiques par les eaux de pluie, essentiellement sous forme de nitrate (Tilman et al., 2002).

L'accumulation du nitrate dans les cours d'eau, les lacs et les bassins versants, où les eaux sont lentement renouvelées, est la cause majeure des phénomènes d'eutrophisation. En plus de la pollution aquatique, les engrais azotés représentent aussi une source de pollution atmosphérique à cause de leur volatilisation sous forme d'oxydes gazeux (N_xO_y) et de NH_3 (Gruber and Galloway, 2008). Par ailleurs, le coût énergétique du processus de production industrielle des engrais est très élevé (plus de 1 % de la production mondiale d'énergie) (Kitano

et al., 2012). L'optimisation de la fertilisation azotée des agrosystèmes représente alors un défi majeur sur le plan agricole mais aussi écologique. Celle-ci est basée principalement sur l'adéquation de l'utilisation des fertilisants (Kramer et al., 2006), et l'amélioration de l'efficacité d'utilisation d'azote (la NUE, ou Nitrogen Use Efficiency) chez les plantes cultivées (Garnett et al., 2009; Pathak, 2008). Cette dernière est étroitement liée au prélèvement et au transport racinaire de l'azote (Pathak, 2008) qui est un des axes de recherche majeurs de la présente thèse.

1.2. Prélèvement de l'azote par les plantes, considérations physiologiques

Le prélèvement de l'azote et des nutriments de façon générale se fait principalement par les racines. Même si l'urée peut-être appliquée sur les parties aériennes des plantes aux champs, cette molécule est rapidement transformée en NH_4^+ puis en NO_3^- par l'activité uréase et nitrifiante des microorganismes du sol (Marschner, 1995). Les ions NH_4^+ et NO_3^- absorbés du sol sont transportés tout au long des racines par les vaisseaux xylémiens vers le reste des organes de la plante. La variation de leurs concentrations dans la solution du sol a contraint la plante à développer des mécanismes de transport adaptés. On distingue deux flux opposés entre les cellules racinaires et le milieu extérieur; un influx et un efflux (Crawford and Glass, 1998). Il est souvent observé que l'efflux ne représente qu'une faible proportion du transport (Delhon et al., 1995b) et que l'altération du prélèvement est principalement due à des variations d'influx (Clarkson and Lüttge, 1991; Lee, 1993).

Il existe deux systèmes d'influx d'azote, un système de transport à haute affinité (HATS, High Affinity Transport System) et un à faible affinité (LATS, Low Affinity Transport System). Bien que le premier possède une haute affinité au N (K_m 10-100 μM), sa capacité de transport reste faible et saturable à de faibles concentrations. Le LATS ($K_m > 0,5 \text{ mM}$) par contre se caractérise par sa faible affinité et par sa grande capacité de transport. Ça contribution devient significative pour des concentrations externes de N élevées (mM) (Siddiqi et al., 1989; von Wiren et al., 2000; Wang et al., 1993). Dans le cas du NO_3^- chacun de ces deux systèmes de transport est décomposé en deux types de régulation; le premier est constitutif alors que le second est inductible par le NO_3^- lui-même. On distingue alors iHATS, cHATS, iLATS et cLATS (Crawford and Glass, 1998; von Wiren et al., 2000).

Des mesures des concentrations intracellulaires en NO_3^- et du potentiel de membrane indiquent que son influx s'effectue majoritairement contre son gradient de potentiel

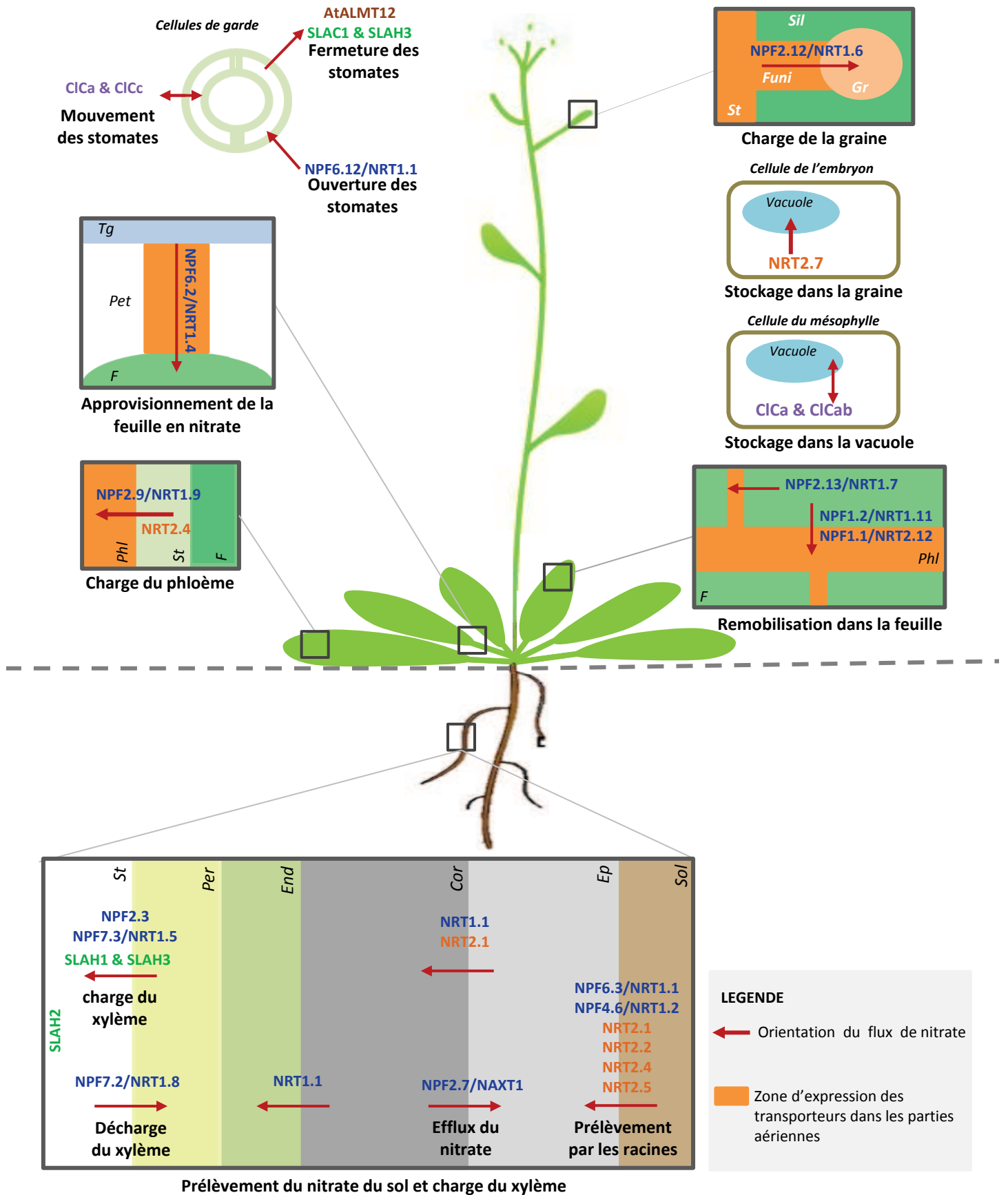


Figure 1.2. Les transporteurs de nitrate et leurs rôles chez Arabidopsis.

Les transporteurs de nitrate de la famille NPF/NRT1 (en bleu), NRT2 (en orange), SLAC1/SLAH (en vert), CIC (en violet) et ALMT (en marron).

Cor : cortex, End : Endoderme, Ep : épiderme, F : feuille, Funi : Funicule, Gr : graine, Per : péricycle, Pet : pétiole, Phl : phloème, Sil : silique, St : Stèle, Tg : tige.

électrochimique (Miller and Smith, 1996). Ce qui implique que le transport du NO_3^- se fait grâce à un mécanisme de transport actif. Ceci est probablement assuré par un cotransport de 2 protons H^+ et un ion NO_3^- (Crawford and Glass, 1998; Glass et al., 1992).

Le mécanisme de transport du NH_4^+ est quant à lui moins compris. Celui-ci pourrait se réaliser *via* une voie symport NH_3/H^+ (Mayer et al., 2006; Mayer and Ludewig, 2006) parfois considérée comme une voie uniport de NH_4^+ (Ludewig et al., 2002), ou une voie symport de NH_4^+/H^+ (Ortiz-Ramirez et al., 2011). Un mécanisme antiport de NH_4^+/H^+ a même été décrit chez les mammifères (Westhoff et al., 2002). Le transport de NH_4^+ se fait généralement grâce à des transporteurs de type AMT/MEP/Rh (Giehl et al., 2017; Loque and von Wiren, 2004; Ludewig et al., 2007).

Les transporteurs de NO_3^- étant des objets d'études essentiels de cette thèse (en particulier chapitre 4), seront décrits plus en détails dans la partie suivante.

1.3. Les transporteurs de nitrate

Les transporteurs impliqués dans le prélèvement, la distribution ou le stockage du NO_3^- chez *Arabidopsis* sont répartis en 5 familles (Noguero and Lacombe, 2016) : La famille anciennement appelée NRT1 ou PTR et renommée récemment NPF par (Leran et al., 2014), la famille NRT2 (Krapp et al., 2014; Orsel et al., 2002), la famille SLAC1/SLAH (Hedrich, 2012), la famille CLC (Barbier-Brygoo et al., 2011) et la famille ALMT (ALMT12) (Sasaki et al., 2010). Leurs rôles et spécificités sont décrits ci-dessous et résumés dans la figure 1.2.

La famille NPF comporte 53 membres chez *Arabidopsis* impliqués entre autres dans le transport de nitrate, du nitrite, des peptides et des hormones (Corratge-Faillie and Lacombe, 2017). Un criblage au chlorate (ClO_3^-) a permis d'identifier des mutants résistants à cet analogue toxique du NO_3^- . Certains mutants nommés *chl1*, sont affectés dans le gène *CHL1/NRT1.1/NPF6.3*. C'est par cette approche que le premier transporteur de NO_3^- chez les plantes a été identifié (Tsay et al., 1993). Initialement attribué au LATS (Tsay et al., 1993), NRT1.1 possède en réalité une double affinité pour le NO_3^- (Liu and Tsay, 2003). Ainsi, à faibles concentrations de NO_3^- , il est phosphorylé par la kinase CIPK23 sur le résidu T101 ce qui lui confère une forte affinité pour le NO_3^- . Inversement il présente une faible affinité face à de fortes concentrations de nitrate lorsqu'il est déphosphorylé (Liu et al., 1999). NRT1.2/NPF4.6 identifié par homologie de séquence avec NRT1.1/NPF6.3, fonctionne au sein du cLATS (Huang et al., 1999). Ces deux transporteurs sont les seuls membres dans cette famille impliqués dans le prélèvement racinaire du NO_3^- dans le sol (Noguero and Lacombe, 2016). Les autres membres

sont répartis dans les différents organes de la plante et assurent plusieurs rôles (Figure 1.2). NRT1.4/NPF6.2 par exemple, exprimé au niveau des pétioles, est impliqué dans le transport du NO_3^- dans les feuilles (Chiu et al., 2004); NRT1.5/NPF7.3 et NPF2.3 sont exprimés dans le péricycle et interviennent notamment dans l'export du NO_3^- vers le xylème (Li et al., 2017a; Lin et al., 2008; Taochy et al., 2015). Sa translocation vers les feuilles est par la suite effectuée par NRT1.8/NPF7.2 (Li et al., 2010); l'expression de NRT1.6/NPF2.12 au niveau des siliques lui permet de dispenser le NO_3^- aux graines (Almagro et al., 2008); NRT1.7/NPF2.13, NRT1.11/NPF1.2 et NRT1.12/NPF1.1 sont des transporteurs phloémiens qui interviennent dans la remobilisation du NO_3^- des vieilles feuilles vers les plus jeunes (Fan et al., 2009; Hsu and Tsay, 2013); NRT1.9/NPF2.9 est également exprimé au niveau du phloème et favorise la charge du nitrate dans la sève descendante (Wang and Tsay, 2011). NAXT1/NPF2.7 participe, quant à lui, à l'efflux du nitrate vers le milieu extérieur (Segonzac et al., 2007). À l'exception de NRT1.1/NPF6.3 qui se caractérise par sa double affinité, tout le reste des protéines NPF semble travailler à faible affinité ($K_m > 1\text{mM}$).

Les transporteurs à haute affinité appartiennent plutôt à la famille NRT2 (7 membres chez *Arabidopsis*) (Krapp et al., 2014). NRT2.1, NRT2.2, NRT2.4, et NRT2.5 sont les transporteurs racinaires impliqués dans le prélèvement du nitrate dans le sol (Kiba et al., 2012; Kiba and Krapp, 2016; Lezhneva et al., 2014; Orsel et al., 2004; Orsel et al., 2002). Dans ce contexte, NRT2.1 est l'élément principal puisqu'il semble contribuer à lui seul à 72 % de l'activité du iHATS (Li et al., 2007). NRT2.2 possède un rôle complémentaire à celui de NRT2.1 (Filleur et al., 2001). NRT2.4 et NRT2.5 sont localisés au niveau de l'épiderme et du cortex des racines ainsi que dans les parties aériennes et sont impliqués dans le prélèvement du nitrate à de très faibles concentrations (Kiba et al., 2012; Lezhneva et al., 2014). Ils sont considérés comme des marqueurs de la réponse à la carence en azote (Kiba et al., 2012; Lezhneva et al., 2014; Safi, submitted). Leurs expressions dans les feuilles leur permettent aussi de charger le phloème en nitrate (Kiba et al., 2012; Lezhneva et al., 2014). NRT2.5 est l'effecteur majeur du cHATS avec 63 % d'influx de nitrate (Kotur and Glass, 2015). NRT2.3 et son plus proche homologue NRT2.6 ont montré une activité de transport de nitrate dans des ovocytes (Kotur et al., 2012). Mais leur rôle dans la plante reste encore un peu flou, d'autant que leur expression n'est ni régulée par la fourniture d'azote ni par la carence (Okamoto et al., 2003). Cependant, plusieurs études ont mis en évidence l'importance de NRT2.6 dans la réponse des plantes aux pathogènes (Dechorgnat et al., 2012; Kechid et al., 2013; Mantelin et al., 2006). NRT2.7 est un transporteur tonoplastique qui est responsable du stockage du NO_3^- dans les graines (Chopin et al., 2007). Hormis ce dernier, les 6 autres membres de NRT2 interagissent physiquement avec NAR2.1/NRT3.1

(Kotur et al., 2012). La formation d'un complexe avec cette protéine semble être nécessaire pour le fonctionnement du transporteur (Kotur and Glass, 2015; Laugier et al., 2012; Orsel et al., 2006; Yong et al., 2010).

La famille de canaux ioniques SLAC1/SLAH compte 5 membres chez *Arabidopsis*, SLAC1 et ses 4 homologues SLAH1 à SLAH4 (Negi et al., 2008). SLAC1 et SLAH3 sont exprimés dans les cellules de garde et impliqués dans la fermeture des stomates (Geiger et al., 2011; Negi et al., 2008; Vahisalu et al., 2008). Récemment il a été démontré SLAH1 et SLAH3 sont exprimés dans le péricycle et qu'ils interviennent probablement dans le chargement du xylème en NO_3^- et Cl^- (Cubero-Font et al., 2016). La capacité d'efflux de Cl^- est favorisée par l'hétérodimérisation des deux canaux (Cubero-Font et al., 2016). SLAH2 est caractérisé par sa sélectivité au nitrate puisqu'il est imperméable au Cl^- (Maierhofer et al., 2014). Il est exprimé dans la stèle des racines. L'activité de transport de ces canaux est finement régulée par des kinases CPK6, CPK21, CPK23, CIPK23 et OST1 (Brandt et al., 2012; Geiger et al., 2011; Maierhofer et al., 2014; Scherzer et al., 2012) et des phosphatases PP2CA (Lee et al., 2009).

Les CLCs font aussi parti d'une famille de canaux ioniques permettant le transport du NO_3^- (et du Cl^-) (Barbier-Brygoo et al., 2011). Leur dénomination provient d'ailleurs du fait qu'ils étaient identifiés chez les vertébrés comme étant perméables que au Cl^- (Jentsch et al., 1990). Les protéines caractérisées parmi les 7 membres de la famille sont généralement localisées sur les membranes internes comme celles des organites cellulaires (Zifarelli and Pusch, 2010), ou sur le tonoplaste (CLCa, CLCb, CLCc et CLCg) (Lv et al., 2009). CLCa et CLCb sont responsables du stockage du nitrate dans la vacuole (De Angeli et al., 2006; von der Fecht-Bartenbach et al., 2010). Ils possèdent également une activité d'efflux de la vacuole vers le cytosol (von der Fecht-Bartenbach et al., 2010; Wege et al., 2014). Cette capacité de transport bidirectionnelle permet à CLCa, exprimé dans les cellules de garde, de réguler l'ouverture et la fermeture des stomates (Wege et al., 2014). D'une manière semblable, CLCc perméable à la fois NO_3^- et au Cl^- , régule aussi les mouvements des stomates (Geelen et al., 2000; Harada et al., 2004; Jossier et al., 2010). Aucune perméabilité au NO_3^- n'a cependant, été enregistrée pour CLCg (Nguyen et al., 2016). L'activité de CLCa est régulée à la fois par la kinase OST1 (Wege et al., 2014) et la phosphatase PP2A (Hu et al., 2017). Sa sous-unité catalytique (PP2A-C5) interagit physiquement avec les 4 canaux tonoplastiques : CLCa, CLCb, CLCc et CLCg (Hu et al., 2017). CLCd et CLCf sont localisés sur la membrane de l'appareil de Golgi mais aucune activité de transport de NO_3^- n'a été rapportée (Guo et al., 2014a; Guo et al., 2014b; Marmagne et al., 2007; von der Fecht-Bartenbach et al., 2007). CLCe est localisé sur la membrane thylakoïdienne des chloroplastes (Marmagne et al., 2007) et son mutant correspondant montre

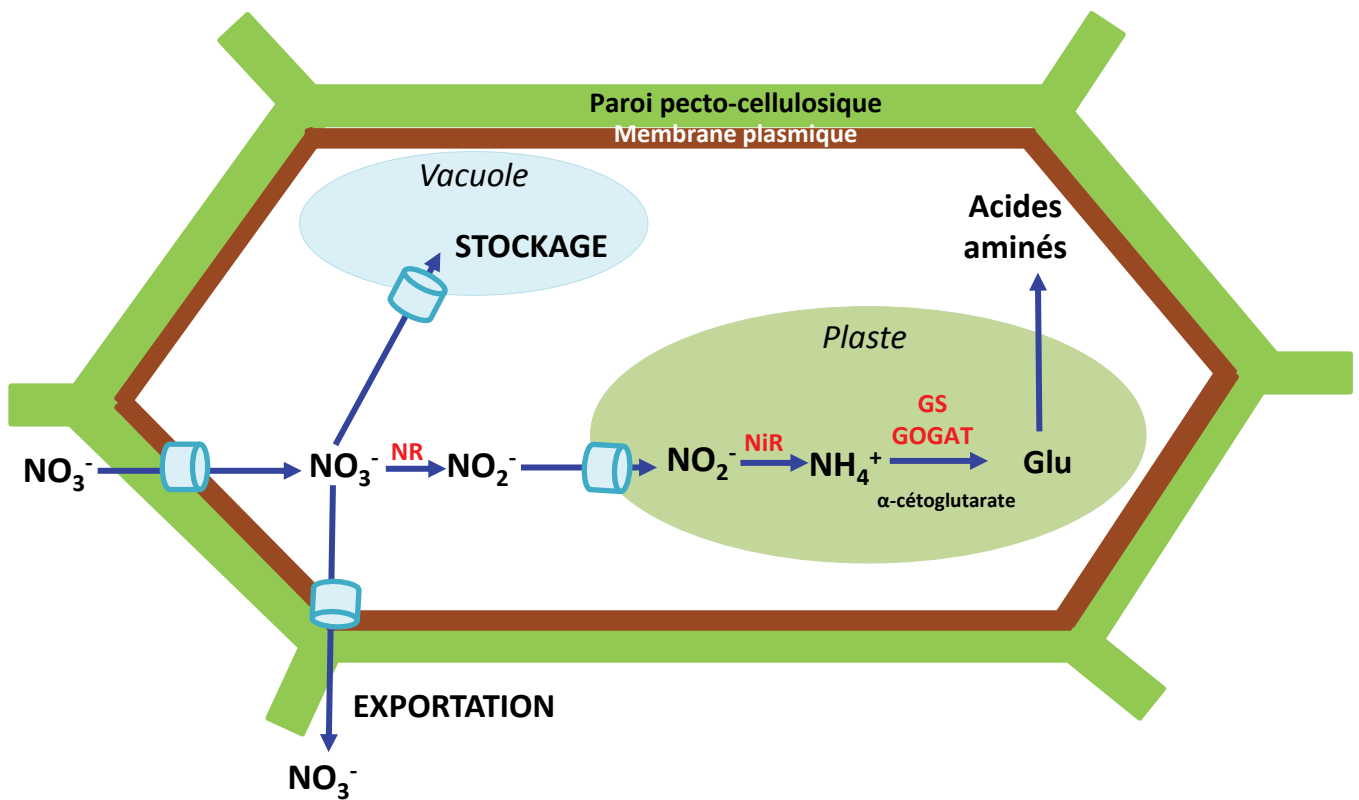


Figure 1.3. Devenir du nitrate dans la cellule végétale.

Une fois entré dans la cellule par des transporteurs membranaires, le nitrate peut être exporté hors de la cellule, stocké dans la vacuole ou réduit en nitrite dans le cytoplasme par la nitrate réductase (NR). Le nitrite est exporté dans les plastes puis réduit en ammonium par la nitrite réductase (NiR) et assimilé en acides aminés par la GS-GOGAT.

un contenu faible de NO_3^- par rapport au sauvage (Monachello et al., 2009). Sa sélectivité au NO_3^- et Cl^- reste à élucider (Herdean et al., 2016).

Enfin, ALMT12 (QUAC1) appartenant à la famille ALMT est capable de transporter en outre du Cl^- et du SO_4^{2-} , mais surtout du NO_3^- (Sasaki et al., 2010). ALMT12 est exprimé principalement au niveau de la membrane plasmique des cellules de garde, mais également sur les membranes du réticulum endoplasmique et la vacuole (Sasaki et al., 2010). Sa capacité à contrôler la fermeture des stomates est elle aussi régulée par la kinase OST1 (Imes et al., 2013).

1.4. Assimilation et métabolisme de l'azote

S'ils ne sont pas stockés dans les vacuoles, ni transloqués vers d'autres organes, le NO_3^- et le NH_4^+ prélevés du sol sont alors assimilés en acides aminés (Figure 1.3). En effet, le NH_4^+ est transporté dans les plastes (généralement les chloroplastes) où il sera assimilé à une molécule de Glu sous l'action de la GS pour donner une molécule de Gln. La GOGAT par la suite, dans une réaction de transamination, utilise un groupement amine de la Gln néoformée pour l'associer à une molécule d' α -cétoglutarate et générer ainsi deux molécules de Glu. Ce dernier servira de nouveau pour la fixation de NH_4^+ sinon, il sera utilisé pour la synthèse de tous les autres acides aminés par transamination. Le NO_3^- doit donc être transformé en NH_4^+ pour pouvoir être intégré dans un squelette carboné. Il est tout d'abord réduit en NO_2^- dans le cytosol par la nitrate réductase (NR) (2 gènes chez Arabidopsis : *NiA1*; *NiA2*). Le NO_2^- est transporté dans les plastes où il est réduit en NH_4^+ par la nitrite réductase (NiR) (Beevers and Hageman, 1980). Seulement ces deux dernières réactions définissent l'assimilation du nitrate au sens propre (Morot-Gaudry, 1997).

L'assimilation de NH_4^+ en Glu peut également avoir lieu sous l'action de la glutamate déshydrogénase (GDH) NADP(H)/NAD(H)-dépendante (Liu and von Wiren, 2017; Tercé-Laforgue et al., 2004). Celle-ci catalyse la transformation réversible de l' α -cétoglutarate en Glu en utilisant un NH_4^+ libre sans qu'il soit associé à une Gln (Lea, 1990; Turano et al., 1997). La GDH possède plusieurs isoformes. Chez Arabidopsis il existe 3 gènes (*GDH1*, *GDH2*, et *GDH3*) codant respectivement 3 sous-unités (β , α et γ). Ces 3 sous-unités peuvent s'associer de façon aléatoire pour former plusieurs homo- et hétéro-hexamères (Marchi et al., 2013). Avant la découverte de la voie GS/GOGAT (Lea and Mifflin, 1974), il a été généralement admis que la GDH est l'enzyme clé de l'assimilation de l'ammonium en acides aminés (Kennedy, 1966; Lewis, 1978), puisqu'elle constitue la voie majeure de synthèse de Glu chez les champignons

(Pateman, 1975; Sims and Folkes, 1964). Bien qu'elle puisse aussi avoir une localisation chloroplastique, son faible niveau d'expression et son affinité très faible au NH_4^+ favorisent son rôle secondaire dans cette voie par rapport à celle de la GS/GOGAT (Miflin and Lea, 1976). Ce rôle complémentaire a été soutenu par plusieurs études surtout en cas d'excès de NH_4^+ ou durant des stages de développement spécifiques (Rhodes et al., 1989; Srivastava and Singh, 1987; Stewart et al., 1980; Yamaya et al., 1986). Plus récemment, c'est plutôt la réaction inverse qui est considérée comme l'activité principale de GDH. C'est-à-dire la formation de α -cétoglutarate et la libération de NH_4^+ à partir de Glu (Aubert et al., 2001; Fagard et al., 2014; Robinson et al., 1991; Robinson et al., 1992). Ceci a été expliqué par la diminution de l'apport en carbone. La libération d'un squelette carboné va donc permettre l'alimentation du cycle de Krebs pour la production d'énergie (Turano et al., 1997). En 2013, Marchi et al (Marchi et al., 2013) ont montré que l'expression de l'isoenzyme 3 (GDH3) est induite en réponse à la carence en azote. Ainsi, cette enzyme considérée comme marqueur de réponse à la carence (voir chapitre 4) (Safi, submitted) pourrait intervenir dans le catabolisme des acides aminés et donc le recyclage de l'azote et le maintien de l'homéostasie du NH_4^+ (Masclaux-Daubresse et al., 2006). Une autre enzyme capable de recycler l'azote est l'asparaginase (2 gènes chez *Arabidopsis*: *ASPGA1* et *ASPG1*) (Gaufichon et al., 2017). Asn est l'acide aminé le mieux adapté pour le stockage et le transport de l'azote en raison de son ratio N/C élevé (2:4) (Coruzzi, 2003; Lea et al., 2007). Par conséquence, la régulation de l'activité des deux enzymes clé de cette voie métabolique (l'asparaginase et de l'asparagine synthétase) permet de contrôler le recyclage et la remobilisation de l'azote (Nakano et al., 2017). Récemment, un facteur de transcription de la famille GARP (Safi et al., 2017), s'est révélé participer à la régulation du recyclage de l'azote en contrôlant l'expression de *ASN1* (Nakano et al., 2017).

1.5. Adaptation des plantes à la variation en N

Les plantes sont des organismes sessiles. Pour faire face aux différents stress biotiques et abiotiques auxquels elles sont exposées, elles ont développé des mécanismes d'adaptation sophistiqués. La fluctuation de la disponibilité du nitrate, par exemple, a présidé à l'évolution d'une panoplie de réponses adaptatives des plantes que ce soit au niveau physiologique, développemental ou moléculaire (Gojon et al., 2009; O'Brien et al., 2016; Vidal and Gutierrez, 2008). Ces réponses adaptatives incluent : la mise en place de différents systèmes de prélèvement de NO_3^- (Krapp et al., 2014), la régulation du stockage et de la remobilisation du

NO_3^- selon les besoins (De Angeli et al., 2006) et l'adaptation de la croissance en fonction de la disponibilité du NO_3^- (Rahayu et al., 2005; Remans et al., 2006).

Un élément essentiel de ces réponses est l'adaptation des systèmes de transport du NO_3^- . Pour que la plante optimise son apport en azote, les scientifiques ont longtemps considéré que la plante absorbait le nitrate en permanence et puis elle en rejetait en fonction de ses besoins. Dans ce cas, c'est l'efflux de nitrate qui est donc régulé (Scaife, 1989). Cette théorie a été rejetée puisqu'il a été démontré que c'est l'influx (et non l'efflux) qui est majoritairement soumis aux mécanismes de régulation (Delhon et al., 1995a; Hole et al., 1990). Bien que l'efflux de NO_3^- soit majoritairement peu régulé en réponse aux fluctuations en azote du milieu extérieur, sa régulation reste un mécanisme non fréquent et son rôle physiologique semble être plutôt limité aux réponses aux stress en général et au stress salin en particulier (Delhon et al., 1995a; Taochy et al., 2015).

La régulation de l'influx fait intervenir plusieurs facteurs : le signal NO_3^- lui-même, le statut azoté de la plante entière (satiété vs demande), les autres métabolites azotés (acides aminés, NH_4^+), l'apport en carbone et le rythme circadien (Crawford and Glass, 1998; Morot-Gaudry, 1997).

La régulation des systèmes d'absorption n'est pas la seule réponse adaptative aux variations de la disponibilité des nutriments. Il est bien établi que les plantes ont développé également une plasticité de leur croissance leur permettant de s'acclimater à différentes conditions environnementales. En particulier, elles sont capables de moduler l'architecture racinaire en fonction de la disponibilité en nutriments (Drew and Saker, 1975; Kellermeier et al., 2014; Malamy, 2005; Remans et al., 2006; Ristova et al., 2013; Zhang and Forde, 2000). Ainsi, dans des conditions de distribution hétérogène de NO_3^- dans le milieu, le système racinaire va coloniser les zones riches en nitrate (Drew, 1975; Remans et al., 2006).

Ces modifications physiologiques et développementales sont directement ou indirectement liées à des voies de signalisation dont on distingue principalement : la réponse à la carence ou NSR (Nitrate Starvation Response) et la réponse à la fourniture ou PNR (Primary Nitrate Response) et les signalisations systémiques décrites ci-dessous.

La NSR peut être comprise comme la réponse des plantes à la carence prolongée en azote (Kiba and Krapp, 2016; Krapp et al., 2011; Menz et al., 2016), caractérisée surtout par l'activation des transporteurs de nitrate à haute affinité *NRT2.4* et *NRT2.5* permettant d'absorber le NO_3^- à très faibles concentrations (de l'ordre du micromolaire) dans le sol (Kiba et al., 2012; Lezhneva et al., 2014), ainsi que *GDH3* qui permet de recycler l'azote en catabolisant les acides aminés (Aubert et al., 2001; Marchi et al., 2013).

La fourniture de nitrate à des plantes préalablement dépourvues en N ou en NO_3^- induit une réponse rapide (en quelques minutes) et spécifique au NO_3^- . Cette réponse est marquée notamment par l'expression des gènes impliqués dans l'assimilation du NO_3^- (*NIA1*, *NIA2*, *NIR*..) mais aussi d'autres gènes sentinelles codant des facteurs de transcription de la famille GARP (Safi et al., 2017) (*HRS1*, *HHO1*, *HHO2*, *HHO3*) (Canales et al., 2014; Krouk et al., 2010b; Wang et al., 2004). On parle alors de la réponse primaire au nitrate (PNR pour Primary Nitrate Response) (Hu et al., 2009; Medici and Krouk, 2014).

Les signalisations à longue distance permettent à la plante de contrôler son statut azoté de manière systémique (communication inter-organes). Des signaux de demande et/ou de satiété en azote sont envoyés d'une racine à une autre en passant par les feuilles pour permettre à la plante d'adapter son métabolisme et son développement. Comme ces signalisations ne sont pas au centre de mon travail, je renvoie le lecteur aux références et revues suivantes (Gansel et al., 2001; Li et al., 2014; Ruffel et al., 2011; Ruffel et al., 2015).

1.6. Les acteurs moléculaires dans les voies de signalisation

1.6.1. Les acteurs moléculaires de la réponse primaire au nitrate (PNR)

Comme évoqué précédemment, la réponse primaire au nitrate (PNR) est définie comme étant la réponse rapide (quelques minutes) de la plante à la présence du nitrate dans le milieu (Medici and Krouk, 2014). Cette réponse est maintenue même chez un double mutant de nitrate réductase, totalement incapable d'assimiler le nitrate. En d'autres termes, c'est l'ion NO_3^- lui-même (et non les produits de son assimilation) qui induit la réponse. De plus, la PNR ne nécessite pas la synthèse *de novo* de protéines (Medici and Krouk, 2014; Wang et al., 2004). La PNR induit des reprogrammations géniques touchant jusqu'à 10 % du transcriptome (Canales et al., 2014; Gutierrez et al., 2007; Krouk et al., 2010b; Wang et al., 2003). Les gènes concernés recouvrent plusieurs fonctions liées à N comme le transport, l'assimilation, le métabolisme des acides aminés et nucléiques ou encore la transcription et l'épissage des ARNs, la synthèse d'hormones et la voie des pentoses phosphates (Castaings et al., 2011; Krouk et al., 2010b). Cette voie de signalisation est probablement la mieux et la plus étudiée à ce jour. De ce fait, un bon nombre d'acteurs moléculaires ont déjà été identifiés, ils sont détaillés ci-dessous.

Le régulateur central de la PNR est NRT1.1 qui, outre son activité de transport, peut se comporter comme un senseur de nitrate (Bouguyon et al., 2015; Ho et al., 2009; Krouk et al.,

2010a). Ce rôle de senseur a définitivement été mis en évidence grâce à un mutant de substitution P492L (*chl1-9*) affecté dans l'activité de transport de NO_3^- , qui conserve toutefois sa capacité à induire la réponse des gènes au NO_3^- (Ho et al., 2009). Ceci a permis pour la première fois de mettre en évidence que les deux fonctionnalités de NRT1.1 (appelé désormais transcepteur (Gojon et al., 2011)) peuvent être génétiquement découplées. Par ailleurs, la PNR est également dépendante de l'état de phosphorylation de NRT1.1. Ainsi, la phosphorylation de la T101 ne permet pas seulement de moduler le système de transport (en passant de LATS à HATS) mais aussi d'altérer la PNR, suggérant que c'est probablement la forme non phosphorylée de NRT1.1 qui permet de percevoir le nitrate (Bouguyon et al., 2015; Ho et al., 2009). L'état de phosphorylation de ce transcepteur et son fonctionnement sont régulés par différentes protéines. En effet, c'est la kinase CIPK23 qui phosphoryle directement le résidu T101 de NRT1.1. CIPK23 est elle-même activée par des senseurs de calcium CBL9 (Ho et al., 2009) et CBL1 (Leran et al., 2015). D'autre part, la désactivation de CIPK23 et CBL1 par la phosphatase ABI2 permettrait de garder NRT1.1 dans un état déphosphorylé (Ho et al., 2009; Leran et al., 2015). Ainsi, CIPK23, CBL9, CBL1 et ABI2 semblent former un complexe régulateur de l'activité de NRT1.1 (Leran et al., 2015). De manière intéressante, ABI2 interagit également avec CIPK8, un autre élément nécessaire à la mise en place de la PNR (Hu et al., 2009; Ohta et al., 2003).

Cependant, il existe un(des) voie(s) indépendante(s) de NRT1.1. En effet, la PNR est fortement affectée chez un mutant KO d'NRT1.1 (*chl1-5*) ayant du NH_4^+ comme source d'azote avant l'apport en NO_3^- , mais elle n'est pas affectée chez le même mutant ayant subi une pré-carence en N. Ceci montre que NRT1.1 n'est probablement pas le seul senseur de nitrate (Wang et al., 2009b).

Le deuxième acteur central de la PNR est NLP7. Le rôle de ce facteur de transcription chez *Arabidopsis* dans la régulation des gènes sentinelles de la PNR a été mis en évidence grâce à deux approches indépendantes (Castaings et al., 2009; Wang et al., 2009b). La première (Castaings et al., 2009) est par la recherche de protéines homologues au facteur de transcription NIT2 de *Chlamydomonas reinhardtii* connu pour réguler l'expression des gènes en réponse au nitrate chez cette algue (Camargo et al., 2007; Schnell and Lefebvre, 1993). La seconde méthode correspond à une approche de criblage génétique basée sur l'utilisation d'un promoteur inducible par le nitrate fusionné à un gène rapporteur. L'induction du gène rapporteur est très fortement altérée chez les mutants *nlp7* (Wang et al., 2009b). Le mutant *nlp7* présente un phénotype de carence en N même en présence de NO_3^- (Castaings et al., 2009). Malgré son rôle central dans la régulation de la PNR, l'expression de NLP7 n'est pas régulée

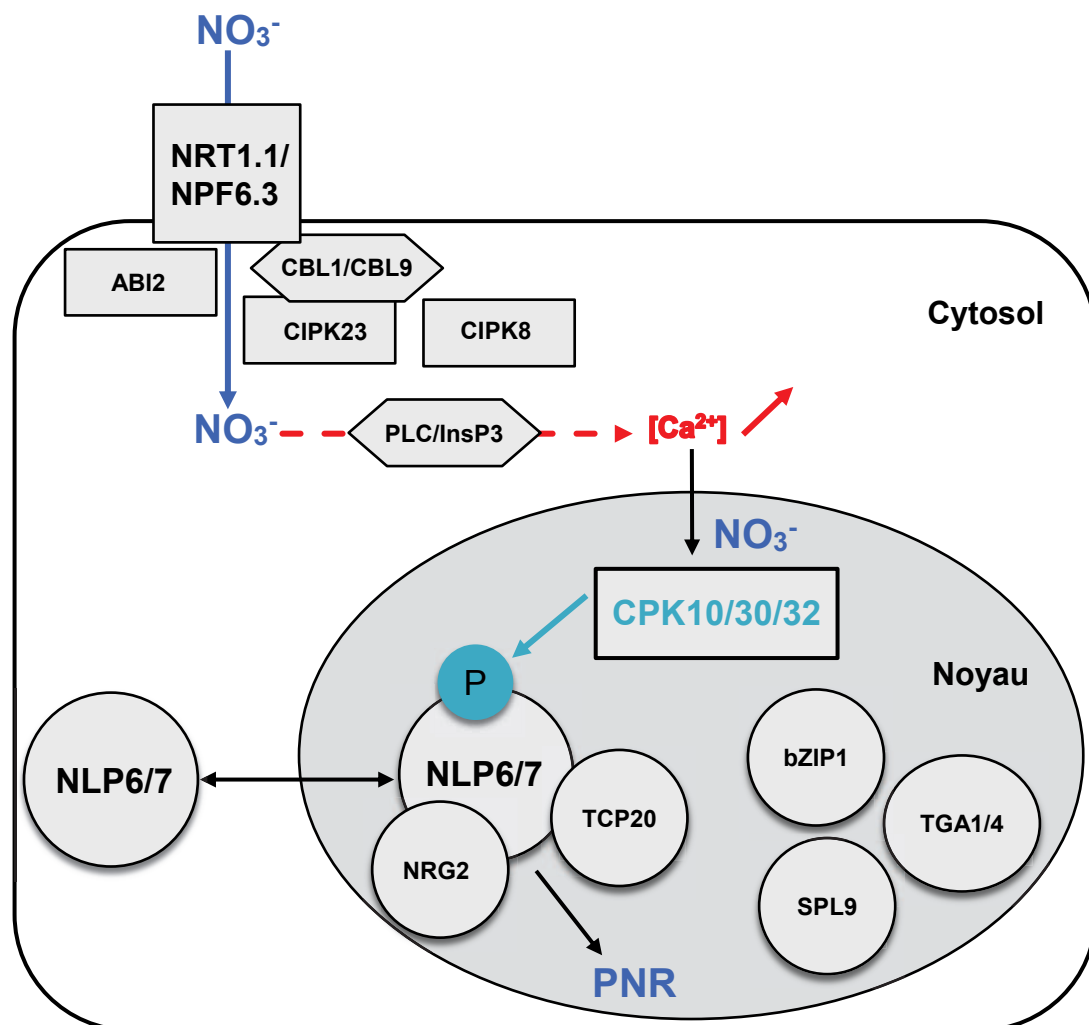


Figure 1.4. Les principaux acteurs moléculaires qui contrôlent la PNR (D'après Krouk, 2017).

transcriptionnellement par le nitrate. Cependant, la présence du NO_3^- conduit à l'accumulation de la protéine dans le noyau (Marchive et al., 2013). Dans cette même étude, les auteurs ont révélé 101 gènes reconnus et régulés par NLP7 dont 91 gènes de réponse au nitrate. Cette forte cohérence valide son rôle important dans la régulation de la PNR (Marchive et al., 2013). Par ailleurs, son proche homologue NLP6, est aussi régulé post-traductionnellement par le NO_3^- . NLP7 et NLP6 régulent tous les deux des gènes de réponse au nitrate *via* le motif NRE (Konishi and Yanagisawa, 2013a; Konishi and Yanagisawa, 2013b). La fusion d'un domaine répresseur à la protéine NLP6, diminue l'expression de presque tous les gènes inductibles par le nitrate (Konishi and Yanagisawa, 2014). Toutes ces données font de NLP6, au même titre que NLP7 un régulateur majeur de la PNR, présentant une certaine redondance fonctionnelle avec NLP7 (Konishi and Yanagisawa, 2013b) (Figure 1.4).

Le fonctionnement de ces 2 facteurs de transcription (NLP6/NLP7) est régulé, entre autres, par l'interaction avec les protéines NRG2 (Xu et al., 2016) et TCP20 (Guan et al., 2017) mais aussi par les kinases CPK10, 30, 32 qui présentent désormais un chaînon essentiel entre la signalisation prenant naissance à la membrane, liée à NRT1.1, et celles nucléaires (Krouk, 2017; Liu et al., 2017a). En présence de NO_3^- des vagues calciques NRT1.1 dépendantes sont induites probablement *via* une phospholipase C (Riveras et al., 2015). L'activation des CPK10, 30 et 32 par le signal calcique va entraîner la phosphorylation de NLP6 et NLP7 et ainsi de favoriser leur localisation nucléaire où ils vont activer les gènes de la PNR (Krouk, 2017; Liu et al., 2017a). La complexité de la régulation de la PNR ne s'arrête pas là, puisque NRT1.1 est régulé aussi au niveau post-transcriptionnel par une protéine nommée CPSF30-L dont le gène est régulé à la fois par le statut redox et par des signalisations liées au calcium. De manière intéressante, le mutant *cpsf30* présente un défaut au niveau du transport de nitrate et de l'expression des gènes sentinelles (Li et al., 2017b).

Les NLPs ne sont pas les seuls FT impliqués dans la PNR. SPL9 par exemple a été identifié comme un FT intervenant dans cette réponse (Krouk et al., 2010b) et qui est lui-même régulé par un microARN, miR156 (Wang et al., 2009a). Bien que d'autres FT puissent réguler plusieurs réponses liées au nitrate comme le développement racinaire, leur implication dans le contrôle de la PNR *per se* reste à prouver (Medici and Krouk, 2014; O'Brien et al., 2016). C'est le cas de TGA1 et TGA4 (Alvarez et al., 2014), bZIP1 (Para et al., 2014), ANR1 (Gan et al., 2005). L'ensemble de ces données est résumé dans la figure 1.4.

1.6.2. Les acteurs de la réponse à la carence en N (NSR)

La NSR c'est la réponse des plantes à la carence prolongée en azote, caractérisée surtout par une modification caractéristique de l'architecture racinaire, l'activation du HATS du nitrate, la réduction de la croissance et la sénescence des feuilles, la translocation de l'azote vers les tissus les plus jeunes, la diminution de la photosynthèse et l'accumulation des anthocyanes (Drew and Saker, 1975; Himmelblau and Amasino, 2001; Kiba and Krapp, 2016; Krapp et al., 2011; Peng et al., 2007a).

Ces formes d'adaptation à la carence en N, sont précédées par des régulations transcriptomiques marquées par la répression des gènes assignés à la photosynthèse, la synthèse de la chlorophylle, et la synthèse des protéines plastidiales ou encore l'induction des gènes de métabolisme secondaire et surtout des gènes impliqués dans le HATS (*NRT2.4* et *NRT2.5*) et dans le recyclage de l'N (*GDH3*) (Aubert et al., 2001; Krapp et al., 2011; Marchi et al., 2013; Peng et al., 2007a; Scheible et al., 2004).

Contrairement à la PNR où plusieurs acteurs moléculaires ont été identifiés, les régulateurs de la NSR sont beaucoup moins connus. Ce n'est qu'en 2009 qu'une étude a révélé le rôle de 3 FT de la famille LBD dans la régulation de la réponse à la carence en N (Rubin et al., 2009). Les auteurs ont montré que LBD37, LBD38 et LBD39 qui sont induits par le nitrate, inhibent des gènes de la synthèse des anthocyanes. Ainsi, l'expression de ces gènes est constitutive chez les mutants (*lbd37*, *lbd38* et *lbd39*) qui accumulent de l'anthocyane même en présence de NO_3^- , alors que les sur-expressseurs n'en produisent pas même en conditions de carence. LBD37/38/39 ont aussi un effet répressif sur l'expression de certains gènes d'assimilation d'azote et des transporteurs de nitrate y compris des transporteurs à haute et très haute affinité comme *NRT2.1* et *NRT2.2* et *NRT2.5*. Les lignées transgéniques affectées dans ces 3 FT, ont des teneurs en NO_3^- et en acides aminés altérées (Rubin et al., 2009).

Le rôle du Ca^{2+} et des CBL dans la PNR a été bien établi (§ 1.6.1), mais est ce qu'ils sont aussi impliqués dans la NSR? Récemment, il a été suggéré que la carence en nitrate pourrait déclencher un changement rapide de la concentration cytosolique en Ca^{2+} (Ma et al., 2015). La même étude a mis en évidence que CBL7, un senseur de Ca^{2+} induit par la carence en NO_3^- , est impliqué dans la régulation de la NSR. Des mutants *cb17* carencés en nitrate présentent une anomalie de croissance de la racine primaire et une baisse de la teneur en NO_3^- par rapport au sauvage. Le défaut dans la teneur en NO_3^- est corrélé avec la dérégulation des gènes *NRT2.4* et *NRT2.5* (Ma et al., 2015). Le mécanisme par lequel CBL7 régule cette voie de signalisation reste cependant à élucider.

Outre son rôle majeur dans la régulation de la PNR, NLP7 a été proposé par Castaings et al., (2009) comme un répresseur des gènes de la réponse à la carence en N (Castaings et al., 2009).

À part les facteurs de transcription, d'autres protéines régulatrices peuvent aussi intervenir dans ce genre de réponses adaptatives comme l'ubiquitine E3 ligase NLA qui régule la remobilisation de l'N *via* la dégradation du transporteur NRT1.7 (Liu et al., 2017b). Ainsi, le mutant *nla* ne parvient pas à mettre en place les mécanismes d'adaptation à la carence en N, comme par exemple la synthèse des anthocyanes, et présente un phénotype de sénescence abrupte et précoce en -N. Ces données montrent que NLA est un régulateur essentiel du développement et de l'adaptation des plantes dans des conditions limitantes en N (Peng et al., 2007a; Peng et al., 2007b). L'accumulation des transcrits de *NLA* et ainsi son activité sont finement régulées par miR827 (Kant et al., 2011).

Ces dernières années, de multiples études ont illustré l'implication des petits ARN dans différents processus physiologiques (Axtell et al., 2007; Borges and Martienssen, 2015; Kamthan et al., 2015). Les micro ARN en particulier sont impliqués dans les réponses adaptatives des plantes face à la carence en nutriments (Fujii et al., 2005; Hsieh et al., 2009; Jones-Rhoades and Bartel, 2004; Pant et al., 2009). Une carence en N, induit l'expression de miR160, miR780, miR842, miR846, miR826 et son transcrit complémentaire miR5090 et inhibe celle de miR169, miR171, miR395, miR397, miR398, miR399, miR408, miR827, et miR857 (He et al., 2014; Liang et al., 2012). miR196, découvert d'abord chez *Medicago truncatula* comme régulateur du développement des nodules (Comber et al., 2006), semble être un acteur moléculaire dans la réponse à la carence en azote chez *Arabidopsis thaliana* (Zhao et al., 2011). En effet, la surexpression de ce micro ARN, donne des plantes hypersensibles à la carence en N, qui accumulent moins d'N et de chlorophylle que les plantes sauvages et chez lesquelles l'expression des transporteurs de nitrate est atténuée. Le rôle de miR196 dans la régulation de la NSR passe probablement par la régulation de l'accumulation des transcrits des NFYA. Puisque l'induction de l'expression de ces FT par la carence en N, est totalement abolie par l'expression constitutive de miR169 (Zhao et al., 2011). De plus, la surexpression des NFYA donne un phénotype opposé à celui observé chez les sur-expressseurs de miR169 caractérisé surtout par une sénescence tardive et une augmentation de l'accumulation de chlorophylle (Leyva-González et al., 2012). Un membre de la famille NFYC (fonctionne en hétérotrimère avec NFYA et NFYB) module le ratio N/C en augmentant l'accumulation des protéines et en diminuant celle de l'amidon (Li et al., 2015).

Les deux micro ARNs miR826 et miR5090 issus de la duplication inversée de leur gène cible AOP2 sont induits par la carence en N. Leur sur-expression engendre une meilleure tolérance à la carence en N, qui se traduit par l'induction des gènes de réponse à la NSR accompagnée d'une amélioration du prélèvement de l'N, l'augmentation de la biomasse, du nombre des racines latérales, et du taux de chlorophylle (He et al., 2014).

En conclusion, les informations concernant les acteurs moléculaires impliqués dans le contrôle de la NSR sont plus disparates et les mécanismes moléculaires de la perception de l'absence d'N par les plantes ne sont pas encore élucidés. Ceci fait l'objet de l'étude proposée dans les chapitres 3 (SPX) et 4 (HHOs) de cette thèse.

2. Interaction des signaux N et P

2.1. La nutrition phosphatée des plantes

Après l'azote, le phosphore (P) est le deuxième macronutriment limitant la croissance des plantes (Abel et al., 2002; Marschner, 1995). C'est un élément essentiel qui entre dans la structure des acides nucléiques, des phospholipides membranaires, des phosphoprotéines, les coenzymes (NADPH, H^+ /NADP $^+$) et des molécules de transfert d'énergie (ATP, GTP..). Sur le plan fonctionnel, il est impliqué dans de nombreux processus biologiques comme la photosynthèse, la respiration. Le phosphate inorganique (Pi) joue surtout un rôle crucial dans les cascades de transduction de signal et dans la régulation de l'activité enzymatique (Marschner, 1995; Poirier and Bucher, 2002).

Le transport du Pi est régi par 2 systèmes, un LATS faisant intervenir des symports Pi/Na $^+$ (PHT2 et PHT3) et un HATS dont les transporteurs sont des symports Pi/H $^+$ (PHT1) (Casieri et al., 2013; Nussaume et al., 2011; Rausch and Bucher, 2002).

Comme l'azote, la biodisponibilité du phosphore aux plantes est limitée. Ceci est dû principalement à deux raisons: i) Contrairement à N qui peut être assimilé sous différentes formes, le phosphate inorganique est quasiment la seule forme de P directement assimilable par les plantes. ii) Et la tendance du Pi à réagir avec des cations (Al $^{3+}$, Fe $^{2+}$, Fe $^{3+}$, Ca $^{2+}$, Mg $^{2+}$) pour former des sels assez insolubles (Marschner, 1995; Poirier and Bucher, 2002; Raghothama, 1999).

Les plantes ont développé des stratégies adaptatives pour pouvoir faire face aux variations de la disponibilité en Pi. Par exemple, une carence en Pi engendre chez la plante des

changements morphologiques, physiologiques, métaboliques, biochimiques et moléculaires. Ces modifications groupées sous le nom de PSR (pour Phosphate Starvation Response), visent à améliorer le prélèvement, l'acquisition, et l'efficacité d'utilisation du Pi globalement (Raghothama, 1999; Scheible and Rojas-Triana, 2015). Les réponses adaptatives les plus connues dans ce contexte comprennent; l'adaptation de l'architecture racinaire (augmentation de la croissance des racines latérales et des poils absorbants et l'inhibition de la croissance de la racine primaire) (Chevalier et al., 2003), la création de nouvelles racines spécialisées (racines protéoïdes chez certaines espèces végétales) (Lambers et al., 2006), la mycorrhization (Bucher, 2007), la solubilisation du Pi du sol (sécrétions d'enzymes et d'acides organiques) (Raghothama, 1999), l'induction du HATS (Raghothama, 1999), le recyclage et la remobilisation du phosphate interne (Nakamura et al., 2005). Toutes ces réponses sont précédées par des régulations d'expression de centaines voire de milliers de gènes (Misson et al., 2005; Secco et al., 2013).

En réalité, les voies de signalisations liées au phosphate dépendent aussi de la disponibilité des autres nutriments (Zn, Fe, S, N). Nous allons en décrire une dans le paragraphe suivant car certains objets moléculaires étudiés dans cette thèse (HHOs voir chapitre 3) sont largement impliqués dans cette interaction.

2.2. L'interaction N/P

Ces dernières années, des mécanismes par lesquels les plantes intègrent la présence ou l'absence d'une combinaison N/P commencent à être élucidés.

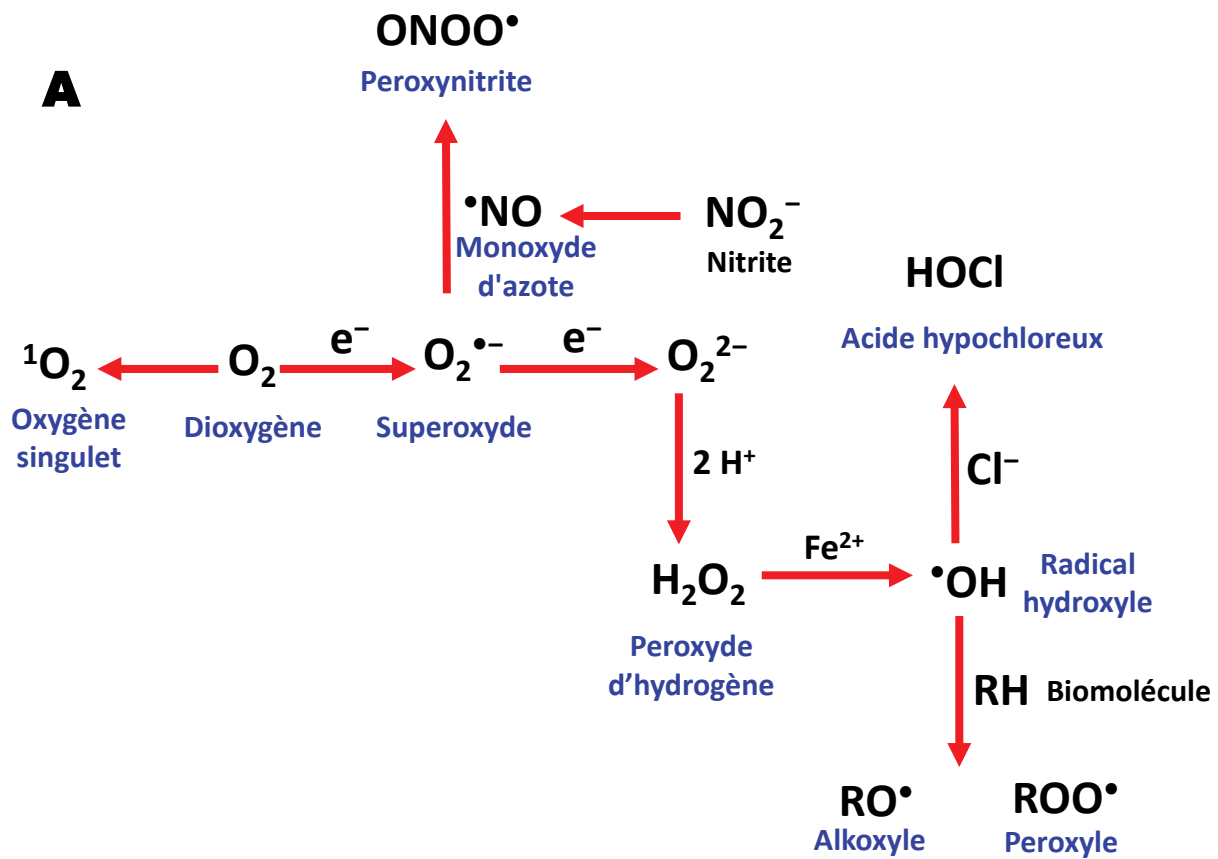
Une observation remarquable de l'interaction entre N et P se manifeste par la réversion du phénotype du mutant *nla* (§ 1.6.2) de deux manières, une carence combinée en N/P ou la mutation de *PHT1.1*. La diminution du prélèvement du Pi permet au mutant d'échapper à la sénescence précoce induite par la carence en N (Kant et al., 2011; Peng et al., 2008). Par ailleurs, *NLA* participe également à l'établissement de l'homéostasie du Pi vu que le mutant accumule beaucoup plus de Pi que le sauvage et que le phénotype malade du mutant est dû entre autres à la toxicité du Pi sur-accumulé. Cette toxicité qui phénocopie le mutant *pho2* est surpassée soit par l'augmentation de la concentration en NO_3^- soit par la diminution de la concentration en Pi. Ceci est expliqué par un effet antagoniste exercé par NO_3^- et Pi sur leurs accumulations. Ainsi la fourniture de fortes concentrations de NO_3^- diminue l'accumulation de Pi et *vice versa* (Kant et al., 2011). En outre, l'E2 conjugase *PHO2* interagit physiquement avec *NLA* pour ubiquitiner le transporteur de phosphate *PHT1;4* en conditions suffisantes en Pi. Cette

polyubiquitination va permettre la dégradation protéasome-dépendante du transporteur et ainsi diminuer le prélèvement du Pi. Par contre, pendant la carence en Pi, les transcrits de *NLA* et *PHO2* sont dégradés respectivement par miR399 et miR827 (induits par la carence en Pi et réprimés par la carence en N) ce qui permet de surpasser la dégradation de PHT1;4 et ainsi augmenter le prélèvement du Pi (Park et al., 2014).

Le “crosstalk” entre N et P agit également sur le développement de la plante. Un effet antagoniste de NO_3^- et de Pi sur la floraison a été observé. En effet, la plante fleurit de façon précoce à faible concentration en NO_3^- mais présente une floraison retardée dans des conditions limitantes en Pi. De plus, l'interaction entre ces deux anions crée un effet cumulatif. C'est-à-dire des concentrations élevées en Pi combinées à une faible disponibilité en NO_3^- accélèrent davantage le processus de floraison (Kant et al., 2011).

Récemment de nouveaux éléments ont été ajoutés à la liste des gènes impliqués dans l'intégration des signaux NO_3^- et Pi. Deux FT de la famille GARP (Safi et al., 2017) ont été révélés comme des régulateurs de la croissance racinaire en réponse à une combinaison N/P. En particulier, de facteur de transcription HRS1 induit par la fourniture de NO_3^- (Canales et al., 2014; Krouk et al., 2010b) exerce un effet répresseur sur le développement de la racine primaire en absence de Pi (Liu et al., 2009). Cette observation a été ultérieurement confirmée par notre équipe par des expériences qui ont démontré le rôle essentiel de ce FT dans le contrôle de l'élongation de la racine primaire dans des conditions particulières de disponibilité en nitrate et en phosphate contrastées. Il s'est avéré qu'HRS1 réprime la croissance de la racine primaire en conditions de carence en phosphore mais seulement en présence de NO_3^- dans le milieu. Ce rôle implique un mécanisme moléculaire original par lequel ce FT intègre en même temps la signalisation de NO_3^- et de Pi nécessitant des mécanismes de contrôle tant au niveau transcriptionnel qu'au niveau post-transcriptionnel (Medici et al., 2015).

Chez le riz, l'intégration des signaux NO_3^- et Pi pour réguler la croissance racinaire est effectuée par un micro ARN fortement induit par la carence en Pi (miR444). Sa surexpression améliore l'accumulation à la fois du NO_3^- et du Pi en stimulant l'expression des gènes codant des transporteurs. Par contre, l'ajustement de l'architecture racinaire en réponse à la carence en Pi a été altéré chez les sur-expressseurs d'une manière NO_3^- -dépendante. Ces lignées transgéniques ont aussi des difficultés à s'adapter à des conditions limitées en N en raison d'un défaut dans leur capacité à remobiliser l'azote (Yan et al., 2014b).



B

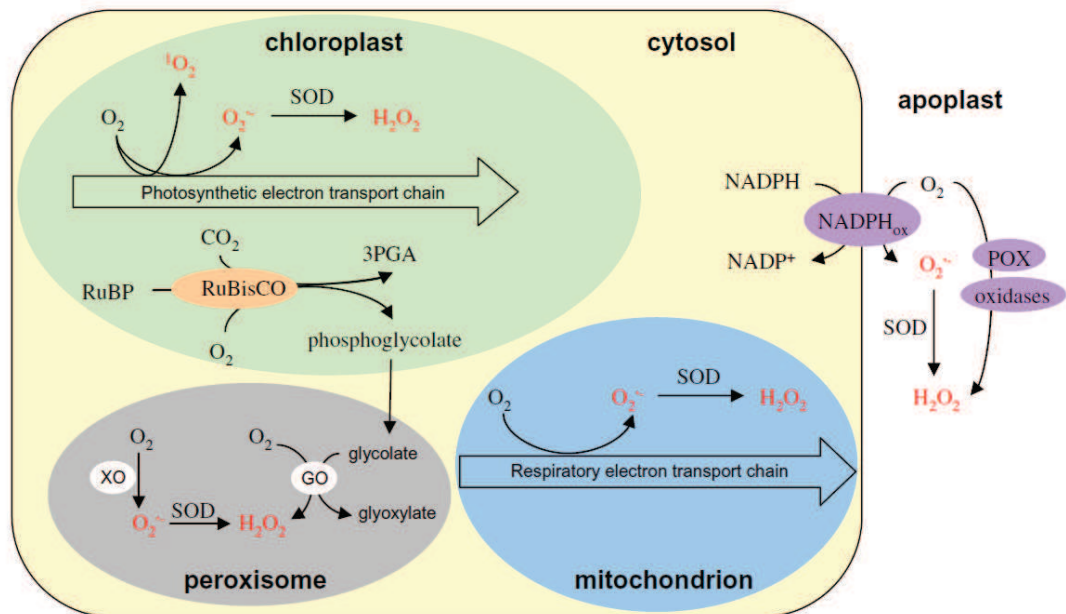


Figure 1.5. Les espèces réactives de l'oxygène, formation et sites de production

A) Formation des différentes ROS à partir du dioxygène atmosphérique. Le nom de chaque entité réactive est marqué en bleu.

B) Production des ROS dans les différents compartiments cellulaires chez la plante (Mhamdi et al., 2010).

3. Les espèces réactives de l'oxygène

3.1. Généralités

Le dioxygène O_2 , est indispensable à la vie car il permet la respiration mitochondriale qui produit l'énergie nécessaire au métabolisme. Et bien que inerte, ses formes excitées ou partiellement réduites sont très réactives. Ces formes considérées comme des sous-produits inévitables du métabolisme aérobie sont appelées les espèces réactives de l'oxygène (ROS, Reactive Oxygen Species) (Choudhury et al., 2017). On distingue les radicaux libres (comme le radical hydroxyl $\cdot OH$, l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$, et le monoxyde d'azote $\cdot NO$) et les espèces non radicalaires (comme l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , et l'ozone O^3). En plus de de l'oxygène, certains ROS contiennent également un atome d'N (comme le $\cdot NO$) et sont ainsi appelées RNOS (espèces réactives de l'oxygène et de l'azote). Dans tout le reste de ce manuscrit, le terme ROS concerne aussi bien les RNOS que les ROS sans N.

L'instabilité des ROS leur permet de réagir entre eux ou avec d'autres molécules pour créer de nouvelles espèces réactives comme l'acide hypochloreux $HOCl$, le peroxydinitrite $ONOO^-$ et les radicaux alkoxyle $RO\cdot$ et peroxyde $ROO\cdot$ (Gill and Tuteja, 2010; Mhamdi et al., 2010) (Figure 1.5A). Ces molécules sont très instables et capables de déstabiliser d'autres molécules entraînant ainsi une réaction en chaîne.

3.2. Les sièges de production des ROS

Les ROS sont produites pratiquement dans tous les compartiments de la cellule surtout au niveau des éléments les plus en contact avec l'oxygène, comme les chaînes de transport des électrons dans la mitochondrie et dans le chloroplaste mais aussi dans le peroxysome, le réticulum endoplasmique (RE), la membrane plasmique, la paroi et l'apoplasme (Mhamdi et al., 2010; Mignolet-Spruyt et al., 2016) (Figure 1.5B). Dans la mitochondrie, la majeure partie de l'oxygène subit une réduction tétravalente par la cytochrome c oxydase conduisant à la production de l'eau. Cependant, en laissant fuir des électrons, l' O_2 peut être réduit de façon monoélectronique conduisant à la formation de $O_2^{\cdot -}$ (Cadenas and Davies, 2000). Pour les chloroplastes, les premières entités réactives qui apparaissent sont 1O_2 suite à l'excitation de la chlorophylle associée au PSII, et l' $O_2^{\cdot -}$ produit lors du transfert des électrons photosynthétiques au niveau du PSI (Asada, 2006). Le RE contribue aussi à la formation de $O_2^{\cdot -}$ lors du processus de repliement des protéines (Ozgun et al., 2014) mais aussi lors des réactions de détoxification

Tableau 1. Les différents mécanismes responsables de la production des ROS, leurs localisations ainsi que les types de ROS générées.

Mécanisme	Localisation	Type de ROS
Photosynthèse	Chloroplaste	$O_2^{\cdot-}$
Respiration	Mitochondrie	$O_2^{\cdot-}$
Glycolate oxydase	Peroxisome	H_2O_2
Chlorophylle excitée	Chloroplaste	$O_2^{\cdot-}$
NADPH oxydase	Membrane plasmique	$O_2^{\cdot-}$
β -oxydation des acides gras	Peroxisome	H_2O_2
Oxalate oxydase	Apoplaste	H_2O_2
Xanthine oxydase	Peroxisome	$O_2^{\cdot-}$
Peroxydase	Paroi cellulaire	$O_2^{\cdot-}$ H_2O_2
Amine oxydase	Apoplaste	H_2O_2

des drogues liposolubles et la neutralisation des xénobiotiques impliquant le cytochrome P450 (Gill and Tuteja, 2010; Kim et al., 2009). Les peroxysomes sont probablement les sites majeurs de la production d'H₂O₂, en raison de leur type de métabolisme oxydatif (comme la β -oxydation des acides gras et la photorespiration par le biais de la glycolate oxydase). Ils produisent également du O₂^{•-} grâce à la xanthine oxydase (del Rio et al., 2006; Mittler, 2002). La production du 'NO chez les animaux se fait par la NO synthase (NOS). L'existence de cette enzyme dans le règne végétal reste cependant controversée. Pour l'instant, la production de 'NO chez les plantes reste associée uniquement à l'activité de la nitrate réductase (Planchet et al., 2005). Les autres sources des ROS qui ne dérivent pas des organites mais localisées au niveau de la membrane plasmique, la paroi ou l'apoplasme font intervenir les NADPH oxydases, l'oxalate oxydase, l'amine oxydase et les peroxydases (Bolwell and Wojtaszek, 1997; Mittler, 2002) (Tableau 1).

3.3. Systèmes antioxydants et stress oxydatif

Les ROS sont produites de façon continue dans la cellule et contribuent par plusieurs processus au maintien de l'homéostasie cellulaire, néanmoins leur concentration doit être régulée. Une production non contrôlée de ROS peut avoir des effets délétères voire létaux pour la cellule. Les principales enzymes responsables de la détoxification des ROS sont les superoxydes dismutase (SOD), les catalases (CAT), les peroxydases (GPX, APX..) et les peroxyrédoxines. La première enzyme qui intervient dans la détoxification des ROS est la SOD. Elle produit l'H₂O₂ à partir de O₂^{•-} qui va être à son tour, transformé en H₂O sous l'action des CAT et des peroxydases (Mittler, 2002; Mittler et al., 2004). Pour réduire l'H₂O₂ en H₂O, GPX et APX oxydent en contrepartie le glutathion et l'ascorbate respectivement. La régénération de ces molécules antioxydantes se fait grâce aux enzymes GR, MDAR et DHAR (Miller et al., 2010; Mittler, 2002; Mittler et al., 2004) (Figure 1.6).

Le glutathion et l'acide ascorbique sont des molécules essentielles lors des réactions de réduction de l'H₂O₂ mais il existe également d'autres composés non enzymatiques qui contribuent à la détoxification des ROS comme les tocophérols, les flavonoïdes et les caroténoïdes (Gill and Tuteja, 2010), ou encore la proline et les polyols (mannitol, sorbitol, myo-inositol) (Gill and Tuteja, 2010; Shen et al., 1997; Smirnoff and Cumbes, 1989; Trovato et al., 2008).

La suraccumulation des ROS suite à un déséquilibre entre leur production et leur détoxification a des effets nocifs sur la cellule et engendre des dommages oxydatifs comme la

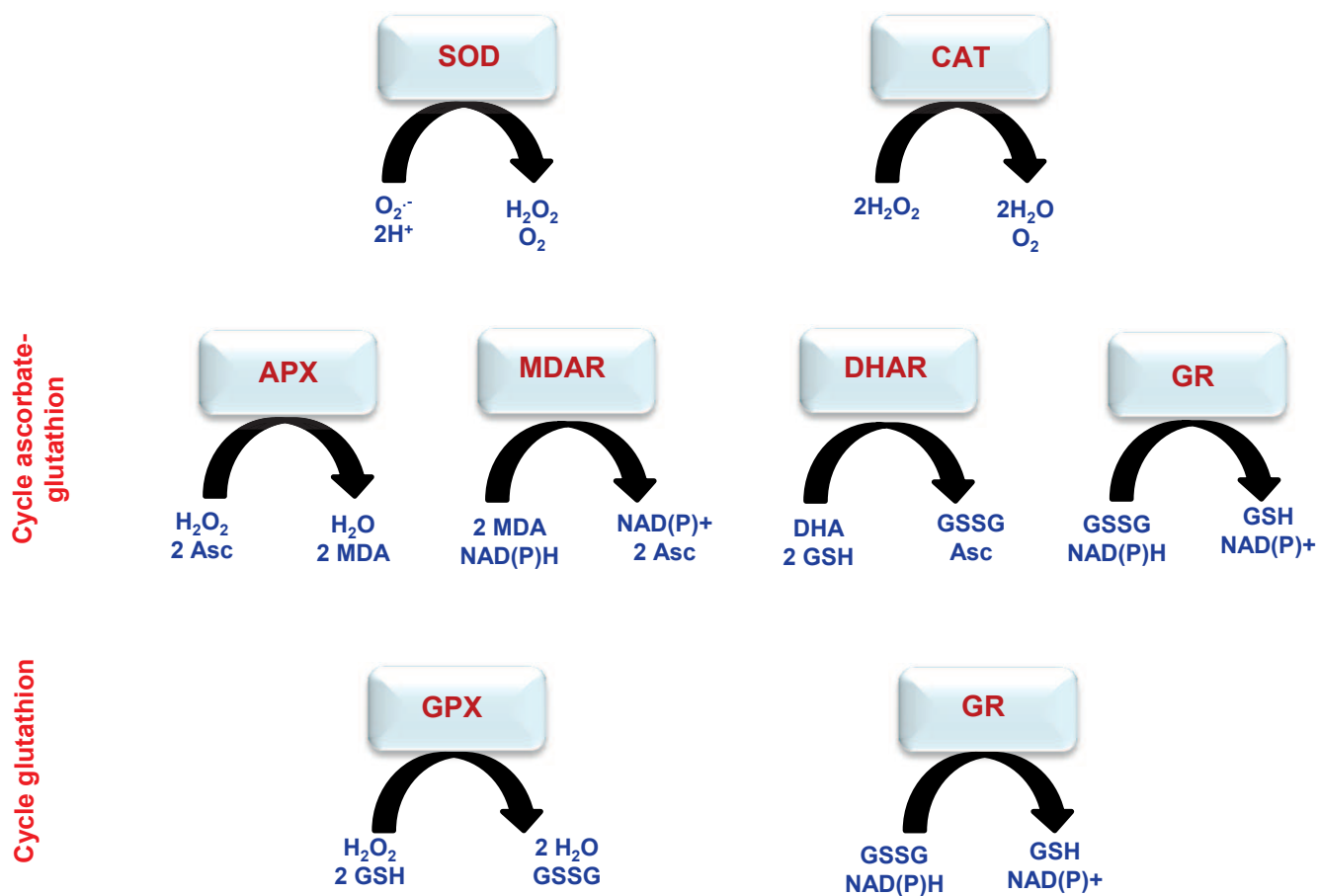


Figure 1.6. Les mécanismes enzymatiques principaux de détoxification des ROS.

SOD: superoxyde dismutase ; CAT: catalase ; APX: ascorbate peroxydase ; Asc: ascorbate ; MDA: monodéhydroascorbate ; MDAR, MDA réductase ; DHA: déhydroascorbate ; DHAR: DHA réductase ; GSH: glutathion réduit ; GSSG: glutathion oxydé GPX: glutathion peroxydase ; GR: Glutathion réductase.

peroxydation des lipides, l'oxydation des protéines, de l'ADN et de l'ARN aboutissant à des dommages cellulaires inévitables touchant les gènes, l'intégrité de la membrane et le fonctionnement des protéines. Ces processus qui peuvent même aboutir à la mort cellulaire sont groupés sous le nom de stress oxydatif (Choudhury et al., 2017; Mittler, 2002; Mittler, 2017) (Figure 1.7).

3.4. Le rôle signalétique des ROS

En dépit de leurs effets délétères pour les biomolécules, les ROS jouent différents rôles dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et dans la régulation de plusieurs processus physiologiques et métaboliques (Apel and Hirt, 2004; Laloi et al., 2004). Ils interviennent dans la protection des plantes contre les pathogènes (Wojtaszek, 1997), l'établissement des symbioses chez les légumineuses (Santos et al., 2001), la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire (Mittler, 2017), le gravitropisme racinaire (Joo et al., 2001), et la régulation de la réponse à la carence en macronutriments. Par exemple, la production d' H_2O_2 dans les racines d'*Arabidopsis* joue un rôle dans la régulation de l'expression génique en réponse à la carence en potassium (Shin and Schachtman, 2004). La carence en N et en P induit également une accumulation d' H_2O_2 (Shin et al., 2005). Par ailleurs, la production des ROS et particulièrement le radical hydroxyl $\cdot OH$, affecte le transport membranaire de K^+ et de Ca^{2+} chez les plantes (Demidchik et al., 2010; Demidchik et al., 2003). L'application de molécules détoxifiantes de $\cdot OH$ comme le mannitol, réduit considérablement cet effet (Cuin and Shabala, 2007). Les ROS interviennent aussi dans le développement des poils absorbants et la différenciation des racines. En effet, chez le mutant *rh2*, il a été démontré qu'une NADPH oxydase (*AtRBOHC*) contrôle le développement des poils absorbants en régulant la croissance de l'apex via l'activation des canaux calciques (Foreman et al., 2003). Par ailleurs, les concentrations différentielles de $O_2^{\cdot -}$ et d' H_2O_2 ont été montrées récemment comme impliquées dans le contrôle de la différenciation du méristème racinaire. Ce gradient de concentration est maintenu par le facteur de transcription UPB1 qui inhibe l'expression des peroxydases et maintient ainsi un seuil élevé d' H_2O_2 nécessaire à l'élongation des cellules et ultérieurement à leur différenciation (Tsukagoshi et al., 2010). Les ROS participent aussi au maintien des signalisations à longue distance. En effet, des travaux ont montré que les plantes peuvent médier une communication systémique consécutive à la blessure. Cette signalisation nécessite une production de ROS NADPH-oxydase dépendante le long du trajet du signal (Miller et al., 2009). Un dernier exemple de l'implication des ROS dans l'acclimatation des plantes à l'environnement, est la fermeture

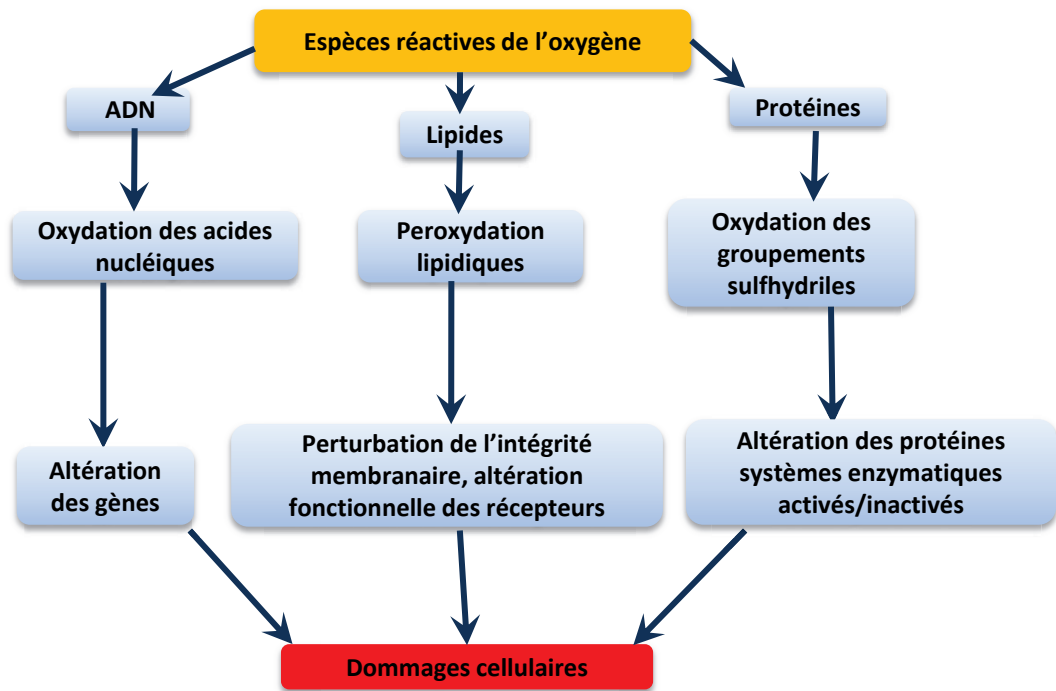


Figure 1.7. Les dommages cellulaires causés par les ROS.

stomatique. En effet, il a été montré qu'un traitement à l'ABA conduit à une accumulation de peroxyde d'hydrogène qui active des canaux calciques membranaires permettant la fermeture stomatique (Pei et al., 2000). L'ensemble de ces exemples démontre le rôle des ROS dans l'acclimatation des plantes à leur environnement. Mais quels sont les mécanismes moléculaires par lesquels les ROS déclenchent ces réponses ?

Les ROS peuvent effectuer des modifications dans la structure et la fonction des protéines aboutissant à des changements dans la régulation du métabolisme et de l'expression des gènes. Parmi les modifications post-traductionnelles liées aux ROS, on trouve la sulfonylation, la carbonylation, la glutathionylation et la S-nitrosylation (Choudhury et al., 2017). La sulfonylation et la S-nitrosylation ciblent notamment les groupements thiols (R-SH) des cystéines qui, en présence d' H_2O_2 , seront oxydés en acide sulfénique (R-SOH) puis en ponts disulfures (S-S). De la même manière, le $^{\bullet}NO$ est capable lors d'une réaction de S-nitrosylation de prendre la place du proton du groupement thiol pour former le SNO. Mais d'autres acides aminés, comme la méthionine, peuvent subir une sulfonylation pour se transformer en méthionine sulfoxyde. L'oxydation de tryptophane donne naissance à une molécule instable, le tryptophane hydroperoxyde qui se décompose rapidement en N'-formylkynurénine et kynurénine. L'acide sulfénique formé par sulfonylation est hautement réactif et peut former des liaisons covalentes avec le glutathion lors d'une réaction de S-glutathionylation. La carbonylation touche un large spectre d'acides aminés comme l'arginine, la thréonine, la lysine, la proline, et l'histidine. Ce dernier, ainsi que la cystéine peuvent également subir une carbonylation en réagissant avec des produits issus de lipoperoxydation (Choudhury et al., 2017; Janssen-Heininger et al., 2008).

Ces modifications régulent directement l'activité des protéines cibles comme les FT, les protéases, les phosphatases et les kinases. Le statut redox de la cellule intervient par exemple dans la modulation des MAPK qui constituent un système de transduction de signal conservé chez les eucaryotes. Les MAPK sont connues pour affecter le sort des cellules vers l'apoptose, la prolifération ou la différenciation (Cuadrado and Nebreda, 2010). Ces kinases sont, en particulier, capables de moduler l'expression des gènes de défenses comme les PAL et les protéines PRs et de réguler l'immunité innée chez les plantes (Asai et al., 2002; Nakagami et al., 2005).

4. Les facteurs de transcription

4.1. Généralités

La plupart des processus biologiques sont finement régulés *via* la modulation de l'expression des gènes. Ces régulations transcriptionnelles sont directement liées à l'activité des facteurs de transcription. Les facteurs de transcription sont généralement des protéines contenant des "DNA-binding domains" (DBD) qui leur permettent de se fixer sur le promoteur pour réguler l'expression de leurs gènes cibles. Cependant, il existe des protéines régulatrices qui ne se fixent pas sur l'ADN mais qui interagissent avec ces derniers pour former des complexes transcriptionnels. Vu qu'ils participent à la régulation de la transcription, ces protéines sont également qualifiées de facteurs de transcription (Gonzalez, 2015).

À la différence des facteurs de transcription de base (ou généraux) qui se fixent sur les éléments du promoteur basal comme la boîte TATA, les facteurs de transcription dits spécifiques reconnaissent des séquences variées situées en amont du promoteur basal (Gonzalez, 2015; Lee and Young, 2000). La présence de ce genre de séquences est nécessaire pour la régulation de la transcription parce que i) l'interaction entre les facteurs de transcription généraux et le promoteur basal n'est pas suffisante pour former un complexe transcriptionnel stable ii) les facteurs de transcription généraux ne peuvent pas réprimer l'expression des gènes (Gonzalez, 2015; Stargell and Struhl, 1996; Struhl et al., 1998). Dans tout le reste du manuscrit, le terme facteur de transcription (FT) fera référence aux facteurs de transcription spécifiques.

Les organismes supérieurs codent jusqu'à des milliers de facteurs de transcription (~10% des gènes codants des protéines) et chaque FT pourrait réguler des centaines jusqu'à des milliers de gènes ce qui illustre la complexité des réseaux de régulation des gènes chez les eucaryotes (Carre et al., 2017; O'Malley et al., 2016; Shiu et al., 2005; Vaquerizas et al., 2009).

Après le séquençage du génome d'*Arabidopsis*, 1500 FT ont été identifiés puis classifiés en 30 familles (Riechmann et al., 2000). Des analyses plus détaillées ont par la suite permis l'identification de plus de 2000 FT. Mais le nombre exact des FT et des familles sur lesquelles ils sont répartis varient selon les bases de données. PlantTFDB par exemple en compte 58 familles constituées de 2296 FT codés par 1717 gènes (Jin et al., 2017). Le nombre de gènes par famille varie énormément entre les familles HRT-like et NF-X1 qui contiennent 2 membres chacune par exemple, et la famille bHLH codant pour 225 FT (Jin et al., 2017). Le règne végétal contient aussi bien des FT conservés chez tous les eucaryotes que des FT spécifiques des

plantes. La famille GARP est un exemple de FT présents uniquement chez les végétaux (Gonzalez, 2015; Riechmann et al., 2000).

4.2. La famille GARP

Une large partie de mon travail de thèse s'est focalisé sur l'étude de gènes appartenant à une famille particulière de facteurs de transcription nommée GARP. J'ai eu l'opportunité de rédiger avec mes encadrants l'article suivant pour le journal *Current Opinion in Plant Biology* (Safi et al., 2017), qui présente les détails de cette famille de FT ayant une grande diversité de fonctions physiologiques et moléculaires.



The world according to GARP transcription factors

Alaeddine Safi, Anna Medici, Wojciech Szponarski,
Sandrine Ruffel, Benoît Lacombe and Gabriel Krouk

Plant specific GARP transcription factor family (made of ARR-B and G2-like) contains genes with very diverse in planta functions: nutrient sensing, root and shoot development, floral transition, chloroplast development, circadian clock oscillation maintenance, hormonal transport and signaling. In this work we review: first, their structural but distant relationships with MYB transcription factors, second, their role in planta, third, the diversity of their *Cis*-regulatory elements, fourth, their potential protein partners. We conclude that the GARP family may hold keys to understand the interactions between nutritional signaling pathways (nitrogen and phosphate at least) and development. Understanding how plant nutrition and development are coordinated is central to understand how to adapt plants to an ever-changing environment. Consequently GARPs are likely to attract increasing research attentions, as they are likely at the crossroads of these fundamental processes.

Address

Laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, UMR5004 CNRS/INRA/SupAgro/UM, Institut de Biologie Intégrative des Plantes 'Claude Grignon', Place Pierre Viala, 34060 Montpellier, France

Corresponding author: Krouk, Gabriel (gkrouk@gmail.com, gabriel.krouk@nrs.fr)

Current Opinion in Plant Biology 2017, 39:159–167

This review comes from a themed issue on Cell signalling and gene regulation

Edited by Tzyy-Jen Chiou, Wayne K Versaw and Toru Fujiwara

For a complete overview see the [Issue](#) and the [Editorial](#)

Available online 10th August 2017

<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2017.07.006>

1369-5266/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Nutrient availability is a major environmental factor affecting plant growth and development. These environmental variations are quite complex because of the diversity of external nutrient stimuli, but also from the fact that these external stimuli are seen by plants as a myriad of different combinations. To decode this information and respond accordingly, plants have evolved different regulatory networks. These latter include transcriptional Genes Regulatory Networks (GRNs; understood as the relationships of transcription factors [TFs] to their target

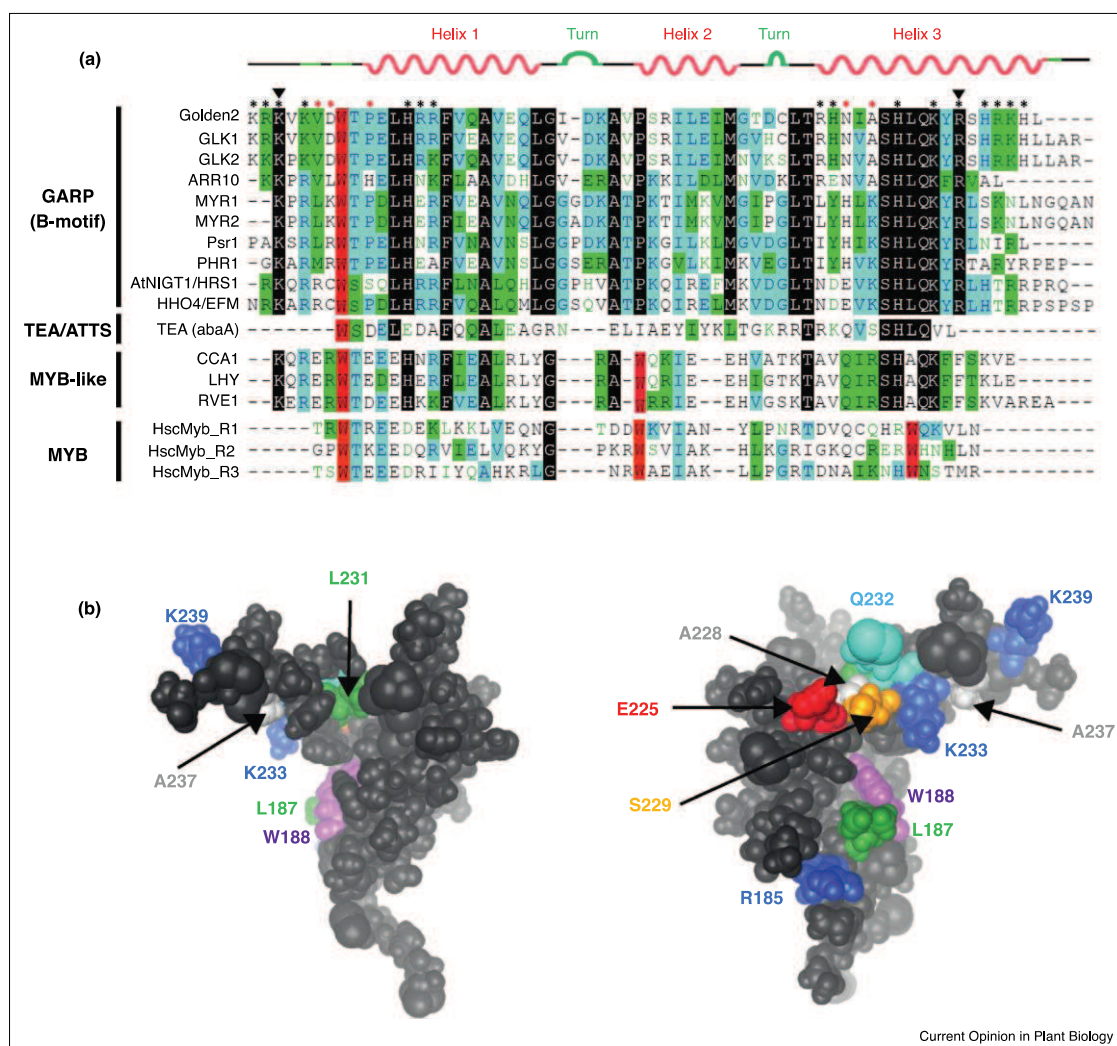
genes) being at the center of recent systems biology investigations. However, many aspects of TFs roles and mode of action are still largely unknown.

Completion of the Arabidopsis genome in 2000 led to an almost exhaustive identification and classification of TFs in a given plant [1]. Depending on reference databases TF numbers may vary, but according to the PlantTFDB [2], that consider TFs as strictly DNA binding proteins, the Arabidopsis genome encodes 2296 TFs (1717 loci), that can be classified into 58 TF families.

When some TF families are constrained to particular roles in plants — such as the AUXIN RESPONSE FACTORS (ARF) family for instance controlling plant response to auxin [3–5] — other TFs groups contains closely related genes involved in very diverse functions. This is the case for the GARP (Golden2, ARR-B, Psr1) family that recently attracted a lot of attention since it gathers genes involved in: plant development, hormone signaling, organogenesis, circadian clock oscillations, resistance to pathogens, as well as genes that may constitute a central nutrient sensing system in plants. In the following paragraphs we first, present the delineation of the GARP TF family, second, review their physiological role in nutrient sensing and other functions, third, present the diversity of their potential *Cis*-Regulatory Elements (CREs), and fourth, report their potential interactants.

GARPs form a distinct group of TFs distantly related to the MYB-superfamily. GARP are often associated to MYB or MYB-like TFs. MYB (from myeloblastosis) TFs are widely distributed in all eukaryotic organisms. In contrast to animals and fungi, higher plants contain a large numbers of MYB genes [1]. For example, in Arabidopsis, the MYB family contains 197 members forming the largest TFs family [6,7]. MYB proteins contain a MYB DNA binding domain which generally comprises up to three imperfect repeats of 51–53 amino acids (R1, R2, and R3) [7]. Each repeat forms three α -helices and contains three regularly spaced tryptophan residues with 18 or 19 amino acid spacing [8] (Figure 1a). The tryptophan residues build a hydrophobic cluster in the helix-turn-helix (HTH) structure in each repeat and stabilize the structure of the DNA binding domain, which presumably helps in the specific recognition of DNA [9] (Figure 1a). Based on the number of MYB motif repeats, MYB TFs are classified into four major subfamilies: first, R2R3-MYB, with two imperfect adjacent repeats; second, R1R2R3-MYB, which are the

Figure 1



Similarities and differences between the GARP, MYB-like, TAE/ATTS and the MYB motifs with insight into the 3D structure of the GARP motif. **(a)** Sequence alignment of the GARP, TAE/ATTS, MYB-like and MYB domains has been built using the Vector NTI (Invitrogen) software. Black shaded sequences represent identical amino acids. The three regularly spaced tryptophan (W) residues are highlighted in red as they are key to distinguish between the different family domains. GARP members have only the first W. The two other W residues are replaced by P and L respectively (see text). Conserved residues are highlighted in light blue and less conserved in green. Numbers on the top indicate the amino acid positions according to ZmGolden2 sequence (K184 and R236). Positively charged residues implicated in interaction with DNA are marked by black asterisks according to ZmGolden2. Red asterisks show basic amino acids present in other GARPs but not in ZmGolden2. The helix-turn-helix motif formed by the GARP domain is presented on the top. Each secondary structure is aligned with its corresponding amino acid sequence according to ARR10 (PDB). **(b)** GARP or B-motif 3D structure and DNA interacting residues has been resolved in Hosoda *et al.* [17]. Space fill representation showing two different opposite views of the GARP domain are presented using 3D Molecule Viewer software (Invitrogen). Amino acids involved in protein–DNA interaction are highlighted in color (R185, L187, W188, E225, A228, S229, L231, Q232, K233, A237 and K239).

norm in animals, with three adjacent repeats; third, MYB-related proteins including a heterogeneous group which usually contain a single MYB repeat (or even a part of MYB domain); and fourth, atypical MYB proteins

containing more than three MYB repeats. In Arabidopsis, 138, 5, 52 and 2 genes have been identified respectively in each group [1,7]. More divergent but still related to the MYB superfamily is the GARP family. GARP is the

acronym built of gene names belonging to this family: Golden2 in maize [10], ARR-B proteins from Arabidopsis [11], and Chlamydomonas Psr1 [1,12].

The GARP family in Arabidopsis contains 56 genes (loci) [1,2*] and includes the TFs already classified as ARR-B with a N-ter receiver domains (Figure 2; Supplemental Figure 1, see conserved motif analysis), as well as the G2-like genes [1]. A gene can be classified in the GARP family if the derived protein contain the conserved signature motif called B-motif which somewhat resembles both the MYB-like domain of MYB-related proteins [13] and the TEA/ATTS DNA binding domains (TEA for TEF-1, TECL, ABAA and ATTS for ABAA, TECL p, TEF-1 Sequence) found in many proteins that regulate developmental processes in diverse species [10,14,15] (Figure 1a).

Interestingly, phylogenetic analyses have demonstrated the monophyly of the GARP motif relative to TEA/ATTS and MYB-related domains. Thus, GARP TFs are phylogenetically distinct from both TEA and MYB-related proteins [16]. Because of the resemblance between the B-motif and the MYB-like domain, GARP TFs are usually confused with MYB-related TFs. However, they contain only 1 of the 3 regularly spaced tryptophan residues highly conserved in the MYB domain (Figure 1a). And in contrast to MYB-related proteins characterized by the (SHAQK(Y/F/F)) motif, GARP TFs contain a different consensus sequence (SHLQ(K/M)(Y/F)) [1,17]. Taken together, all these data show that previous reports placing GARP TFs in the MYB or MYB-related groups are likely inaccurate (Figure 1a). Finally, despite this weak sequence similarity that it shares with other animals TFs, GARP family TFs are considered plant specific proteins [1,17].

The multi-functionality of GARPs in plants

It is now clear that TFs belonging to GARP do not share a simple common specific function in plants. Thus in these following paragraphs we summarize the most important functions associated to the GARP family (summarized in Figure 2), with special emphasis on their role in nutrient and hormonal response.

Role of GARPs in hormonal signaling

GARP TFs partly got their names from the ARR-B (above) being the transcriptional effectors downstream the cytokinin (CK) signaling [18]. More precisely, the ARR1, ARR2, ARR10, ARR11 and ARR12 display clear cytokinin related phenotypes in plants [19]. Among the strongest recorded phenotype to date the *arr1;arr10;arr12* triple mutant displays defects in: female gametophyte development, shoot development, primary root growth, and seed size [20]. At the transcriptional level mutations in the ARR-B genes trigger a notable reduction in plant transcriptional responses to exogenous CK provision

[20,21]. Thus, GARP TFs are clearly involved in the transduction of the CK signaling *per se* in particular through the action of ARR-B.

Germination phenotype of *hrs1-1* mutants is reverted when crossed with *abi3*, *abi4* and *abi5* mutants. This provides a nice genetic demonstration that HRS1 likely acts upstream of the ABA signaling pathway in germinating seedlings [22].

Other connections between GARP TFs and hormone signaling have been reported recently in the study of the highly NO_3^- controlled TFs AtNIGT1/HRS1 and its close homologous HHO1 [23*]. In this work, a particularly relevant cluster of genes being induced in the double mutant *hrs1-1;hho1-1* and repressed in the HRS1-OE and the HHO1-OE transgenic plants was enriched in genes related to 'auxin response stimulus' and overlapped with key markers of ABA, Auxin, methyl-jasmonate and gibberellins responses. This does not demonstrate that HRS1 and HHO1 are actually involved in the control of hormonal signaling but that their related signaling pathway may converge towards such hormonal biomodules [23*].

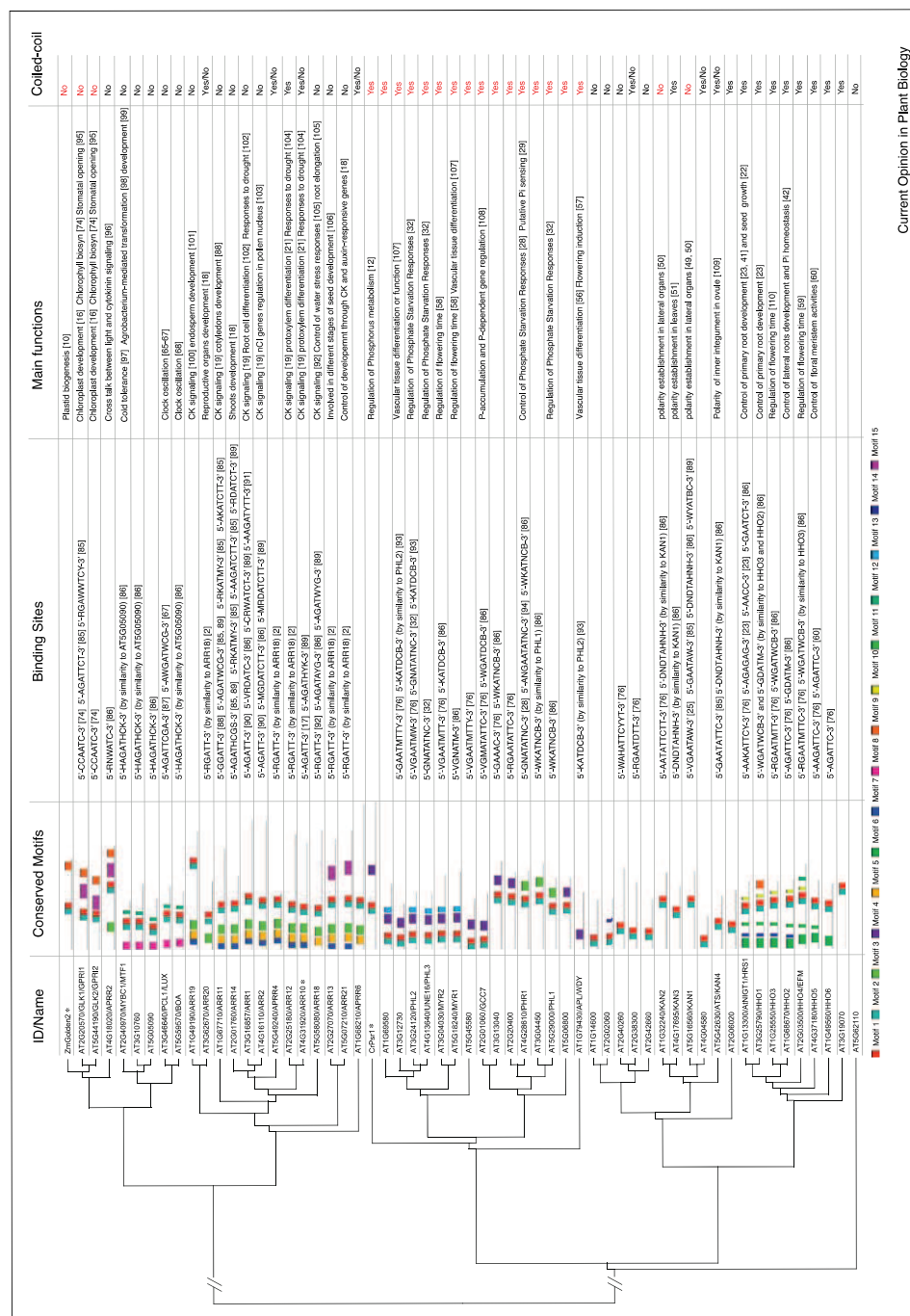
Moreover, KAN1 targets (involved in polarity establishment) contain auxin transport and signaling genes [24*,25]. This control seems to have at least a broad relevance at the embryonic stage by the appearance of ectopic auxin maxima [26]. In addition, KAN1 also regulates genes implicated in the response to ABA, JA, brassinosteroids, ethylene, CK and GA [25].

These informations demonstrate that GARP TFs are important components of the regulation of hormonal transport and signaling.

Role of GARPs in nutrient response and sensing processes

Historically the first GARP TF shown to be involved in nutritional responses was the Chlamydomonas phosphorus-stress response 1 (Psr1). It was isolated as a resistant strain on high concentrations of radioactive phosphate [27]. The same gene was cloned and renamed Phosphorus Starvation Response 1 (Psr1) as this mutant was harboring P starvation related phenotypes [12]. Three years later, another GARP was isolated by genetic studies in Arabidopsis by cloning the gene responsible for the mis-regulation of the P starvation response marker Induced by P Starvation 1 (*IPS1*) [28]. This gene, PHosphate starvation Response 1 (PHR1) was very recently shown to be part of a central regulatory module defining something resembling a Pi sensing system. Indeed, PHR1 was shown to physically interact with the protein SPX1 in presence of Pi. This interaction was shown to prevent PHR1 to bind its cognate CRE named P1BS. Conversely, upon P starvation, PHR1 and SPX1 are not interacting physically which releases PHR1 to activate its targets (*IPS1* for

Current Opinion in Plant Biology



instance) [29^{**}]. Equivalent mechanism, though more complicated, was reported for rice OsPHR2 and OsSPX1 and OsSPX2 [30^{**}]. Arabidopsis PHR1 was shown *in planta* to act redundantly with its homologous PHR1-Like 1 (PHL1) and 2 (PHL2) [31,32]. Even if some investigations concerning the actual affinities of the PHR/SPX complex for Pi or inositol polyphosphate (InsP) [33] are needed to call the PHR/SPX a *bona fide* P sensor, this body of work demonstrates that the GARP family likely hosts nutrient sensing proteins. Furthermore, through its activity, PHR1 also displays effects on membrane lipids [34^{*}], on primary and secondary metabolisms accumulation [35^{*}] and on adaptation to high light [36] in Pi-deficient plants. Moreover, PHR1 serves as the convergence point for the cross-talk between Pi and other essential nutrients, such as sulfate, zinc, and iron reviewed in Briat *et al.* [37].

Another sub-group of the GARP protein that attracted recently lots of attention was the one containing HRS1 and HHO proteins (Figure 2). Interestingly, the research community working on nitrate signaling was very much interested into HRS1 and its homologous genes, because they were found to be the most robustly and quickly (within minutes) NO₃⁻ regulated genes [38–40]. HRS1 was then studied using the TARGET technique [23^{*}] that allow to quickly identify the direct targets of a transcription factor [41]. Among the direct targets of HRS1, many phosphate-related genes were found. The double mutant *hrs1-1;hho1-1* displayed root phosphate deprivation resistant phenotypes only when nitrate were present in the media. This phenotype could be explained by the combination of a transcriptional control by NO₃⁻, and a post-translational control by Pi of HRS1 [23^{*},42]. This study defines HRS1 and HHOs as potentially at the crossroads of N and P signals. This work was recently supported by a study of a related gene HHO2 (Figure 2). HHO2, which is itself transcriptionally regulated by P signals, was shown to influence plant response to P starvation including root development, and Pi content [43].

This body of evidences demonstrates that GARPs are important factors controlling plant responses to nutrients and include probable nutrient sensors.

Role of GARPs in chloroplast biogenesis

Historically the oldest function identified for GARPs was a role in chloroplast biogenesis. Indeed, in 1926 a mutant named *golden2* (*g2*) was described to harbor a golden color phenotype in Maize leaves [44]. Seventy years later, G2 was identified as a transcriptional regulator of the photosynthetic identity of maize leaves [10]. The *g2* mutant alleles are responsible for the pale green leaf blade color with white leaf sheaths. Several orthologues pairs of GLKs were identified in different species (Rice, Arabidopsis, Tomato, Pepper) where they show overlapping expression profiles and redundant functions [16,45,46]. GLK proteins determine the chloroplast structure. In both maize and Arabidopsis, the loss of function of GLK determines aberrant morphology in chloroplast ultrastructure: plastids are small, with rudimentary lamellae thylakoids and lack grana thylakoids [16].

In parallel to morphological chloroplast modifications, GLKs regulate photosynthetic machinery. In the double Arabidopsis *KO* mutant *glk1;glk2*, the Light Harvesting Complex protein accumulation (LHCII), responsible for chl*a/b* binding, decreases while RuBisCO accumulation remains unchanged [16]. The striking observation of the important role of GLKs in chloroplast biogenesis is that an overexpression of GLKs in non-photosynthetic tissues triggers chlorophyll accumulation and chloroplast formation such as in roots for instance (phenomenon named root greening [47]). Furthermore, the Tomato and Pepper orthologues of the Arabidopsis APRR2, belonging to the same clade as GLKs (Figure 2), are also able to enhance chlorophyll accumulation and to trigger chloroplast structure modification in fruits when overexpressed *in planta* [48]. In conclusion, GLKs and APRR nuclear-encoded proteins are involved in the regulation of nuclear and plastid-encoded proteins, defining basal photosynthetic function of the leaf and fruit tissues.

Role of GARPs in plant development

GARPs transcription factors play an important role in plant organ development. The 4 members of the KANADI family (Figure 2) have been studied largely for their involvement in organ polarity definition in Arabidopsis, in particular in leaves [49–52]. KAN1 was first

Arabidopsis thaliana GARP family overview and relationships with CrPsr1, ZmGolden2. Arabidopsis GARP genes (56 loci) were retrieved from the PlantTFDB [2^{*}]. This includes the ARR-B genes as well as the G2-like genes. Only one protein per locus was used to not bias the phylogenetic analysis. Genes that gave their name to the gene family were also included in the analysis and marked by asterisk (ARR-10, CrPsr1 and ZmGolden2). The tree was built using the mafft algorithm (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>, parameters: G-INS-1, BLOSUM62) and drawn with FigTree. Different parameters including FFT-NS-2, FFT-NS-i, E-INS-i were used that yielded very similar trees. For each TF, the figure presents: first, conserved protein motifs determined using the MEME suite algorithm. Conserved protein motifs (Motifs #1 to #15) across the GARP family are provided in Supplemental Figure 1; second, the potential CREs defined by DAP-seq or other approaches (PBM, EMSA, Selex, Chip-seq, etc.) [17,23^{*},25,28,32,60,67,74,85–94]. Letters different from A, T, C and G correspond to the commonly used IUPAC nucleotide code of degenerated nucleotides; third, their so far discovered functions [10,12,16,18,19,21,22,23^{*},28,29^{**},32,42,43,49–51,56,57^{*},58,59^{**},60,65–68,74,88,92,95–105,107–110] and fourth, the presence of coiled-coil domain. The latter was deduced from literature [17,28,108,111] (in red) and predicted (in black) using mainly, MARCOIL, a Markov Model-based algorithm (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/marcoil/>) [112,113] and supported by other prediction programs: prabi (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_lupas.html), COILS (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html), COILS/PCOILS (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/pcoils/>), Paircoil2 (<http://cb.csail.mit.edu/cb/paircoil2/paircoil2.html>), and CCHMM (http://gpcr.biocomp.unibo.it/cgi/predictors/cc/pred_cchmm.cgi). Note that Refs. [85–144] are listed in Supplemental Text.

identified as determining the polarity along leaf adaxial–abaxial axis [49,52], changing the density of mesophyll and trichome cells. KANADI genes involved in leaf symmetry determination are expressed in the abaxial domain of the Shoot Apical Meristem (SAM) where they act as negative regulators of genes involved in auxin biosynthesis, transport and signaling [25]. The strong effect of KANs on organ development rises from their role in embryo patterning at early stages [26] and their connection to the auxin signaling and transport. KANs are also determinant of leaf or spikelets structure in other species such as in maize [53] or rice [54].

GARP TFs also influence vascular tissues definition. For instance, KAN1 ectopic expression triggers the loss of vascular development [49,50] inhibiting procambium activity [55]. KAN4 plays a role in vascular bundle patterning [52]. APL promotes and represses phloem and xylem cells differentiation respectively [56]. Finally, ARR1/10/12 control root vascular tissues formation [21].

GARPs play a role in the reproductive organs determination. KAN1 and KAN2 determine the symmetry of floral organs [49]. At a different level, APL promotes the floral induction, by transcriptionally activating the FLOWERING LOCUS T (FT) [57]. On the other hand, MYR1 and MYR2 act as repressors of the flowering time under low light intensities [58]. Another repressor of flowering is the Early Flowering Myb protein (EFM/HHO4). EFM represses FT transcription in leaf vascular tissues integrating temperature and light signals [59]. Recently WUSCHEL (WUS, controlling the floral organ number) was shown to be regulated by the complex formed by Ultrapetala1 (ULT1) and ULT1 Interacting Factor1 (UIF1)/HHO5 [60].

Root development is also an important aspect controlled by several GARPs. For examples, KAN1 or KAN3 loss and gain of function plants have altered primary and lateral roots traits [49,50]. KANADI overexpressors have defects in LR primordia formation [61]. ARR-B proteins through their role in CK signaling show an effect on root development [20,62]. Finally, as evoked above GARPs (PHR1/PHL1, HRS1, HHO2, GLKs) are involved in determining root development plasticity in response to nutrient signals [22,23,31,43,63,64], highlighting once more the close connections between nutrition and development.

Role of GARPs in clock oscillation

Another interesting aspect of the multifunctionality of the GARP family is that 2 independent genetic studies of a mutagenized population expressing an oscillating gene fused to the LUCIFERASE (LUC) reporter, lead to the identification a PHYTOCLOCK1 (PCL1) [65] also known as LUX ARRHYTHMO (LUX) [66] as being an important component of the phasing of the core clock [67]. Because of its strong homology with LUX/PCL1 (Figure 2), BROTHER OF LUX ARRHYTHMO (BOA) was

studied and also displayed an effect on the oscillation of central clock genes such as CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 (CCA1), LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY), GIGANTEA (GI), and TIMING OF CAB EXPRESSION1 (TOC1/APRR1) [68]. All together, these results show that GARP TFs are also important components maintaining circadian oscillations in plants.

Role of GARPs in resistance to pathogens

Overexpression of GLK1 confers enhanced resistance to *Fusarium graminearum*, a nonhost fungal pathogen in *Arabidopsis* [69,70]. More recently, Murmu *et al.* suggested that AtGLKs are involved in JA-dependent susceptibility to the biotrophic pathogen *Hpa Noco2* and in JA-independent resistance to the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* [71]. GLKs are not only involved in plant fungus defense, but also in virus infection immunity. More precisely, GLKs could enhance the resistance against Cucumber mosaic virus (CMV) by regulating the content of endogenous hormones (SA and JA), the expression of defense-associated genes and by modulating antioxidant system in *Arabidopsis* [72]. This role in the control of hormone accumulation could be an interesting gate to link different physiological phenomenon including development, resistance to pathogens and nutrition.

Insights into protein 3D structure and DNA interaction

In GARPs, the B domain (made of conserved motifs #1 and #2 in Figure 2, Sup Figure 1) of 60 amino acids forms a three α -helices 3D structure containing a helix-turn-helix (HTH) motif [17] (Figure 1a). In a manner similar to the MYB domain, HTH structure recognizes the DNA major groove by positively charged residues located in the third helix [9,17,73]. The N-terminus contains a basic rich flexible arm [17]. This long N-terminal loop is implicated in DNA minor groove binding, just like homeodomains of homeobox TFs [17]. Although DNA binding and nuclear localization are usually structurally and functionally separable, GARP TFs show a NLS in their DNA binding domains indicating that the B motif is a multifunctional domain [17].

Different DNA sequences have been revealed to be bound by GARP TFs, in a sequence specific manner (PHR1 [28], ARR10 [17], GLKs [74], OsNIGT1 [75], AtHRS1 [23]). In addition, a high-throughput *cis* elements discovery method called DAP-seq, has recently defined the *Arabidopsis* cistrome by studying 2.7 million binding targets of 529 TFs [76]. Based on these available data, we summarize Figure 2 the motifs recognized by each GARP member. Interestingly, some GARP family proteins show dual specificity on DNA binding [73]. Among TFs that bind two consensus sequences or more we found for example, OsNIGT1 (GAATC and GAATATTC [75]) and his homologous in *Arabidopsis* AtNIGT1/HRS1 (AACC, AGAAGA [23]). Yanagisawa has explained this by the dimerization and dissociation capacity of GARPs

[73]. Actually, the first motif bound by NIGT1, resembles to CCAATC and AGATT (in the complementary strand), bound respectively by GLK1/2 [74] and ARR10 [17]. Whereas the second is very similar to the P1BS palindromic sequence (GNATATNC) bound by PHR1 [28]. Intriguingly, GLKs and ARR10 may recognize their respective DNA motifs as monomers, while PHR1 binds to P1BS as a dimer. ARR10 residues involved into DNA recognition are shown in a 3D structure of its GARP domain (Figure 1b). Thus, it has been suggested that NIGT1 monomer binds GAATC sequence, but palindromic sequence is bound only after dimer formation [73]. This model may also explain, at least in part, why some GARPs recognize very divergent DNA sequences (Figure 2).

The diversity of protein–DNA interactions can also be explained by the different protein partners that the GARPs may have. To get further into this aspect please refer to Supplemental Text and Supplemental Figure 2, that recapitulates and discuss GARPs proteins–protein interactions found in literature and in databases.

Conclusion

It is noteworthy that the plant specific GARP family is presumably related to the MYBs being present in many branches of living organisms [77–79] controlling development and basal molecular processes [80,81]. In plants, the GARP family evolved into a versatile group of proteins that gather developmental regulators [16,21,23*,49,50,56,57*,59**,60] as well as probable nutrient sensors [29**,30**]. Since nutrition and development are intimately linked through potential dedicated signaling pathways [82–84], the GARP family holds many promises concerning the potential to find within it, very key regulators of the co-control of nutrition and development.

Since adaptation of plants to an ever-changing environment will be crucial to sustain food networks on the planet, the GARP family is likely to hold potential keys to unlock this issue.

Acknowledgements

This work was supported by Agence Nationale de la Recherche (IMANA ANR-14-CE19-0008 with a doctoral fellowship to AS), by CNRS (LIA-CoopNet, PEPS-SuperRegNet) and by NSF (IOS 1339362-NutriNet).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2017.07.006>.

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

1. Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR et al.: **Arabidopsis**

transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 2000, **290**:2105–2110.

2. Jin J, Tian F, Yang DC, Meng YQ, Kong L, Luo J, Gao G: **PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants.** *Nucleic Acids Res* 2017, **45**:D1040–D1045.

This paper describes a very usefull and well organized database of plant TF.

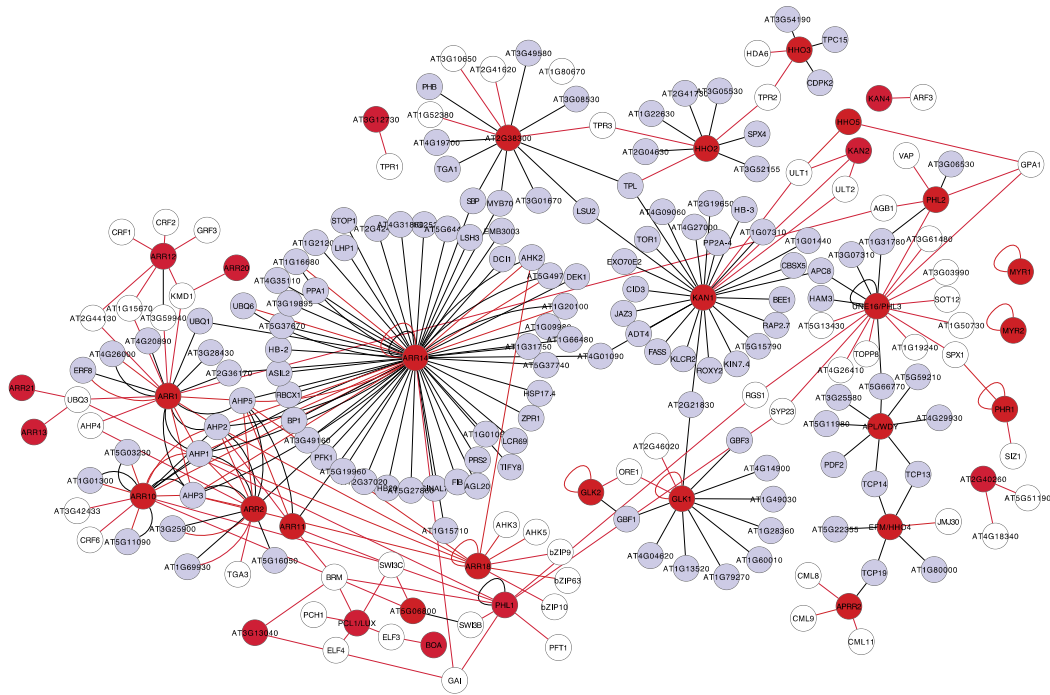
3. Guilfoyle TJ, Ulmasov T, Hagen G: **The ARF family of transcription factors and their role in plant hormone-responsive transcription.** *Cell Mol Life Sci* 1998, **54**:619–627.
4. Guilfoyle TJ, Hagen G: **Auxin response factors.** *Curr Opin Plant Biol* 2007, **10**:453–460.
5. Li SB, Xie ZZ, Hu CG, Zhang JZ: **A review of Auxin Response Factors (ARFs) in plants.** *Front Plant Sci* 2016, **7**:47.
6. Riechmann JL, Ratcliffe OJ: **A genomic perspective on plant transcription factors.** *Curr Opin Plant Biol* 2000, **3**:423–434.
7. Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L: **MYB transcription factors in Arabidopsis.** *Trends Plant Sci* 2010, **15**:573–581.
8. Kanei-Ishii C, Sarai A, Sawazaki T, Nakagoshi H, He DN, Ogata K, Nishimura Y, Ishii S: **The tryptophan cluster: a hypothetical structure of the DNA-binding domain of the myb protooncogene product.** *J Biol Chem* 1990, **265**:19990–19995.
9. Ogata K, Hojo H, Aimoto S, Nakai T, Nakamura H, Sarai A, Ishii S, Nishimura Y: **Solution structure of a DNA-binding unit of Myb: a helix-turn-helix-related motif with conserved tryptophans forming a hydrophobic core.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**:6428–6432.
10. Hall LN, Rossini L, Cribb L, Langdale JA: **GOLDEN 2: a novel transcriptional regulator of cellular differentiation in the maize leaf.** *Plant Cell* 1998, **10**:925–936.
11. Imamura A, Hanaki N, Nakamura A, Suzuki T, Taniguchi M, Kiba T, Ueguchi C, Sugiyama T, Mizuno T: **Compilation and characterization of Arabidopsis thaliana response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction.** *Plant Cell Physiol* 1999, **40**:733–742.
12. Wykoff DD, Grossman AR, Weeks DP, Usuda H, Shimogawara K: **Per1, a nuclear localized protein that regulates phosphorus metabolism in Chlamydomonas.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:15336–15341.
13. Sakai H, Aoyama T, Bono H, Oka A: **Two-component response regulators from Arabidopsis thaliana contain a putative DNA-binding motif.** *Plant Cell Physiol* 1998, **39**:1232–1239.
14. Burglin TR: **The TEA domain: a novel, highly conserved DNA-binding motif.** *Cell* 1991, **66**:11–12.
15. Andrianopoulos A, Timberlake WE: **ATTS, a new and conserved DNA binding domain.** *Plant Cell* 1991, **3**:747–748.
16. Fitter DW, Martin DJ, Copley MJ, Scotland RW, Langdale JA: **GLK gene pairs regulate chloroplast development in diverse plant species.** *Plant J* 2002, **31**:713–727.
17. Hosoda K: **Molecular structure of the GARP family of plant myb-related DNA binding motifs of the Arabidopsis response regulators.** *Plant Cell* 2002, **14**:2015–2029.
18. Tajima Y, Imamura A, Kiba T, Amano Y, Yamashino T, Mizuno T: **Comparative studies on the type-B response regulators revealing their distinctive properties in the His-to-Asp phosphorelay signal transduction of Arabidopsis thaliana.** *Plant Cell Physiol* 2004, **45**:28–39.
19. Kieber JJ, Schaller GE: **Cytokinins.** *Arabidopsis Book* 2014, **12**:e0168.
20. Argyros RD, Mathews DE, Chiang YH, Palmer CM, Thibault DM, Etheridge N, Argyros DA, Mason MG, Kieber JJ, Schaller GE: **Type B response regulators of Arabidopsis play key roles in cytokinin signaling and plant development.** *Plant Cell* 2008, **20**:2102–2116.
21. Yokoyama A, Yamashino T, Amano Y, Tajima Y, Imamura A, Sakakibara H, Mizuno T: **Type-B ARR transcription factors,**

- ARR10 and ARR12, are implicated in cytokinin-mediated regulation of protoxylem differentiation in roots of *Arabidopsis thaliana*.** *Plant Cell Physiol* 2007, 48:84-96.
22. Wu C, Feng J, Wang R, Liu H, Yang H, Rodríguez PL, Qin H, Liu X, Wang D: **HRS1 acts as a negative regulator of abscisic acid signaling to promote timely germination of *Arabidopsis* seeds.** *PLoS ONE* 2012, 7:e35764.
 23. Medici A, Marshall-Colon A, Ronzier E, Szponarski W, Wang R, Gojon A, Crawford NM, Ruffel S, Coruzzi GM, Krouk G: **AtNIGT1/HRS1 integrates nitrate and phosphate signals at the *Arabidopsis* root tip.** *Nat Commun* 2015, 6:6274.
- This work highlights a potential molecular mechanism that entangle N and P signals and control root development through the convergence of these signals on the protein HRS1.
24. Huang T, Harrar Y, Lin C, Reinhardt B, Newell NR, Talavera-Rauh F, Hokin SA, Barton MK, Kerstetter RA: ***Arabidopsis* KANADI1 acts as a transcriptional repressor by interacting with a specific cis-element and regulates auxin biosynthesis, transport, and signaling in opposition to HD-ZIPIII factors.** *Plant Cell* 2014, 26:246-262.
- This work makes the nice demonstration of KAN1 is a regulator of auxin biosynthesis, transport and signaling.
25. Merelo P, Xie Y, Brand L, Ott F, Weigel D, Bowman JL, Heisler MG, Wenkel S: **Genome-wide identification of KANADI1 target genes.** *PLoS ONE* 2013, 8:e77341.
 26. Izhaki A, Bowman JL: **KANADI and class III HD-Zip gene families regulate embryo patterning and modulate auxin flow during embryogenesis in *Arabidopsis*.** *Plant Cell* 2007, 19:495-508.
 27. Shimogawara K, Wykoff DD, Usuda H, Grossman AR: ***Chlamydomonas reinhardtii* mutants abnormal in their responses to phosphorus deprivation.** *Plant Physiol* 1999, 120:685-694.
 28. Rubio V, Linhares F, Solano R, Martin AC, Iglesias J, Leyva A, Paz-Ares J: **A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae.** *Genes Dev* 2001, 15:2122-2133.
 29. Puga MI, Mateos I, Charukesi R, Wang Z, Franco-Zorrilla JM, de Lorenzo L, Irigoyen ML, Masiero S, Bustos R, Rodríguez J *et al.*: **SPX1 is a phosphate-dependent inhibitor of Phosphate Starvation Response 1 in *Arabidopsis*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, 111:14947-14952.
- This paper (together with Ref. [30]) provides evidences that the SPX1 PHR1 protein partners may constitute the basis of a Phosphate sensing system. This work is opening exiting avenues to investigate the role of GARPs in nutrient sensing pathways.
30. Wang Z, Ruan W, Shi J, Zhang L, Xiang D, Yang C, Li C, Wu Z, Liu Y, Yu Y *et al.*: **Rice SPX1 and SPX2 inhibit phosphate starvation responses through interacting with PHR2 in a phosphate-dependent manner.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, 111:14953-14958.
- This paper (together with Ref. [29]) provides evidences that the rice SPX1/SPX2 PHR2 protein partners may constitute the basis of a Phosphate sensing system. This work is opening exiting avenues to investigate the role of GARPs in nutrient sensing pathways.
31. Bustos R, Castrillo G, Linhares F, Puga MI, Rubio V, Perez-Perez J, Solano R, Leyva A, Paz-Ares J: **A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*.** *PLoS Genet* 2010, 6:e1001102.
 32. Sun L, Song L, Zhang Y, Zheng Z, Liu D: ***Arabidopsis* PHL2 and PHR1 act redundantly as the key components of the central regulatory system controlling transcriptional responses to phosphate starvation.** *Plant Physiol* 2016, 170:499-514.
 33. Wild R, Gerasimaite R, Jung JY, Truffault V, Pavlovic I, Schmidt A, Saiardi A, Jessen HJ, Poirier Y, Hothorn M *et al.*: **Control of eukaryotic phosphate homeostasis by inositol polyphosphate sensor domains.** *Science* 2016, 352:986-990.
 34. Pant BD, Burgos A, Pant P, Cuadros-Inostroza A, Willmitzer L, Scheible WR: **The transcription factor PHR1 regulates lipid remodeling and triacylglycerol accumulation in *Arabidopsis thaliana* during phosphorus starvation.** *J Exp Bot* 2015, 66:1907-1918.
- An example that the PHR1 protein effect can impact metabolic reprogramming upon P starvation here lipid metabolism.
35. Pant BD, Pant P, Erban A, Huhman D, Kopka J, Scheible WR: **Identification of primary and secondary metabolites with phosphorus status-dependent abundance in *Arabidopsis*, and of the transcription factor PHR1 as a major regulator of metabolic changes during phosphorus limitation.** *Plant Cell Environ* 2015, 38:172-187.
- A nice example that the PHR1 protein effect can impact metabolic reprogramming upon P starvation and that its role is not restricted to transcriptional effects.
36. Nilsson L, Lundmark M, Jensen PE, Nielsen TH: **The *Arabidopsis* transcription factor PHR1 is essential for adaptation to high light and retaining functional photosynthesis during phosphate starvation.** *Physiol Plant* 2012, 144:35-47.
 37. Briat JF, Rouached H, Tissot N, Gaymard F, Dubos C: **Integration of P, S, Fe, and Zn nutrition signals in *Arabidopsis thaliana*: potential involvement of PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1 (PHR1).** *Front Plant Sci* 2015, 6:290.
 38. Krouk G, Tranchina D, Lejay L, Cruikshank AA, Shasha D, Coruzzi GM, Gutierrez RA: **A systems approach uncovers restrictions for signal interactions regulating genome-wide responses to nutritional cues in *Arabidopsis*.** *PLoS Comput Biol* 2009, 5:e1000326.
 39. Krouk G, Mirowski P, LeCun Y, Shasha DE, Coruzzi GM: **Predictive network modeling of the high-resolution dynamic plant transcriptome in response to nitrate.** *Genome Biol* 2010, 11:R123.
 40. Canales J, Moyano TC, Villarroel E, Gutierrez RA: **Systems analysis of transcriptome data provides new hypotheses about *Arabidopsis* root response to nitrate treatments.** *Front Plant Sci* 2014, 5:22.
 41. Bargmann BO, Marshall-Colon A, Efroni I, Ruffel S, Birnbaum KD, Coruzzi GM, Krouk G: **TARGET: a transient transformation system for genome-wide transcription factor target discovery.** *Mol Plant* 2013, 6:978-980.
 42. Liu H, Yang H, Wu C, Feng J, Liu X, Qin H, Wang D: **Overexpressing HRS1 confers hypersensitivity to low phosphate-elicited inhibition of primary root growth in *Arabidopsis thaliana*.** *J Integr Plant Biol* 2009, 51:382-392.
 43. Nagarajan VK, Satheesh V, Poling MD, Raghothama KG, Jain A: ***Arabidopsis* MYB-related HHO2 exerts a regulatory influence on a subset of root traits and genes governing phosphate homeostasis.** *Plant Cell Physiol* 2016, 57:1142-1152.
 44. Jenkins MT: **A second gene producing golden plant color in maize.** *Am Nat* 1926, 60:484-488.
 45. Powell AL, Nguyen CV, Hill T, Cheng KL, Figueroa-Balderas R, Aktas H, Ashrafi H, Pons C, Fernandez-Munoz R, Vicente A *et al.*: **Uniform ripening encodes a Golden 2-like transcription factor regulating tomato fruit chloroplast development.** *Science* 2012, 336:1711-1715.
 46. Brand A, Borovsky Y, Hill T, Rahman KA, Bellalou A, Van Deynze A, Paran I: **CaGLK2 regulates natural variation of chlorophyll content and fruit color in pepper fruit.** *Theor Appl Genet* 2014, 127:2139-2148.
 47. Kobayashi K, Baba S, Obayashi T, Sato M, Toyooka K, Keranen M, Aro EM, Fukaki H, Ohta H, Sugimoto K *et al.*: **Regulation of root greening by light and auxin/cytokinin signaling in *Arabidopsis*.** *Plant Cell* 2012, 24:1081-1095.
 48. Pan Y, Bradley G, Pyke K, Ball G, Lu C, Fray R, Marshall A, Jayasuta S, Baxter C, van Wijk R *et al.*: **Network inference analysis identifies an APRR2-like gene linked to pigment accumulation in tomato and pepper fruits.** *Plant Physiol* 2013, 161:1476-1485.
 49. Kerstetter RA, Bollman K, Taylor RA, Bombliks K, Poethig RS: **KANADI regulates organ polarity in *Arabidopsis*.** *Nature* 2001, 411:706-709.
 50. Eshed Y, Baum SF, Perea JV, Bowman JL: **Establishment of polarity in lateral organs of plants.** *Curr Biol* 2001, 11:1251-1260.
 51. Eshed Y, Izhaki A, Baum SF, Floyd SK, Bowman JL: **Asymmetric leaf development and blade expansion in *Arabidopsis* are**

- mediated by KANADI and YABBY activities. *Development* 2004, **131**:2997-3006.
52. Emery JF, Floyd SK, Alvarez J, Eshed Y, Hawker NP, Izhaki A, Baum SF, Bowman JL: **Radial patterning of Arabidopsis shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes.** *Curr Biol* 2003, **13**:1768-1774.
 53. Candela H, Johnston R, Gerhold A, Foster T, Hake S: **The milkweed pod1 gene encodes a KANADI protein that is required for abaxial/adaxial patterning in maize leaves.** *Plant Cell* 2008, **20**:2073-2087.
 54. Zhang GH, Xu Q, Zhu XD, Qian Q, Xue HW: **SHALLOT-LIKE1 is a KANADI transcription factor that modulates rice leaf rolling by regulating leaf abaxial cell development.** *Plant Cell* 2009, **21**:719-735.
 55. Illegems M, Douet V, Meylan-Bettex M, Uyttewaald M, Brand L, Bowman JL, Stieger PA: **Interplay of auxin, KANADI and Class III HD-ZIP transcription factors in vascular tissue formation.** *Development* 2010, **137**:975-984.
 56. Bonke M, Thitamadee S, Mahonen AP, Hauser MT, Helariutta Y: **APL regulates vascular tissue identity in Arabidopsis.** *Nature* 2003, **426**:181-186.
 57. Abe M, Kaya H, Watanabe-Taneda A, Shibuta M, Yamaguchi A, Sakamoto T, Kurata T, Ausin I, Araki T, Alonso-Blanco C: **FE, a phloem-specific Myb-related protein, promotes flowering through transcriptional activation of FLOWERING LOCUS T and FLOWERING LOCUS T INTERACTING PROTEIN 1.** *Plant J* 2015, **83**:1059-1068.
 58. Zhao C, Hanada A, Yamaguchi S, Kamiya Y, Beers EP: **The Arabidopsis Myb genes MYR1 and MYR2 are redundant negative regulators of flowering time under decreased light intensity.** *Plant J* 2011, **66**:502-515.
 59. Yan Y, Shen L, Chen Y, Bao S, Thong Z, Yu H: **A MYB-domain protein EFM mediates flowering responses to environmental cues in Arabidopsis.** *Dev Cell* 2014, **30**:437-448.
- This work shows that EFM/HHO4 interacts with the JMJ30 H3K36me2 demethylase to specifically demethylate an active mark H3K36me2 at FT. This opens interesting perspectives for the role of GARPs as potential pioneer TFs.
60. Moreau F, Thevenon E, Blanvillain R, Lopez-Vidriero I, Franco-Zorrilla JM, Dumas R, Parcy F, Morel P, Trehin C, Carles CC: **The Myb-domain protein ULTRAPETALA1 INTERACTING FACTOR 1 controls floral meristem activities in Arabidopsis.** *Development* 2016, **143**:1108-1119.
 61. Hawker NP, Bowman JL: **Roles for Class III HD-Zip and KANADI genes in Arabidopsis root development.** *Plant Physiol* 2004, **135**:2261-2270.
 62. Ruffel S, Krouk G, Ristova D, Shasha D, Birnbaum KD, Coruzzi GM: **Nitrogen economics of root foraging: transitive closure of the nitrate-cytokinin relay and distinct systemic signaling for N supply vs. demand.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:18524-18529.
 63. Nilsson L, Muller R, Nielsen TH: **Increased expression of the MYB-related transcription factor, PHR1, leads to enhanced phosphate uptake in Arabidopsis thaliana.** *Plant Cell Environ* 2007, **30**:1499-1512.
 64. Kang J, Yu H, Tian C, Zhou W, Li C, Jiao Y, Liu D: **Suppression of photosynthetic gene expression in roots is required for sustained root growth under phosphate deficiency.** *Plant Physiol* 2014, **165**:1156-1170.
 65. Onai K, Ishiura M: **PHYTOCLOCK 1 encoding a novel GARP protein essential for the Arabidopsis circadian clock.** *Genes Cells* 2005, **10**:963-972.
 66. Hazen SP, Borevitz JO, Harmon FG, Pruneda-Paz JL, Schultz TF, Yanovsky MJ, Liljegren SJ, Ecker JR, Kay SA: **Rapid array mapping of circadian clock and developmental mutations in Arabidopsis.** *Plant Physiol* 2005, **138**:990-997.
 67. Helfer A, Nusinow DA, Chow BY, Gehrke AR, Bulyk ML, Kay SA: **LUX ARRHYTHMO encodes a nighttime repressor of circadian gene expression in the Arabidopsis core clock.** *Curr Biol* 2011, **21**:126-133.
 68. Dai S, Wei X, Pei L, Thompson RL, Liu Y, Heard JE, Ruff TG, Beachy RN: **BROTHER OF LUX ARRHYTHMO is a component of the Arabidopsis circadian clock.** *Plant Cell* 2011, **23**:961-972.
 69. Savitch LV, Subramaniam R, Allard GC, Singh J: **The GLK1 'regulon' encodes disease defense related proteins and confers resistance to Fusarium graminearum in Arabidopsis.** *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **359**:234-238.
 70. Schreiber KJ, Nasmith CG, Allard G, Singh J, Subramaniam R, Desveaux D: **Found in translation: high-throughput chemical screening in Arabidopsis thaliana identifies small molecules that reduce Fusarium head blight disease in wheat.** *Mol Plant Microbe Interact* 2011, **24**:640-648.
 71. Murmu J, Wilton M, Allard G, Pandeya R, Desveaux D, Singh J, Subramaniam R: **Arabidopsis GOLDEN2-LIKE (GLK) transcription factors activate jasmonic acid (JA)-dependent disease susceptibility to the biotrophic pathogen Hyaloperonospora arabidopsidis, as well as JA-independent plant immunity against the necrotrophic pathogen Botrytis cinerea.** *Mol Plant Pathol* 2014, **15**:174-184.
- This paper reports the role of GLK1 and GLK2 in the disease resistance likely through the activation of hormonal dependant and independant pathways.
72. Han XY, Li PX, Zou LJ, Tan WR, Zheng T, Zhang DW, Lin HH: **GOLDEN2-LIKE transcription factors coordinate the tolerance to Cucumber mosaic virus in Arabidopsis.** *Biochem Biophys Res Commun* 2016, **477**:626-632.
- This paper links GARPs to virus resistance opening a new avenue of research on this TF clade.
73. Yanagisawa S: **Characterization of a nitrate-inducible transcriptional repressor NIGT1 provides new insights into DNA recognition by the GARP family proteins.** *Plant Signal Behav* 2013, **8**:e24447.
 74. Waters MT, Wang P, Korkaric M, Capper RG, Saunders NJ, Langdale JA: **GLK transcription factors coordinate expression of the photosynthetic apparatus in Arabidopsis.** *Plant Cell* 2009, **21**:1109-1128.
 75. Sawaki N, Tsujimoto R, Shigyo M, Konishi M, Toki S, Fujiwara T, Yanagisawa S: **A nitrate-inducible GARP family gene encodes an auto-repressible transcriptional repressor in rice.** *Plant Cell Physiol* 2013, **54**:506-517.
 76. O'Malley RC, Huang SS, Song L, Lewsey MG, Bartlett A, Nery JR, Galli M, Gallavotti A, Ecker JR: **Cistrome and epicistrome features shape the regulatory DNA landscape.** *Cell* 2016, **165**:1280-1292.
 77. Klempnauer KH, Gonda TJ, Bishop JM: **Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene v-myb and its cellular progenitor c-myb: the architecture of a transduced oncogene.** *Cell* 1982, **31**:453-463.
 78. Paz-Ares J, Ghosal D, Wienand U, Peterson PA, Saedler H: **The regulatory c1 locus of Zea mays encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators.** *EMBO J* 1987, **6**:3553-3558.
 79. Lipsick JS: **One billion years of Myb.** *Oncogene* 1996, **13**:223-235.
 80. Introna M, Luchetti M, Castellano M, Arsura M, Golay J: **The myb oncogene family of transcription factors: potent regulators of hematopoietic cell proliferation and differentiation.** *Semin Cancer Biol* 1994, **5**:113-124.
 81. Weston K: **Myb proteins in life, death and differentiation.** *Curr Opin Genet Dev* 1998, **8**:76-81.
 82. Krouk G, Ruffel S, Gutierrez RA, Gojon A, Crawford NM, Coruzzi GM, Lacombe B: **A framework integrating plant growth with hormones and nutrients.** *Trends Plant Sci* 2011, **16**:178-182.
 83. Krouk G: **Hormones and nitrate: a two-way connection.** *Plant Mol Biol* 2016, **91**:599-606.
 84. Ristova D, Carre C, Pervent M, Medici A, Kim GJ, Scalia D, Ruffel S, Birnbaum KD, Lacombe B, Busch W *et al.*: **Combinatorial interaction network of transcriptomic and phenotypic responses to nitrogen and hormones in the Arabidopsis thaliana root.** *Sci Signal* 2016, **9**:rs13.



Sup Figure 1: Conserved motifs are determined using the MEME suite algorithm. 56 GARP protein sequences as been subjected to MEME algorithm. Motifs have to be found in 5 different proteins to be displayed.



Sup Figure 2. Protein-protein interaction network of Arabidopsis GARP TFs. A compilation of 3 different interactomes [122 - 124] was queried with the 56 Arabidopsis GARP members (red nodes). Interacting proteins are represented as light blue nodes in relationship between each others and GARP TFs. Known interaction from literature [11,28,29,31,57,59,60,92,105,110,111,115,121,125-144] were manually inserted in the network using a different color coding (red edges, white nodes). The Cytoscape file is provided online in Sup File 1.

Supplemental text:

The world according to GARP transcription factors.

Alaeddine Safi, Anna Medici, Wojciech Szponarski, Sandrine Ruffel, Benoît Lacombe, Gabriel Krouk*.

GARP protein interactions

The activity of TFs depends on DNA binding but also by the interaction with other proteins; some interesting evidences for GARPs protein-protein interaction are reported in the literature. The dimerization capacity of PHR1 [28], PHL1 [31] and their orthologues in rice OsPHR1, OsPHR2, OsPHR3 and OsPHR4 [114] was explained by the presence of a coiled-coil domain and the disruption of this CC-domain abolishes the DNA binding capacity of PHR1 [28]. Many other GARP TFs show a CC-domain in their amino acid sequences [108]. Thus, GARP family could be subdivided into two subgroups: subgroup I including Golden2, most of ARR-B, KAN1 and KAN2 without a coiled-coil domain and subgroup II named GCC (for GARP coiled coil) including PHR1, APL and Psr1 with a coiled-coil domain [17,108]. Importantly, alternative splicing of *MYR1* and *MYR2* in their coiled-coil and/or GARP domains, can affect their homodimerization, 3D folding, localization and activities [111].

Based on these data, it has been predicted that GARP proteins belonging to subgroup I bind non-palindromic DNA as a monomer, whereas those of subgroup II bind palindromic sequence as a dimer [24]. However, Y2H assays have shown that maize Golden2 as well as all GLK proteins in Arabidopsis and maize can form dimers. This may be due to the presence of the Golden2 C-Terminal (GCT) box [115]. It is also the case for ARR18 [105].

These findings prompted us to examine the presence of this domain in all Arabidopsis GARP family members using several coiled-coil domain prediction softwares (Figure 2).

Many TFs of GARP family contain a potential Ser/Thr-Pro motif at the beginning of the $\alpha 2$ helix (Figure 1A), a regulatory domain involved in the phosphorylation-dependent prolyl isomerization [116]. Besides their capacity of dimerization, several GARP TFs have been shown to interact physically with other transcription regulators (Figure 3).

One important GARP TF interactants is the SPX family whose members' role is mainly the regulation of Pi homeostasis [117].

In rice, the activity of the AtPHR1 ortholog (OsPHR2) is regulated by the same mechanism via the interaction with either OsSPX1 or OsSPX2 proteins [30]. The regulation of PHR2 in rice seems to be more complicated than that in Arabidopsis, since it is not only negatively regulated in the nucleus (by SPX1 and SPX2), but also in the cytosol by another SPX protein. Indeed, SPX4 inhibits the translocation of PHR1 from the cytoplasm to the nucleus [118].

This interaction between GARP and SPX proteins is Pi-dependent, which provides evidence to support that this mechanism forms a Pi-sensing system regulating Pi homeostasis and allowing plants to adapt to environmental cues [29,30,118]. In *Lotus japonicus*, IPN2, a GARP TF, is crucial for nodule organogenesis by transcriptional activation of NIN gene. IPN2 interacts physically with a GRAS transcription regulator, NSP2, via his coiled coil domain. It was suggested that these interacting partners form a TF complex in the nucleus to induce the expression of genes essential for nodule formation and development [119].

Several recent studies showed that TFs could regulate gene expression not only by binding to its specific CRE but also by recruiting histone modifiers [59,120]. For example, HHO4/EFM, a very close homologous of HRS1, interacts with an H3K36me2 demethylase JM30. This interaction is essential for the binding to the promoter of the FLOWERING LOCUS T (FT) by both proteins and so for *FT* repression during the floral transition [59]. *FT* is also transcriptionally regulated by APL/FE, another GARP TF which was known to promote phloem differentiation [56]. And it was suggested that APL/FE could interact with a Jumonji protein to increase *FT* transcription *via* histone modifications [57]. Another homologous of HRS1 called HHO3/HMYB1 has been also shown to control flowering by repressing *FT* gene. Even if they repress the same gene, HHO4 and HHO3 have different partners and different mechanisms to control plant flowering. It turns out that the latter interacts with a HISTONE DEACETYLASE 6 (HDA6) whose main function is to promote chromatin condensation [110]. Taken together these observations, may point the fact that HHO proteins could be pioneer transcription factors opening interesting avenues to understand their molecular dynamics.

Y2H and *in vitro* binding assays indicated that GLKs can interact with G-box-binding factors (GBFs). This interaction probably through the Pro-rich region of GBFs could enhance the transcriptional level of the corresponding target genes [121].

In order to give a complete overview of the protein-protein interactions for the whole GARP family, we queried Protein-Protein Interaction (PPI) databases with the 56 Arabidopsis GARPs and built the PPI network provided in Figure 3. Adding all the interactions described in the literature (red edges) we obtained a more complex network in which almost 35 over the 56 Arabidopsis GARP interact directly or via other nodes. Further analysis need to be performed to unravel the specificity of these interactions that could be the basis to explain i) the multifunctionality and the of the GARPs family and II) their role in the cross-talk between nutrient sensing, hormonal signaling and developmental processes.

Sup Figure 1. Protein motifs discovered by MEME analysis and displayed in Figure 2.

Sup Figure 2. Protein-protein interaction network of Arabidopsis GARP TFs. A compilation of 3 different interactomes [122-124] was queried with the 56 Arabidopsis GARP members (red nodes). Interacting proteins are represented as light blue nodes in relationship between each others and GARP TFs. Known interaction from literature [11,28,29,31,57,59,60,92,105,110,111,115,121,125-144] were manually inserted in the network using a different color coding (red edges, white nodes).

References and recommended reading

of interest •, of outstanding interest ••

11. Imamura A, Hanaki N, Nakamura A, Suzuki T, Taniguchi M, Kiba T, Ueguchi C, Sugiyama T, Mizuno T: **Compilation and characterization of Arabidopsis thaliana response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction.** *Plant Cell Physiol* 1999, **40**:733-742.
 17. Hosoda K: **Molecular Structure of the GARP Family of Plant Myb-Related DNA Binding Motifs of the Arabidopsis Response Regulators.** *The Plant Cell Online* 2002, **14**:2015-2029.
 - 24. Huang T, Harrar Y, Lin C, Reinhart B, Newell NR, Talavera-Rauh F, Hokin SA, Barton MK, Kerstetter RA: **Arabidopsis KANADI1 acts as a transcriptional repressor by interacting with a specific cis-element and regulates auxin biosynthesis, transport, and signaling in opposition to HD-ZIPIII factors.** *Plant Cell* 2014, **26**:246-262.
- This work makes the nice demonstration of KAN1 is a regulator of auxin biosynthesis, transport and signaling.
28. Rubio V, Linhares F, Solano R, Martin AC, Iglesias J, Leyva A, Paz-Ares J: **A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae.** *Genes Dev* 2001, **15**:2122-2133.
 - 29. Puga MI, Mateos I, Charukesi R, Wang Z, Franco-Zorrilla JM, de Lorenzo L, Irigoyen ML, Masiero S, Bustos R, Rodriguez J, et al.: **SPX1 is a phosphate-dependent inhibitor of Phosphate Starvation Response 1 in Arabidopsis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, **111**:14947-14952.
- This paper (together with ref 30) provides evidences that the SPX1 PHR1 protein partners may constitute the basis of a Phosphate sensing system. This work is opening exiting avenues to insvetigate the role of GARPs in nutrient sensing pathways.
- 30. Wang Z, Ruan W, Shi J, Zhang L, Xiang D, Yang C, Li C, Wu Z, Liu Y, Yu Y, et al.: **Rice SPX1 and SPX2 inhibit phosphate starvation responses through interacting with PHR2 in a phosphate-dependent manner.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, **111**:14953-14958.
- This paper (together with ref 29) provides evidences that the rice SPX1/SPX2 PHR2 protein partners may constitute the basis of a Phosphate sensing system. This work is opening exiting avenues to insvetigate the role of GARPs in nutrient sensing pathways.
31. Bustos R, Castrillo G, Linhares F, Puga MI, Rubio V, Perez-Perez J, Solano R, Leyva A, Paz-Ares J: **A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in Arabidopsis.** *PLoS Genet* 2010, **6**:e1001102.
 56. Bonke M, Thitamadee S, Mahonen AP, Hauser MT, Helariutta Y: **APL regulates vascular tissue identity in Arabidopsis.** *Nature* 2003, **426**:181-186.
 - 57. Abe M, Kaya H, Watanabe-Taneda A, Shibuta M, Yamaguchi A, Sakamoto T, Kurata T, Ausin I, Araki T, Alonso-Blanco C: **FE, a phloem-specific Myb-related protein, promotes flowering through transcriptional activation of FLOWERING LOCUS T and FLOWERING LOCUS T INTERACTING PROTEIN 1.** *Plant J* 2015, **83**:1059-1068.
 - 59. Yan Y, Shen L, Chen Y, Bao S, Thong Z, Yu H: **A MYB-domain protein EFM mediates flowering responses to environmental cues in Arabidopsis.** *Dev Cell* 2014, **30**:437-448.

This work shows that EFM/HHO4 interacts with the JMJ30 H3K36me2 demethylase to specifically demethylate an active mark H3K36me2 at FT. This opens interesting perspectives for the role of GARPs as potential pioneer TFs.

60. Moreau F, Thevenon E, Blanvillain R, Lopez-Vidriero I, Franco-Zorrilla JM, Dumas R, Parcy F, Morel P, Trehin C, Carles CC: **The Myb-domain protein ULTRAPETALA1 INTERACTING FACTOR 1 controls floral meristem activities in Arabidopsis.** *Development* 2016, **143**:1108-1119.
85. Franco-Zorrilla JM, Lopez-Vidriero I, Carrasco JL, Godoy M, Vera P, Solano R: **DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, **111**:2367-2372.
86. Weirauch MT, Yang A, Albu M, Cote AG, Montenegro-Montero A, Drewe P, Najafabadi HS, Lambert SA, Mann I, Cook K, et al.: **Determination and inference of eukaryotic transcription factor sequence specificity.** *Cell* 2014, **158**:1431-1443.
87. Silva CS, Lai X, Nanao M, Zubieta C: **The Myb domain of LUX ARRHYTHMO in complex with DNA: expression, purification and crystallization.** *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 2016, **72**:356-361.
88. Imamura A, Kiba T, Tajima Y, Yamashino T, Mizuno T: **In vivo and in vitro characterization of the ARR11 response regulator implicated in the His-to-Asp phosphorelay signal transduction in Arabidopsis thaliana.** *Plant Cell Physiol* 2003, **44**:122-131.
89. Mathelier A, Zhao X, Zhang AW, Parcy F, Worsley-Hunt R, Arenillas DJ, Buchman S, Chen CY, Chou A, Ienasescu H, et al.: **JASPAR 2014: an extensively expanded and updated open-access database of transcription factor binding profiles.** *Nucleic Acids Res* 2014, **42**:D142-147.
90. Sakai H, Aoyama T, Oka A: **Arabidopsis ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators.** *Plant J* 2000, **24**:703-711.
91. Taniguchi M, Sasaki N, Tsuge T, Aoyama T, Oka A: **ARR1 directly activates cytokinin response genes that encode proteins with diverse regulatory functions.** *Plant Cell Physiol* 2007, **48**:263-277.
92. Veerabagu M, Kirchner T, Elgass K, Stadelhofer B, Stahl M, Harter K, Mira-Rodado V, Chaban C: **The interaction of the Arabidopsis response regulator ARR18 with bZIP63 mediates the regulation of PROLINE DEHYDROGENASE expression.** *Mol Plant* 2014, **7**:1560-1577.
93. Chang KN, Zhong S, Weirauch MT, Hon G, Pelizzola M, Li H, Huang SS, Schmitz RJ, Urich MA, Kuo D, et al.: **Temporal transcriptional response to ethylene gas drives growth hormone cross-regulation in Arabidopsis.** *Elife* 2013, **2**:e00675.
94. Muller R, Morant M, Jarmer H, Nilsson L, Nielsen TH: **Genome-wide analysis of the Arabidopsis leaf transcriptome reveals interaction of phosphate and sugar metabolism.** *Plant Physiol* 2007, **143**:156-171.
95. Nagatoshi Y, Mitsuda N, Hayashi M, Inoue S, Okuma E, Kubo A, Murata Y, Seo M, Saji H, Kinoshita T, et al.: **GOLDEN 2-LIKE transcription factors for chloroplast development affect ozone tolerance through the regulation of stomatal movement.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016, **113**:4218-4223.
96. Pischke MS, Huttlin EL, Hegeman AD, Sussman MR: **A transcriptome-based characterization of habituation in plant tissue culture.** *Plant Physiol* 2006, **140**:1255-1278.
97. Zhai H, Bai X, Zhu Y, Li Y, Cai H, Ji W, Ji Z, Liu X, Liu X, Li J: **A single-repeat R3-MYB transcription factor MYBC1 negatively regulates freezing tolerance in Arabidopsis.** *Biochem Biophys Res Commun* 2010, **394**:1018-1023.

98. Sardesai N, Lee LY, Chen H, Yi H, Olbricht GR, Stirnberg A, Jeffries J, Xiong K, Doerge RW, Gelvin SB: **Cytokinins secreted by Agrobacterium promote transformation by repressing a plant myb transcription factor.** *Sci Signal* 2013, **6**:ra100.
99. Sardesai N, Laluk K, Mengiste T, Gelvin S: **The Arabidopsis Myb transcription factor MTF1 is a unidirectional regulator of susceptibility to Agrobacterium.** *Plant Signal Behav* 2014, **9**.
100. Gifford ML, Dean A, Gutierrez RA, Coruzzi GM, Birnbaum KD: **Cell-specific nitrogen responses mediate developmental plasticity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:803-808.
101. Day RC, Herridge RP, Ambrose BA, Macknight RC: **Transcriptome analysis of proliferating Arabidopsis endosperm reveals biological implications for the control of syncytial division, cytokinin signaling, and gene expression regulation.** *Plant Physiol* 2008, **148**:1964-1984.
102. Dello Ioio R, Linhares FS, Scacchi E, Casamitjana-Martinez E, Heidstra R, Costantino P, Sabatini S: **Cytokinins determine Arabidopsis root-meristem size by controlling cell differentiation.** *Curr Biol* 2007, **17**:678-682.
103. Lohrmann J, Sweere U, Zabaleta E, Baurle I, Keitel C, Kozma-Bognar L, Brennicke A, Schafer E, Kudla J, Harter K: **The response regulator ARR2: a pollen-specific transcription factor involved in the expression of nuclear genes for components of mitochondrial complex I in Arabidopsis.** *Mol Genet Genomics* 2001, **265**:2-13.
104. Nguyen KH, Ha CV, Nishiyama R, Watanabe Y, Leyva-Gonzalez MA, Fujita Y, Tran UT, Li W, Tanaka M, Seki M, et al.: **Arabidopsis type B cytokinin response regulators ARR1, ARR10, and ARR12 negatively regulate plant responses to drought.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016, **113**:3090-3095.
105. Veerabagu M, Elgass K, Kirchler T, Huppenberger P, Harter K, Chaban C, Mira-Rodado V: **The Arabidopsis B-type response regulator 18 homomerizes and positively regulates cytokinin responses.** *Plant J* 2012, **72**:721-731.
106. Hoth S, Ikeda Y, Morgante M, Wang X, Zuo J, Hanafey MK, Gaasterland T, Tingey SV, Chua NH: **Monitoring genome-wide changes in gene expression in response to endogenous cytokinin reveals targets in Arabidopsis thaliana.** *FEBS Lett* 2003, **554**:373-380.
107. Zhao C, Craig JC, Petzold HE, Dickerman AW, Beers EP: **The xylem and phloem transcriptomes from secondary tissues of the Arabidopsis root-hypocotyl.** *Plant Physiol* 2005, **138**:803-818.
108. Lundmark MN, L. Kørner, C. Nielsen, T.H.: **Overexpression of the MYB-related transcription factor GCC7 in Arabidopsis thaliana leads to increased levels of Pi and changed P-dependent gene regulation.** *Functional Plant Biology* 2011, **38**:151-162.
109. McAbee JM, Hill TA, Skinner DJ, Izhaki A, Hauser BA, Meister RJ, Venugopala Reddy G, Meyerowitz EM, Bowman JL, Gasser CS: **ABERRANT TESTA SHAPE encodes a KANADI family member, linking polarity determination to separation and growth of Arabidopsis ovule integuments.** *Plant J* 2006, **46**:522-531.
110. Ke YH: **HMYB1 interacts with HDA6 and is involved in flowering in Arabidopsis.** In *Institute of Plant Biology, College of Life Science* Edited by: National Taiwan University 2016:70. [Wu K (Series Editor), vol Master.]
111. Zhao C, Beers E: **Alternative splicing of Myb-related genes MYR1 and MYR2 may modulate activities through changes in dimerization, localization, or protein folding.** *Plant Signal Behav* 2013, **8**:e27325.
112. Alva V, Nam SZ, Soding J, Lupas AN: **The MPI bioinformatics Toolkit as an integrative platform for advanced protein sequence and structure analysis.** *Nucleic Acids Res* 2016, **44**:W410-415.

113. Delorenzi M, Speed T: **An HMM model for coiled-coil domains and a comparison with PSSM-based predictions.** *Bioinformatics* 2002, **18**:617-625.

•114. Ruan W, Guo M, Wu P, Yi K: **Phosphate starvation induced OsPHR4 mediates Pi-signaling and homeostasis in rice.** *Plant Mol Biol* 2017, **93**:327-340.

This work shows the broad conservation of the role of PHR1 like proteins in rice in the control of P related phenomenon.

115. Rossini L, Cribb L, Martin DJ, Langdale JA: **The maize golden2 gene defines a novel class of transcriptional regulators in plants.** *Plant Cell* 2001, **13**:1231-1244.

116. Lu KP, Finn G, Lee TH, Nicholson LK: **Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer.** *Nat Chem Biol* 2007, **3**:619-629.

117. Wang C, Ying S, Huang H, Li K, Wu P, Shou H: **Involvement of OsSPX1 in phosphate homeostasis in rice.** *Plant J* 2009, **57**:895-904.

118. Lv Q, Zhong Y, Wang Y, Wang Z, Zhang L, Shi J, Wu Z, Liu Y, Mao C, Yi K, et al.: **SPX4 Negatively Regulates Phosphate Signaling and Homeostasis through Its Interaction with PHR2 in Rice.** *Plant Cell* 2014, **26**:1586-1597.

119. Kang H, Chu X, Wang C, Xiao A, Zhu H, Yuan S, Yang Z, Ke D, Xiao S, Hong Z, et al.: **A MYB coiled-coil transcription factor interacts with NSP2 and is involved in nodulation in Lotus japonicus.** *New Phytol* 2014, **201**:837-849.

••120. Song ZT, Sun L, Lu SJ, Tian Y, Ding Y, Liu JX: **Transcription factor interaction with COMPASS-like complex regulates histone H3K4 trimethylation for specific gene expression in plants.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015, **112**:2900-2905.

This work demonstrates that GARPs can interact with histone modification complex and therefore can influence gene expression at the same time through CREs and chromatin remodeling.

121. Tamai HI, Meshi, T.: **Arabidopsis GARP transcriptional activators interact with the Pro-rich activation domain shared by G-box-binding bZIP factors.** *Plant Cell Physiol.* 2002, **1**:99-107.

122. Braun P CA, Charlotiaux B, Dreze M, Ecker JR, Hill DE, Roth FP, Vidal M, Galli M, Balumuri P, Bautista V, Chesnut JD, Kim RC, de los Reyes C, Gilles P, Kim CJ, Matrubutham U, Mirchandani J, Olivares E, Patnaik S, Quan R, Ramaswamy G, Shinn P, Swamilingiah GM, Wu S, Ecker JR, Dreze M, Byrdsong D, Dricot A, Duarte M, Gebreab F, Gutierrez BJ, MacWilliams A, Monachello D, Mukhtar MS, Poulin MM, Reichert P, Romero V, Tam S, Waaijers S, Weiner EM, Vidal M, Hill DE, Braun P, Galli M, Carvunis AR, Cusick ME, Dreze M, Romero V, Roth FP, Tasan M, Yazaki J, Braun P, Ecker JR, Carvunis AR, Ahn YY, Barabási AL, Charlotiaux B, Chen H, Cusick ME, Dangl JL, Dreze M, Ecker JR, Fan C, Gai L, Galli M, Ghoshal G, Hao T, Hill DE, Lurin C, Milenkovic T, Moore J, Mukhtar MS, Pevzner SJ, Przulj N, Rabello S, Rietman EA, Rolland T, Roth FP, Santhanam B, Schmitz RJ, Spooner W, Stein J, Tasan M, Vandenhaute J, Ware D, Braun P, Vidal M.: **Evidence for network evolution in an Arabidopsis interactome map.** *Science* 2011, **333**:601-607.

123. Chen J, Lalonde S, Obrdlik P, Noorani Vatani A, Parsa SA, Vilarino C, Revuelta JL, Frommer WB, Rhee SY: **Uncovering Arabidopsis membrane protein interactome enriched in transporters using mating-based split ubiquitin assays and classification models.** *Front Plant Sci* 2012, **3**:124.

124. Jones AM, Xuan Y, Xu M, Wang RS, Ho CH, Lalonde S, You CH, Sardi MI, Parsa SA, Smith-Valle E, et al.: **Border control--a membrane-linked interactome of Arabidopsis.** *Science* 2014, **344**:711-716.

125. Perochon A, Dieterle S, Pouzet C, Aldon D, Galaud JP, Ranty B: **Interaction of a plant pseudo-response regulator with a calmodulin-like protein.** *Biochem Biophys Res Commun* 2010, **398**:747-751.
126. Dortay H, Mehnert N, Burkle L, Schmulling T, Heyl A: **Analysis of protein interactions within the cytokinin-signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*.** *FEBS J* 2006, **273**:4631-4644.
127. Dortay H, Gruhn N, Pfeifer A, Schwerdtner M, Schmulling T, Heyl A: **Toward an interaction map of the two-component signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*.** *J Proteome Res* 2008, **7**:3649-3660.
128. Efroni I, Han SK, Kim HJ, Wu MF, Steiner E, Birnbaum KD, Hong JC, Eshed Y, Wagner D: **Regulation of leaf maturation by chromatin-mediated modulation of cytokinin responses.** *Dev Cell* 2013, **24**:438-445.
129. Causier B, Ashworth M, Guo W, Davies B: **The TOPLESS interactome: a framework for gene repression in *Arabidopsis*.** *Plant Physiol* 2012, **158**:423-438.
130. Choi J, Huh SU, Kojima M, Sakakibara H, Paek KH, Hwang I: **The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in *Arabidopsis*.** *Dev Cell* 2010, **19**:284-295.
131. Huang H, Alvarez S, Bindbeutel R, Shen Z, Naldrett MJ, Evans BS, Briggs SP, Hicks LM, Kay SA, Nusinow DA: **Identification of Evening Complex Associated Proteins in *Arabidopsis* by Affinity Purification and Mass Spectrometry.** *Mol Cell Proteomics* 2016, **15**:201-217.
132. Nusinow DA, Helfer A, Hamilton EE, King JJ, Imaizumi T, Schultz TF, Farre EM, Kay SA: **The ELF4-ELF3-LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth.** *Nature* 2011, **475**:398-402.
133. Kim HJ, Chiang YH, Kieber JJ, Schaller GE: **SCF(KMD) controls cytokinin signaling by regulating the degradation of type-B response regulators.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**:10028-10033.
134. Rauf M, Arif M, Dortay H, Matallana-Ramirez LP, Waters MT, Gil Nam H, Lim PO, Mueller-Roeber B, Balazadeh S: **ORE1 balances leaf senescence against maintenance by antagonizing G2-like-mediated transcription.** *EMBO Rep* 2013, **14**:382-388.
135. Manzano C, Abraham Z, Lopez-Torrejon G, Del Pozo JC: **Identification of ubiquitinated proteins in *Arabidopsis*.** *Plant Mol Biol* 2008, **68**:145-158.
136. Klopffleisch K, Phan N, Augustin K, Bayne RS, Booker KS, Botella JR, Carpita NC, Carr T, Chen JG, Cooke TR, et al.: ***Arabidopsis* G-protein interactome reveals connections to cell wall carbohydrates and morphogenesis.** *Mol Syst Biol* 2011, **7**:532.
137. Cutcliffe JW, Hellmann E, Heyl A, Rashotte AM: **CRFs form protein-protein interactions with each other and with members of the cytokinin signalling pathway in *Arabidopsis* via the CRF domain.** *J Exp Bot* 2011, **62**:4995-5002.
138. Shin R, Jez JM, Basra A, Zhang B, Schachtman DP: **14-3-3 proteins fine-tune plant nutrient metabolism.** *FEBS Lett* 2011, **585**:143-147.
139. Garcia-Dominguez M, March-Diaz R, Reyes JC: **The PHD domain of plant PIAS proteins mediates sumoylation of bromodomain GTE proteins.** *J Biol Chem* 2008, **283**:21469-21477.
140. Ou B, Yin KQ, Liu SN, Yang Y, Gu T, Wing Hui JM, Zhang L, Miao J, Kondou Y, Matsui M, et al.: **A high-throughput screening system for *Arabidopsis* transcription factors and its application to Med25-dependent transcriptional regulation.** *Mol Plant* 2011, **4**:546-555.
141. Marin-de la Rosa N, Sotillo B, Miskolczi P, Gibbs DJ, Vicente J, Carbonero P, Onate-Sanchez L, Holdsworth MJ, Bhalarao R, Alabadi D, et al.: **Large-scale identification of gibberellin-related transcription factors defines group VII ETHYLENE RESPONSE FACTORS as functional DELLA partners.** *Plant Physiol* 2014, **166**:1022-1032.

142. Tamura K, Fukao Y, Iwamoto M, Haraguchi T, Hara-Nishimura I: **Identification and characterization of nuclear pore complex components in *Arabidopsis thaliana*.** *Plant Cell* 2010, **22**:4084-4097.
143. Pires HR, Monfared MM, Shemyakina EA, Fletcher JC: **ULTRAPETALA *trxG* genes interact with KANADI transcription factor genes to regulate *Arabidopsis* gynoecium patterning.** *Plant Cell* 2014, **26**:4345-4361.
144. Kelley DR, Arreola A, Gallagher TL, Gasser CS: **ETTIN (ARF3) physically interacts with KANADI proteins to form a functional complex essential for integument development and polarity determination in *Arabidopsis*.** *Development* 2012, **139**:1105-1109

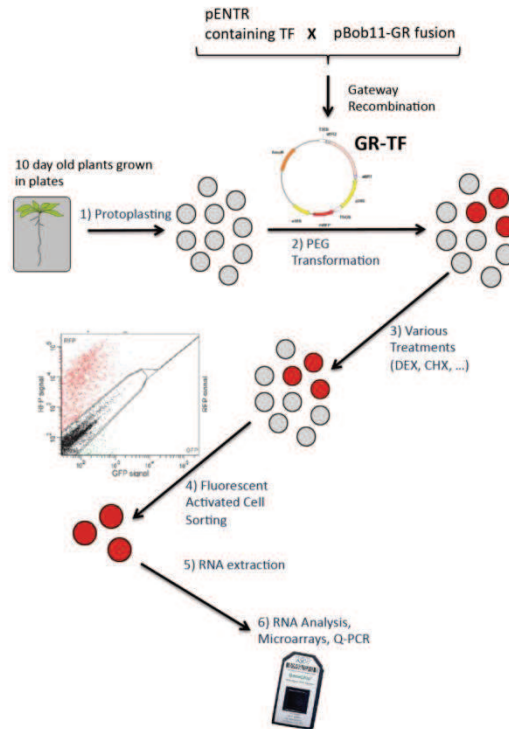
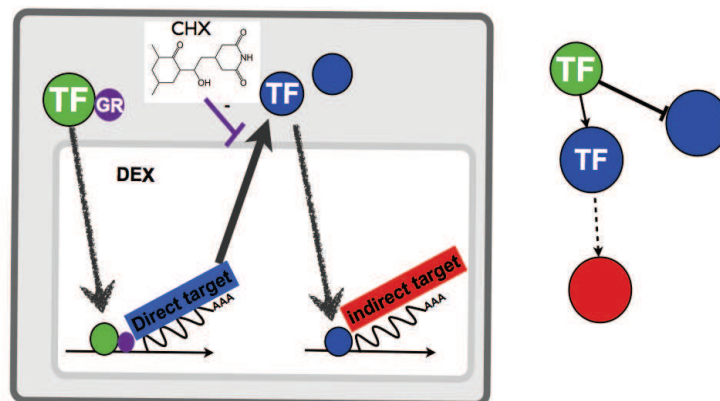
A**B**

Figure 1.8. Principe de la technique TARGET (D'après Bargmann et al., 2013).

A) La technique du TARGET consiste à cloner le FT dans un vecteur permettant la fusion protéique avec le récepteur de glucocorticoïdes (GR). Ce même vecteur est par ailleurs porteur d'une cassette (35S::RFP) qui sert à trier par FACS les protoplastes transformés. Avant le tri cellulaire, les protoplastes sont traités (DEX, CHX, NO_3^- ...). Les ARNs sont par la suite extraits à partir des protoplastes positifs pour l'étude d'expression des gènes.

B) La fusion FT-GR interagit avec une HSP qui la séquestre dans le cytoplasme. Le DEX provoque un changement conformationnel du GR permettant ainsi sa libération de la HSP et l'entrée du complexe FT-GR dans le noyau. En présence de CHX (cycloheximide), le traitement par le glucocorticoïde permet de déterminer quelles sont les cibles directes du facteur de transcription étudié.

4.3. Études des facteurs de transcription: détails sur le TARGET

Une des approches menées en routine par l'équipe, ainsi que par le laboratoire du Pr Coruzzi (NYU), s'articule autour de la technique appelée TARGET (Bargmann et al., 2013). Cette technique permet d'élucider les cibles étant directement régulées par un facteur de transcription donné, à la différence du Chip-Seq (Johnson et al., 2007), Y1H (Bonaldi et al., 2017), EMSA (Hellman and Fried, 2007), DAP-seq (O'Malley et al., 2016) qui mesurent la capacité de fixation d'un facteur de transcription (Para et al., 2014). L'approche TARGET consiste à cloner le facteur de transcription dans un vecteur permettant la fusion protéique avec le récepteur de glucocorticoïdes (GR) de rat. Ce même vecteur est par ailleurs porteur d'une cassette (35S::RFP) qui permet la sélection par FACS (Fluorescent Activated Cell Sorter) des protoplastes ayant subi un événement de transformation (Figure 1.8A). La fusion FT-GR interagit dans le cytoplasme des cellules végétales avec une HSP qui la séquestre dans ce compartiment cellulaire. Ce n'est qu'en présence de glucocorticoïde que le GR opère un changement conformationnel qui autorise l'entrée de FT-GR dans le noyau. En présence de cycloheximide (inhibiteur de la traduction), le traitement par le glucocorticoïde permet de déterminer quelles sont les cibles primaires du facteur de transcription étudié (Figure 1.8B). La combinaison de cette technique avec une étude de l'expression du génome rend possible la détermination des cibles du facteur de transcription considéré. Par l'étude des cibles directes et régulées d'un facteur de transcription donné (comme par exemple l'enrichissement des fonctions des gènes de ces listes), il a été montré qu'il est possible de déterminer le(s) rôle(s) *in planta* du facteur de transcription considéré. Par exemple, les cibles du facteur de transcription ABI3 (impliqué dans la signalisation de l'acide abscissique (Koornneef et al., 1989; Monke et al., 2012)) comportent à la fois des gènes essentiels à la réponse des plantes à cette hormone, mais aussi des gènes responsables de la germination des graines. Si ABI3 avait été un facteur de transcription dont on ne connaissait pas la fonction, il aurait été possible de la prédire (Bargmann et al., 2013).

C'est ce principe que l'équipe a appliqué à certains facteurs de transcription dont la fonction était inconnue et qui avaient pour caractéristique d'être très fortement et très rapidement régulés par le nitrate (voir dessous).

C'est dans cette logique que mon travail de thèse s'inscrit. Pour la famille NLP, j'ai été impliqué dans l'étude de TARGET elle-même car des données de ce type n'étaient pas disponibles au commencement de ce travail. Pour les gènes HHOs appartenant à la famille des GARPs, les données de TARGET étaient disponibles et mon travail a consisté à élargir

les connaissances sur le rôle *in planta* de ces facteurs de transcription. Les objectifs détaillés concernant les 2 familles sont exposés ci-dessous.

5. Objectifs du travail

Comme l'introduction bibliographique a pu le mettre en avant, outre son rôle de source majeure d'azote, il est maintenant clairement établi que le NO_3^- intervient aussi en tant que molécule signal régulant entre autres de nombreux processus physiologiques et développementaux de la plante (Chapitre 1, Parties 1-4). Ces régulations passent en particulier par la reprogrammation NO_3^- -spécifique du transcriptome qui peut toucher des milliers de gènes (Canales et al., 2014; Krouk et al., 2010b; Medici and Krouk, 2014; Wang et al., 2004).

Du fait de ces reprogrammations massives du transcriptome, les facteurs de transcription sont donc des objets d'étude centraux pour comprendre la réponse des plantes au nitrate et sont, de fait, l'objet d'étude de ma thèse.

Par ailleurs, les mécanismes de réponses aux différentes voies de signalisation liées à l'azote/ NO_3^- (décrites précédemment, PNR et NSR entre autres) sont loin d'être complètement caractérisées (Krouk, 2017; O'Brien et al., 2016; Undurraga et al., 2017).

Mon projet de thèse consistait donc à étudier des facteurs de transcription (FT) impliqués en amont et/ou en aval de la transduction des signaux associées à l'azote en général et au NO_3^- en particulier de manière à i) élucider et préciser leurs rôles dans ces voies de signalisation (identification de cibles directes par la technique TARGET), ii) révéler d'éventuels "cross-talks" avec d'autres voies de signalisation.

En effet, il est maintenant évident que les signalisations ne sont pas des voies indépendantes et que des mécanismes croisés sont à l'œuvre (voir introduction sur les interactions N/P par exemple).

Les deux familles de FT qui ont été étudiées durant cette thèse sont :

- i) la famille NLP (NIN-Like Proteins ; en collaboration avec l'équipe du Dr Anne Krapp, Versailles France, et le laboratoire du Pr Coruzzi, New York USA) ; en particulier NLP7.
- ii) et la sous-famille HRS1/HHOs appartenant à la grande famille des GARPs.

5.1. Objectifs de l'étude du rôle des NLPs dans la transduction du signal nitrate

Les NIN-Like Proteins (NLPs) se sont révélées être des régulateurs centraux de la signalisation du nitrate (§ 1.6.1). Des expériences de ChIP-chip ont montré que NLP7 est

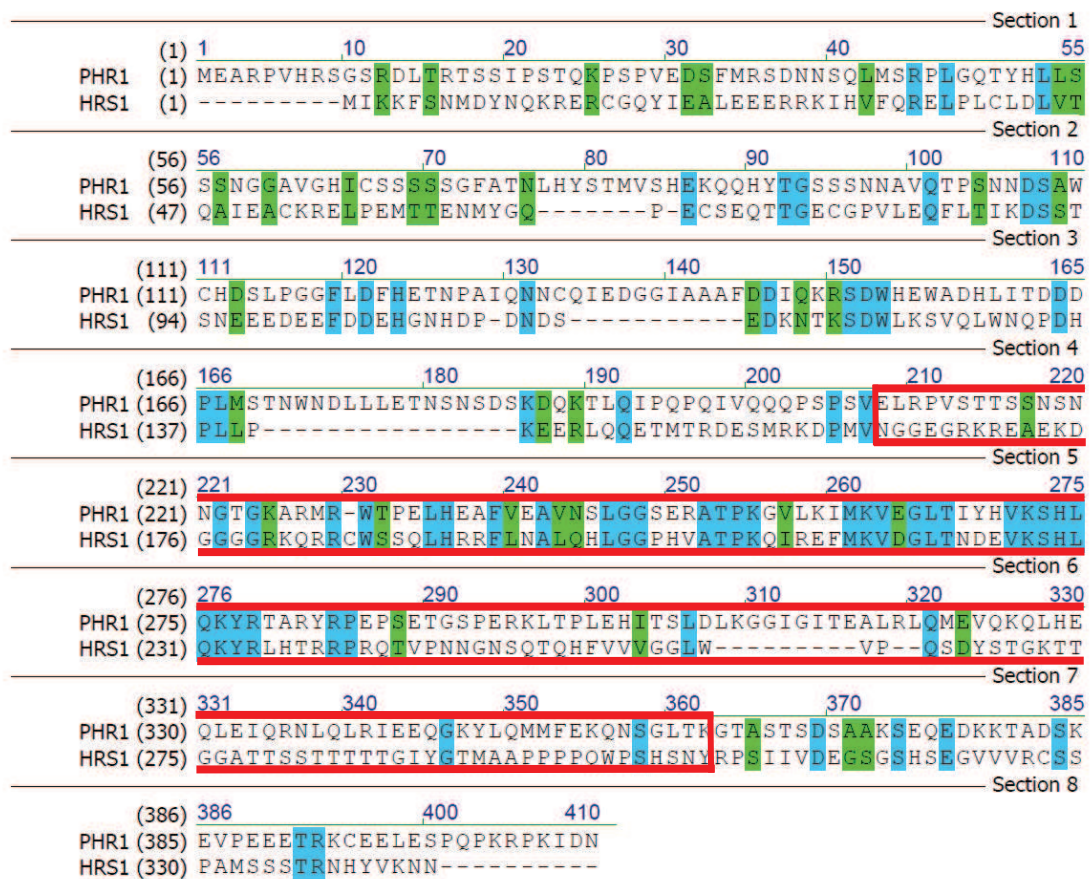


Figure 1.9. Alignement des séquences protéiques de PHR1 et HRS1.
 Les acides aminés identiques sont marqués en bleu et le résidus similaires en vert. La séquence Δ PHR1 (aa 208–362) responsable de l'interaction de PHR1 avec SPX1 (Puga et al., 2014) est encadrée en rouge. Cette séquence contient une partie très conservée entre les deux protéines (aa 217-288).

capable de se fixer au promoteur de 851 gènes en réponse au nitrate (Marchive et al., 2013). De manière intéressante, parmi cet ensemble fixé par NLP7, il existe des gènes impliqués dans le métabolisme de l'azote et/ou impliqués dans la réponse des plantes au nitrate comme *ANR1* (Zhang and Forde, 1998), *LBD37/38* (Rubin et al., 2009), *CIPK8* et *NRT1.1* (Hu et al., 2009). Cependant, il est connu que la fixation d'un facteur de transcription à un promoteur ne garantit pas que ce dernier régule directement sa cible (Para et al., 2014).

Dans cette optique, l'objectif de cette partie de mon travail était d'identifier, par l'approche TARGET, les cibles directes et indirectes de certains FTs de la famille NLP (NLP7, NLP6 et NLP2), d'étudier leur rôle dans la perception du nitrate et dans la régulation des réseaux de gènes impliqués dans cette signalisation. Ce travail s'est fait en étroite collaboration avec le laboratoire de l'IJPB (Versailles) et l'université de New York.

5.2. Objectifs de l'étude des facteurs de transcription de la sous-famille HRS1/HHO

5.2.1. Étude de l'interaction SPX/HRS1, un carrefour entre la voie de transduction du phosphate et celle du nitrate?

Récemment, il a été mis en évidence que SPX1 et PHR1 (Facteur de transcription contrôlant la réponse à la carence en Pi) interagissent physiquement et forment un complexe vraisemblablement capable de percevoir le Pi (Puga et al., 2014; Qi et al., 2017). Donc, il est possible que le complexe PHR1/SPX1 forme un système de perception (senseur) de Pi. Dans ce cadre, il est important de noter que HRS1 et PHR1 appartiennent à la même famille de FT. De manière remarquable, leur homologie la plus forte est sur le domaine protéique de PHR1 ayant servi à l'identification de son interaction avec SPX1 (Puga et al., 2014) (Figure 1.9).

Un des objectifs de ma thèse était alors de valider l'hypothèse selon laquelle, HRS1 pourrait interagir avec les protéines SPX pour former un complexe impliqué dans la perception du NO_3^- , du PO_4^{3-} ou de la combinaison des deux signaux.

5.2.2. Rôle des facteurs de transcription de la famille HHO dans la réponse des plantes au N

Des études transcriptomiques ont montré que *HRS1* est induit de manière très précoce et très fortement par la fourniture de NO_3^- , ce qui a fait de lui un marqueur de la réponse des plantes aux NO_3^- (Krouk et al., 2010b). Dans l'équipe, les analyses de TARGET d'*HRS1* ont permis de dresser une liste des gènes cibles de ce FT (Medici et al., 2015). De

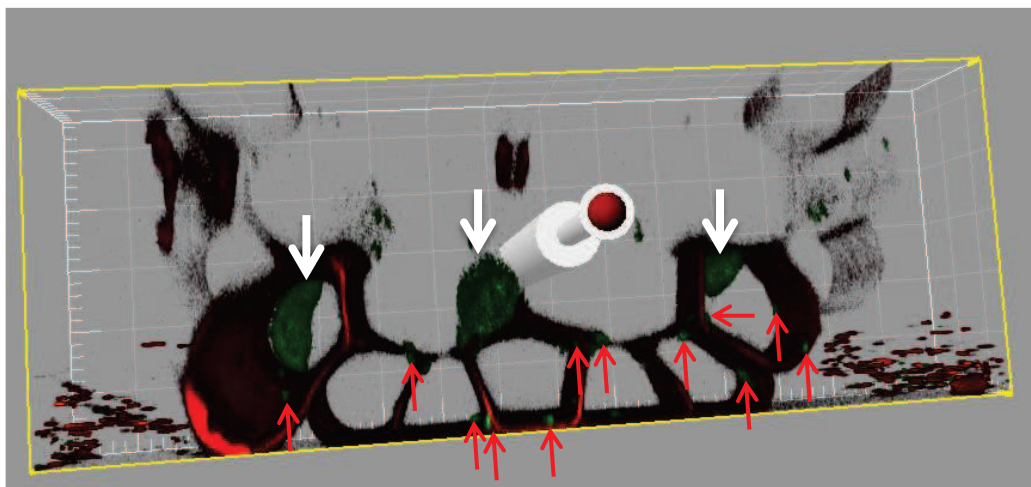


Figure 1.10. Reconstruction 3D réalisée au microscope confocale sur la racine primaire de plantes HRS1-GFP.

Les flèches blanches correspondent au signal nucléaire de la GFP et les flèches rouges représentent les signaux vert non nucléaires (Medici et al., 2015).

manière intéressante, les gènes directement induits par HRS1 contiennent un nombre important de gènes impliqués dans la réponse des plantes au phosphate. Cette observation fut une clé pour la démonstration du rôle d'HRS1 dans le contrôle de la croissance des plantes en réponse à une combinaison $\text{NO}_3^-/\text{PO}_4^{3-}$ (Medici et al., 2015). Outre son rôle dans la régulation de la croissance racinaire, de nombreuses autres fonctions semblent sous le contrôle direct de cette protéine.

Dans la partie résultat correspondante (Chapitre 4), je montrerai que l'étude des autres cibles directes d'HRS1 a permis d'identifier un rôle important de ce FT dans la réponse des plantes à la carence en azote et aux ROS, et leur effets croisés (Safi, submitted).

5.2.3. Quel rôle pour la forme non nucléaire d'HRS1?

Dans le but d'étudier le rôle d'HRS1 *in planta* Medici et al. (Medici et al., 2015) ont mis en place des lignées transgéniques exprimant une protéine de fusion HRS1:GFP sous le contrôle du promoteur natif pHRS1. Les résultats d'imagerie ont montré que ce FT n'est pas seulement localisé dans le noyau des poils absorbants, des cellules épidermiques et corticales de la zone d'élongation des racines mais aussi dans des compartiments cellulaires intra-cytoplasmiques (Figure 1.10). Par ailleurs, il s'est avéré grâce aux expériences de TARGET qu'il existe des gènes plastidiaux qui semblent être régulés directement par HRS1.

Par conséquent, j'avais comme premier objectif de démontrer que les compartiments cellulaires marqués par la GFP pourraient être des plastes et de commencer à caractériser le rôle d'HRS1 dans ces compartiments cellulaires non-nucléaires.

En conclusion de cette partie, l'ensemble de ces objectifs avait pour but commun de progresser dans la compréhension de la réponse des plantes aux nutriments et en particulier au NO_3^- . Mes résultats ont permis de consolider certains aspects de cette compréhension et d'en identifier de nouveaux. Ceci ouvre en particulier la voie à l'amélioration de la nutrition des plantes comme les chapitres résultats suivants vont tenter de l'illustrer.

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

Tableau 2.1. Liste des différentes lignées utilisées

(1) Medici et al., 2015; (2) Lignée créée dans l'équipe;

(3) Lignée créée pendant la thèse; (4) Ishida et al., 2008.

Lignées	Fond génétique	Détails	Origine et références
<i>hrs1-1</i>	Col-0	Mutant d'insertion de T-DNA (SALK_067074)	(1)
<i>hho1-1</i>	Col-0	Mutant d'insertion de T-DNA (SAIL_28_D03)	(1)
<i>hho2-1</i>	Col-0	Mutant d'insertion de T-DNA (SALK_070096)	(2)
<i>hho3-1</i>	Col-0	Mutant d'insertion de T-DNA (SALK_146833)	(2)
<i>hrs1;hho1</i>	Col-0	Double mutant issu du croisement <i>hrs1-1</i> x <i>hho1-1</i>	(1)
<i>hrs1;hho1;hho2</i>	Col-0	Triple mutant issu du croisement <i>hrs1;hho1</i> x <i>hho2-1</i>	(2)
<i>hrs1;hho1;hho2;hho3</i>	Col-0	Quadruple mutant issu du croisement <i>hrs1;hho1;hho2</i> x <i>hho3-1</i>	(2)
35S:HRS1	Col-0	Lignée sur-exprimant le gène HRS1 sous contrôle du promoteur pCaMV35S.	(2)
35S:HHO1	Col-0	Lignée sur-exprimant le gène HHO1 sous contrôle du promoteur pCaMV35S.	(2)
pHRS1:HRS1:GFP	Col-0	Lignée exprimant HRS1 fusionnée à celui de la GFP sous le contrôle de son propre promoteur.	(3)
CT-DsRed	Ws	Lignée exprimant la DsRed fusionnée à un peptide d'adressage aux chloroplastes	(4)
pHRS1:HRS1:GFP; CT- DsRed	Col-0/Ws	Lignée issue du croisement des deux dernières lignées.	(3)
PTS:mCherry	Col-0	Lignée exprimant la mCherry fusionnée à un peptide d'adressage aux chloroplastes	(3)
pHRS1:HRS1:GFP; PTS:mCherry	Col-0	Lignée issue du croisement pHRS1:HRS1:GFP x PTS:mCherry.	(3)
<i>hrs1;hho1;hho2;hho3</i>; pHRS1:HRS1:GFP	Col-0	Lignée exprimant HRS1:GFP sous contrôle de son propre promoteur dans le fond génétique du quadruple mutant.	(3)
NLS:HRS1:GFP	Col-0	Lignée exprimant HRS1 fusionnée à la GFP sous le contrôle de son propre promoteur ayant une séquence de localisation au noyau en N-ter.	(3)
PTS:HRS1:GFP	Col-0	Lignée exprimant HRS1 fusionnée à la GFP sous le contrôle de son propre promoteur ayant une séquence de localisation au plastides en N-ter.	(3)
mut ATG:HRS1:GFP	Col-0	Lignée exprimant HRS1 fusionnée à la GFP dont le codon d'initiation a été muté en GTG ayant par conséquent une délétion de 7 acides aminés en N-ter d'HRS1.	(3)
<i>hrs1;hho1;hho2;hho3</i>; NLS:HRS1:GFP	Col-0	Lignée exprimant NLS:HRS1:GFP dans le fond génétique du quadruple mutant.	(3)
<i>hrs1;hho1;hho2;hho3</i>; PTS:HRS1:GFP	Col-0	Lignée exprimant PTS:HRS1:GFP dans le fond génétique du quadruple mutant.	(3)
<i>hrs1;hho1;hho2;hho3</i>; mut ATG:HRS1:GFP	Col-0	Lignée exprimant mut ATG:HRS1:GFP dans le fond génétique du quadruple mutant.	(3)

1. Lignées et souches utilisés

La plante modèle *Arabidopsis thaliana* a été utilisée pour l'ensemble des expériences réalisées au cours de la thèse. Les détails des différentes lignées utilisées ainsi que leurs écotypes respectifs sont résumés dans le tableau 2.1. Les lignées homozygotes des différents génotypes ont été criblées par PCR.

Les bactéries utilisées sont *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101) et différentes souches d'*Escherichia coli*: Top 10 (Invitrogen™), DH5α (Invitrogen™), Rosetta™ 2(DE3) pLysS (Novagen, Darmstadt, Germany) (Tableau 2.2).

2. Constructions moléculaires pour l'obtention des plantes transgéniques

Les lignées sur-exprimant HRS1 et HHO1 ont été obtenues en clonant leurs séquences codantes dans le vecteur pMDC32 contenant un promoteur 35S du CaMV (Medici et al., 2015). Pour créer les lignées pHRS1:HRS1:GFP, la séquence génomique d'HRS1 comprenant 3 Kb de région promotrice a été amplifiée par PCR et clonée dans le vecteur pMDC107 (Curtis and Grossniklaus, 2003; Medici et al., 2015). Cette construction a été utilisée pour créer les lignées NLS et PTS par Ω -PCR et mut-ATG par mutagenèse dirigée (Chen et al., 2013), en utilisant les amorces référencées dans le tableau 2.3. La cassette PTS:mCherry a été construite en clonant, en amont du gène de la mCherry, la séquence de transit de la petite sous-unité de la Rubisco dans le vecteur pBIN20 (Nelson et al., 2007). De manière similaire, le peptide de transit de RECA (AT1G79050) a été fusionné à la DsRed en utilisant le vecteur pBI121 (Ishida et al., 2008).

2.1. Clonage

L'ensemble des clonages a été basé sur l'utilisation du système Gateway® (Life Technologies). La séquence codante du gène est amplifiée par PCR en utilisant des ADNc comme matrice et cloné dans un vecteur d'entrée (pENTR ou pDONR). La CDS est ensuite transférée par recombinaison dans un vecteur de destination. C'est ce dernier qui est utilisé dans les expériences (transformation des plantes, TARGET, production de protéines). Après chaque étape de clonage, des vérifications sont réalisées par PCR et séquençage. Les différentes amorces utilisées dans le clonage sont listées dans le tableau 2.4.

Tableau 2.2. Liste des différents vecteurs et souches bactériennes utilisés

Gène/clone	Détails	Vecteur	Bactérie	Type de ransformation	Résistance du plasmide	Résistance de bactérie
NLP7	ATG_STOP	pDEST15	Rosetta	thermique	Amp	Chl
NLP7	ATG_STOP	pBeacon_RFP_GR	Top 10	thermique	Amp	
SPX4	CACC-ATG_STOP	pENTR D-TOPO	Top 10	thermique	Kan	
SPX4	attL1-ATG_STOP-attL2	pDONR 207	Top 10	thermique	Gen	
SPX4	attB1-ATG_STOP-attB2	pDEST15	Rosetta	thermique	Amp	Chl
CD3-999	plastid-mCherry marker	pt-rk	Top 10	commandé	Kan	
CD3-999	plastid-mCherry marker	pt-rk	Agrobactérie	électrique	Kan	Gen/Rif
HRS1:GFP	p3kHRS1:HRS1:GFP	pMDC107	TOP10	électrique	Kan/Hyg	.
HRS1	ATG_STOP	pBeacon_RFP_GR	DH5 α	électrique	Amp	
mut ATG HRS1:GFP	p3kHRS1:HRS1:GFP	pMDC107	DH5 α	électrique	Kan/Hyg	.
PTS:HRS1:GFP	p3kHRS1:PTS:HRS1:GFP	pMDC107	DH5 α	électrique	Kan/Hyg	.
NLS:HRS1:GFP	p3kHRS1:NLS:HRS1:GFP	pMDC107	DH5 α	électrique	Kan/Hyg	.
mut ATG HRS1:GFP	p3kHRS1:HRS1:GFP	pMDC107	Agrobactérie	électrique	Kan/Hyg	Gen/Rif
PTS:HRS1:GFP	p3kHRS1:PTS:HRS1:GFP	pMDC107	Agrobactérie	électrique	Kan/Hyg	Gen/Rif
NLS:HRS1:GFP	p3kHRS1:NLS:HRS1:GFP	pMDC107	Agrobactérie	électrique	Kan/Hyg	Gen/Rif
HRS1:GFP	p3kHRS1:HRS1:GFP	pMDC107	Agrobactérie	électrique	Kan/Hyg	Gen/Rif

2.2. Oméga PCR

L'Oméga PCR est caractérisée par l'utilisation de longues amorces chimériques dites « mégaprimers » (Chen et al., 2013). Les « mégaprimers » destinés à l'insertion ou à la substitution sont constituées d'une partie identique à la matrice à amplifier et d'une autre partie qui contient les modifications souhaitées. Pour la délétion, les mégaprimers sont formés des 2 séquences flanquantes du fragment à déléter. Contrairement aux mégaprimers utilisés pour les constructions mut ATG, NLS et délétion qui ont été commandés (EUROFINS), ceux de PTS ont été amplifiés par PCR classique. La liste des amorces utilisées est résumée dans le tableau 2.3.

Le vecteur pMDC107 contenant la cassette pHRS1:HRS1:GFP (Medici et al., 2015) a servi de matrice pour les différentes réactions d' Ω -PCR. Une ADN polymérase à haute-fidélité (Phusion, Thermo Scientific™) a été utilisée suivant ce programme : 98 °C pendant 30 sec, 5 cycles à 98 °C pendant 30 sec, 52 °C pendant 1 min, 72 °C pendant 5-10 min, 15 cycles de 98 °C pendant 30 sec, 55 °C pendant 1 min, 72 °C pendant 5-10 min suivis d'une dernière incubation à 72 °C pendant 10 min. Le produit PCR subit ensuite un traitement par *DpnI* (Promega) à 37 °C pendant 4 h. *DpnI* est une enzyme de restriction qui reconnaît une séquence palindromique omniprésente (5'-G^{me}ATC-3'). Ce site de restriction n'est clivé que s'il porte une méthylation. Etant donné que les plasmides sont naturellement méthylés dans les bactéries, le vecteur d'origine sera dégradé par l'enzyme et seulement le plasmide néo synthétisé par PCR sera introduit dans des bactéries compétentes.

2.3. Transformation des bactéries

La transformation des bactéries est réalisée suivant les recommandations du fournisseur. 10 à 100 ng de plasmide sont ajoutés aux bactéries compétentes qui, après avoir subi un choc thermique ou électrique sont reprises dans 200 μ l de SOC (Sigma Aldrich). Après 1h d'incubation à 37 °C (30 °C pour les Agrobactéries) sous agitation (200 rpm), la solution bactérienne est étalée sur boîtes de LB supplémentées d'antibiotiques appropriés. Les boîtes de Pétri sont par la suite incubées une nuit à 37 °C.

La liste des différents vecteurs ainsi que des souches de bactéries utilisés est résumée dans le tableau 2.2.

2.4. Extraction des plasmides et séquençage

Plusieurs colonies issues du clonage sont séparément mises en culture dans 5 ml de LB contenant les antibiotiques de sélection afin d'isoler les clones recombinants. Après une nuit d'incubation à 37 °C, les bactéries sont culottées. L'extraction des plasmides se fait

Tableau 2.3. Liste et détails des méga-primers utilisés en Ω -PCR

Amorces	Sens	Séquence (5'-3')	Taille (pb)	T _m (°C)
mut ATG	F	TAAGTCCCTAAAGTATCATC <u>G</u> TGATTAAAAAGTTCAGCAATATGG	45	68,5
	R	CCATATTGCTGAACTTTTTAAT <u>C</u> AATGATACTTTAGGGACTTA	45	68,5
mut ATG2	F	<u>G</u> TGATTAAAAAGTTCAGCAAT <u>G</u> TGGATTACAACCAGAAACGAGAG	45	70,3
	R	CTCTCGTTTCTGGTTGTAAT <u>C</u> CAATTGCTGAACTTTTTAAT <u>C</u> A	45	70,3
NLS	F	GGATTAAAATTAAGTCCCTAAAGTATCATC <u>ATG</u> CAGCCAAGCCTGAAACGTATGAAGATTTCAGCCC TCCTCCCAACCGATTAAAAAGTTCAGCAATATGGATTAC	105	> 75
	R	GTAATCCATATTGCTGAACTTTTTAATCGGTTGGGAGGAGGGCTGAATCTTCATACGTTTCAGGCTT GGCTGCAATGATGATACTTTAGGGACTTAATTTAATCC	105	> 75
PTS	F	GGATTAAAATTAAGTCCCTAAAGTATCATC <u>ATGGCTTCCTCAGTTCTTTCCTCTGCAGC</u>	59	75
	R	<u>GTAATCCATATTGCTGAACTTTTTAAT</u> GCTCAAATCAGGAAGGTATGAG	49	70,3
Délétion	F	GATTAAAATTAAGTCCCTAAAGTATCAT <u>CC</u> GGAGATGACGACGGAGAATATGTACGG	58	> 75
	R	CCGTACATATTCTCCGTCGTCATCTCC <u>GG</u> GATGATACTTTAGGGACTTAATTTAATC	58	> 75

grâce au kit GenElute HP plasmid Miniprep (Sigma-Aldrich). L'ADN plasmidique est repris dans 100 µl d'eau et dosé à 260 nm (NANODROP 1000 spectrometer, Thermo Scientific, Wilmington, USA) et ensuite envoyé à séquencer (EUROFINS).

2.5. Transformation des plantes

Les vecteurs contenant les différentes constructions ont été introduits dans *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101). Ces dernières sont utilisées par la suite dans la transformation des plantes d'*Arabidopsis* par « floral dip » (Zhang et al., 2006). En bref, après 20 h d'incubation à 30 °C, les Agrobactéries transformées sont centrifugées 5 min à 5000 rpm et reprises dans une solution de trempage (5 % saccharose, 0.02 % SILWET L-77). Les hampes florales sont trempées dans ce mélange pendant 90 secondes. Les plantes sont par la suite couvertes de sacs en plastiques pendant 24 h. Les graines issues de cette transformation (T0) sont criblées *in vitro* en présence des antibiotiques appropriés puis par PCR.

2.6. Croisement des plantes

Des plantes cultivées en serre pendant 5 semaines sont utilisées pour le croisement. Les sépales, les pétales et les anthères sont enlevés afin de faire apparaître le stigmate sur lequel le pollen d'une autre plante sera déposé. Les siliques mûres sont récoltées individuellement et les graines sont criblées par la technique appropriée.

2.7. Extraction de l'ADN génomique

Des feuilles de plantes cultivées en serre sont récoltées dans des tubes de 2 ml contenant une bille en acier et congelées dans l'azote liquide. Les échantillons sont broyés au broyeur à bille (Broyeur Retsch® Mixer Mills MM400, 25 agitation.s⁻¹, 1 min). 500 µl de tampon CTAB (20 g.l⁻¹ Hexadecyltrimethyl-ammonium bromide, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8, 100 mM Tris pH 8) sont ajoutés à la poudre. Les tubes sont mis sous agitation durant 5 min, incubés pendant 30 min à 60 °C et centrifugés 10 min à 14000 g. Le surnageant est transféré dans un tube de 1,5 ml auquel sont ajoutés 500 µl de chloroforme/alcool isoamylique (24/1). Après homogénéisation et centrifugation 10 min à 14000 g, le surnageant est transféré dans un tube de 1,5 ml contenant 500 µl d'isopropanol pour précipitation des acides nucléiques. Une nouvelle centrifugation (10 min, 14000 g) permet alors de culotter l'ADN. Le culot est rincé 2 fois à l'éthanol 70 % et séché. Il est à la fin repris dans 40 µl d'eau stérile.

Tableau 2.4. Liste et détails des amorces utilisées pour le clonage et le séquençage

Amorce	Séquence (5'-3')	Taille (pb)	Tm (°C)
Primer GR	GCTGAAATCATCACTAATCAGATACC	26	60.1
Primer GR 2	CATGCATGAGGTGGTTGAGA	20	57.3
Seq pBOB	GCGGACTCTAGCATGGCCGCGGG	23	71.3
Plastid TS	GCATGGCTTCCTCAGTTCTTTCC	23	62.4
Seq pHRS1	CAAAATACTGATCCTAGAGGCC	22	58.4
GST F seq	GGTGATCATGTAACCCATCCTG	22	60.3
M13 rev (-29)	CAGGAAACAGCTATGACC	18	53.7
M13 uni (-21)	TGTAAACGACGGCCAGT	18	53.7
pEntr attL1 F	TCGCGTTAACGCTAGCATGGAT	22	60.3
pEntr attL2 R	ACATCAGAGATTTTGAGACACGGGC	25	63
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	20	53.2
T7 rev	GCTAGTTATTGCTCAGCGGTGG	22	62.1
Primer pD207 F	CGCGTTAACGCTAGCATGGATCTCGGGC	28	71
Primer pD207 R	CGGGCCAGAGCTGCAGCTGGATGGC	25	72.8
NLP2 F	CACCATGGAAGGTGGTCGTGGTGGTGG	27	71
NLP2 R	TTATAACGAGGGACCAAGACCGATGC	26	64.8
NLP2 F2	CTCTGTCTGCGACCCCTTCAGCAGG	24	67.8
NLP2 R2	CCTGCTGAAGGGTCGCAGACAGAG	24	67.8
NLP6 F	CACCATGGAAGTTGACGACTTGGATCTCAGC	31	69.5
NLP6 R	TCACAAGCACATCATAGTTTCCTCTGAGC	29	65.3
NLP6 F2	CTCTGTCTGCGACCCCTTCAGCAGG	24	67.8
NLP6 R2	CCTGCTGAAGGGTCGCAGACAGAG	24	67.8
NLP7 F	CGACCAAGAGCAAGATTTGCTGTTGGG	27	66.5
NLP7 R	CCCAACAGCAAATCTTGCTCTTGGTCG	27	66.5
attB1 NLP2 F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAAGGTGG TCGTGGTGGTGGAG	56	> 75
attB1 NLP2 R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTATAACGAGGG ACCA AGACCGATG	55	> 75
attB1 NLP6 F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAAGTTGAC GAC TTGGATCTCA	56	> 75
attB1 NLP6 R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACAAGCACATC ATA GTTTCCTCT	55	> 75
attB1 SPX1 F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAG AACC ATGAAGTTTGGTAAGAGTCTCAGCA	71	> 75
attB1 SPX1 R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCATTTCGCTACT TGC TCCAACAAT	55	> 75
attB1 SPX2 F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAG AACC ATGAAGTTTCGGCAAGAGCCTAAGCA	71	> 75
attB1 SPX2 R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCATTTCGCTACT TGT TCAAGGACA	55	> 75
attB1 SPX3 F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAG AACC ATGAAGTTTGGAAAGAGGATTAAG	71	> 75
attB1 SPX3 R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCATGGAATAGG AATC GGAGAAGAT	55	> 75
attB1 SPX4 F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAG AACC ATGAAATTCGGCAAGAGTTTCGTA	71	> 75
attB1 SPX4 R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAGTGGGAAGG TCCA GTATCTTCC	55	> 75

2.8. PCR

Les différentes réactions PCR ont été effectuées dans un Thermocycleur 2720 (Applied Biosystems^{MC}). L'amplification est réalisée grâce à une ADN polymérase (Gotaq® DNA polymerase, Promega, ou Phusion, Thermo ScientificTM pour les versions à haute fidélité) suivant les recommandations des fournisseurs. Après une phase initiale de dénaturation à 95 °C pendant 5 min, l'amplification est réalisée en 35 cycles (1 min à 95 °C, 30 sec à 55°C et 1 min/Kb à 72 °C) suivie d'une phase finale d'extension de 10 min à 72 °C. Le produit PCR est ensuite analysé par électrophorèse. La migration (30 min à 100 V) se fait sur gel d'agarose 1 % dans du TAE 1X. La liste des amorces utilisées est illustrée dans les tableaux 2.4 et 2.5.

3. Conditions de culture et traitements

3.1. Culture en serre

L'amplification des graines est réalisée en serre. Les plantes sont soumises à un cycle jour/nuit de 16h/8h de 23 °C/21 °C. L'hygrométrie n'est pas contrôlée. Lorsque la luminosité externe n'est pas suffisante, l'éclairage est maintenu à 150 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ grâce à des lampes à vapeur de sodium. Le substrat utilisé pour la culture est le terreau Neuhaus huminsubstrat® (Klasmann-Deilmann, Allemagne). Les plantes sont sub-irriguées à l'eau du robinet une à deux fois par semaine.

3.2. Cultures hydroponiques

Les expériences réalisées en hydroponie ont été basées sur la méthode décrite par (Conn et al., 2013). Les bouchons des tubes Eppendorf noirs sont percés et remplis d'agar 0.5 % p/v (Figure 2A). Les graines sont ensuite déposées sur l'agar, incubées 2 jours à 4°C à l'obscurité. Après une semaine d'incubation dans l'eau du robinet, les plantules sont transférées sur un milieu de culture composé de 1 mM KH_2PO_4 , 1,5 mM MgSO_4 , 0,25 mM K_2SO_4 , 3 mM CaCl_2 , 0,1 mM Na-Fe-EDTA, 30 μM H_3BO_3 , 5 μM MnSO_4 , 1 μM ZnSO_4 , 1 μM CuSO_4 , 0,1 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 5 μM KI, 0,5 g.l^{-1} MES et 0,5 mM NH_4NO_3 . Le pH est ajusté à 5,7 avec du KOH 1 M. Les plantes sont cultivées pendant 5-6 semaines (selon l'expérience) dans les conditions suivantes : cycle jour/nuit 8 h/16 h, 23 °C/21 °C, intensité lumineuse 260 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et humidité relative 70 %. Elles sont par la suite transférées sur le

Tableau 2.5. Liste des amorces utilisées pour le criblage plantes

Gène	Amorce	Séquence (5'-3')	Taille (pb)	Tm (°C)
HRS1	HRS1-ATG	ATGATTAAAAAGTTCAGCAATATGGATTACAACC	34	62.2
AT1G13300	HRS1-STOP	TTAATTATTCTTGACGTAATGATTACGGGTAGAA	34	62.2
HHO1	HHO1-ATG	CACCATGATCAAGAACTTAAGTAATATGAAG	31	61.6
AT3G25790	HHO1-STOP	TTATGATATTATTTTGCATCTTTCGTC	28	56.3
HHO2	HHO2-ATG	CACCATGGTGGAGATGGATTACGCTAAGAAAATG	34	68.3
AT1G68670	HHO2-STOP	TTATGACACAGGAGTAGAAGTATTTGTATTTG	32	61.8
HHO3	HHO3-ATG	CACCATGATGTTCAAGAGCGGTGACATGGATTAC	34	69.5
AT1G25550	HHO3-STOP	TTATGAAAGAGGAAGAAGGTGTGGTGTGTG	30	65.4
Clathrine	CLA-F	AGCATACACTGCGTGCAAAG	20	57.3
AT4G24550	CLA-R	TCGCCTGTGTCACATATCTC	20	57.3
RbohC	rbohC_LP	ACAGGGCTACGCCTGTATTG	20	55
At5g51060	rbohC_RP	GTCCGGAGCTTACTTTGCTG	20	55
	rbohC_LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	19	52.4
	rbohC_LP2	TCTAAGACCACGGTACCATCG	21	52.4
	rbohC_RP2	CGAGCTTAAGCGTTTGACATC	21	47.6
RbohB	rbohB_LP	TCCAAATTTGGACATTGCATAG	22	54.7
AT1G09090	rbohB_RP	AGCTTGGACTIONGGTCCTTAGC	21	59.8
	rbohB_LB3	TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATACAC	34	64
DsRED	DsRED F	CTCCTCCGAGAACGTCATCACCGAG	25	67.9
	DsRED R	CCGTCCTTCAGCTTCAGGGCC	21	65.7

même milieu avec ou sans azote (1 à 3 semaines pour l'influx de $^{15}\text{NO}_3^-$ et 6h pour le dosage des ROS).

Le milieu est renouvelé tous les 4 jours tout au long de l'expérience et puis 24h avant la récolte des tissus (Figure 2B).

3.3. Cultures *in vitro*

La culture *in vitro* des plantes est réalisée en conditions axéniques comme décrit précédemment (Gifford et al., 2008; Krouk et al., 2010b). Les paramètres des chambres de culture sont: cycle jour/nuit de 16h/8h, intensité lumineuse de $65 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, température de 22°C.

Les graines sont stérilisées par agitation pendant 8 min dans une solution de stérilisation contenant 50 % d'éthanol, 12,5 % de javel et 37,5 % H_2O (v/v). Elles sont ensuite lavées 5 fois avec l'éthanol absolu et séchées sous hotte à flux laminaire.

3.3.1 Culture en Phytatrays™ (hydroponie stérile)

Les graines stériles, sont semées à la volée sur des mailles de nylon (Nitex 03-250/47 mesh) soutenues par un support en plastique pour permettre aux racines de pousser dans des Phytatrays™ stériles contenant 250 ml de milieu de culture liquide autoclavé (Figure 2C). Ce dernier est composé de : 1 mM KH_2PO_4 , 1,5 mM MgSO_4 , 0,25 mM K_2SO_4 , 3 mM CaCl_2 , 0,1 mM Na-Fe-EDTA, 30 μM H_3BO_3 , 5 μM MnSO_4 , 1 μM ZnSO_4 , 1 μM CuSO_4 , 0,1 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 5 μM KI, 1 g.l^{-1} Saccharose, 0,5 g.l^{-1} MES. Le pH est ajusté à 5,7 avec du KOH 1 M. Ce milieu est complété par 0,5 mM de NH_4NO_3 comme source d'azote. Deux semaines après le semis, les plantes sont transférées dans un milieu frais avec ou sans N (0,5 mM de NH_4NO_3). Les plantes qui sont dépourvues d'azote ont été préalablement rincées avec le même milieu pour éliminer l'azote adsorbé sur les racines. Les différents traitements (DPI, KI...) sont appliqués au moment du transfert.

Les racines sont récoltées à différents moments après le traitement et immédiatement congelées dans de l'azote liquide.

3.3.2. Culture en boîtes de Pétri

Le milieu utilisé pour la culture en boîtes, est le $\frac{1}{2}$ MS sans azote (Plant Media) contenant 1 g.l^{-1} Saccharose et 0,5 g.l^{-1} MES et complété (le cas échéant) par la source et la quantité d'azote appropriées à chaque expérience. Le pH est ajusté à 5,7 avec du KOH 1 M. Le mélange est solidifié avec 1 % p/v d'agar puis autoclavé à 120°C pendant 20 minutes. Quarante millilitres de milieu sont coulés dans des boîtes de Pétri 12x12 cm. Les graines, préalablement stérilisées, sont semées à l'aide d'un cure-dent stérile. Les boîtes sont

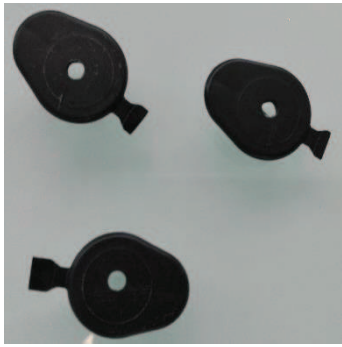
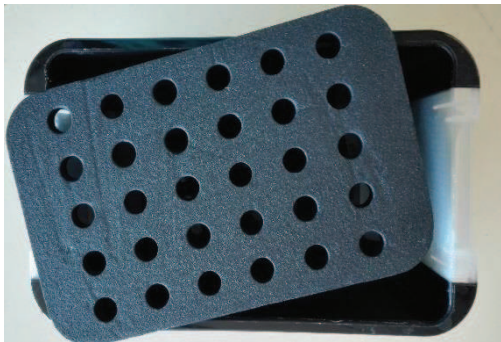
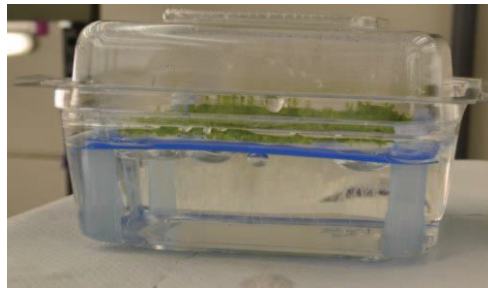
A**B****C**

Figure 2. Illustrations des systèmes de culture en hydroponie. A) Préparation des bouchons eppendorfs pour le semis. **B)** Culture des plantes en bassine noire sur support flottant. **C)** Système de culture Phytatray (hydroponie stérile).

fermées par du parafilm et placées verticalement en chambre de culture pendant une semaine.

4. Mesure de l'influx racinaire de NO_3^-

4.1. Marquage au $^{15}\text{NO}_3$

Les mesures d'influx de NO_3^- ont été réalisées comme décrits par (Lejay et al., 1999). Les racines sont tout d'abord rincées dans une solution de CaSO_4 0,1 mM pendant 1 min. Les plantes sont ensuite incubées 5 min dans un milieu de culture standard contenant une source d'azote marquée K^{15}NO_3 (99 % ^{15}N) dont la concentration est dépendante de l'expérience. Pour éliminer toute trace de ^{15}N adsorbée sur les racines, celles-ci sont rincées encore une fois dans du CaSO_4 0,1 mM durant 1 min, avant d'être récoltées, placées dans des cupules en étain puis séchées 48 h à 70 °C. Après séchage, le poids sec ainsi que la teneur en N total et le pourcentage en ^{15}N sont déterminés par spectrométrie de masse à flux continu (Lejay et al., 1999).

4.2. Mesure du ^{15}N par spectrométrie de masse

Le dosage isotopique a été réalisé comme décrit précédemment par (Clarkson et al., 1996). Les échantillons subissent une combustion à 1000 °C en présence de Cr_2O_3 et de CuO puis une réduction à 550 °C en présence de CuO . La totalité de l'azote transformé en N_2 est véhiculée par un flux d'Hélium ultra pur pour être injectée dans un spectromètre de masse (IsoPrime) connecté à un analyseur élémentaire (Euro-EA Vector, GV Instruments) où les pourcentages de ^{14}N et de ^{15}N sont quantifiés. L'influx de $^{15}\text{NO}_3^-$ est déterminé selon la formule suivante :

$\%N \times 10000 \times (1/14) \times (\%E) \times (1/\%ES) \times (1/\text{\#hours})$ et exprimé en : $\mu\text{mol N} / \text{g de matière sèche} / \text{heure}$.

$\%N$: le pourcentage d'N total dans un échantillon. $\%N = \text{g N} / 100 \text{ g matière sèche}$.

$\%E$: l'enrichissement isotopique en ^{15}N dans un échantillon et correspond à la différence entre l'abondance isotopique en ^{15}N mesurée et l'abondance isotopique en ^{15}N présente dans les échantillons témoins (n'ayant pas été en contact avec la solution marquée, 0,3663).

$\%ES$: le pourcentage de $^{15}\text{NO}_3^-$ fourni aux plantes.

5. Analyse de l'expression des gènes

5.1. Extraction des ARN totaux

Les tissus congelés (quelques dizaines de mg de racines) sont broyés une ou 2 fois par agitation en présence d'une bille d'acier de 3 mm de diamètre (Broyeur Retsch® mixer mills MM400, 25 agitation.s⁻¹, 1 min). La poudre obtenue est reprise dans 1ml de TRIzol reagent (Invitrogen) pour séparer les protéines et les acides nucléiques et incubée au moins 5 min à température ambiante sous agitation. Deux-cent µl de chloroforme sont ajoutés au mélange, successivement incubé 5 min sous agitation à température ambiante et centrifugé (15 min, 4°C, 14 000 g). Le surnageant contenant les acides nucléiques (environ 400 µl) est récupéré, mélangé à 0,5 ml d'isopropanol et 1 µl de GlycoBlue™ (Ambion®), incubé 5-10 min dans la glace et centrifugé (30 min, 4°C, 14 000 g) pour précipiter les ARNs. Le surnageant est éliminé, le culot est lavé deux fois dans 0,5 ml d'éthanol 75 % (v/v) et centrifugé (5 min, 4°C, 14 000 g). L'éthanol est éliminé et le culot est séché (quelques minutes) avant d'être repris dans 30-40 µl d'eau stérile ultra-pure. Les ARNs totaux ainsi extraits sont dosés par spectrométrie à 260 nm (NANODROP 1000 spectrometer, Thermo Scientific, Wilmington, USA) et les résultats sont analysés avec le logiciel ND-1000 V3.7.1. La pureté des ARNs est vérifiée par la mesure des ratios DO₂₆₀/DO₂₈₀ et DO₂₆₀/DO₂₃₀ qui doivent être proche de 2.

5.2. Rétro-transcription des ARN messagers

Avant la rétro-transcription, les ARNs totaux (2 à 4 µg) subissent un traitement à la DNase I (SIGMA-ALDRICH, St Louis, USA) (0,1 U) incubés 30 min à 23°C au thermocycleur 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems). Le mélange est additionné de 1 µl d'EDTA, incubé 10 min à 70°C et puis maintenu dans la glace pour stopper l'activité de la DNase afin d'éviter tout risque de dégrader les ADNc à venir. Les ARNs sont incubés pendant 5 min à 65°C en présence de 50 pmol oligo-dT₍₂₀₎, et de 20 nmol de dNTP puis gardés dans la glace. La rétro-transcription est réalisée en présence de la Thermo™script (Invitrogen) (15 unités), 4 µl de tampon de synthèse d'ADNc 5X, 1 µl de DTT 0.1 M, 40 U de RNase OUT. Le volume est ajusté à 22 µl avec de l'eau ultra-pure. La réaction est laissée pendant 1h30 à 50°C puis 5 min à 85°C. Les ADNc obtenus sont dilués dans 60 µl d'eau ultra-pure ou TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8 avec HCl).

Tableau 2.6. Liste et détails des amorces utilisées en qPCR

Gène	AGI	Amorce	Séquence (5'-3')	Taille (pb)	Tm (°C)
<i>Clathrine</i>	AT4G24550	Sens	AGCATACACTGCGTGCAAAG	20	57.3
		Anti-sens	TCGCCTGTGTACATATCTC	20	57.3
<i>Actine</i>	AT3G18780	Sens	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	23	62.4
	AT1G49240	Anti-sens	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC	23	58.9
<i>HRS1</i>	AT1G13300	Sens	ATATAGACTGCATACAAGAAGGC	23	57.1
		Anti-sens	TAGTCCGATTGTGGTACCCATAAA	24	59.3
<i>NRT2.4</i>	AT5G60770	Sens	GAACAAGGGCTGACATGGAT	20	57.3
		Anti-sens	GCTTCTCGGTCTCTGTCCAC	20	61.4
<i>NRT2.5</i>	AT1G12940	Sens	ACTGAAGAAGACTATTATCTCGCC	24	59.3
		Anti-sens	CTCTTTCGCTAATGCTGGTTT	21	55.9
<i>NRT2.1</i>	AT1G08090	Sens	AACAAGGGCTAACGTGGATG	20	57,3
		Anti-sens	CTGCTTCTCCTGCTCATTCC	20	59,4
<i>GDH3</i>	AT3G03910	Sens	CCATGGGAAGCTAAAGAACAAG	22	58,4
		Anti-sens	AGAAGGTTAAACTGCAATTAGCAC	24	57,6
<i>HHO1</i>	AT3G25790	Sens	GATGATGAAGAACACCAGTC	20	55.3
		Anti-sens	TATTAGAAACAACCTGCGTCG	20	53.2
<i>BT1</i>	AT5G63160	Sens	CTCTTTGCAGGCAATATAAGAATAG	25	58.1
		Anti-sens	GGCTTTAGCAGACGCTACTC	20	59.4
<i>BT2</i>	AT3G48360	Sens	CATAGAAAGGAGCAGGATCTTTAC	24	59.3
		Anti-sens	TTGTTATCTACTACGTTTGATGGAC	25	58.1

5.3. Quantification de l'accumulation des transcrits par q-PCR

Les amorces utilisées ont été conçues à l'aide du logiciel LightCycler® Probe Design Software 2.0 et synthétisées par le laboratoire EUROFINs. Les couples d'amorces sont définis préférentiellement dans la partie 3'-UTR et amplifient des fragments d'ADNc de 80-150 pb. Elles font 20-23 pb et ont une température d'hybridation d'environ 60 °C et un % CG d'environ 50. La liste des amorces utilisées est donnée dans le tableau 2.6.

L'amplification est réalisée à l'aide du réactif SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa, Clontech, China) en plaque de 384 puits (Hard-Shell® 384-Well Skirted PCR Plates, Roche, Mannheim, Allemagne) dans un LightCycler® LC480 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) selon les instructions du fournisseur avec de 1 µL d'ADNc dans un volume de 10 µL contenant 1 µM de chacune des amorces. Les conditions d'amplification sont illustrées dans le tableau 2.7. À la fin des 42 cycles d'amplification, le produit PCR est dénaturé en augmentant la température de 0,05°C par seconde jusqu'à 95°C afin de mesurer la spécificité de l'amplification grâce à l'analyse de la « melting curve ». L'analyse des résultats est effectuée avec le logiciel LightCycler® LC480 SW1.5 (Roche, Mannheim, Allemagne) en utilisant la méthode des « Fit points » pour calculer les Cp (crossing point). Des dilutions successives d'un mélange d'une même quantité des différents échantillons d'ADNc sont utilisées comme gamme étalon. Une bonne amplification possède une efficacité comprise entre $0.8 < E < 1$. Les résultats sont normalisés par rapport aux valeurs obtenues pour la clathrine (AT4G24550) et l'actine (AT3G18780, AT1G49240) (Charrier et al., 2002). Chaque échantillon est testé en *duplicata/triplicata*; la concentration en produit d'amplification est calculée comme la moyenne des valeurs obtenues, préalablement normalisées par rapports aux concentrations des gènes de ménage (*CLA*, *ACT*).

6. Extraction des protéines racinaires et analyse par western blot

Les racines d'*Arabidopsis* (1 semaine sur ½ MS) ont été broyées. La poudre a été reprise dans 1 ml de méthanol pré-refroidi à -20 °C. Le mélange est agité (vortex), incubé 10 min à -20 °C et centrifugé 5 min à 14000 g à 4 °C. Les mêmes étapes sont répétées en utilisant de l'acétone à la place du méthanol. Une fois le culot complètement séché, 100 µl de réactif d'extraction (Protein Extraction Reagent Type 4, Sigma Aldrich) contenant 1 µl d'inhibiteur de protéases (Sigma Aldrich) est ajouté. Le mélange est ensuite incubé 30 min à

Tableau 2.7. Programme d'amplification de l'ADNc par la PCR quantitative

	Température	Temps	Rampe
Pré-incubation	95 °C	10 min	4.8 °C/sec
Amplification (42 cycles)	95 °C	5 sec	4.8 °C/sec
	60 °C	5 sec	2.5 °C/sec
	72 °C	10 sec	4.8 °C/sec
Courbe de fusion	95 °C	5 sec	4.8 °C/sec
	65 °C	1 min	2.5 °C/sec
	97 °C	-	0.11 °C/sec
Refroidissement	40 °C	30 sec	2.5 °C/sec

température ambiante sous agitation et centrifugé à 14000 g pendant 30 min. Le surnageant est récupéré et les protéines solubles sont quantifiées en utilisant le réactif Pierce™ 660 nm Protein Assay Reagent (Thermo Scientific) (Antharavally et al., 2009). Une courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant des concentrations croissantes de BSA. Le western blot a été réalisé avec 40 µg de protéines est révélé grâce à l'anticorps anti GFP couplé à l'HRP (Miltényi Biotec, 130-091-833). La révélation a été réalisée à la caméra CCD (LAS3000, Fujifilm).

7. Dosage enzymatique des ROS

Le dosage d'H₂O₂ a été basé sur la méthode décrite par (Shin et al., 2005). La poudre (~30 mg) issue du broyage des racines est additionnée de 200 µl de tampon phosphate (50 mM K₂HPO₄, pH 7.4), vortexée et centrifugée (14 000 g, 10 min, 4°C). Il est important de réaliser cette partie du protocole à 4°C (chambre froide). Dans une plaque de microtitration transparente, 50 µl du surnageant sont déposés avec 50 µl du mélange réactionnel (100 µM Amplex Red® dilué dans le DMSO, 0.2 U.ml⁻¹ HRP, 50 mM tampon phosphate K₂HPO₄, pH 7.4). Pour calibrer le dosage : une gamme d'H₂O₂ (0 ; 1,25 ; 2,5 ; 6,25 ; 12,5 ; 25 et 50 µM) a été réalisée parallèlement. La plaque est ensuite incubée 30 min à l'obscurité à température ambiante. L'absorbance est mesurée au VICTOR₂™ (MULTILABEL COUNTER, Life Sciences) à 560 nm. Les valeurs du dosage ont été reportées sur la gamme d'étalonnage. Les résultats ont été exprimés en nmol d'H₂O₂ produites / mg de matière fraîche.

8. TARGET

8.1. Construction et purification du vecteur pBeaconRFP_GR-FT sur gradient de CsCl

L'insertion des CDS des facteurs de transcription dans le vecteur pBeaconRFP_GR a été basée sur l'utilisation du système de recombinaison Gateway® (Life Technologies). Le clonage a été vérifié par PCR et séquençage (Tableau 2.4).

Une culture bactérienne est réalisée dans 1 litre de milieu TB (12 g.l⁻¹ Tryptone, 24 g.l⁻¹ Extraits de levure, 72 mM K₂HPO₄, 17 mM KH₂PO₄, 0,4 % Glycérol, pH 7,3) en partant d'une préculture fraîche (37 °C à 250 rpm). Le lendemain, les bactéries sont centrifugées à 4000 g pendant 15 min et incubées à -20 °C avant d'être reprises dans 40 ml de solution de resuspension (10 mM EDTA, pH 8 avec du NaOH) additionnés de 80 ml de solution de lyse

(NaOH 0.1 N, 1 % SDS) et mélangées par agitation pendant 5 sec. 30 ml d'une 3^{ème} solution (acétate de potassium 3 M, acide acétique 15 %) sont ensuite ajoutés suivis d'une centrifugation à 4000 rpm pendant 5 min. Le surnageant est filtré sur un filtre préalablement mouillé (Miracloth, Calbiochem®) et mélangé avec 150 ml d'isopropanol dans des pots Nalgène. Après une nuit d'incubation à 4 °C, les bouteilles sont centrifugées 5 min à 4000 rpm. Le culot est rincé avec de l'éthanol 95 % avant d'être séché puis repris dans de 3.5 ml d'EDTA 10 mM. Dans un tube de 15 ml, le volume est ajusté à 4,7 ml auquel sont ajoutés 5,5 g CsCl et 300 µl de BET (10 mg/ml). Après dissolution du CsCl homogénéisation de tous les ingrédients, les tubes sont à nouveau centrifugés 5 min à 3000 rpm. Le surnageant est alors récupéré dans des tubes OptiSeal de 3,3 ml (Beckman Coulter RefN°: 361627) qui sont soigneusement équilibrés puis ultracentrifugés toute la nuit à 80000 rpm (Beckman, TLN100). La bande (0.5-2 cm) sont visualisées sous lumière UV et la bande inférieure qui correspond à l'ADN plasmidique superenroulé est aspirée à l'aide d'une seringue et transférée dans un tube de 15 ml. Le volume est ajusté à 3,5 ml avec de l'eau auquel est ajouté le même volume d'une solution de butanol saturée en sel (83,3 % n-butanol, 16,7 % NaCl 3 M). Après vortex et centrifugation (1500 rpm, 3 min), le surnageant saturé en BET est éliminé et l'ADN dissout dans la phase aqueuse est récupéré. Cette étape est répétée au moins deux fois jusqu'à ce que la phase aqueuse devienne bien claire. Après élimination de toute trace de BET, 2 volumes d'éthanol 95 °C sont ajoutés à la phase aqueuse afin de précipiter l'ADN plasmidique. Une incubation 15 min à 4 °C est alors réalisée suivie d'une centrifugation pendant 1 h à vitesse maximale. Le culot d'ADN est séché puis repris dans de l'eau pour une concentration 3-5 µg/µl.

8.2. Isolement des protoplastes

Des plantes cultivées pendant 10 jours dans des boîtes de Pétri ont été utilisées pour la préparation des protoplastes. 10 g/l de saccharose ont été ajoutés au milieu de culture pour augmenter la densité des cellules et ainsi faciliter leur sédimentation lors de la centrifugation. Brièvement, les racines sont récoltées et incubées pendant 3 h dans une solution de digestion de la paroi cellulaire (1,25 % Cellulase [Yakult, Japan], 0,3 % Macerozyme [Yakult, Japan], 0,4 mM Mannitol, 20 mM MES, 20 mM KCl, 0,1 % BSA, 10 mM CaCl₂, 5 mM β-mercaptoéthanol, le pH est ajusté à 5,7 avec du Tris/HCl 1 M pH 7.5). Les protoplastes libérés sous l'action des enzymes sont alors filtrés sur des filtres en nylon de 40 µm (VWR® Cell Stainers) et centrifugés 10 min à 300 g. Les cellules culottées sont récupérées et le surnageant est réutilisé pour le rinçage des racines afin de récupérer le maximum de protoplastes qui seront à leur tour filtrés et centrifugés. Cette étape est réalisée 2 à 3 fois et les protoplastes sont regroupés puis resuspendus dans 1 ml de solution de

transformation (0,4 M Mannitol, 15 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 4 mM MES, pH 5.7 avec du KOH). Les cellules sont ensuite comptées à l'aide d'une lame de Malassez (MARIENFELD) et leur concentration est ajustée à 4 millions cellules / ml. 1 million de cellules (250 μl) est utilisé pour chaque transformation au PEG (Figure 1.8).

8.3. Transformation des protoplastes

Pour chaque transformation, 50 μg d'ADN plasmidique sont utilisés auxquels sont ajoutés 250 μl de protoplastes et 250 μl de solution de transformation (40 % PEG 4000, 0,4 M Mannitol et 0,1 M CaCl_2). Le mélange est incubé à température ambiante pendant 15 minutes. Un rinçage est effectué avec 15 ml de solution de lavage (154 mM NaCl, 125 mM CaCl_2 , 5 mM KCl, 2 mM MES, pH 5,7 avec du KOH) suivi d'une centrifugation de 10 min à 150 g. Le surnageant est éliminé, et les protoplastes sont resuspendus dans 1 ml de solution de lavage puis transférés dans une plaque 24 puits et incubés toute la nuit à température ambiante et à l'obscurité (Figure 1.8).

8.4. Traitements des protoplastes et tri cellulaire

Après incubation et expression du plasmide, les protoplastes sont traités successivement avec 35 μM de CHX (Sigma) durant 30 min et 10 μM de DEX (Sigma) puis incubés toute la nuit à température ambiante. Des traitements au DMSO et à l'éthanol ont été réalisés comme témoins négatifs du CHX et du DEX respectivement. Les protoplastes ayant incorporé le vecteur codant la RFP sont triés à l'aide d'un trieur de cellules (FACS Aria BD Biosciences), en excitant les cellules à 561 nm et en mesurant l'émission à 610-620 nm. Les protoplastes triés sont directement récupérés dans un tampon d'extraction d'ARN et congelés dans l'azote liquide (Figure 1.8).

8.5. Marquage des ARNs et hybridation des puces

Les ARNs ont été extraits à l'aide du kit (RNeasy[®] Micro Kit, QIAGEN) suivant les recommandations du fournisseur et dosées au Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies). Le transcriptome a été réalisé à l'aide de micro-puces GeneChip[®] ATH1 Affymetrix[™]. Brièvement, les ARNs sont rétro-transcrits en présence d'oligo (dt) pour donner naissance à des ADNc simple brin qui, à leur tour, vont servir de matrice pour la synthèse du brin complémentaire. Les ADNc obtenus sont alors transcrits *in vitro* en présence d'un ribonucléotide biotinylé qui va permettre la purification des ARNs néosynthétisés. Les ARNs purifiés sont quantifiés au Bioanalyzer Agilent 2100 puis fragmentés en utilisant le kit GeneChip[®] WT PLUS Reagent (Thermo Scientific). L'hybridation des ARNs fragmentés sur

les puces (ATH1 Affymetrix™) est réalisée à 48 °C pendant 16 h. Les puces hybridées sont rincées, marquées et scannées.

8.6. Analyse bioinformatique et statistique

8.6.1. Analyse du transcriptome

Les données brutes issues de ces puces ont été normalisées par le logiciel Expression Console Software (Affymetrix™) en ajustant le bruit de fond. Pour l'analyse de l'expression des gènes, un test ANOVA (seuil $p < 0,01$) suivi d'un test Tukey (seuil $p < 0,01$) ont été réalisés en utilisant le logiciel statistique R (<https://www.r-project.org/>). L'analyse des clusters de gènes et leur représentation en *heatmap* ont été effectuées à l'aide du logiciel MeV v4.8 (<http://mev.tm4.org/>).

8.6.2. GeneCloud

GeneCloud (Krouk et al., 2015) est une plateforme qui permet d'effectuer une analyse de l'enrichissement sémantique des gènes (<https://m2sb.org/>). Afin d'identifier les fonctions surreprésentées dans une liste de gènes donnée, la description et les détails de chaque gène sont récupérés à partir de TAIR (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>). Cet algorithme permet de compter l'occurrence de chaque terme dans une liste de gènes donnée et la comparer par la suite à l'occurrence du même terme dans tout le génome. Les termes significativement surreprésentés sont alors organisés sous forme de nuage de mots dont la taille et la couleur sont corrélées à leur enrichissement relatif au génome entier.

9. Production et purification des protéines recombinantes

9.1. Cultures bactériennes

La souche utilisée, Rosetta™ 2(DE3)pLysS (Novagen, Darmstadt, Germany), est un dérivé lysogène de la souche classique *E. coli* B. Cette souche possède le gène codant la T7 polymérase sous le contrôle du promoteur lacUV5 inductible par l'IPTG. Les bactéries sont transformées avec le vecteur d'expression Gateway® pDEST15 (Lifescience) exprimant la protéine HRS1 fusionnée à la GST sous le contrôle du promoteur fort du bactériophage T7. Le tag GST (25 KDa environ) permet de purifier la protéine par affinité (voir ci-après).

Les clones recombinants sont mis en pré-préculture dans 10 ml de milieu LB (Tryptone 10 g.l⁻¹, Extraits de levure 5 g.l⁻¹, NaCl 5 g.l⁻¹, pH 7 avec NaOH) à 37 °C pendant une nuit sous agitation, en présence des agents sélectifs : chloramphénicol (34 µg/ml) et carbénicilline, analogue de l'ampicilline, (50µg/ml). Le lendemain, 1 ml de cette préculture est réensemencé dans un erlenmeyer contenant 250 ml de milieu TB (12 g.l⁻¹ Tryptone, 24 g.l⁻¹ Extraits de levure, 72 mM K₂HPO₄, 17 mM KH₂PO₄, 0.4 % Glycérol, pH 7,3). La DO ayant atteint 0,7, l'addition de 1 mM d'IPTG (inducteur du promoteur bactérien de la β-galactosidase (lac)), permet d'activer l'expression du gène et d'induire l'accumulation de la protéine recombinante. L'état inductif est maintenu 16 h à 22°C sous agitation (200 rpm).

9.2. Lyse des bactéries et extraction des protéines

Le culot bactérien, obtenu par centrifugation à 8000 g pendant 10 minutes à 4°C, est repris dans 10 ml de PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,3) en présence de lysozyme et un inhibiteur de protéases. Les bactéries sont lysées dans la glace par 2 cycles de sonication de 30 sec (80 % d'intensité) séparés par une pause de 15 sec. Le lysat contenant la totalité des protéines solubles est récupéré par centrifugation (12000 g, 12 min, 4°C).

9.3. Purification de la protéine recombinante

L'extrait protéique est mélangé à des billes de glutathion-sépharose (GE Healthcare, Freiburg, Allemagne) et le volume est ajusté à 8 ml avec du tampon PBS. Le mélange est incubé 2h30 sous légère agitation horizontale à 4°C puis 15 min à température ambiante pour permettre la fixation du tag GST de la protéine de fusion sur les billes de sépharose (la GST a une très forte affinité pour son substrat le glutathion immobilisé sur ces billes). Après centrifugation (650 g, 10 min, 2°C), le surnageant est éliminé et 5 cycles de lavages par le PBS sont réalisés en prélevant un aliquote de surnageant à chaque fois. L'élution de la protéine d'intérêt se fait par compétition, en ajoutant 200 µl de tampon d'élution (10 mM glutathion, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 avec HCl). Ce mélange est incubé 15 min à température ambiante sous légère agitation horizontale suivi d'une centrifugation (650 g, 10 min, 2°C). Cette étape est répétée 2 autres fois et les 3 fractions sont récupérées séparément et conservées à 4°C. Afin de purifier ultérieurement la protéine, cette dernière est dialysée pendant toute la nuit dans un tampon de dialyse (NaCl 150 mM, HEPES 50 mM, pH 7,4 avec NaOH) à 4°C.

Tableau 2.8. Liste et détails des oligonucléotides utilisés pour l'EMSA

Motifs utilisés pour l'EMSA								
Description			Séquence (5'-3')		Taille (pb)	Tm °C		
Motif 7 (X4)	F		GATGTTTCTAGA	GATGTTTCTAGA	GATGTTTCTAGA	GATGTTTCTAGA	48	69.4
	R		TCTAGAAACATC	TCTAGAAACATC	TCTAGAAACATC	TCTAGAAACATC		
Motif7-mut1 (x4)	F		TATGTTTCTATA	TATGTTTCTATA	TATGTTTCTATA	TATGTTTCTATA	48	62.6
	R		TATAGAAACATA	TATAGAAACATA	TATAGAAACATA	TATAGAAACATA		
Motif7-mut2 (x4)	F		GATGTTTATAGA	GATGTTTATAGA	GATGTTTATAGA	GATGTTTATAGA	48	66
	R		TCTATAAACATC	TCTATAAACATC	TCTATAAACATC	TCTATAAACATC		
Motif7-mut3 (x4)	F		TATGTTTATATA	TATGTTTATATA	TATGTTTATATA	TATGTTTATATA	48	59.2
	R		TATATAAACATA	TATATAAACATA	TATATAAACATA	TATATAAACATA		
Motif 1 (X4)	F		GGAGAAGAAA	GGAGAAGAAA	GGAGAAGAAA	GGAGAAGAAA	40	69.4
	R		TTTCTTCTCC	TTTCTTCTCC	TTTCTTCTCC	TTTCTTCTCC		
Motif 5 (X4)	F		AAACCAAACCGA	AAACCAAACCGA	AAACCAAACCGA		36	68.3
	R		TCGGTTTGTTT	TCGGTTTGTTT	TCGGTTTGTTT			
séquences promotrices utilisées pour l'EMSA								
Description		AGI	Séquence (5'-3')		Taille (pb)	Tm		
NRT2.4	AT5G60770	F	CTCAAAAAATTAGAAATGTTTAAAGTAGATAATGCAAACA		40	62.3		
		R	TGTTTGCATTATCTACTTTAAACATTCTAATTTTTTTGAG		40	62.3		
NRT2.4	AT5G60770	F	AAGGTTTTCTGGTTTCTTTCTAGATGAAAAATAAAATA		40	62.3		
		R	TATTTTATTTTCACTAGAAAGAAAACCCAGAAACCTT		40	62.3		
NRT2.5	AT1G12940	F	CACCCAAGTTTAACGATTTTATCGTTAATTTTCTTAGG		40	65.3		
		R	CCTAAAGAAAATTAACGATAAAAATCGTTAAACTTGGGTG		40	65.3		
NRT2.5	AT1G12940	F	TTCGAACCTCGATCGATGTTTTCAGAGATTGTACCATGAG		40	70.5		
		R	CTCATGGTACAATCTCTGAAAACATCGATCGAGGTTTCGAA		40	70.5		

9.4. Analyse des protéines sur gel de polyacrylamide dénaturant SDS-PAGE

Après avoir été dosées à 660 nm selon la méthode de (Antharavally et al., 2009) en utilisant le réactif Pierce™ 660 nm Protein Assay Reagent (Thermo Scientific), les protéines sont dénaturées pendant 5 min à 95°C en présence de 25 % (v/v) du tampon Laemmli 4X (0,25 M Tris-HCl pH 6,8, 40 % glycérol, 8 % SDS, 0,04 % Bleu de Bromophénol, 4 % β -mercaptoéthanol) puis séparées en gel de polyacrylamide 5 et 12,5 % respectivement pour le gel de concentration (pH 6,8) et le gel de séparation (pH 8,8) en conditions dénaturantes (SDS). La migration se fait 15 min à 60 V puis 1h30 à 120 V dans le tampon de migration TGS (Tris base 15,23 g.l⁻¹, Glycine 72,06 g.l⁻¹, 0,5 % SDS). Les protéines sont ensuite visualisées par coloration du gel au bleu de Coomassie ou transférées sur membrane. La production de la protéine a été validée par western blot comme décrit précédemment (Feys et al., 2001) en utilisant des anticorps anti GST couplé à l'HRP.

10. Retard sur gel ou EMSA

10.1. Choix et hybridation des oligonucléotides

Les fragments double-brin d'ADN ont été préparés à partir d'oligonucléotides sens et antisens complémentaires (Tableau 2.8) Ces derniers (100 μ M) ont été mélangés en concentration équimolaire pour obtenir des concentrations finales de 50 nM pour les sondes biotinylées et 2 μ M pour les non biotinylées. Les oligonucléotides sont chauffés 5 min à 94°C dans le thermocycleur, refroidis (-1 °C/min) jusqu'à T_m, puis incubés 30 min à T_m et refroidis (-1 °C/min) jusqu'à 4 °C.

10.2. Analyses de retard sur gel

La liaison de la protéine recombinante (150 ng) sur les sondes biotinylées (20 fmoles) est réalisée dans un mélange réactionnel contenant 10 mM de Tris, 50 mM de KCl, 1 mM de DTT, pH 7,5, 2,5 % de glycérol, 5 mM de MgCl₂, 1 μ g poly (dl-dC) et 0,05 % de NP-40. La spécificité de liaison a été vérifiée par compétition avec 10, 25, 50 et 200 X de sondes non-biotinylées, et par des tests avec des sondes contenant des nucléotides mutés (Tableau 2.8). Après incubation à 24 °C pendant 30 min le mélange protéine-sonde est séparé sur gel natif de polyacrylamide 4 % dans le TBE 0.5 % (TBE 10 % : 5,4 g.l⁻¹ Tris base, 2,75 g.l⁻¹ Acide Borique, 1 mM Na₂EDTA pH 8, H₂O qsp 1L) et transféré par capillarité dans le tampon

SSC 20X ($175,3 \text{ g.l}^{-1}$ NaCl, $88,2 \text{ g.l}^{-1}$ Tri-Na-Citrate- $2\text{H}_2\text{O}$, pH 7) pendant une nuit sur une membrane de nylon Biodyne B (Thermo Scientific). Après cross-link par UV (254 nm) pendant 90 sec à 120 mJ.cm^{-2} , la migration des sondes marquées à la biotine est révélée par incubations séquentielles à température ambiante (en agitation) avec : i) tampon de blocage (Blocking Buffer Thermo Scientific) (20 ml, 15 min). ii) streptavidine couplée à la HRP (Thermo Scientific) (dilués au 1/300 dans 20 ml de tampon de blocage, 15 min). iii) tampon de lavage (Wash Buffer Thermo Scientific) (5 min, 4 fois). iv) tampon d'équilibration du substrat (Substrate Equilibration Buffer Thermo Scientific). v) le substrat chimioluminescent : luminol+peroxyde (Thermo Scientific). La révélation est réalisée par autoradiographie.

11. Observation microscopique d'HRS1-GFP et ses lignées dérivées

11.1. Criblage

Le criblage des lignées exprimant la GFP et/ou la mCherry a été effectué aux objectifs 20X et 40X sous un microscope apotome inversé (ApoTome.2, Zeiss Axio Observer 7) connecté à une caméra digitale monochrome (HAMAMATSU ORCA-Flash4.0 LT) et piloté par le logiciel Zen 2. Les filtres d'excitation 450-490 nm et 533-558 nm ont été utilisés respectivement pour la GFP et la mCherry qui émettent de la fluorescence détectée respectivement à travers des filtres d'émission 500-550 nm et 570-640 nm. L'intensité du laser est maintenue à 100 %.

11.2. Co-localisation

La colocalisation des deux protéines de fusion HRS1-GFP avec CT-DsRed et PTS-mCherry a été réalisée au microscope confocal inversé (Leica TCS SP8) équipé d'un objectif 63X à huile et contrôlé par le logiciel LAS AF du fournisseur. La GFP est excitée à 488 nm par une source de laser Argon et la fluorescence émise par l'échantillon est filtrée à travers une bande passante de 500-535 nm. Le laser 561 nm a été utilisé pour l'excitation de la DsRed et la mCherry à 546 et 587 nm respectivement. L'intensité du laser est réglée en fonction des lignées observées. L'émission de la fluorescence par la DsRed est récupérée 586 nm, tandis que celle de la mCherry est détectée à 610 nm. La détection du signal

Tableau 2.9. Outils de prédiction de la localisation de la protéine HRS1

Prédicteur	Localisation
SUAcon	noyau
ngLOC	noyau
AdaBoost	noyau
ATP	
BaCello	noyau
ChloroP 1.1	
EpiLoc	
PSORT	noyau
Ipsort	
MitoPred	
MitoProt	
MitoLoc2	noyau
Nucleo	noyau
PCLR 0.9	
Plant-mPloc	noyau
Pprowler 1.2	mitochondrie
Predotar v1.03	
PredSL	extracellulaire, endoplasmique, réticulum, golgi
PTS1	
SLPFA	mitochondrie
SLP-Local	cytosol, noyau
SubLoc	noyau
TargetP 1.1	
WoLF PSORT	noyau
SLocX	
Predotar v1.03	
AtSubP	noyau
Yloc	noyau
PrediSi	
Protocompb	extracellulaire
LOCALIZER	noyau
Protein Prowler	noyau
PredictProtein	noyau
TargetLoc	autre, plastes

fluorescent a été réalisée à l'aide d'un détecteur PMT hybride. L'ouverture du pinhole est maintenue à 1 Airy. Les images ont été acquises à une résolution de 1024x1024.

12. Outils bioinformatiques

L'alignement des séquences de protéines ou d'ADN afin de vérifier les résultats de séquençage ou de comparer les séquences protéiques des facteurs de transcription a été réalisé à l'aide du logiciel Vector NTI (Invitrogen).

La représentation de la structure 3D du motif GARP et le marquage des résidus impliqués dans l'interaction avec l'ADN ont été faits grâce au logiciel 3D Molecule Viewer software (Invitrogen).

La construction de l'arbre phylogénétique des GARPs a été effectuée en utilisant l'algorithme mafft (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>, parameters: G-INS-1, BLOSUM62) et le logiciel FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Les motifs conservés ont été déterminés grâce à l'algorithme MEME suite (<http://meme-suite.org/doc/meme.html>). La prédiction du domaine coiled-coil a été effectuée à l'aide des algorithmes suivant : MARCOIL (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/marcoil>), prabi (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_lupas.html), COILS (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html), COILS/PCOILS (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/pcoils>), Paircoil2 (<http://cb.csail.mit.edu/insb.bib.cnrs.fr/cb/paircoil2/paircoil2.html>), et CCHMM (http://gpcr.biocomp.unibo.it/cgi/predictors/cc/pred_cchmm.cgi).

Le réseau d'interaction protéine-protéine a été construit en utilisant le logiciel Cytoscape.

La liste des outils utilisés pour la prédiction de la localisation cellulaire d'HRS1 est présentée dans le tableau 2.9.

Chapitre 3: Étude de l'interaction SPX/HRS1, un carrefour entre la voie de transduction du phosphate et celle du nitrate?

1. Introduction

Plusieurs FT de la famille GARP sont impliqués dans des voies de signalisations nutritionnelles (Safi et al., 2017). C'est le cas de *Psr1*, le premier membre de la famille identifié comme étant impliqué dans la nutrition en phosphate. Il a été isolé chez une souche de *Chlamydomonas reinhardtii* résistante à des très fortes concentrations de Pi radioactif (Shimogawara et al., 1999). *Psr1*, dont l'expression augmente drastiquement suite à une privation de Pi, semble être crucial pour l'acclimatation de l'algue à la carence en Pi (Wykoff et al., 1999). Son homologue chez *Arabidopsis*, *PHR1*, a été isolé grâce à une approche de criblage génétique. Le mutant *phr1* est affecté dans l'induction d'un marqueur de la PSR (*IPS1*) (Rubio et al., 2001). *PHR1* est un régulateur central dans la perception de Pi selon un mécanisme qui fait intervenir également une autre protéine nommée *SPX1* (Puga et al., 2014). Les *SPX* sont des petites protéines qui jouent un rôle important dans la tolérance des plantes à la carence en P (Duan et al., 2008). Les gènes codant les *SPX* sont au nombre de quatre chez *Arabidopsis* et six chez le riz. Ils sont tous fortement induits par la carence en Pi à l'exception de *AtSPX4* et *OsSPX4* (Duan et al., 2008; Secco et al., 2012a; Wang et al., 2009c). Chez la levure, la protéine *Pho87*, contenant un domaine *SPX*, est un senseur de Pi (Giots et al., 2003; Secco et al., 2012b). Le rôle de sensing de Pi chez *Arabidopsis* semble être assuré par le couple *SPX1/PHR1*. En effet, les deux protéines interagissent physiquement en présence de Pi. cette interaction empêche *PHR1* de se fixer sur le motif *P1BS* présent dans le promoteur de ses gènes cibles. Par contre en cas de privation de Pi, l'interaction de *SPX1* avec *PHR1* est perdue permettant ainsi à ce dernier d'activer les gènes de la réponse à la carence en Pi via le *CRE P1BS* (Puga et al., 2014; Qi et al., 2017). Le même mécanisme a été rapporté chez le riz où l'activité de *OsPHR2* (orthologue de *AtPHR1*) est régulée via l'interaction avec *OsSPX1* ou *OsSPX2* (Wang et al., 2014). Les mécanismes qui contrôlent l'activité de *OsPHR2* semblent être plus élaborés puisqu'elle n'est pas seulement régulée dans le noyau (par *OsSPX1* et *OsSPX2*) mais aussi dans le cytoplasme par une autre protéine *SPX*. En effet, *OsSPX4* séquestre *OsPHR2* dans le cytosol et empêche sa translocation vers le noyau (Lv et al., 2014). L'interaction Pi-dépendante entre les *GARP* et les *SPX* définit un mécanisme assez conservé de perception et de régulation de l'homéostasie de Pi.

En outre, les processus développés par les plantes pour faire face aux variations de la disponibilité des nutriments sont assez complexes. Cette complexité provient de la diversité des signaux externes, mais aussi du fait que ces signaux ne sont pas perçus séparément par la plante mais plutôt sous forme de nombreuses combinaisons de stimuli

(Kellermeier et al., 2014; Krouk et al., 2009; Ristova et al., 2016). Afin de réagir à cette myriade d'informations, les plantes ont développé des réseaux de régulation de gènes appropriés à chaque voie de signalisation. Il existe cependant, des FT qui fonctionnent dans différentes voies de signalisation permettant à la plante d'intégrer plusieurs signaux. C'est le cas de *PHR1* qui présente un point d'aiguillage important entre le Pi et d'autres nutriments comme le sulfate, le zinc et le fer (Briat et al., 2015). Des homologues à *PHR1* appartenant à la sous-famille *HRS1/HHO* sont aussi impliqués dans l'intégration des signaux P et N (Medici et al., 2015). En plus d'être très rapidement induits par le NO_3^- , *HHO2* et *HRS1* sont respectivement régulés aux niveaux transcriptionnel et post-traductionnel par le Pi (Medici et al., 2015; Nagarajan et al., 2016). *HHO2* est impliqué dans la réponse à la carence en Pi et contrôle à la fois la teneur des plantes en Pi et le développement racinaire (Nagarajan et al., 2016). *HRS1* et *HHO1* sont aussi impliqués dans le contrôle de la croissance racinaire et cette régulation dépend largement de la disponibilité en P et en N. En effet, ces deux FT répriment la croissance de la racine primaire en réponse à la privation de Pi (Liu et al., 2009; Medici et al., 2015). De manière intéressante, le phénotype marquant du double mutant *hrs1;hho1* n'est détecté qu'en carence exclusive en Pi. Une carence combinée en Pi et en NO_3^- abolit complètement le phénotype de *hrs1;hho1* (Medici et al., 2015). Toutes ces données mettent en valeur le rôle potentiel des GARP dans l'intégration des signaux P et N.

Contrairement à *PHR1* qui est exprimé dans des conditions suffisantes en Pi (Rubio et al., 2001), *HRS1* est induit à la fois par la fourniture du nitrate (Canales et al., 2014; Krouk et al., 2010b; Medici et al., 2015) et vraisemblablement par la carence en Pi (Liu et al., 2009). Par ailleurs, en plus d'être des proches homologues, *HRS1* et *PHR1* partagent le même domaine qui permet à *PHR1* d'interagir avec *SPX1* (Figure 1.9).

Prises dans leur ensemble, toutes ces observations suggèrent que *HRS1* pourrait interagir avec les protéines *SPX* pour former un complexe impliqué dans la perception du NO_3^- , du Pi ou de la combinaison des deux. Ce sont ces hypothèses que j'ai testé dans cette partie de ma thèse dont les résultats sont présentés ci-dessous.

2. Résultats et discussion

Afin d'évaluer s'il existe un mécanisme selon lequel *SPX1* pourrait moduler l'activité de *HRS1*, j'ai cloné leurs CDS respectivement dans les vecteurs pDEST17 et pDEST15. Les protéines recombinantes purifiées, *SPX1-MBP* et *HRS1-GST*, ont été alors utilisées dans les expériences d'EMSA à la manière de Puga et al (Puga et al., 2014). Le but était de déterminer l'influence de *SPX1* sur la capacité d'*HRS1* à reconnaître ses éléments *cis* cibles. En effet, récemment deux motifs significativement sur-représentés dans les promoteurs des

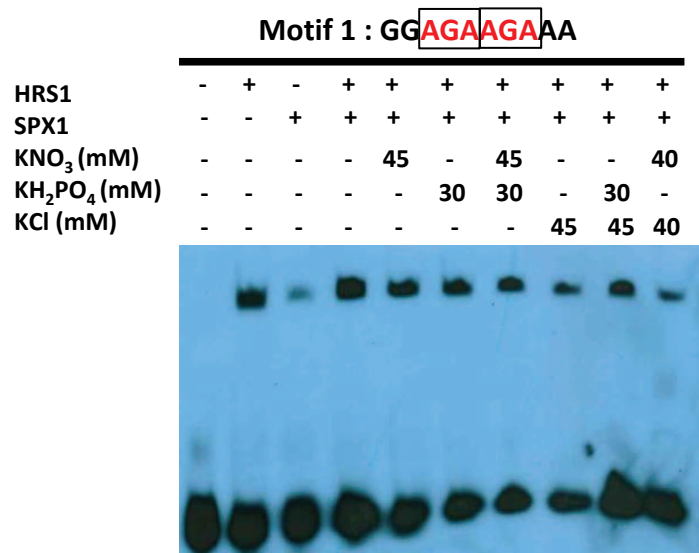


Figure 3.1. Effet de SPX1 sur la fixation d'HRS1 au motif 1 en présence de KNO₃, KH₂PO₄, ou KCl.

EMSA sur un gel natif de polyacrylamide (4%) en utilisant 40 pb (4X motif 1) d'ADN biotinylé (20 fmol), en présence de 150 ng de chaque protéine. La révélation a été faite grâce à la streptavidine couplée à l'HRP, par autoradiographie (5 min).

cibles directes induites par HRS1 ont été définis (Medici et al., 2015). Ces deux motifs nommés motif 1 (GGAGAAGAAA) et motif 5 (AAACCAAACCGA) ont été utilisés pour tester l'interaction putative du couple SPX1/HRS1. Sachant que l'interaction SPX1/PHR1 est Pi-dépendante (Puga et al., 2014) et que l'expression et l'activité d'HRS1 dépendent fortement du NO_3^- (Canales et al., 2014), des combinaisons différentes de KH_2PO_4 et de KNO_3 ont été ajoutées au mélange réactionnel. Le KCl a été utilisé comme contrôle.

Les résultats présentés (Figures 3.1 et 3.2) ont permis de montrer que HRS1 retarde le Motif 1 (Figures 3.1 et 3.2A) ainsi que le Motif 5 (Figure 3.2B) ce qui valide les données publiées par (Medici et al., 2015).

En absence de nitrate et de phosphate, la présence simultanée de SPX1 et HRS1 semble n'avoir aucun effet négatif ni positif sur le binding de ce dernier au motif 1. Par contre, l'ajout de KNO_3 , de KH_2PO_4 ou d'une combinaison des deux, réduit légèrement le signal correspondant au complexe HRS1-motif 1. Cependant, l'altération de l'activité d'HRS1 par SPX1 ne semble pas être spécifiquement liée à la présence du KNO_3 et/ou du KH_2PO_4 puisque l'effet du KCl est plus déstabilisant que celui du KNO_3 et du KH_2PO_4 (Figure 3.1).

L'inhibition de la fixation d'HRS1 par 3 sels différents et même en présence de toutes les combinaisons pourrait être juste associée au cation K^+ , le seul élément commun entre les 3 sels. Pour cela, une nouvelle expérience a été réalisée en substituant le KNO_3 , le KH_2PO_4 et le KCl par du NaNO_3 , le NaH_2PO_4 et le NaCl respectivement (Figure 3.2A). Les deux protéines HRS1 et SPX1 ont été déposées à chaque fois en présence d'un seul sel ou de combinaisons de plusieurs. Aucun effet, cependant, n'a été observé comme dans les expériences précédentes (Figure 3.2A).

La même expérience a été effectuée mais cette fois-ci en utilisant le motif 5 (AAACCAAACCGA) comme cible d'HRS1. Le même retard a été observé à chaque fois quelques soient les ions ajoutés au milieu réactionnel (Figure 3.2B).

De manière troublante, bien que SPX1 ne soit pas un facteur de transcription au sens strict du terme, un retard est observé pour le motif 1 (GGAGAAGAAA). Le niveau très bas du signal observé peut être expliqué par une fixation aspécifique de SPX1 ou par la présence de traces d'autres protéines dans l'extrait de protéine recombinante, lors de la purification de SPX1.

Pris dans leur ensemble, ces résultats montrent que SPX1 n'influence pas l'activité de fixation d'HRS1 ni en présence de NaNO_3 , ni en présence de NaH_2PO_4 . D'autres investigations doivent être effectuées pour pouvoir trancher sur l'interaction SPX1-HRS1 en présence KNO_3 et du KH_2PO_4 . L'ajout de ces produits en absence de SPX1, pourrait constituer une bonne piste pour dévoiler si la faible inhibition du binding d'HRS1 (Figure 3.1)

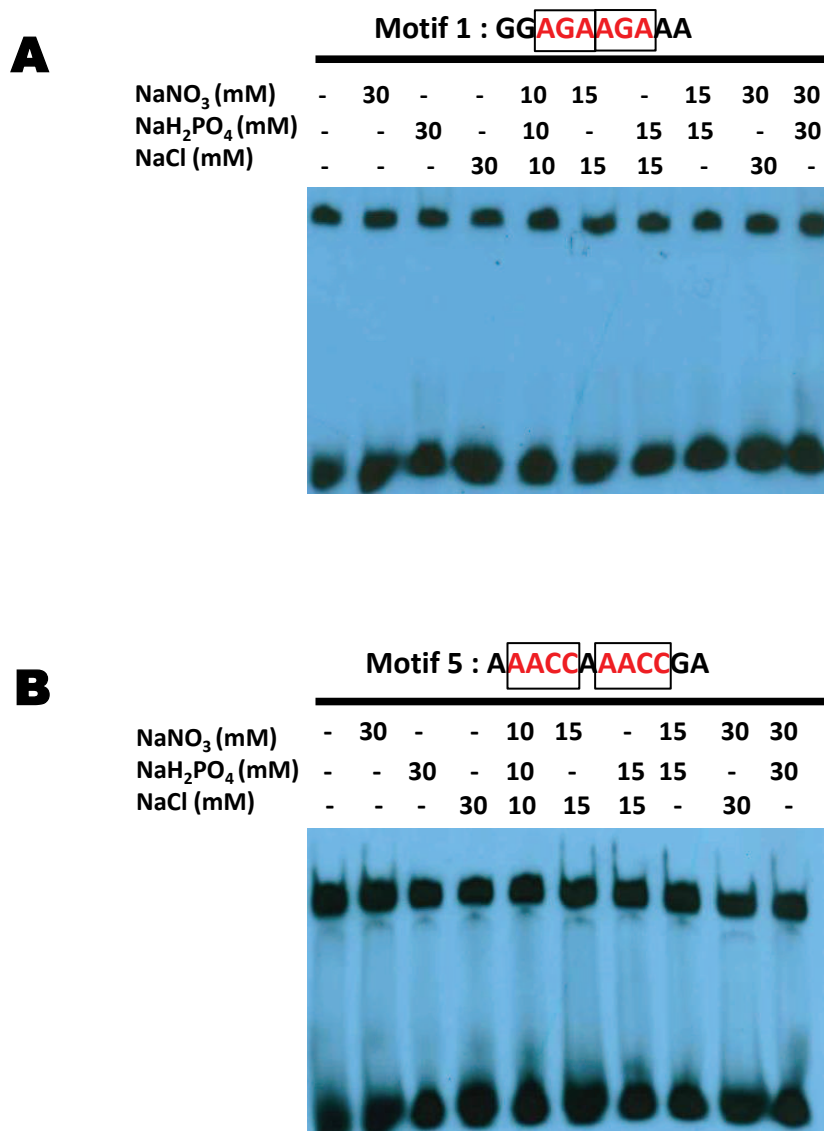


Figure 3.2. Tests de l'interaction HRS1/SPX1.

EMSA sur un gel natif de polyacrylamide (4%) en utilisant 40-48 pb (4X motif) d'ADN biotinylé (20 fmol), en présence de 150 ng chaque protéine. La révélation a été faite grâce à la streptavidine couplée à l'HRP, par autoradiographie (5 min).

A) Effet de SPX1 sur la fixation d'HRS1 au motif 1 en présence de NaNO₃, NaH₂PO₄, ou NaCl.

B) Effet de SPX1 sur la fixation d'HRS1 au motif 5 en présence de NaNO₃, NaH₂PO₄, ou NaCl.

(HRS1 et SPX1 sont présents dans tout les puits).

résulte d'un mécanisme faisant intervenir plusieurs acteurs y compris SPX1 ou ce n'est qu'un simple effet des sels (peut-être K^+) sur l'interaction protéine/ADN.

3. Conclusion et perspectives

Bien que j'aie utilisé les deux motifs cibles d'HRS1 et testé plusieurs conditions ioniques, je n'ai pas réussi à révéler un mécanisme d'interaction HRS1-SPX1. Les autres parties de la thèse (Chapitre 4 en particulier) ayant donné des résultats plus tôt, nous avons pris la décision de se focaliser sur d'autres questions plus prometteuses à ce moment de la thèse. Cependant, l'interaction des HHOs avec les SPX semble toujours être une hypothèse intéressante malgré les résultats négatifs présentés ci-avant.

En effet, l'utilisation des protéines recombinantes SPX1-MBP et HRS1-GST dont les conformations tridimensionnelles ont été au moins légèrement modifiées par les étiquettes protéiques, pourrait influencer l'interaction native de ces protéines. Le clivage des protéines chimères par une protéase spécifique lors de la purification constitue une alternative intéressante. La thrombine par exemple, qui coupe au niveau de la partie N-terminale de la GST, permettrait de libérer HRS1 et de tester cette hypothèse.

Ces expériences réalisées *in vitro*, ne sont pas suffisantes pour pouvoir rejeter de manière incontestable toute interaction possible entre ces deux protéines. Des tests *in vitro* utilisant d'autres techniques comme le FITC, ou des techniques *in vivo* ou *in planta* pourraient nous donner des réponses plus claires.

Même si ça n'affectera pas le binding de HRS1 *in vitro*, l'interaction avec les SPX pourrait avoir lieu au niveau du cytosol (comme OsSPX4 et OsPHR2 (Lv et al., 2014)), des expériences d'interaction protéine-protéine (co-immunoprécipitation par exemple) sont des solutions intéressantes pour répondre à cette question.

Outre les motifs 1 et 5 qui se présentent majoritairement dans les gènes induits par HRS1, un nouveau motif (GATGTTTCTAGA) sur-représenté dans les promoteurs des gènes réprimés a été identifié. Ce motif est impliqué dans la régulation des gènes de la réponse à la carence en N (voir chapitre 4). De manière intéressante, contrairement aux autres CRE reconnus par HRS1 (Medici et al., 2015), ce dernier est le seul identifié par DAP-seq (O'Malley et al., 2016). Par ailleurs, la répression transcriptionnelle a été identifiée comme étant l'activité dominante d'HRS1 qui possède une séquence similaire au domaine répressif du motif EAR (EAR-motif repression domain). En effet, la fusion d'HRS1 au domaine de binding de GAL4 (35S:GAL4DB-HRS1) permet d'inhiber l'activité luciférase dont l'expression est sous le contrôle du promoteur GAL4 (35S:5xGAL4DB-HRS1) (Mito et al., 2011).

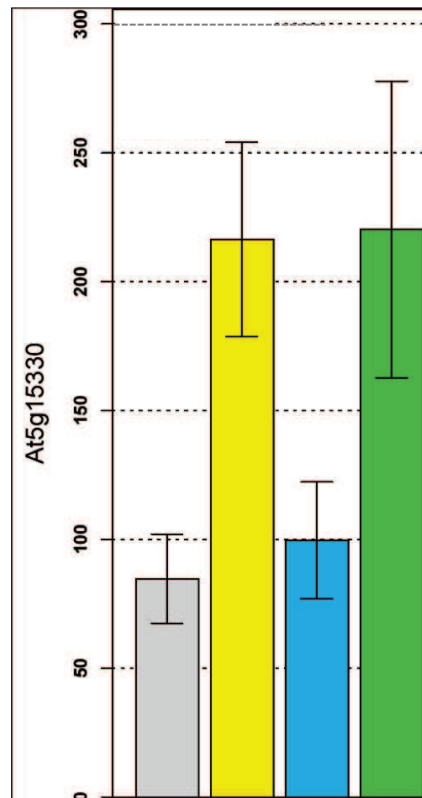


Figure 3.3. Induction de *SPX4* spécifiquement par le nitrate.

Niveaux relatifs d'accumulation des transcrits de *SPX4*. Les plantes ont été cultivées pendant 14 jours en hydroponie stérile en présence de 0,5 mM succinate d'ammonium, transférées sur –N pendant 24h puis transférées sur 1 mM KCl (gris), 1 mM KNO₃ (jaune), 1 mM NH₄Cl (bleu) ou 0,5 mM NH₄NO₃ (vert). (Données de Ristova et al., 2016).

D'ailleurs, une activité d'auto-répression a été attribuée à son orthologue OsNIGT1 chez le riz (Sawaki et al., 2013). Toutes ces données montrent qu'une grande part de l'activité d'HRS1 serait basée sur la répression de l'expression des gènes possédant ce nouveau motif. Ces informations nous incitent donc à évaluer la capacité de SPX1 à réguler le binding d'HRS1 à cet élément *cis* régulateur (GATGTTTCTAGA).

Cette régulation pourrait également faire intervenir plusieurs protéines SPX comme c'est le cas de OsPHR2 chez le riz régulé à la fois par OsSPX1, OsSPX2 et OsSPX4 (Lv et al., 2014; Wang et al., 2014).

Ainsi, AtSPX4 est un bon candidat vu qu'il est, comme HRS1, induit par le nitrate (Figure 3.3). De plus, SPX4 interagit physiquement avec HHO2 (Safi et al., 2017). D'autre part, HHO2 ainsi que HHO3 partagent avec leur homologue HRS1 le même élément *cis* régulateur (GATGTTTCTAGA) (O'Malley et al., 2016; Safi, submitted). L'ensemble de ces données suggère une régulation de la NSR *via* des interactions entre SPX4 et HRS1 d'une part et SPX4 et HHO2 d'autre part (Safi et al., 2017).

Finalement, une interaction entre SPX3 (dont la localisation peut être chloroplastique (Duan et al., 2008)) et HRS1 pourrait éventuellement contrôler le double adressage (noyau/plastes) de ce dernier (voir chapitre 5).

Chapitre 4: Rôle des facteurs de transcription de la famille HHO et des ROS dans la réponse des plantes à la carence en azote

1. Introduction et contexte

Les études réalisées sur la sous-famille HRS1/HHO ont montré que ces protéines jouent un rôle capital dans la régulation de plusieurs processus physiologiques : plasticité de la croissance racinaire (Liu et al., 2009; Medici et al., 2015; Nagarajan et al., 2016), tolérance au stress salin (Mito et al., 2011), maintien de l'homéostasie nutritionnel (Nagarajan et al., 2016)) et durant différents stades de développement de la plante allant de la germination (Czechowski, 2005; Wu et al., 2012) jusqu'à la floraison (Ke, 2016; Moreau et al., 2016; Yan et al., 2014a). Pour revue voir (Safi et al., 2017) (Chapitre 1).

Un des axes de recherche majeurs menés dans l'équipe est l'étude de la perception des nutriments azotés par les plantes et plus particulièrement les voies de transduction liées au signal NO_3^- . Afin d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la signalisation du NO_3^- , notre équipe a réalisé des études transcriptomiques pour déterminer des reprogrammations géniques induites par le NO_3^- . Ces analyses ont révélé que *HRS1*, *HHO1*, *HHO2* et *HHO3* sont très fortement induits de manière précoce en réponse à la fourniture du NO_3^- (Krouk et al., 2010b). D'autres travaux indépendants ont aussi trouvé que *HRS1* est parmi les gènes les plus fortement induits par le NO_3^- (Canales et al., 2014; Wang et al., 2004). Ces observations qui ont défini *HRS1* comme marqueur de réponse au NO_3^- constituent des arguments prometteurs pour placer HRS1 dans la liste des acteurs moléculaires contrôlant des aspects de la perception du nitrate et sa relation au développement.

Pour tester cette hypothèse, une expérience de TARGET (Bargmann et al., 2013) a été réalisée afin d'identifier les listes de gènes régulés par HRS1. Les données issues de cette approche ont indiqué que HRS1 est capable de réguler directement des gènes liés aux ROS (Medici et al., 2015). De plus, *NRT2.4* pourrait être une cible directe réprimée par HRS1 (Medici et al., 2015). En outre, l'expression de ce gène et celle d'un autre transporteur de nitrate (*NRT1.1*) sont différenciellement régulées chez le double mutant *hrs1;hho1* et chez deux lignées surexprimant respectivement *HRS1* et *HHO1* (Medici et al., 2015).

Étant donné que *NRT1.1* peut se comporter comme un transporteur de nitrate à haute affinité (Liu and Tsay, 2003) et que *NRT2.4* fonctionne exclusivement à faible concentration de NO_3^- , et qu'il est considéré comme un marqueur de la réponse à la carence en N (Kiba et al., 2012), cela suggère que HRS1 (voire ses homologues) pourraient être impliqués dans la régulation de la NSR en contrôlant les transporteurs de NO_3^- à haute affinité. C'est en partie ce que j'ai testé dans ce chapitre de ma thèse.

Par ailleurs, les carences nutritionnelles sont connues pour induire une production de ROS (Shin et al., 2005; Shin and Schachtman, 2004) et leur accumulation régule les systèmes de transport membranaires de K^+ et de Ca^{2+} au niveau des racines (Demidchik et al., 2010;

Demidchik et al., 2003). Ceci suggère que les ROS pourraient être nécessaires pour l'établissement de la réponse à la carence en nutriments. En associant ces données avec celles du TARGET (Medici et al., 2015), on peut supposer que HRS1 pourrait réguler la réponse à la carence en azote en altérant la production et/ou l'accumulation des ROS.

Ce chapitre présente le manuscrit d'un article qui a été soumis à *Nature Communications*, puis à *The Plant Cell* puis déposé à BioRxiv. L'article a été envoyé en revue dans les 2 journaux. *Nature Communications* nous a encouragé à soumettre une révision. Des résultats complémentaires à cet article sont en cours d'obtention pour re-soumission.

2. Résultats et discussion

Article

HRS1/HHOs GARP transcription factors and reactive oxygen species are regulators of Arabidopsis nitrogen starvation response.

HRS1/HHOs GARP transcription factors and reactive oxygen species are regulators of Arabidopsis nitrogen starvation response.

Authors: Alaeddine Safi¹, Anna Medici¹, Wojciech Szponarski¹, Amy Marshall-Colon^{2,3}, Sandrine Ruffel¹, Frédéric Gaymard¹, Gloria Coruzzi², Benoît Lacombe¹, Gabriel Krouk^{*1}.

Affiliation:

- 1 Laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, UMR5004 CNRS/INRA/SupAgro/UM, Institut de Biologie Intégrative des Plantes 'Claude Grignon', Place Pierre Viala, 34060 Montpellier, France.
- 2 New York University, Department of Biology, Center for Genomics & Systems Biology, 12 Waverly Place, New York, N.Y. 10003, USA.
- 3 Present Address:
Department of Plant Biology, University of Illinois at Urbana–Champaign, Urbana, IL, USA

* Correspondence should be addressed to
Gabriel Krouk
gkrouk@gmail.com

Abstract

Plants need to cope with strong variations in the nitrogen content of the soil solution. Although many molecular actors are being discovered concerning how plants perceive NO_3^- provision, it is less clear how plants recognize a lack of Nitrogen. Indeed, following N removal plants activate their Nitrogen Starvation Response (NSR) being characterized in particular by the activation of very high affinity nitrate transport systems (NRT2.4, NRT2.5) and other sentinel genes such as GDH3. Here we show using a combination of functional genomics (via *TF perturbation*) and molecular physiology studies, that the GARP Transcription Factors (TFs) belonging the HHO sub-family are important regulators of the NSR through two potential mechanisms. First, HHOs directly repress *NRT2.4* and *NRT2.5* high-affinity nitrate transporters. Genotypes affected in HHO genes (mutants and overexpressors) display modified high-affinity nitrate transport activities opening interesting perspectives in biotechnology applications. Second, we show that Reactive Oxygen Species (ROS) are important to control NSR in wild type plants and that HRS1 and HHO1 overexpressors are affected in their ROS content, defining a potential feed-forward branch of the signaling pathway. Taken together our results define two new classes of molecular actors in the control of NSR including ROS and the first transcription factors to date. This work (i) opens perspectives on a poorly understood nutrient related signaling pathway, and (ii) defines targets for molecular breeding of plants with enhanced NO_3^- uptake.

Introduction

The fertilization of crops with nitrogen (N) is a key requirement for global food production systems, sustaining the world's population and ensuring food security. As N is *the* key rate-limiting nutrient in plant growth, understanding the factors that limit N-use efficiency (NUE) will have particular relevance (Han et al., 2015). Inefficient NUE by agricultural systems is also responsible for nitrate run-off into water soil and atmosphere. Increased leaching of N into drainage water and the release of atmospheric nitrous oxide and reactive N greenhouse gases, pollutes the troposphere, contributes to global warming, and accelerates the eutrophication of rivers and acidifies soils (Sutton et al., 2011). Thus, understanding the regulation of N transport by plants is likely to contribute to tackle these problems.

As sessile organisms, plants need to adapt to fluctuating nitrogen (N) conditions (Crawford and Glass, 1998; O'Brien et al., 2016). N related adaptations include modification of germination (Alboresi et al., 2005), root and shoot development (Forde and Walch-Liu, 2009; Gruber et al., 2013; Krouk et al., 2010a; O'Brien et al., 2016; Rahayu et al., 2005), flowering time (Castro Marin et al., 2010), transcriptome and metabolome (Krouk et al., 2010a; O'Brien et al., 2016; Scheible et al., 1997; Stitt, 1999; Wang et al., 2004).

Interestingly, one can distinguish between different N-related signaling pathways being activated in response to different N-variation scenarios and being reported by different sets of sentinel genes.

These signaling pathways include the Primary Nitrate Response (PNR) (Hu et al., 2009; Medici and Krouk, 2014) that can be seen when NO_3^- -depleted or N-depleted plants are treated with NO_3^- . PNR sentinel genes are very quickly (within minutes) (Krouk et al., 2010b) regulated by NO_3^- and include nitrate reductase gene 1 (*NIA1*), nitrite reductase gene 1 (*NIR1*), glucose 6 phosphate dehydrogenase (*G6PDH*), and several others such as the GARP transcription factors *HRS1* (hypersensitive to low Pi-elicited primary root shortening 1 (Liu et al., 2009)) and *HHO1* (*HRS1* homologue 1 (Liu et al., 2009)) (Canales et al., 2014; Medici and Krouk, 2014). PNR is probably the most studied and understood N-related signaling pathway for which several molecular actors have been identified so far. These include the NO_3^- transceptor *CHL1/NRT1.1/NPF6.3* (Ho et al., 2009), kinases and phosphatase (*CIPK8*, *CIPK23*, *ABI2*, *CPK10,30,32*) (Ho et al., 2009; Hu et al., 2009; Leran et al., 2015; Liu et al., 2017), and several transcription factors (*NLP6/7*, *TGA1*, *NRG2*, *BT2*, *TCP20*, *SPL9*) (Alvarez et al., 2014; Araus et al., 2016; Castaings et al., 2009; Guan et al., 2017; Krouk et al., 2010b; Marchive et al., 2013; Wang et al., 2009; Xu et al., 2016). Recently a NO_3^- -triggered Ca_2^+ signal have been shown to be a crucial relay between the *NRT1.1* transceptor and the nuclear events controlling PNR (Krouk, 2017; Liu et al., 2017; Riveras et al., 2015).

Long-distance N-related root-shoot-root signals have also been shown to adapt plant development and metabolism to the whole nitrogen status of the plant (Gansel et al., 2001; Li et al., 2014; Ruffel et al., 2011; Ruffel et al., 2015). These long-distance signals can be divided into N-demand signals and N-supply signals, which can be genetically uncoupled (Li et al., 2014; Ruffel et al., 2011; Ruffel et al., 2015). Cytokinin and CEP peptides biosynthesis have been shown to be important to generate the N-demand root-to-shoot-to-root relay necessary to regulate genes and modify root development in conditions where N-supply is heterogeneous (Ohkubo et al., 2017; Ruffel et al., 2011; Ruffel et al., 2015; Tabata et al., 2014).

Finally, another signaling pathway includes N-Starvation Response (NSR). It can be related to the molecular events triggered by a prolonged N-deprivation (Kiba and Krapp, 2016; Krapp et al., 2011; Menz et al., 2016). Sentinel genes of NSR include high affinity ($K_m \sim 10 \mu M$) NO_3^- transporters *NRT2.4* and *NRT2.5* (activated to retrieve traces of NO_3^- in the soil), as well as the glutamate dehydrogenase 3 gene (*GDH3*; hypothesized to be activated to recycle N) (Kiba et al., 2012; Kotur and Glass, 2015; Lezhneva et al., 2014; Marchi et al., 2013). To date, the calcineurin B-like7 displayed an effect on *NRT2.4* and *NRT2.5* gene expression in the context of NSR (Ma et al., 2015). A role of miR169 was shown in the control of NFYA transcription factors in response to NSR with a substantial impact on *NRT2.1* and *NRT1.1* transcriptional regulation (Zhao et al., 2011). However, no proof of the actual role of the NFYA genes themselves on NSR was provided in this work (Zhao et al., 2011). LBD37,38,39 transcription factors over-expression have been shown to impact anthocyanin production on plants with N-deprived status (Rubin et al., 2009) with a potential regulation on nitrate transporters including *NRT2.5* (Rubin et al., 2009). However, no direct regulatory target of LBDs were provided in this previous study (Rubin et al., 2009).

These different N-related signaling pathways are likely to be tightly intertwined but no molecular actors are known to be to play such a role. Here, we show that one of the most strongly and rapidly NO_3^- regulated transcription factor (HRS1) (Canales et al., 2014; Krouk et al., 2010b) and its close homologous GARP TFs (HHOs) (Safi et al., 2017), are involved in NSR regulation. This has very important consequences on high-affinity NO_3^- transport activity, as well on plant growth. We also demonstrate that NSR is abolished by ROS scavenging molecules in wild-type plants (WT) and interferes in HHO-manipulated genotypes, thus defining a two-branched signaling pathway.

Results

During our recent investigations (Medici et al., 2015) on HRS1 direct targets and their role in the control of root development in response to combination of N and P signals, we remarked a that *NRT2.4* transcript accumulation was repressed upon controlled nuclear entrance (Bargmann et al., 2013; Medici et al., 2015) of the GR:HRS1 fusion protein (see Sup Fig. 1a; (Medici et al., 2015)). We also noticed that *NRT2.4* was over-expressed in the double *hrs1;hho1* mutant (data shown in Sup Fig. 1b). These preliminary results suggested that HRS1 could be a direct regulator of the *NRT2.4* gene.

Moreover, as *NRT2.4* was shown to be a very good marker of the N-starvation response (Kiba et al., 2012), and no regulator was shown to participate in this signaling pathway at the outset of this study, we decided to investigate the role of HRS1 and its close homologous in the NSR response. Since the experiments in Medici et al. (2015) (Sup Fig. 1b) were performed on plants grown in very particular conditions (minus-Phosphate, plus-N), we investigated the behavior of the *hrs1;hho1* mutants and HRS1, HHO1 over-expressors (Sup Fig. 2a) in the specific context of the NSR (transfer of plants from N containing media to N-free media). To consolidate our investigations, we also studied two other genes that are sentinels of the NSR, namely *NRT2.5* (another very high affinity NO_3^- transporter) (Lezhneva et al., 2014), and *GDH3* (Marchi et al., 2013).

HHOs repress NSR sentinel genes

In the growth context of NSR treatments, as expected (Kiba et al., 2012), we showed that in WT plants NSR is manifested by the strong activation of *NRT2.4*, *NRT2.5*, and *GDH3* genes within the first days of starvation (Fig. 1a). These studies revealed that NSR was diminished in 35S:HRS1 plants. In this experiment, these genes are also affected in the *hrs1;hho1* double mutants. Indeed, in the *hrs1;hho1* genotype, NSR sentinel genes peak earlier and are also repressed at earlier time-points compared to WT (Fig. 1a). Since HRS1 and HHO1 are homologous genes, and because the double mutant has a NSR phenotype, we set up an experiment to compare HRS1 and HHO1 over-expressers side-by-side. This result (Fig. 1b) showed that 35S:HRS1 and 35S:HHO1 display similar molecular phenotypes with a reduction of the NSR response. Taken together, these results suggest that HRS1 and HHO1 are repressors of NSR, likely through the direct regulation of *NRT2.4* and *NRT2.5* loci.

One interesting aspect of the *hrs1;hho1* double mutant, which we observed across the different experiments, was a very erratic response to NSR with the most representative response shown in Figure 1a. In order to explain this phenomenon and to stabilize the phenotype we recalled that HRS1, HHO1 and its paralogs HHO2 and HHO3 (Fig. 2a) are all transcriptionally regulated by PNR (upon plant transfer from a N-depleted media to a NO_3^- containing media) (Krouk et al., 2010b; Wang et al., 2004). To understand the interactions of the HHO paralogs in regulating the NSR, we generated plants with an increasing number of deletions in this gene sub-family (Fig. 2a). We generated the triple *hrs1;hho1;hho2* and quadruple *hrs1;hho1;hho2;hho3* mutants by crossing (characterization in Sup Fig. 2b) and compared them with WT, single and double mutants. The rationale was that; if these HRS/HHO transcription factors (TFs) are indeed repressors of the NSR, they could strongly be regulated by nitrate (in the context of the PNR) in order to quickly stop the NSR response when NO_3^- or Nitrogen is available. We thus tested this hypothesis by subjecting the plants (WT, single, double, triple and quadruple HRS/HHO mutants) to a nitrogen starvation treatment first, then treated them with NO_3^- , and then followed the speed of NSR sentinel gene repression (Fig. 2b). In this context, we showed that in WT, consistent to what was observed by Okamoto et al. (2003) (Okamoto et al., 2003), NSR sentinels peaks within minutes and are strongly repressed within 2 to 4 hours following NO_3^- provision (Fig. 2b). As predicted, the sequential deletion of the HHO paralogs triggers a de-repression of NSR genes. It is noteworthy that the de-repression of the NSR sentinel genes follows the sequential deletion of HHOs (quite manifest at the 2 and 3 hour time-points) (Fig. 2c). The HRS/HHO quadruple mutant displayed the strongest phenotype and seems to be unable to completely repress the locus even after several hours of NO_3^- provision (Fig. 2b, 2c).

To validate that it is indeed a combination of HRS/HHO deletion that de-repressed the NSR sentinels (as opposed, for example, to the simple effect of *hho3* mutation), we performed a complementation experiment of the quadruple *hrs/hho* mutant with pHRS1:HRS1:GFP. We showed (Fig. 2c) that two independent lines are able to fully restore the WT phenotype regarding the NSR sentinel gene expression. This demonstrates that it is indeed a combination of HRS/HHO deletions that is needed to observe the de-repression of NSR genes (Fig. 2b, 2c, 2d).

These results show that HHOs have a redundant function and that they collectively are involved into repressing NSR sentinels when NO_3^- is provided (Fig. 2).

HHOs control NO₃⁻ HATS

Among the three NSR sentinel genes, NRT2.4 and NRT2.5 were shown to be involved in a very high-affinity nitrate transport system (Kiba et al., 2012; Lezhneva et al., 2014). Since we observed interesting molecular phenotypes in the context of N-starvation for the 35S:HRS1 and *hrs1;hho1* mutants (Fig. 1), we tested their high-affinity transport system (HATS) activity following prolonged NO₃⁻ starvation (Fig. 3a). We performed ¹⁵NO₃⁻ labeling experiments, and indeed found that 35S:HRS1 plants are affected in NO₃⁻ HATS (10 μM) activity. We repeated the experiment to measure the range of affinities at which the HRS1 overexpression had an effect. We observed (Fig. 3b) that the whole high-affinity range was decreased in the 35S:HRS1 plants (with a 2-fold decrease for the very high nitrate affinity conditions, concomitant with a decrease in NRT2.4, NRT2.5, NRT2.1 mRNA accumulation), while low affinity nitrate transport activity remained unchanged in the 35S:HRS1 background (Fig. 3b). The double mutant *hrs1;hho1* displayed little phenotype in this context, as compared to the WT.

Since we showed that the *hrs1/hho* mutants were unable to totally repress the *NRT2.4*, *NRT2.5* loci (Fig. 2b), we also wanted to study functional phenotypes in the HHOs mutants. Thus, we performed ¹⁵NO₃⁻ labeling experiment on N-containing media (Fig. 4a). Consistent with our previous findings (Fig. 2a), the sequential deletion of HHOs increases the HATS NO₃⁻ transport activity with a maximum effect recorded for the *hrs;hho,hho2,hho3* quadruple mutant that displays a 2.5 fold increase of HATS activity (Fig. 4a). Very interestingly, the nitrate transport activity increase is accompanied with a strong stimulation of the quadruple mutant growth in these conditions (Fig. 4b). Although this phenotype is less pronounced than in the quadruple mutant, the double mutant *hrs1;hho1* still displays bigger shoots as compared to the wild type (Sup Fig. 3). The mutant phenotypes were lost in plants grown on -N conditions (data not shown). This can be easily explained. Indeed, even if *NRT2.4* and *NRT2.5* are de-repressed in the mutants in both conditions, only the mutants grown on +N can take up more nitrate than WT. Furthermore, HHOs expression is known to be very low in -N conditions (Krouk et al., 2010b; Menz et al., 2016), so mutations of genes, being weakly expressed in -N, are expected to have low or no effect. These are two possible explanations of why we see mutant phenotypes only on +N conditions.

In conclusion, the modification of HHOs expression has functional consequences on NO₃⁻ HATS activities consistent with their role on the transcriptional control on HATS transporters NRT2.4, NRT2.5.

HRS1 direct targets point to a role of Reactive Oxygen Species

To broaden our investigations around this phenomenon, we studied HRS1 direct genome-wide targets in an N-varying context. To this end, we performed HRS1-perturbations using a *TARGET* analysis (Transient Assay Reporting Genome-wide Effect of Transcription factors (Bargmann et al., 2013; Medici et al., 2015; Para et al., 2014)), including 3 biological repeats, by using root protoplasts not treated with NO₃⁻ during the *TARGET* procedure. We compared these new results with previously reported *TARGET* results for *HRS1*, in which we maintained NO₃⁻ in the media (Medici et al., 2015). Both studies were performed in parallel in the exact same conditions and in the same lab. Cycloheximide (CHX) was maintained in the

media during the procedure to retrieve only potential direct targets of HRS1. This provided several important insights concerning HRS1 TF activity.

First, we retrieved 1050 potential HRS1 direct targets (non-redundant AGI) (see Material and Method for statistics, and Sup File 1 for the gene list). This list of HRS1 direct targets was subjected to GeneCloud (Krouk et al., 2015) analysis that performs semantic term enrichment analysis on gene lists (Fig. 5a). This revealed that HRS1 controls a highly coherent group of genes, function-wise. Very strikingly, the terms related to redox function (oxidation, peroxide, reductase, oxygen) was highly overrepresented in this list of genes controlled by HRS1 (Fig. 5a, Sup File 1).

A clustering analysis revealed 12 different modes of gene control by HRS1 in combination with NO_3^- (Fig. 5b, cluster lists are provided in Sup File 1). Interestingly, the expressions of the vast majority (86%) of the HRS1 direct genome-wide targets are dependent on the NO_3^- context (Fig. 5b). This can be explained by N related transcriptional, post-transcriptional, post-translational modifications that could affect HRS1 itself or its TF partners.

Among the 12 clusters of HRS1 target genes, the two NO_3^- -insensitive ones are Clusters #5 and #8. Cluster #8 contains genes whose functions were reminiscent to the germination control of HRS1 demonstrated in previous work (Wu et al., 2012) (Fig. 5b). Cluster #5 contains genes with diverse function including a Chaperone DnaJ-domain protein and a Glutaredoxin. It is noteworthy that most of the HRS1 regulated gene clusters contain genes related to the redox state of the cells (Figure 5b). However, the most enriched clusters in redox related genes are cluster #12 and #2. Cluster #2 contains many genes annotated as heat shock protein and heat shock factors. For this cluster, HRS1 plays a role of repressor only when NO_3^- is provided to the protoplasts. On the other hand, cluster #12 contains genes that are repressed by HRS1 only when NO_3^- is not present during the TARGET procedure (Fig. 5b). This cluster contains many redox related genes such as a Catalase1 (CAT1), a Ferredoxin, a Thioredoxin, and a Cupredoxin.

In conclusion, this HRS1 TF perturbation analysis in the *TARGET* system prompted us to investigate below i) the role of ROS in the NSR, ii) the role of ROS in the HRS1 dependent control of NSR. It also illustrates that as TF can greatly modify its targets according to a nutritional context (Fig. 5).

ROS scavenging molecules are strong repressors of NSR

To investigate the role of ROS in NSR, we undertook a pharmacological approach. We showed that NSR is strongly repressed if plants are concomitantly treated with ROS scavenging molecules. In a first experiment, we used a co-treatment with potassium iodide (KI, 5 mM) (Tsukagoshi et al., 2010) and mannitol (5 mM) (Cuin and Shabala, 2007; Shen et al., 1997a; Shen et al., 1997b; Voegelé et al., 2005), shown to scavenge H_2O_2 and $\text{HO}^\bullet$ respectively. This KI-mannitol co-treatment totally abolished the induction of the NSR sentinel genes (Fig. 6a). In a second experiment, we investigated the respective role of KI and mannitol alone, or in combination and also used diphenyliodonium (DPI, NADPH oxidases inhibitor) (Orozco-Cardenas et al., 2001; Tsukagoshi et al., 2010) and DMSO as a mock control. This experiment confirmed that the inhibition of ROS production has a severe effect on NSR response. More precisely, for *NRT2.4* and *NRT2.5*, we recorded that KI and DPI strongly repressed the gene

response to N deprivation. For *NRT2.5* and *GDH3*, the mannitol alone seems to also have an effect as it dampens down transcriptional responses to N depletion. For *NRT2.5* and *GDH3*, we also found that DMSO may have an effect on its own. However, when DPI treatment was compared to its DMSO mock control, it was significantly affecting NSR for the three sentinel genes. These experiments demonstrate that ROS scavenging molecules are affecting plant NSR. And that ROS are an essential activating potential second messenger of NSR.

Since i) HRS1 regulates ROS related genes (Fig. 5); and because ii) ROS production seem to be important molecules for NSR and; and iii) HRS1 and HHOs are important regulators of NSR themselves (Fig. 1-2); we wanted to know if the NSR control of HRS1 could have some branch being ROS-dependent or, if it was a pure direct regulation. To do this we set up two types of experiments:

-First, we demonstrated that the regulation of *NRT2.4* and *NRT2.5* loci happens through the potential binding of HRS1 to the promoter of these genes (Fig. 7). To this end, we identified a new potential HRS1 DNA-binding element by running the MEME algorithm (Bailey et al., 2009) on the 500 bp upstream sequences of the most repressed HRS1 genes in the TARGET analysis (List from repressed direct targets in Medici et al. (2015) (Medici et al., 2015)). This new HRS1 cis-element uncovered contains the GANNNTCTNGA consensus that resembles the consensus motif of HHO2 and HHO3 revealed by DAP-seq in the work by O'Malley et al. (2016) (O'Malley et al., 2016) (Fig. 7a). We used EMSA and competition assays with cold probes to demonstrate that HRS1 had a specific affinity for this new motif, and that the conserved cytosine in the sequence is not critical for the DNA-protein recognition, while the distal guanines play a significant role (Fig. 7b-d). Interestingly, this HRS1 motif is found two times in each of the promoters of the 3 sentinel genes as well as in *NRT2.1* (Fig. 7e). We thus tested the binding of HRS1 to probes made from the promoter sequences framing the HRS1 binding sites, and validated that HRS1 is able to bind NSR sentinel genes in a promoter context (Fig. 7e-g). Our results are strengthened by DAP-seq data (O'Malley et al., 2016), showing that HHOs sub-family binding (Safi et al., 2017) is specially present in the promoter of the *NRT2.4*, *NRT2.5*, *GDH3* genes. Interestingly no specific binding is recorded for *KANADI2* or *bZIP16* being respectively: a G2-like as well but not in the same sub-family (Safi et al., 2017), or a bZIP (different TF family).

Taken together, DAP-seq (Sup Fig. 4), EMSA (Fig. 7), TARGET (Sup Fig. 1a), Over-expression (Fig. 1; Sup Fig. 1b), mutant phenotype (Fig. 1-4; Sup Fig. 1b), suggests that HRS1 and its homologous genes directly repress the NSR sentinel genes.

-Second, we wanted to test if the HHO-related phenotypes could also be explained by a default in a ROS production and/or accumulation. To this aim, by using Amplex[®] Red measurements (Chakraborty et al., 2016; Shin et al., 2005; Shin and Schachtman, 2004), we demonstrated that NSR early (within 6 hours) triggers ROS accumulation in root tissues of WT plants consistent with previous observations (Shin et al., 2005; Shin and Schachtman, 2004). We also found that this accumulation is lost in the 35S:HRS1 plants and reduced in the 35S:HHO1 genotype (Fig. 8a). Unexpectedly, the quadruple *hrs/hho* mutant did not display any ROS accumulation changes. This could be explained by the fact that HRS1 and HHO1 over-expressors may overproduce ROS scavenging proteins (as found for HRS1 in the TARGET results), when the 4 mutations in the *hrs/hho* quadruple mutant are not enough to de-repress them at the same level (due to functional redundancy) leading to a WT phenotype for ROS

accumulation in the mutant. This interesting observation will be important for future investigations to uncouple the ROS dependent and independent branches of NSR controlled by HRS1 and HHOs.

As we observed that ROS early accumulate in response to N starvation (Fig. 8a), we decided to treat the double and quadruple *hrs/hho* mutants with KI-mannitol in this context (Fig. 8b). We found that ROS scavenging treatment indeed represses NSR sentinel genes in the *hhos* mutants to the level of WT, totally abolishing the NSR and the mutant phenotype (Fig. 8b). These results show that ROS scavenging agents are able to overcome the *hhos* mutant phenotype.

In conclusion, we show that HHO genes directly control NSR sentinels (Fig. 7). We also report that upon NSR, ROS are produced and participate to NSR activation. To a certain extent, ROS accumulation can also explain phenotypes observed in HHO affected genotypes. Thus, we conclude that HRS1 and HHO1 are able to reduce ROS accumulation and potentially reduce NSR through a ROS-dependent and parallel branch of the signaling pathway (Fig. 8b and Fig. 9).

Discussion

To date the role of ROS as a potential messenger in NSR was hypothesized by several groups (Krapp et al., 2011; Shin et al., 2005) but, to our knowledge, never formally demonstrated. Previously, Shin et al. (2004) (Shin and Schachtman, 2004) demonstrated that upon +K starvation, ROS accumulation through the action of RHD2 (NADPH-oxidase) was important to sustain the full transcriptional activation of +K transporters. The same group (Shin et al., 2005) also demonstrated that –P, and –N treatments trigger the production of ROS. However, the direct role of ROS in the NSR was so far elusive. In the current work, we present evidence that, preventing the production of ROS during NSR strongly represses the response of the NSR sentinel genes (Fig. 6). Taken together, these above-mentioned research (Krapp et al., 2011; Shin et al., 2005; Shin and Schachtman, 2004) and others (Balzergue et al., 2017; Hoehenwarter et al., 2016; Mora-Macias et al., 2017; Muller et al., 2015), strongly support that ROS are potential central hubs of the nutrient starvation responses. Because plant are able to differentiate between the different nutritional deprivations, the next challenge will be to understand how is the nutritional specificity of ROS production detected by cells? How is the plant able to detect the ROS signal coming from N rather than a K deficiency? Some clue probably lies into the cellular specificity of the ROS production (Shin et al., 2005). One could also consider that ROS production is an independent and unspecific branch enhancing any kind of nutrient deficiencies which specificities are encoded by genetic factors (as for Phosphate starvation response [PSR], (Puga et al., 2014)). Further research will be necessary to sort this out.

The second factor found in this work, to be a strong regulators of NSR sentinel genes is HRS1. HRS1 was previously found to control the P response of primary root development (Liu et al., 2009; Medici et al., 2015) and to control germination *via* an ABA dependent pathway (Wu et al., 2012). HRS1 and its close HHO homologous genes are also very well known to be among the most NO₃⁻ regulated gene in the Arabidopsis genome (Canales et al., 2014; Krouk et al., 2010b; Wang et al., 2004). The very strong control of HHOs by NO₃⁻ seems to be important for

its functions. Previously, we showed that HRS1 NO_3^- regulation is necessary to integrate the NO_3^- and the PO_4^{3-} signal and to trigger appropriate primary root response (Medici et al., 2015). Herein, we show using over-expressors, mutants, TARGET, EMSA, and DAP-seq data, that HRS1 directly represses *NRT2.4*, *NRT2.5* genes. These genes are activated upon N starvation to retrieve NO_3^- traces in the soil solution. Thus, it seems critical for the plant to repress them (by HRS1 TF activity) when NO_3^- is provided to N starved plants (Fig. 2). In this work, we generated a genotype missing 4 HHOs (HRS1, HHO1, HHO2, HHO3). This genotype is unable to fully repress the *NRT2.4* and *NRT2.5* loci (Kiba et al., 2012; Lezhneva et al., 2014). These four mutations lead to an important enhancement of the HATS activity (~2.5 fold at 100 μM of external NO_3^-), leading to an enhancement of growth (Fig. 4). To our knowledge this opens original perspectives to develop genotypes with increased transport capacities in crops, and improve NUE with potential long-term impact on global warming (see Introduction).

Conclusion

The model that we propose (Fig. 9) defines two new kinds of molecular actors (HRS1/HHOs and ROS) in the control of plant to NSR (+N $\rightarrow$ -N). We show that ROS are produced upon NSR and that this response production is necessary for NSR sentinel gene activation. We also show that HRS1 and HHO1 i) control ROS accumulation in response to NSR, ii) directly repress NSR sentinel genes (*NRT2.4*, *NRT2.5*).

Material and Methods

Plant material. The *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) plants were in the Columbia-0 background. Mutant *hrs1-1* (SALK_067074), *hho1-1* (SAIL_28_D03) (Medici et al., 2015) *hho2-1* (SALK_070096) and *hho3-1* (SALK_146833) were obtained from ABRC seed stock center and homozygote lines were screened by PCR. The double (*hrs1;hho1*), triple (*hrs1;hho1;hho2*) and quadruple (*hrs1;hho1;hho2;hho3*) mutants has been obtained by crossings and PCR validation. The promoter gene *GFP* lines were obtained by PCR and cloning of *HRS1* from genomic sequences, bringing 3-kb upstream promoter region and the gene, into pMDC107 Gateway-compatible vector (Curtis and Grossniklaus, 2003).

Overexpressor lines were obtained by cloning HRS1- and HHO1-coding sequences into pMDC32 Gateway-compatible vector (see Medici et al., 2015). The constructs were transferred to *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 and used for the *Arabidopsis* transformation by the floral dip method to transform Columbia or the quadruple mutant for complementation (Zhang et al., 2006).

Growth conditions and treatments. Plants were grown in sterile hydroponic conditions for 14 days in day/night cycles (16/8 h; 90 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at 22°C as described in Krouk et al. (2010) (Krouk et al., 2010b). Hydroponic media consisted of 1 mM KH_2PO_4 , 1.5 mM MgSO_4 , 0.25 mM K_2SO_4 , 3 mM CaCl_2 , 0.1 mM Na-Fe-EDTA, 30 μM H_3BO_3 , 5 μM MnSO_4 , 1 μM ZnSO_4 , 1 μM CuSO_4 , 0.1 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 5 μM KI; supplied with 3 mM sucrose, 0.5 mM ammonium nitrate (1 mM KNO_3 for results in figure 1) and 0.5 g L^{-1} MES. pH was adjusted to 5.7 by adding KOH 1M. Plants were grown for 14 days in day/night cycles (16/8 h; 90 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at

22 °C. For +N → -N experiments, plants were transferred to an equivalent fresh nitrogen-free medium or 0.5 mM ammonium nitrate containing medium (1 mM KNO₃ for results in figure 1). For -N → +N experiments, all plants have been nitrogen starved for 3 days, and then transferred to an equivalent fresh medium containing 0.5 mM ammonium nitrate. Drug treatments for ROS scavenging were added upon plants transfer to the new media. Roots (corresponding to approximately 60 plants coming from a single phytatray) were harvested at different time points and immediately frozen in liquid nitrogen. Each time point and genotype being harvested from a different phytatray.

Experiments have been performed at least twice and representative data are reported in figures. For non-sterile hydroponic culture, seeds were sown on Eppendorf taps with 1 mm whole filled by H₂O-agar 0.5% solution and grown during 7 days on H₂O. Then, plants were transferred to the same media as above (without sucrose) and supplied with 0.5 mM ammonium nitrate and grown in short day light period (8h light 23°C and 16h dark 21°C) at 260 μmol photons m⁻².s⁻¹ and 70% humidity. Nutritive solution was renewed every 4 days for 5 weeks. Then plants were transferred to an equivalent fresh nitrogen-free medium or 0.5 mM ammonium nitrate containing medium (1 to 3 weeks for ¹⁵NO₃⁻ uptake experiments and 6h for ROS measurements).

For mutants complementation experiments (Fig. 2c), Columbia and *hrs1;hho1;hho2;hho3;pHRS1:HRS1:GFP* sterilized seeds were sown on the surface of sterile solid media (1% (w/v) agar) consisting of MS/2 basal salt medium containing no nitrogen, supplemented with 3 mM sucrose, 0.5 mM ammonium nitrate, MES buffered at pH 5.7 (0.5 g L⁻¹). Agar plates were incubated vertically in *in vitro* growth chamber for 12 days in day/night cycles (16/8 h; 90 μmol photons m⁻².s⁻¹) at 22 °C.

Real-time qPCR analysis. Total RNAs were extracted from Arabidopsis roots using Trizol® and digested with DNaseI (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). RNAs were then reverse transcribed to one-strand complementary DNA using Thermo script RT (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Gene expression was determined by quantitative PCR (LightCycler 480; Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) using gene-specific primers (provided upon request) and TAKARA mix (Roche, IN, USA). Expression levels of tested genes were normalized to expression levels of the actin and clathrin genes as previously described in (Krouk et al., 2010b).

Expression and purification of GST-HRS1 protein. The protocol was fully described in (Medici et al., 2015). Briefly, *HRS1* coding sequence were first cloned in the pDONR207 vector, and then transferred to pDEST15 vector (Invitrogen) by LR reaction following the manufacturer's instructions. The GST-HRS1 fusion protein was expressed in Escherichia coli Rosetta 2(DE3)pLysS (Novagen, Darmstadt, Germany). Transformed cells were grown in a phosphate-buffered rich medium (Terrific broth) at 37°C containing appropriate antibiotics until the OD₆₆₀ reached 0.7-0.8. After induction with 1 mM IPTG (isopropyl-b-D-thiogalactoside) for 16 h at 22° C, bacteria were harvested by centrifugation (6000 ×g, 10 min, 4°C) and suspended in 1X PBS buffer containing lysozyme from chicken egg white (Sigma) and complete protease inhibitor cocktail (Roche). The resulting cell suspension was sonicated and centrifuged at 15,000 g, for 15 min at 4°C to remove intact cells and debris. The proteins extract was mixed with buffered

glutathione sepharose beads (GE Healthcare, Freiburg, Germany), and incubated at 4°C for 3 h. The resin was centrifuged (500 ×g, 10 min, 4°C) and washed five times with 1X PBS buffer. GST-HRS1 was then eluted with 10 mM reduced glutathione (Sigma) in 50 mM Tris buffer and dialyzed overnight in 150 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH 7.4 buffer. All fractions were subjected to SDS-PAGE, and proteins concentrations were determined. For proteins quantification, absorbance measurements were recorded on a nanodrop spectrophotometer (Model No.1000, Thermo Scientific Inc., Wilmington, Delaware, USA) at 280 nm, and in parallel on a VICTOR2™ microplate reader (MULTILABEL COUNTER, life sciences) at 660 nm using the Pierce 660 nm Protein Assay (Pierce/Thermo Scientific, Rockford)

Electrophoretic Mobility Shift Assay. EMSA was performed using GST-HRS1 purified protein and DNA probes labeled with Biotin-TEG at the 3' end. Biotin-TEG 3' end -labeled single-stranded DNA oligonucleotides were incubated at 95 °C for 10 min and then annealed to generate double-stranded DNA probes by slow cooling. The sequences of the oligonucleotide probes were synthesized by Eurofins Genomics and are provided in Figure 7. The binding of the purified proteins (~ 150 ng) to the Biotin-TEG labeled probes (20 fmol) was carried out using the LightShift Chemiluminescent EMSA Kit (Thermo Scientific, Waltham, USA) in 20 µL reaction mixture containing 1X binding buffer (10 mM Tris, 50 mM KCl, 1 mM DTT, pH 7.5), 2.5% glycerol, 5 mM MgCl₂, 2 µg of poly (dI-dC) and 0.05 % NP-40. After incubation at 24° C for 30 min, the protein–probe mixture was separated in a 4% polyacrylamide native gel at 100 V for 50 min then transferred to a Biorad B Nylon membrane (Thermo Scientific) by capillary action in 20X SSC buffer overnight. After ultraviolet crosslinking (254 nm) for 90 s at 120 mJ.cm⁻², the migration of Biotin-TEG labeled probes was detected using horseradish peroxidase-conjugated streptavidin in the LightShift Chemiluminescent EMSA Kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's protocol, and then exposed to X-ray film.

ROS measurement. An Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Molecular probes, Eugene, OR, USA) was used to measure H₂O₂ production in 6-week-old plants, according to the manufacturer's protocol. Six independent roots for each treatment and genotype were frozen and ground in liquid N. All extraction protocol was carried out in a cold room at 4 °C. Two hundred µl of phosphate buffer (50 mM K₂HPO₄, pH 7.4) was added to 50 mg of ground frozen tissue. After 2 centrifugations at 14000 g for 10 min, 50 µl of the supernatant was added to 50 µl of the Amplex® Red mixture (100 µM (10-acethyl-3,7-dihydrophenoxazine) and 0.2 U/ml horseradish peroxidase) at room temperature (25 °C) for 30 min under dark conditions. The absorbance was measured using VICTOR2™ microplate reader (MULTILABEL COUNTER, life sciences) at 560 nm in 96-well transparent plates. A blank (containing 50 µL phosphate buffer and 50 µL Amplex® Red reagent) was considered as a negative control. H₂O₂ quantities were reported to the exact powder mass of each sample. The absorbance was measured twice in each point.

¹⁵NO₃⁻ uptake

Influx of ¹⁵NO₃⁻ into the roots was assayed as described previously (Lejay et al., 1999). The plants were sequentially transferred to 0.1 mM CaSO₄ for 1 min and then, to basal nutrient medium (pH 5.7) containing appropriate concentrations of K¹⁵NO₃. In the labeling solution,

$^{15}\text{NO}_3^-$ was used at 10 to 250 μM for HATS and 1 to 5 mM for LATS. After 5 min $^{15}\text{NO}_3^-$ labeling, roots were washed for 1 min in 0.1 mM CaSO_4 , harvested, dried at 70°C for 48 h and analyzed. The total N content and atomic percentage ^{15}N abundance of the samples were determined by continuous-flow mass spectrometry, as described previously (Clarkson et al., 1996), using a Euro-EA Eurovector elemental analyzer coupled with an IsoPrime mass spectrometer (GV Instruments). Each uptake value is the mean $\pm$ SE of 6 replicates (6 independent roots from different plants).

Phylogenetic analysis. The phylogeny reconstruction was established as described in (Safi et al., 2017) on the whole protein sequences. Briefly, the tree was built using the mafft algorithm (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>, parameters: G-INS-1, BLOSUM62) and drawn with FigTree. Different parameters including FFT-NS-2, FFT-NS-i, E-INS-i were used that yielded very similar trees.

TF perturbation assays in the TARGET system. The TARGET procedure has been performed as previously described in and (Bargmann et al., 2013; Medici et al., 2015). Protoplasts were treated with 35 μM CHX (Cycloheximide) for 30 min, then 10 μM DEX (Dexamethasone) was added and cell suspension was incubated in the dark over night at room temperature. Controls were respectively treated with DMSO (dimethylsulfoxide) and ethanol.

The red fluorescent protein was used as marker selection for fluorescent-activated cell sorting of successfully transformed protoplasts. Free nitrogen buffer was maintained during the whole procedure (as compared to Medici et al. (2015) during which NO_3^- was maintained during the TARGET procedure). RNA was extracted and amplified for hybridization with ATH1 Affymetrix chips.

Transcriptomic analysis was performed using ANOVA followed by a Tukey test using R (<https://www.r-project.org/>) custom made scripts following previously published procedures (Obertello et al., 2010; Ristova et al., 2016). Clustering was performed using the MeV software (<http://mev.tm4.org/>).

Briefly, the ANOVA analysis was carried out using the R `aov()` function on log2 MAS5-normalized data. A probe signal has been modeled as follows: $Y_i = \alpha_1.\text{DEX} + \alpha_2.\text{NO}_3 + \alpha_3.\text{NO}_3*\text{DEX} + \varepsilon$; where α_1 to α_3 represent the coefficient quantifying the effect of each of the factors (DEX, NO_3) and their interaction (DEX* NO_3), and ε represents the non-explained variance. We determined the false discovery rate (FDR) to be <10% for an ANOVA pvalue-cutoff of 0.01 and a Tuckey pvalue-cutoff of 0.01.

Acknowledgements

This work was supported by Agence Nationale de la Recherche (IMANA ANR-14-CE19-0008 with a doctoral fellowship to AS), by CNRS (LIA-CoopNet, PEPS-SuperRegNet) and by NSF (IOS 1339362- NutriNet).

Figure Legends:

Figure 1. HRS1 and HHO1 are repressors of NSR sentinel genes. (a) Root response of *NRT2.4*, *NRT2.5* and *GDH3* to NSR in Columbia, *hrs1;hho1*, 35S:HRS1 genotypes. Plants are grown in sterile hydroponic conditions on N containing media for 14 days. At time 0, the media is shifted to -N conditions for 0, 2, 4, 6 days or +N as a control. (b) Root response of *NRT2.4*, *NRT2.5* and *GDH3* to NSR in Columbia WT, 35S:HRS1, 35S:HHO1 genotypes. Plants are grown in sterile hydroponic conditions on N containing media for 14 days. Then the media is shifted to -N conditions for 0, 1, 2, 4, 6 days or +N as a control (the media background is kept unchanged). All transcript levels were quantified by qPCR and normalized to two housekeeping genes (ACT and CLA), values are means $\pm$ s.e.m (n= 4). Asterisks indicate significant differences from WT plants (*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; Student's t-test).

Figure 2. HHO subfamily is involved in repressing NSR sentinels after NO₃⁻ provision. (a) Phylogenetic tree representing the GARP HHO subfamily. The tree was built as described in Safi et al., (2017) using the mafft algorithm (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>, parameters: G-INS-1, BLOSUM62) and drawn with FigTree. (b) Root response of *NRT2.4*, *NRT2.5* and *GDH3* to PNR following N starvation in Columbia WT, *hrs1*, *hrs1;hho1*, *hrs1;hho1;hho2*, *hrs1;hho1;hho2;hho3* genotypes. Plants are grown in sterile hydroponic conditions on full media for 14 days, subjected to N starvation for 3 days and then resupplied with 0.5 mM NH₄NO₃ for 0 (harvest before treatment), 15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h (the media background is kept unchanged). (c) pHRS1:HRS1:GFP is sufficient to complement the *hrs1;hho1;hho2;hho3* quadruple mutant. Col, *hrs1;hho1;hho2;hho3*, *hrs1;hho1;hho2;hho3*:pHRS1:HRS1:GFP line 1 and line 2 (2 independent transformation events) are grown on petri dishes on 0.5 mM of NH₄NO₃ for 12 days. Roots are harvested and transcripts are measured by qPCR. All transcript levels were quantified by qPCR and normalized to two housekeeping genes (ACT and CLA), values are means $\pm$ s.e.m (n= 4). Asterisks indicate significant differences from WT plants (*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; Student's t-test).

Figure 3. HRS1 and HHO1 negatively control NO₃⁻ HATS. (a) NO₃⁻ uptake is altered in the 35S:HRS1 and in the double mutant *hrs1;hho1*. Plants were grown for 5 weeks on a N containing media. The media is then shifted to -N conditions or +N as a control for 1 or 3 weeks. Values are means $\pm$ s.e.m (n= 6). (b) One week starved plants were used to quantify NO₃⁻ HATS and LATS activities as well as high affinity NO₃⁻ transporter transcript levels. qPCR are normalized to two housekeeping genes (ACT and CLA), values are means $\pm$ s.e.m (n= 12). NO₃⁻ uptake measurements were performed on different ¹⁵NO₃⁻ concentrations (10, 100, 250 μ M, 1 and 5 mM) to evaluate HATS and LATS. Values are means $\pm$ s.e.m (n= 6). The experiment was performed exactly as mentioned for (a). Asterisks indicate significant differences from WT plants (*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; Student's t-test).

Figure 4. The HHO subfamily represses NO₃⁻ uptake and growth in +N conditions. (a) NO₃⁻ uptake is altered in the *hrs1*, *hrs1;hho1*, *hrs1;hho1;hho2*, *hrs1;hho1;hho2;hho3* mutants. Plants were grown for 6 weeks on N containing non-sterile hydroponics (0.5 mM NH₄NO₃). NO₃⁻ uptake measurements were performed at 100 μM ¹⁵NO₃⁻ to evaluate the HATS. Values are means ± s.e.m (n= 6). Asterisks indicate significant differences from WT plants (*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; Student's t-test). (b) Representative pictures of Col and the *hrs1;hho1;hho2;hho3* quadruple mutant +N conditions at the day of the uptake experiment show a growth phenotype.

Figure 5. HRS1 direct genome-wide targets are largely NO₃⁻ dependent and contains many redox related genes. TARGET procedure was performed with NO₃⁻ (data from Medici et al. (2015)) and without NO₃⁻ (this work). An ANOVA analysis followed by a Tukey test retrieved 1050 HRS1 regulated genes (ANOVA pval cutoff 0.01, Tukey pval cutoff 0.01, FDR<10%). (a) GeneCloud analysis (Krouk et al., 2015) of the 1050 direct targets of HRS1. (b) Clustering analysis (Pearson correlation) was performed using MeV software (number of clusters was determined by the FOM method). A selection of over-represented semantic terms is displayed in front of each cluster. Remarkable redox related genes are displayed in the right column. The list of each cluster, their related gene list, as well as their respective semantic analysis are provided in Sup File 1.

Figure 6. ROS is necessary for the NSR response. (a) Altered response of *NRT2.4*, *NRT2.5* and *GDH3* by KI-mannitol treatment. Plants are grown in sterile hydroponic conditions on N-containing media for 14 days. Thereafter, the media is shifted to -N conditions containing or not 5 mM of KI and 5 mM of mannitol for 0, 2, 4, 6 days or +N as a control. (b) Altered response of *NRT2.4*, *NRT2.5* and *GDH3* by ROS scavenger treatment. Plants are grown in sterile hydroponic conditions on N containing media for 14 days. Then plants were transferred to -N or +N conditions for 0, 2, 4 days. In parallel, some of the N starved plants were treated with 5 mM KI, 5 mM mannitol, combination of both or with 10 μM DPI. DMSO was used as mock treatment of DPI. All transcript levels were quantified by qPCR and normalized to two housekeeping genes (ACT and CLA), values are means ± s.e.m (n= 4). Asterisks indicate significant differences from WT plants (*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; Student's t-test).

Figure 7. Identification of a new HRS1 cis-regulatory element and binding of HRS1 to the *NRT2.4* and *NRT2.5* promoters. (a) HHOs target motifs. Weight matrix representation of the motifs retrieved by the MEME algorithm analysis from the 500 bp sequences upstream the transcription start sites of the down-regulated HRS1-target genes. HHO2 and HHO3 cis motifs retrieved by DAP-seq (O'Malley et al., 2016). (b) Wild-type and mutated forms of the HRS1 target motif used in EMSA in c and d. (c) EMSA analysis on 48bp (4X repetition of HRS1 target motif); Biotin-TEG labeled DNA probes (20 fmol), GST:HRS1 protein (150 ng). 200X excess of the cold version of the same DNA probes was added in the third well. (d) EMSA analysis on 48bp (4X repetition of motifs listed in b); different concentrations of the cold version of the motif or of the 3 mutated forms were added each time. (e) Schematic representation of *NRT2.4*, *NRT2.5*, *NRT2.1* and *GDH3* genes showing potential HRS1 cis-motif in their promoters. (f) EMSA analysis on 40-bp promoter fragments of *NRT2.4* and *NRT2.5*. (g) List of the promoter

fragments sequences as well as HRS1 target motif used for EMSA analysis. Two promoter fragments sequences were tested for each gene.

Figure 8. ROS is produced early after nitrogen deprivation, regulated by HRS1 and crucial for the NSR. (a) H₂O₂ production after N deprivation. Plants were grown in non-sterile hydroponics for 6 weeks on N containing media. Thereafter the media is shifted to –N conditions or +N as a control for 6 hours. H₂O₂ accumulation was measured using Amplex Red (see Material and Methods). Values are means ± s.e.m (n= 6). Different letters means significantly differences (Student's t-test, P < 0.05). (b) ROS scavenging treatment represses NSR sentinel genes in the *hhos* mutants. Plants are grown in sterile hydroponic conditions on N containing media for 14 days. Plants are then N-deprived for 3 days and treated with 5 mM of KI and 5 mM of mannitol. Plants kept on the same renewed media were used as control. Values are means ± s.e.m (n= 4).

Figure 9. Proposed model of the regulation of NSR by HHOs and ROS. On –N conditions, ROS are produced and are needed for the NSR induction. When Nitrogen is present in the media, HRS1 and its homologs are rapidly and highly expressed to repress the NSR either directly by regulating the *NRT2* and *GDH3* promoter activities or indirectly by reducing ROS production.

Supplementary Figure 1. *NRT2.4* is down-regulated by HRS1 and HHO1. (a) HRS1 TARGET shows a direct repression of *NRT2.4* in Arabidopsis root protoplasts data from Medici et al., (2015) (b) *NRT2.4* transcripts level in Wild-type, *hrs1;hho1*, 35SHRS1 and HHO1 genotypes (data from Medici et al., 2015).

Supplementary Figure 2. Characterization of quadruple mutant and OE lines.

(a) Characterization of HRS1 and HHO1 mRNA relative accumulations in 35S:HRS1 and 35S:HHO1 transgenic plants. (b) Characterization of the *hrs1/hho* quadruple mutant. The absence of full length transcripts for HRS1, HHO1, HHO2 and HHO3 was verified by RT-PCR (PCR ATG-Stop) on mRNA isolated from roots of *hrs1;hho1;hho2;hho3* mutant grown for 14 days on MS/2 media (Clathrin was used as control).

Supplementary Figure 3. *hrs1;hho1* double mutant displays growth phenotype in +N conditions. Representative pictures of Col and the *hrs1;hho1* double mutant. Plants were grown for 6 weeks on N containing non-sterile hydroponics (0.5 mM NH₄NO₃).

Supplementary Figure 4. HHOs binding evidences in *NR2.4*, *NRT2.5* and *GDH3* promoters. Data from DAP-seq (O'Malley et al., 2016) showing binding peaks of HHO family TFs in *NR2.4*, *NRT2.5* and *GDH3* promoters. KAN2 (GARP family) and bZIP16 binding profiles were used as controls. The second line of each TF correspond to the demethylated DNA version (ampDAP-seq) used for DAP-seq binding.

References

- Alboresi, A., Gestin, C., Leydecker, M.T., Bedu, M., Meyer, C., and Truong, H.N. (2005). Nitrate, a signal relieving seed dormancy in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 28:500-512.
- Alvarez, J.M., Riveras, E., Vidal, E.A., Gras, D.E., Contreras-Lopez, O., Tamayo, K.P., Aceituno, F., Gomez, I., Ruffel, S., Lejay, L., et al. (2014). Systems approach identifies TGA1 and TGA4 transcription factors as important regulatory components of the nitrate response of *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant J* 80:1-13.
- Araus, V., Vidal, E.A., Puelma, T., Alamos, S., Mieulet, D., Guiderdoni, E., and Gutierrez, R.A. (2016). Members of BTB Gene Family of Scaffold Proteins Suppress Nitrate Uptake and Nitrogen Use Efficiency. *Plant Physiol* 171:1523-1532.
- Bailey, T.L., Boden, M., Buske, F.A., Frith, M., Grant, C.E., Clementi, L., Ren, J., Li, W.W., and Noble, W.S. (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res* 37:W202-208.
- Balzerque, C., Dartevelle, T., Godon, C., Laugier, E., Meisrimler, C., Teulon, J.M., Creff, A., Bissler, M., Bouchoud, C., Hagege, A., et al. (2017). Low phosphate activates STOP1-ALMT1 to rapidly inhibit root cell elongation. *Nat Commun* 8:15300.
- Bargmann, B.O., Marshall-Colon, A., Efroni, I., Ruffel, S., Birnbaum, K.D., Coruzzi, G.M., and Krouk, G. (2013). TARGET: a transient transformation system for genome-wide transcription factor target discovery. *Mol Plant* 6:978-980.
- Canales, J., Moyano, T.C., Villarroel, E., and Gutierrez, R.A. (2014). Systems analysis of transcriptome data provides new hypotheses about *Arabidopsis* root response to nitrate treatments. *Front Plant Sci* 5:22.
- Castaings, L., Camargo, A., Pocholle, D., Gaudon, V., Texier, Y., Boutet-Mercey, S., Taconnat, L., Renou, J.P., Daniel-Vedele, F., Fernandez, E., et al. (2009). The nodule inception-like protein 7 modulates nitrate sensing and metabolism in *Arabidopsis*. *Plant J* 57:426-435.
- Castro Marin, I., Loef, I., Bartetzko, L., Searle, I., Coupland, G., Stitt, M., and Osuna, D. (2010). Nitrate regulates floral induction in *Arabidopsis*, acting independently of light, gibberellin and autonomous pathways. *Planta*.
- Chakraborty, S., Hill, A.L., Shirsekar, G., Afzal, A.J., Wang, G.L., Mackey, D., and Bonello, P. (2016). Quantification of hydrogen peroxide in plant tissues using Amplex Red. *Methods* 109:105-113.
- Clarkson, D.T., Gojon, A., Saker, L.R., Wiersema, P.K., Purves, J.V., Tillard, P., Arnold, G.M., Paams, A.J.M., Waalburg, W., and Stulen, I. (1996). Nitrate and ammonium influxes in soybean (*Glycine max*) roots: Direct comparison of ^{13}N and ^{15}N tracing. *Plant Cell Environ.* 19:859-868.
- Crawford, N.M., and Glass, A.D.M. (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science* 3:389-395.
- Cuin, T.A., and Shabala, S. (2007). Compatible solutes reduce ROS-induced potassium efflux in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell Environ* 30:875-885.
- Curtis, M.D., and Grossniklaus, U. (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 133:462-469.
- Forde, B.G., and Walch-Liu, P. (2009). Nitrate and glutamate as environmental cues for behavioural responses in plant roots. *Plant Cell Environ* 32:682-693.
- Gansel, X., Munos, S., Tillard, P., and Gojon, A. (2001). Differential regulation of the NO_3^- and NH_4^+ transporter genes *AtNrt2.1* and *AtAmt1.1* in *Arabidopsis*: relation with long-distance and local controls by N status of the plant. *Plant J* 26:143-155.
- Gruber, B.D., Giehl, R.F., Friedel, S., and von Wiren, N. (2013). Plasticity of the *Arabidopsis* root system under nutrient deficiencies. *Plant Physiol* 163:161-179.

- Guan, P., Ripoll, J.J., Wang, R., Vuong, L., Bailey-Steinitz, L.J., Ye, D., and Crawford, N.M. (2017). Interacting TCP and NLP transcription factors control plant responses to nitrate availability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:2419-2424.
- Han, M., Okamoto, M., Beatty, P.H., Rothstein, S.J., and Good, A.G. (2015). The Genetics of Nitrogen Use Efficiency in Crop Plants. *Annu Rev Genet* 49:269-289.
- Ho, C.H., Lin, S.H., Hu, H.C., and Tsay, Y.F. (2009). CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell* 138:1184-1194.
- Hoehenwarter, W., Monchgesang, S., Neumann, S., Majovsky, P., Abel, S., and Muller, J. (2016). Comparative expression profiling reveals a role of the root apoplast in local phosphate response. *BMC Plant Biol* 16:106.
- Hu, H.C., Wang, Y.Y., and Tsay, Y.F. (2009). AtCIPK8, a CBL-interacting protein kinase, regulates the low-affinity phase of the primary nitrate response. *Plant J* 57:264-278.
- Kiba, T., Feria-Bourrellier, A.B., Lafouge, F., Lezhneva, L., Boutet-Mercey, S., Orsel, M., Brehaut, V., Miller, A., Daniel-Vedele, F., Sakakibara, H., et al. (2012). The Arabidopsis nitrate transporter NRT2.4 plays a double role in roots and shoots of nitrogen-starved plants. *Plant Cell* 24:245-258.
- Kiba, T., and Krapp, A. (2016). Plant Nitrogen Acquisition Under Low Availability: Regulation of Uptake and Root Architecture. *Plant Cell Physiol* 57:707-714.
- Kotur, Z., and Glass, A.D. (2015). A 150 kDa plasma membrane complex of AtNRT2.5 and AtNAR2.1 is the major contributor to constitutive high-affinity nitrate influx in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Environ* 38:1490-1502.
- Krapp, A., Berthome, R., Orsel, M., Mercey-Boutet, S., Yu, A., Castaings, L., Elftieh, S., Major, H., Renou, J.P., and Daniel-Vedele, F. (2011). Arabidopsis roots and shoots show distinct temporal adaptation patterns toward nitrogen starvation. *Plant Physiol* 157:1255-1282.
- Krouk, G. (2017). Nitrate signalling: Calcium bridges the nitrate gap. *Nat Plants* 3:17095.
- Krouk, G., Carre, C., Fizames, C., Gojon, A., Ruffel, S., and Lacombe, B. (2015). GeneCloud Reveals Semantic Enrichment in Lists of Gene Descriptions. *Mol Plant* 8:971-973.
- Krouk, G., Crawford, N.M., Coruzzi, G.M., and Tsay, Y.F. (2010a). Nitrate signaling: adaptation to fluctuating environments. *Curr Opin Plant Biol* 13:266-273.
- Krouk, G., Mirowski, P., LeCun, Y., Shasha, D.E., and Coruzzi, G.M. (2010b). Predictive network modeling of the high-resolution dynamic plant transcriptome in response to nitrate. *Genome Biol* 11:R123.
- Lejay, L., Tillard, P., Lepetit, M., Olive, F., Filleur, S., Daniel-Vedele, F., and Gojon, A. (1999). Molecular and functional regulation of two NO₃⁻ uptake systems by N- and C-status of Arabidopsis plants. *Plant J* 18:509-519.
- Leran, S., Edel, K.H., Pervent, M., Hashimoto, K., Corratge-Faillie, C., Offenborn, J.N., Tillard, P., Gojon, A., Kudla, J., and Lacombe, B. (2015). Nitrate sensing and uptake in Arabidopsis are enhanced by ABI2, a phosphatase inactivated by the stress hormone abscisic acid. *Sci Signal* 8:ra43.
- Lezhneva, L., Kiba, T., Feria-Bourrellier, A.B., Lafouge, F., Boutet-Mercey, S., Zoufan, P., Sakakibara, H., Daniel-Vedele, F., and Krapp, A. (2014). The Arabidopsis nitrate transporter NRT2.5 plays a role in nitrate acquisition and remobilization in nitrogen-starved plants. *Plant J* 80:230-241.
- Li, Y., Krouk, G., Coruzzi, G.M., and Ruffel, S. (2014). Finding a nitrogen niche: a systems integration of local and systemic nitrogen signalling in plants. *J Exp Bot*.
- Liu, H., Yang, H., Wu, C., Feng, J., Liu, X., Qin, H., and Wang, D. (2009). Overexpressing HRS1 confers hypersensitivity to low phosphate-elicited inhibition of primary root growth in Arabidopsis thaliana. *J Integr Plant Biol* 51:382-392.

- Liu, K.H., Niu, Y., Konishi, M., Wu, Y., Du, H., Sun Chung, H., Li, L., Boudsocq, M., McCormack, M., Maekawa, S., et al. (2017). Discovery of nitrate-CPK-NLP signalling in central nutrient-growth networks. *Nature*.
- Ma, Q., Tang, R.J., Zheng, X.J., Wang, S.M., and Luan, S. (2015). The calcium sensor CBL7 modulates plant responses to low nitrate in *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun* 468:59-65.
- Marchi, L., Degola, F., Polverini, E., Terce-Laforgue, T., Dubois, F., Hirel, B., and Restivo, F.M. (2013). Glutamate dehydrogenase isoenzyme 3 (GDH3) of *Arabidopsis thaliana* is regulated by a combined effect of nitrogen and cytokinin. *Plant Physiol Biochem* 73:368-374.
- Marchive, C., Roudier, F., Castaings, L., Brehaut, V., Blondet, E., Colot, V., Meyer, C., and Krapp, A. (2013). Nuclear retention of the transcription factor NLP7 orchestrates the early response to nitrate in plants. *Nat Commun* 4:1713.
- Medici, A., and Krouk, G. (2014). The primary nitrate response: a multifaceted signalling pathway. *J Exp Bot* 65:5567-5576.
- Medici, A., Marshall-Colon, A., Ronzier, E., Szponarski, W., Wang, R., Gojon, A., Crawford, N.M., Ruffel, S., Coruzzi, G.M., and Krouk, G. (2015). AtNIGT1/HRS1 integrates nitrate and phosphate signals at the *Arabidopsis* root tip. *Nat Commun* 6:6274.
- Menz, J., Li, Z., Schulze, W.X., and Ludewig, U. (2016). Early nitrogen-deprivation responses in *Arabidopsis* roots reveal distinct differences on transcriptome and (phospho-) proteome levels between nitrate and ammonium nutrition. *Plant J* 88:717-734.
- Mora-Macias, J., Ojeda-Rivera, J.O., Gutierrez-Alanis, D., Yong-Villalobos, L., Oropeza-Aburto, A., Raya-Gonzalez, J., Jimenez-Dominguez, G., Chavez-Calvillo, G., Rellan-Alvarez, R., and Herrera-Estrella, L. (2017). Malate-dependent Fe accumulation is a critical checkpoint in the root developmental response to low phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E3563-E3572.
- Muller, J., Toev, T., Heisters, M., Teller, J., Moore, K.L., Hause, G., Dinesh, D.C., Burstenbinder, K., and Abel, S. (2015). Iron-dependent callose deposition adjusts root meristem maintenance to phosphate availability. *Dev Cell* 33:216-230.
- O'Brien, J.A., Vega, A., Bouguyon, E., Krouk, G., Gojon, A., Coruzzi, G., and Gutierrez, R.A. (2016). Nitrate Transport, Sensing, and Responses in Plants. *Mol Plant* 9:837-856.
- O'Malley, R.C., Huang, S.S., Song, L., Lewsey, M.G., Bartlett, A., Nery, J.R., Galli, M., Gallavotti, A., and Ecker, J.R. (2016). Cistrome and Epicistrome Features Shape the Regulatory DNA Landscape. *Cell* 165:1280-1292.
- Obertello, M., Krouk, G., Katari, M.S., Runko, S.J., and Coruzzi, G.M. (2010). Modeling the global effect of the basic-leucine zipper transcription factor 1 (bZIP1) on nitrogen and light regulation in *Arabidopsis*. *BMC Syst Biol* 4:111.
- Ohkubo, Y., Tanaka, M., Tabata, R., Ogawa-Ohnishi, M., and Matsubayashi, Y. (2017). Shoot-to-root mobile polypeptides involved in systemic regulation of nitrogen acquisition. *Nat Plants* 3:17029.
- Okamoto, M., Vidmar, J.J., and Glass, A.D. (2003). Regulation of NRT1 and NRT2 gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. *Plant Cell Physiol* 44:304-317.
- Orozco-Cardenas, M.L., Narvaez-Vasquez, J., and Ryan, C.A. (2001). Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell* 13:179-191.
- Para, A., Li, Y., Marshall-Colon, A., Varala, K., Francoeur, N.J., Moran, T.M., Edwards, M.B., Hackley, C., Bargmann, B.O., Birnbaum, K.D., et al. (2014). Hit-and-run transcriptional control by bZIP1 mediates rapid nutrient signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:10371-10376.
- Puga, M.I., Mateos, I., Charukesi, R., Wang, Z., Franco-Zorrilla, J.M., de Lorenzo, L., Irigoyen, M.L., Masiero, S., Bustos, R., Rodriguez, J., et al. (2014). SPX1 is a phosphate-

- dependent inhibitor of PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1 in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:14947-14952.
- Rahayu, Y.S., Walch-Liu, P., Neumann, G., Romheld, V., von Wiren, N., and Bangerth, F. (2005). Root-derived cytokinins as long-distance signals for NO₃⁻-induced stimulation of leaf growth. *J Exp Bot* 56:1143-1152.
- Ristova, D., Carre, C., Pervent, M., Medici, A., Kim, G.J., Scalia, D., Ruffel, S., Birnbaum, K., Lacombe, B., Busch, W., et al. (2016). Combinatorial interaction network of transcriptomic and phenotypic responses to nitrogen and hormones in the Arabidopsis thaliana root. *Sci Signal* 9.
- Riveras, E., Alvarez, J.M., Vidal, E.A., Oses, C., Vega, A., and Gutierrez, R.A. (2015). The Calcium Ion Is a Second Messenger in the Nitrate Signaling Pathway of Arabidopsis. *Plant Physiol* 169:1397-1404.
- Rubin, G., Tohge, T., Matsuda, F., Saito, K., and Scheible, W.R. (2009). Members of the LBD family of transcription factors repress anthocyanin synthesis and affect additional nitrogen responses in Arabidopsis. *Plant Cell* 21:3567-3584.
- Ruffel, S., Krouk, G., Ristova, D., Shasha, D., Birnbaum, K.D., and Coruzzi, G.M. (2011). Nitrogen economics of root foraging: transitive closure of the nitrate-cytokinin relay and distinct systemic signaling for N supply vs. demand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:18524-18529.
- Ruffel, S., Poitout, A., Krouk, G., Coruzzi, G.M., and Lacombe, B. (2015). Long-distance nitrate signaling displays cytokinin dependent and independent branches. *J Integr Plant Biol*.
- Safi, A., Medici, A., Szponarski, W., Ruffel, S., Lacombe, B., and Krouk, G. (2017). The world according to GARP transcription factors. *Curr Opin Plant Biol* 39:159-167.
- Scheible, W.R., Gonzalez-Fontes, A., Lauerer, M., Muller-Rober, B., Caboche, M., and Stitt, M. (1997). Nitrate Acts as a Signal to Induce Organic Acid Metabolism and Repress Starch Metabolism in Tobacco. *Plant Cell* 9:783-798.
- Shen, B., Jensen, R.G., and Bohnert, H.J. (1997a). Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiol* 113:1177-1183.
- Shen, B., Jensen, R.G., and Bohnert, H.J. (1997b). Mannitol Protects against Oxidation by Hydroxyl Radicals. *Plant Physiol* 115:527-532.
- Shin, R., Berg, R.H., and Schachtman, D.P. (2005). Reactive oxygen species and root hairs in Arabidopsis root response to nitrogen, phosphorus and potassium deficiency. *Plant Cell Physiol* 46:1350-1357.
- Shin, R., and Schachtman, D.P. (2004). Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8827-8832.
- Stitt, M. (1999). Nitrate regulation of metabolism and growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2:178-186.
- Sutton, M.A., Oenema, O., Erisman, J.W., Leip, A., Grinsven, H.V., and Winiwarter, W. (2011). Too much of a good thing. *Nature* 472:159-161.
- Tabata, R., Sumida, K., Yoshii, T., Ohyama, K., Shinohara, H., and Matsubayashi, Y. (2014). Perception of root-derived peptides by shoot LRR-RKs mediates systemic N-demand signaling. *Science* 346:343-346.
- Tsukagoshi, H., Busch, W., and Benfey, P.N. (2010). Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* 143:606-616.
- Voegele, R.T., Hahn, M., Lohaus, G., Link, T., Heiser, I., and Mendgen, K. (2005). Possible roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in the biotrophic plant pathogen *Uromyces fabae*. *Plant Physiol* 137:190-198.
- Wang, R., Tischner, R., Gutierrez, R.A., Hoffman, M., Xing, X., Chen, M., Coruzzi, G., and Crawford, N.M. (2004). Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of Arabidopsis. *Plant Physiol* 136:2512-2522.

- Wang, R., Xing, X., Wang, Y., Tran, A., and Crawford, N.M. (2009). A genetic screen for nitrate regulatory mutants captures the nitrate transporter gene NRT1.1. *Plant Physiol* 151:472-478.
- Wu, C., Feng, J., Wang, R., Liu, H., Yang, H., Rodriguez, P.L., Qin, H., Liu, X., and Wang, D. (2012). HRS1 acts as a negative regulator of abscisic acid signaling to promote timely germination of Arabidopsis seeds. *PLoS One* 7:e35764.
- Xu, N., Wang, R., Zhao, L., Zhang, C., Li, Z., Lei, Z., Liu, F., Guan, P., Chu, Z., Crawford, N.M., et al. (2016). The Arabidopsis NRG2 Protein Mediates Nitrate Signaling and Interacts with and Regulates Key Nitrate Regulators. *Plant Cell* 28:485-504.
- Zhang, X., Henriques, R., Lin, S.S., Niu, Q.W., and Chua, N.H. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana using the floral dip method. *Nat Protoc* 1:641-646.
- Zhao, M., Ding, H., Zhu, J.K., Zhang, F., and Li, W.X. (2011). Involvement of miR169 in the nitrogen-starvation responses in Arabidopsis. *New Phytol* 190:906-915.

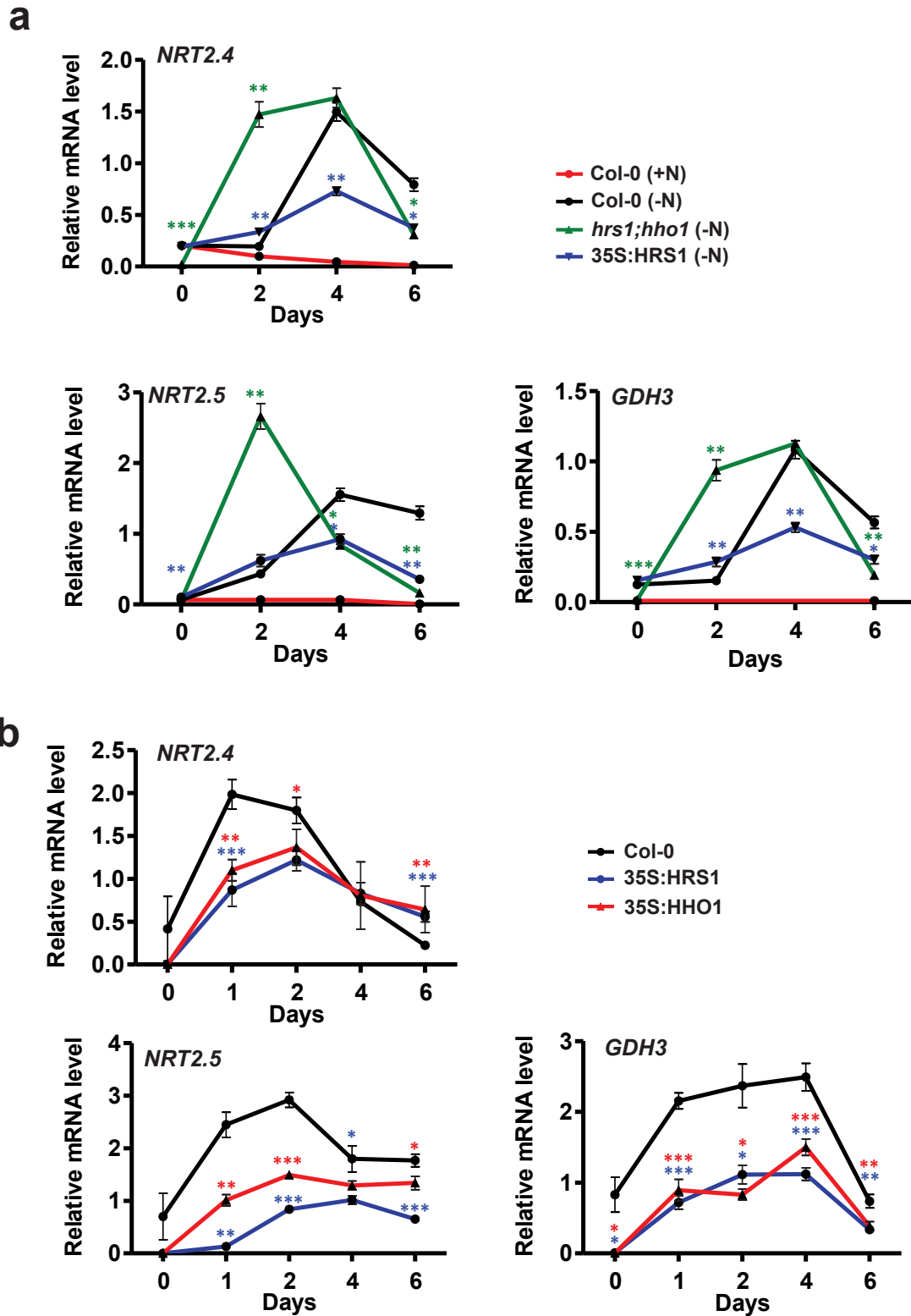
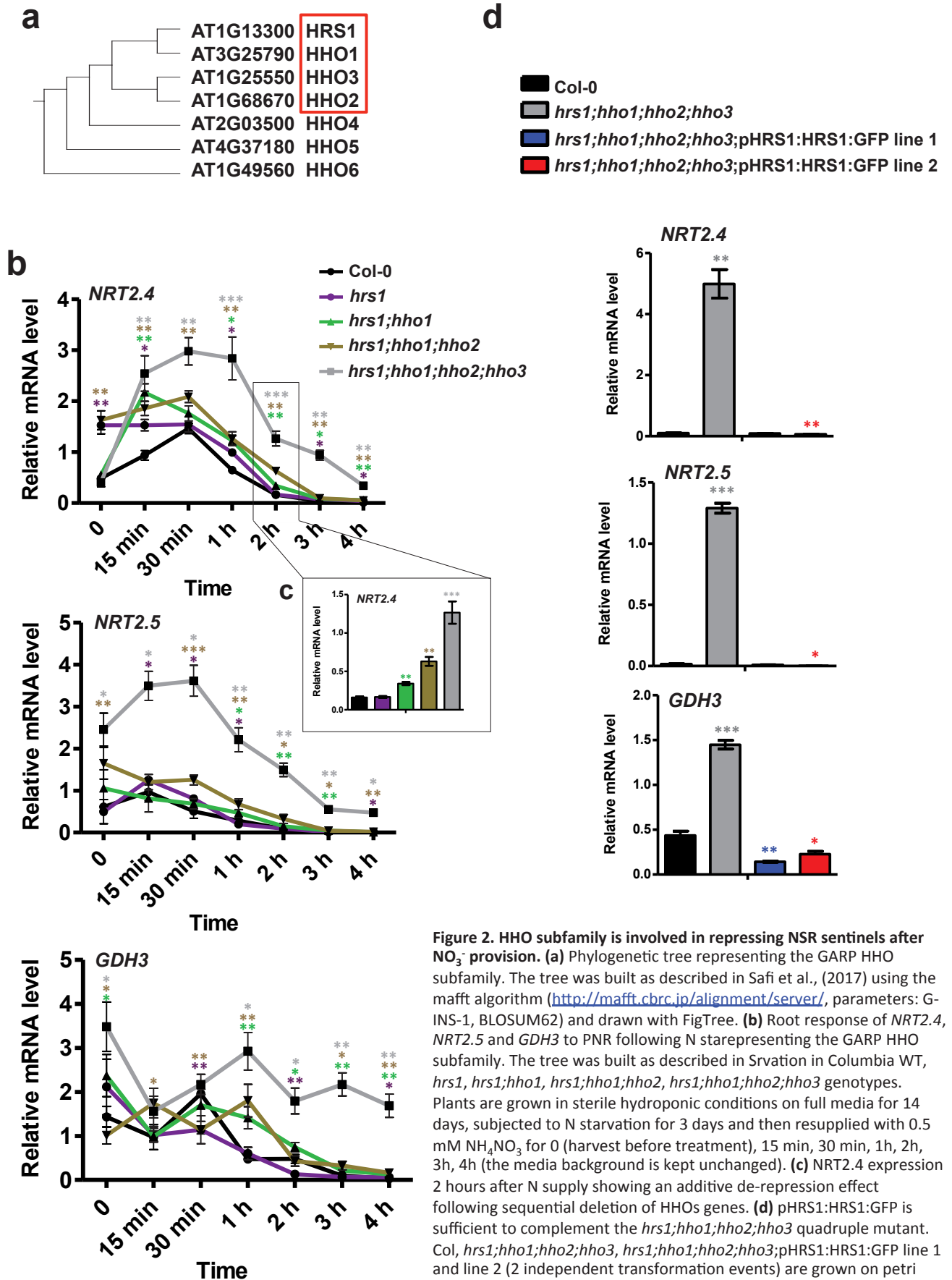


Figure 1. HRS1 and HHO1 are repressors of NSR sentinel genes. (a) Root response of *NRT2.4*, *NRT2.5* and *GDH3* to NSR in Columbia, *hrs1;hho1*, 35S:HRS1 genotypes. Plants are grown in sterile hydroponic conditions on N containing media for 14 days. At time 0, the media is shifted to -N conditions for 0, 2, 4, 6 days or +N as a control. **(b)** Root response of *NRT2.4*, *NRT2.5* and *GDH3* to NSR in Columbia WT, 35S:HRS1, 35S:HHO1 genotypes. Plants are grown in sterile hydroponic conditions on N containing media for 14 days. Then the media is shifted to -N conditions for 0, 1, 2, 4, 6 days or +N as a control (the media background is kept unchanged). All transcript levels were quantified by qPCR and normalized to two housekeeping genes (ACT and CLA), values are means $\pm$ s.e.m (n= 4).



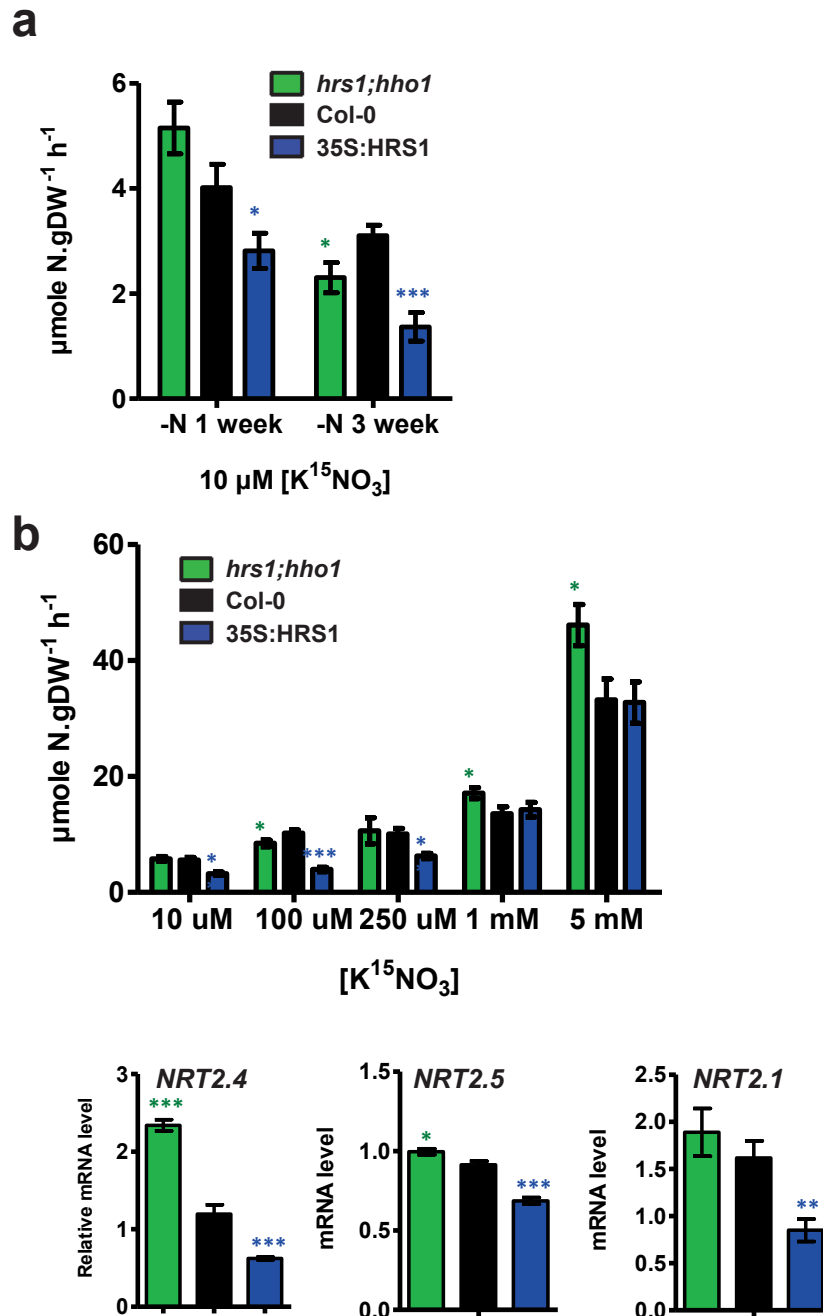


Figure 3. HRS1 and HHO1 negatively control NO_3^- HATS. (a) NO_3^- uptake is altered in the 35S:HRS1 and in the double mutant *hrs1;hho1*. Plants were grown for 5 weeks on a N containing media. The media is then shifted to $-N$ conditions or $+N$ as a control for 1 or 3 weeks. Values are means $\pm$ s.e.m ($n=6$). **(b)** One week starved plants were used to quantify NO_3^- HATS and LATS activities as well as high affinity NO_3^- transporter transcript levels. qPCR are normalized to two housekeeping genes (ACT and CLA), values are means $\pm$ s.e.m ($n=12$). NO_3^- uptake measurements were performed on different $^{15}\text{NO}_3^-$ concentrations (10, 100, 250 μM , 1 and 5 mM) to evaluate HATS and LATS. Values are means $\pm$ s.e.m ($n=6$). The experiment was performed exactly as mentioned for (a).

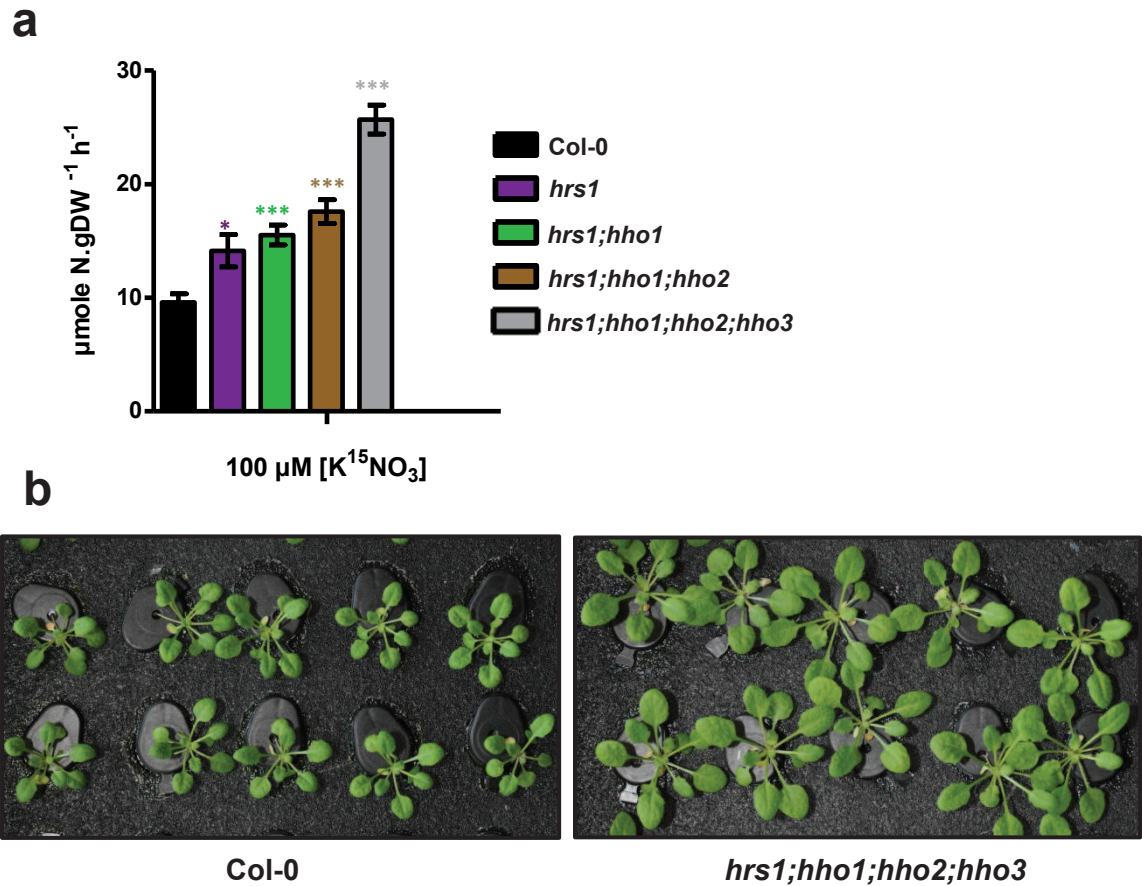


Figure 4. The HHO subfamily represses NO_3^- uptake and growth in +N conditions. (a) NO_3^- uptake is altered in the *hrs1*, *hrs1;hho1*, *hrs1;hho1;hho2*, *hrs1;hho1;hho2;hho3* mutants. Plants were grown for 6 weeks on N containing non-sterile hydroponics (0.5 mM NH_4NO_3). NO_3^- uptake measurements were performed at 100 μM $^{15}\text{NO}_3^-$ to evaluate the HATS. Values are means $\pm$ s.e.m (n= 6). **(b)** Representative pictures of Col and the *hrs1;hho1;hho2;hho3* quadruple mutant +N conditions at the day of the uptake experiment show a growth phenotype.

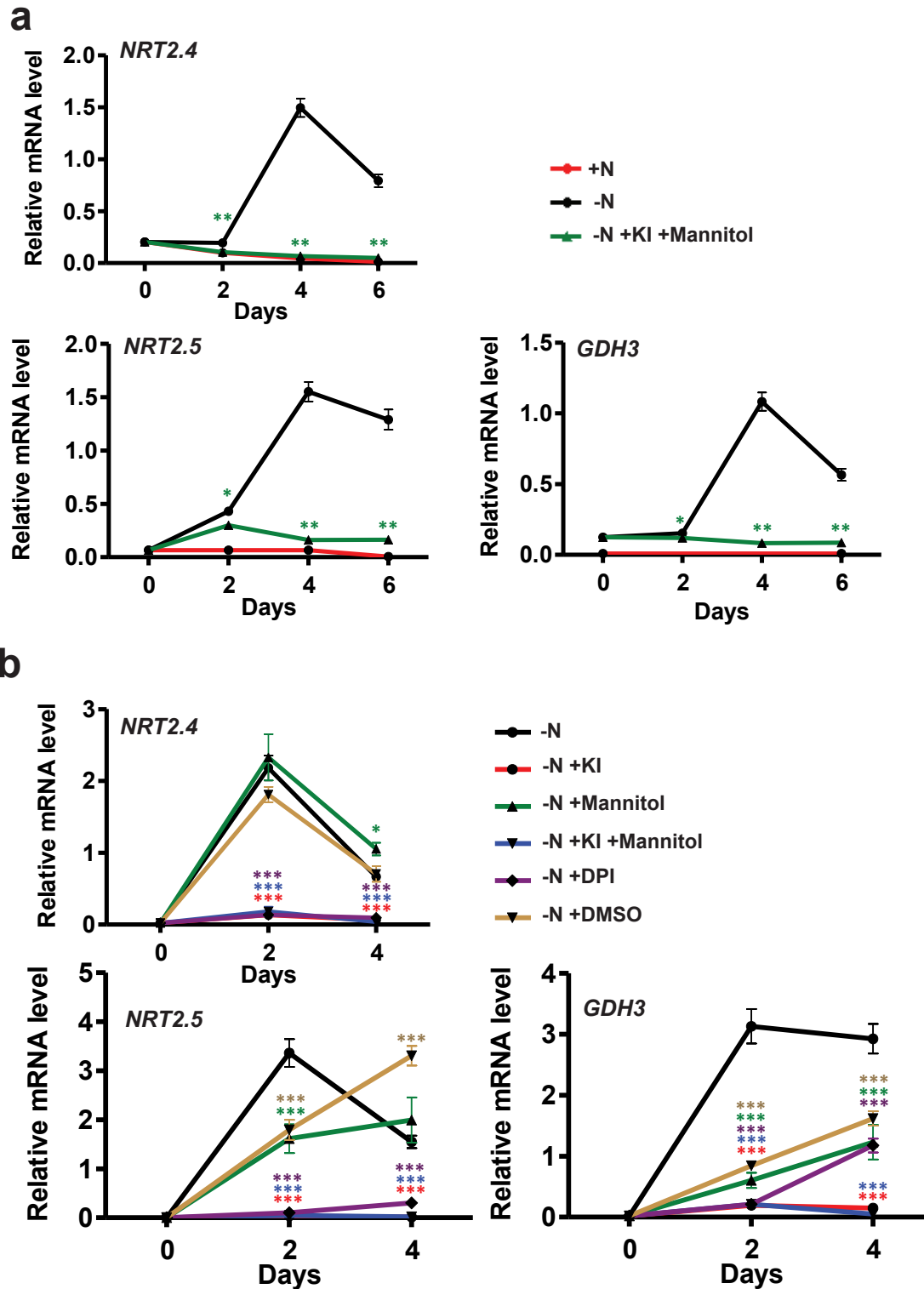


Figure 6. ROS is necessary for the NSR response. (a) Altered response of *NRT2.4*, *NRT2.5* and *GDH3* by KI-mannitol treatment. Plants are grown in sterile hydroponic conditions on N-containing media for 14 days. Thereafter, the media is shifted to –N conditions containing or not 5 mM of KI and 5 mM of mannitol for 0, 2, 4, 6 days or +N as a control. (b) Altered response of *NRT2.4*, *NRT2.5* and *GDH3* by ROS scavenger treatment. Plants are grown in sterile hydroponic conditions on N containing media for 14 days. Then plants were transferred to –N or +N conditions for 0, 2, 4 days. In parallel, some of the N starved plants were treated with 5 mM KI, 5 mM mannitol, combination of both or with 10 μ M DPI. DMSO was used as mock treatment of DPI. All transcript levels were quantified by qPCR and normalized to two housekeeping genes (*ACT* and *CLA*), values are means $\pm$ s.e.m (n = 4).

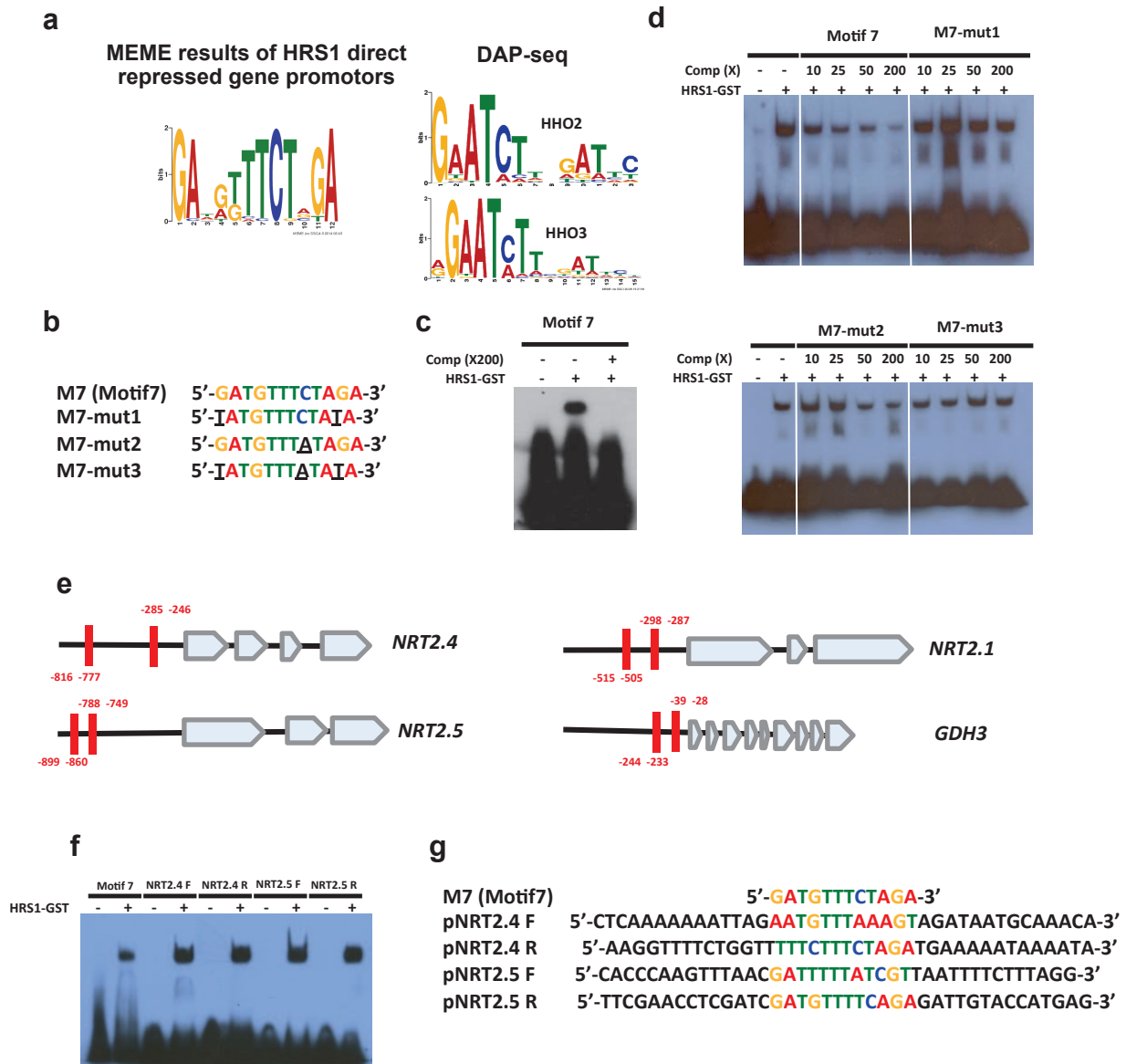


Figure 7. Identification of a new HRS1 *cis*-regulatory element and binding of HRS1 to the *NRT2.4* and *NRT2.5* promoters. (a) HHOs target motifs. Weight matrix representation of the motifs retrieved by the MEME algorithm analysis from the 500 bp sequences upstream the transcription start sites of the down-regulated HRS1-target genes. HHO2 and HHO3 *cis* motifs retrieved by DAP-seq (O'Malley et al., 2016). **(b)** Wild-type and mutated forms of the HRS1 target motif used in EMSA in **c** and **d**. **(c)** EMSA analysis on 48bp (4X repetition of HRS1 target motif); Biotin-TEG labeled DNA probes (20 fmol), GST:HRS1 protein (150 ng). 200X excess of the cold version of the same DNA probes was added in the third well. **(d)** EMSA analysis on 48bp (4X repetition of motifs listed in **b**); different concentrations of the cold version of the motif or of the 3 mutated forms were added each time. **(e)** Schematic representation of *NRT2.4*, *NRT2.5*, *NRT2.1* and *GDH3* genes showing potential HRS1 *cis*-motif in their promoters. **(f)** EMSA analysis on 40-bp promoter fragments of *NRT2.4* and *NRT2.5*. **(g)** List of the promoter fragments sequences as well as HRS1 target motif used for EMSA analysis. Two promoter fragments sequences were tested for each gene.

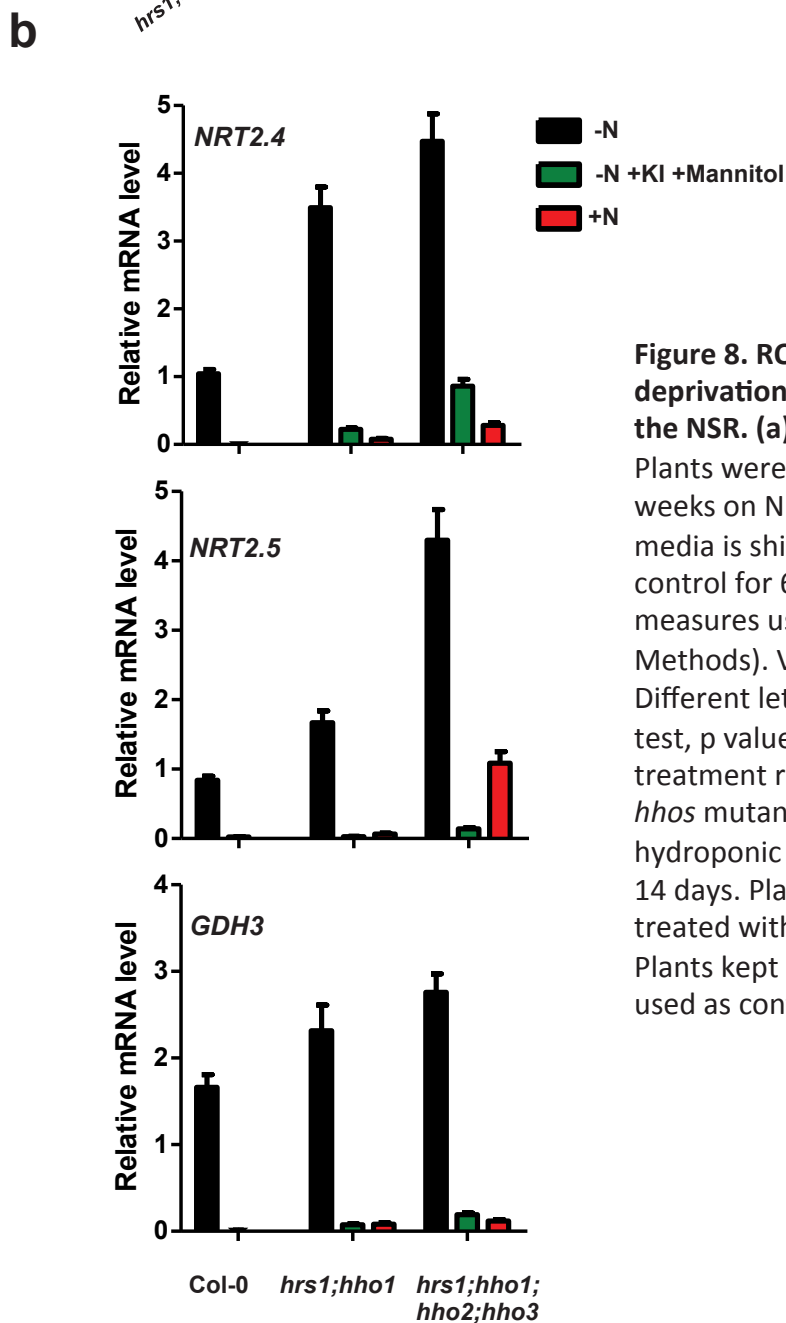
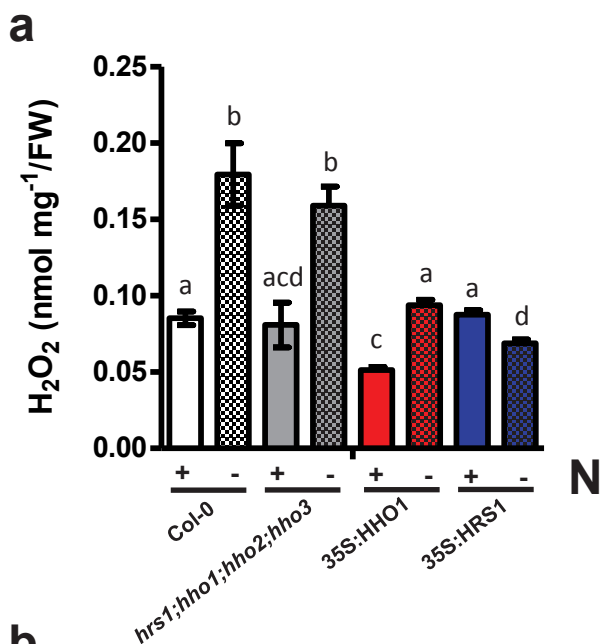


Figure 8. ROS is produced early after nitrogen deprivation, regulated by HRS1 and crucial for the NSR. (a) H_2O_2 production after N deprivation. Plants were grown in non-sterile hydroponics for 6 weeks on N containing media. Thereafter the media is shifted to $-N$ conditions or $+N$ as a control for 6 hours. H_2O_2 accumulation were measures using Amplex Red (see Material and Methods). Values are means $\pm$ s.e.m ($n=6$). Different letters means significantly differences (T-test, p value < 0.05). **(b)** ROS scavenging treatment represses NSR sentinel genes in the *hho*s mutants. Plants are grown in sterile hydroponic conditions on N containing media for 14 days. Plants are then N-deprived for 3 days and treated with 5 mM of KI and 5 mM of mannitol. Plants kept on the same renewed media were used as control. Values are means $\pm$ s.e.m ($n=4$).

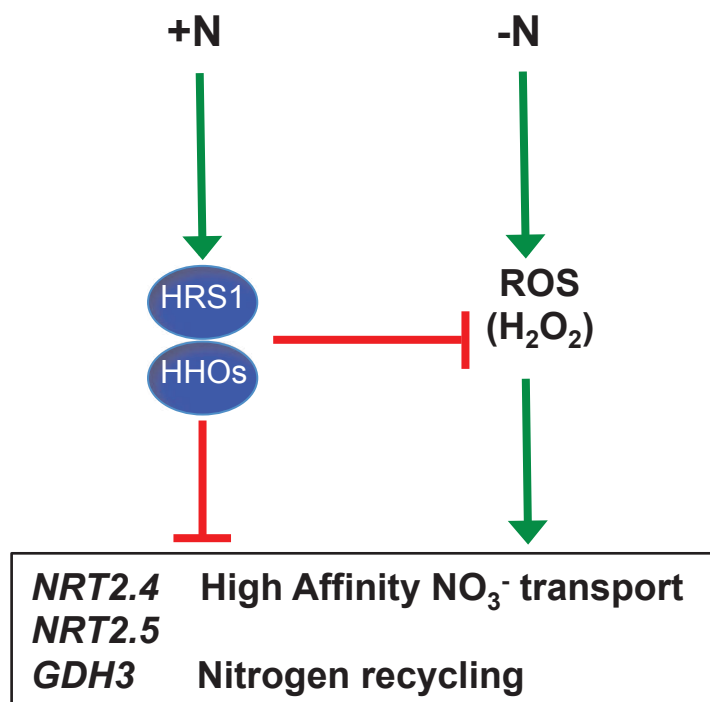
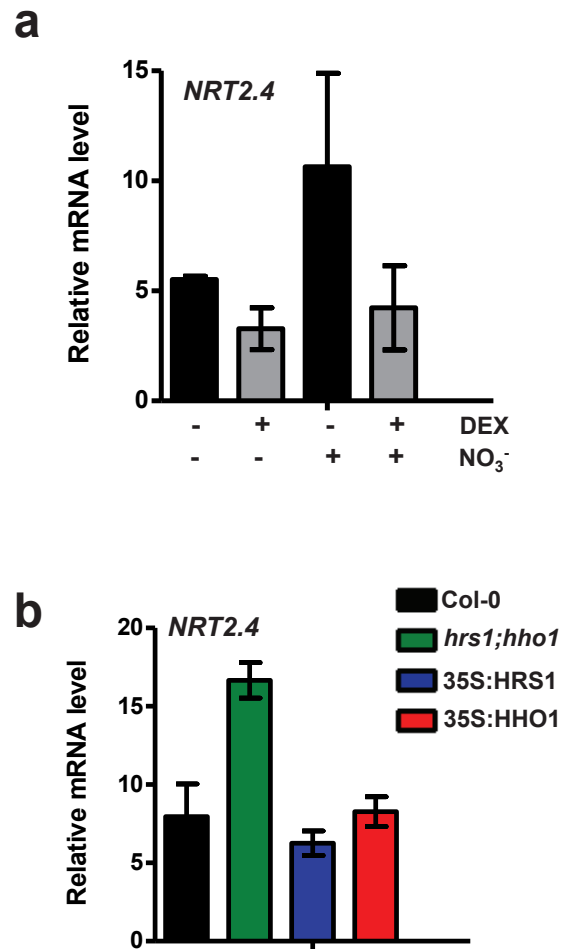
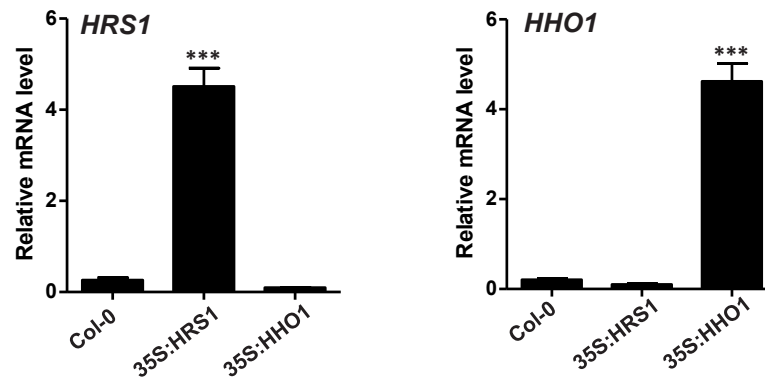


Figure 9. Proposed model of the regulation of NSR by HHOs and ROS. On –N conditions, ROS are produced and are needed for the NSR induction. When Nitrogen is present in the media, HRS1 and its homologs are rapidly and highly expressed to repress the NSR either directly by regulating the *NRT2* and *GDH3* promoter activities or indirectly by reducing ROS production.

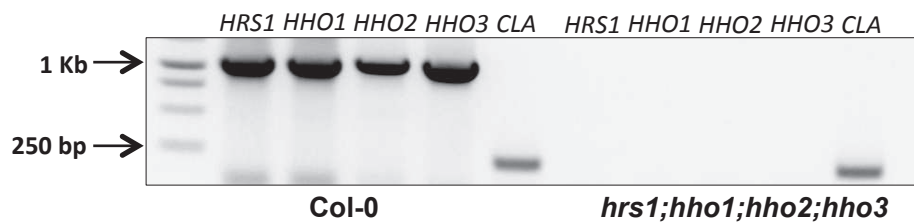


Supplementary Figure 1. *NRT2.4* is down-regulated by HRS1 and HHO1. (a) HRS1 TARGET shows a direct repression of *NRT2.4* in Arabidopsis root protoplasts data from Medici et al., (2015) (b) *NRT2.4* transcripts level in Wild-type, *hrs1;hho1*, 35SHRS1 and HHO1 genotypes ⁴⁶ (data from Medici et al, (2015)).

a



b

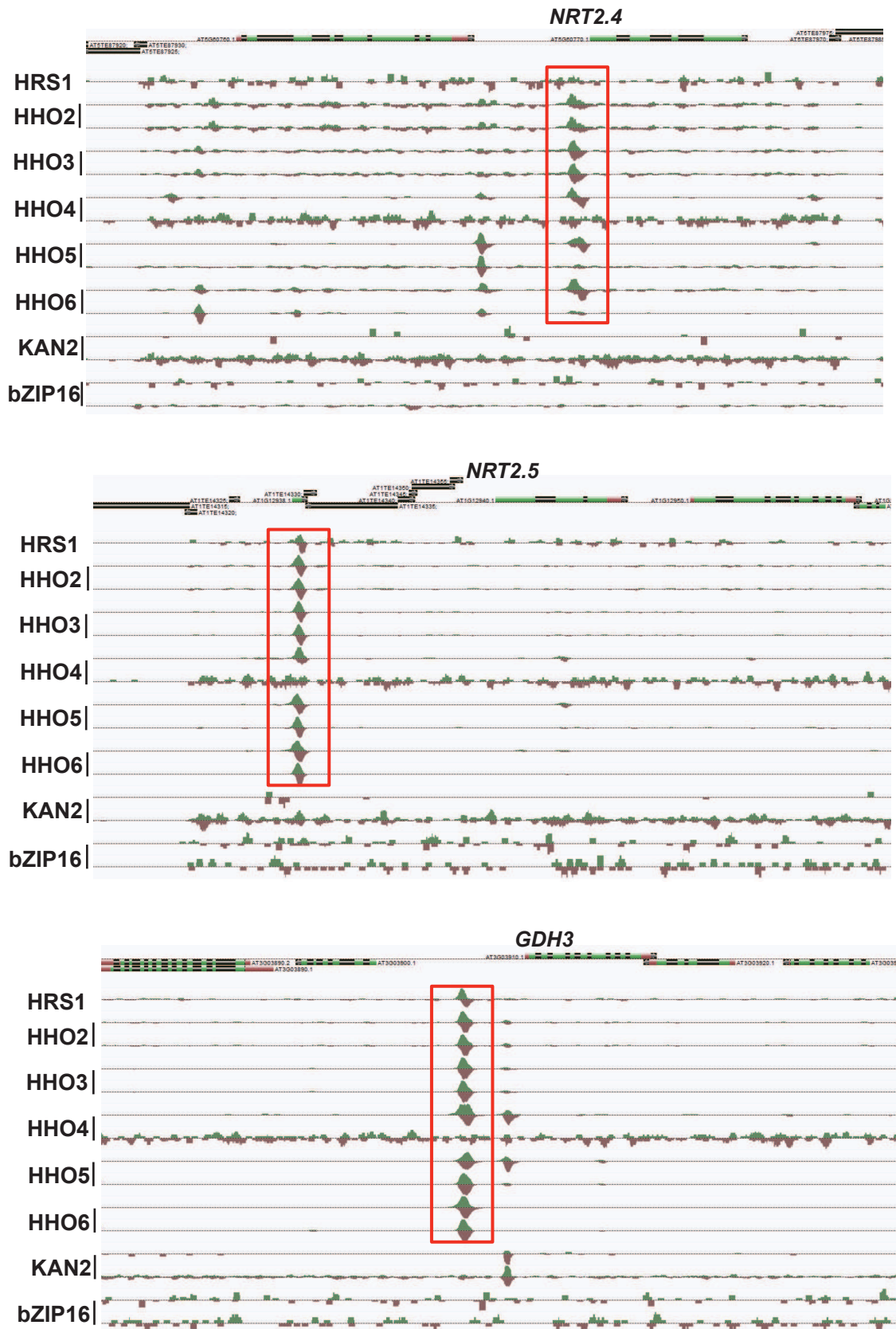


Supplementary Figure 2. Characterization of quadruple mutant and OE lines.

(a) Characterization of *HRS1* and *HHO1* mRNA relative accumulations in *35S:HRS1* and *35S:HHO1* transgenic plants. (b) Characterization of the *hrs1/hho* quadruple mutant. The absence of full length transcripts for *HRS1*, *HHO1*, *HHO2* and *HHO3* was verified by RT-PCR (PCR ATG-Stop) on mRNA isolated from roots of *hrs1;hho1;hho2;hho3* mutant grown for 14 days on MS/2 media (Clathrin is used as control).



Supplementary Figure 3. *hrs1;hho1* double mutant displays growth phenotype in +N conditions. Representative pictures of Col and the *hrs1;hho1* double mutant. Plants were grown for 6 weeks on N containing non-sterile hydroponics (0.5 mM NH_4NO_3).



Supplementary Figure 4. HHOs binding evidences in *NR2.4*, *NRT2.5* and *GDH3* promoters. Data from DAP-seq (O'Malley et al., 2016) showing binding peaks of HHO family TFs in *NR2.4*, *NRT2.5* and *GDH3* promoters. KAN2 (GARP family) and bZIP16 binding profiles were used as controls. The second line of each TF correspond to the demethylated DNA version (ampDAP-seq) used for DAP-seq binding.

3. Conclusion et perspectives

L'ensemble des résultats obtenus dans cette partie montre que HRS1 fonctionne de manière redondante avec ces homologues (HHO1 à HHO3) pour inhiber la réponse à la carence en azote. Cette inhibition se fait *via* une répression directe des gènes marqueurs de cette voie de signalisation par ces FT. Ainsi comparé au sauvage, le quadruple mutant *hrs1;hho1;hho2;hho3* est affecté dans le niveau d'expression des gènes *NRT2.1*, *NRT2.4* et *NRT2.5* conduisant à une meilleure capacité à transporter le nitrate. En utilisant d'autres approches (crible simple hybride sur le promoteur de *NRT2.4*, délétions de promoteurs fusionnés au gène rapporteur GUS), les mêmes résultats ont été obtenus par un laboratoire japonais (Kiba, Submitted).

Dans nos expériences nous montrons aussi que l'établissement de la NSR dépend étroitement des ROS et qu'un défaut de production de ROS affecte profondément cette réponse. Une production de ROS suite à des carences nutritionnelles est un phénomène connu depuis quelques années (Shin et al., 2005; Shin and Schachtman, 2004), mais leur implication dans la régulation de la NSR est une nouveauté. Récemment, un mécanisme de fixation de monoxyde d'azote ('NO) a été rapporté chez *Arabidopsis*. L'assimilation du 'NO atmosphérique constitue une alternative pour des plantes cultivées dans des conditions limitées en azote (Kuruthukulangarakoola et al., 2017).

Outre la régulation directe des gènes de la NSR, la famille HRS1/HHO semble aussi contrôler la réponse à la carence en N indirectement en inhibant l'accumulation des ROS. Des facteurs de transcription de la famille G2-like, GLK1/2 et PHL1, se sont révélés aussi être impliqués respectivement dans la tolérance de l'ozone (fait partie des ROS) (Nagatoshi et al., 2016) et dans l'accumulation de proline suite à la carence en phosphate (Aleksza et al., 2017). La proline étant un acide aminé impliqué dans la détoxification des ROS (Chen and Dickman, 2005; Gill and Tuteja, 2010; Trovato et al., 2008).

Des expériences complémentaires sont en cours pour confirmer la régulation de la production des ROS par les HHOs. Des études sur des mutants NADPH oxydases seront également réalisées dans le but d'identifier le mécanisme génétique qui associerait les ROS à la NSR.

Chapitre 5: HRS1 est-il un FT qui régule à la fois des gènes nucléaires et des gènes plastidiaux?

1. Introduction et contexte

Les organismes eucaryotes supérieurs ont besoin de coordonner et d'harmoniser le fonctionnement de leurs organites *via* un réseau de signalisations intracellulaires inter-organelles (Brautigam et al., 2009; Grimm et al., 2014). Les signaux qui partent du noyau pour réguler le fonctionnement des organites sont groupés sous le nom de signalisation antérograde et ceux qui vont dans le sens opposé constituent la signalisation rétrograde (Grimm et al., 2014). Parmi ces organites, les mitochondries et les plastes (issus de l'endosymbiose d'une cellule eucaryote primitive avec respectivement une α -protéobactérie et une cyanobactérie) montrent une complexité particulière dans leur structure et les processus de signalisation associés (Andersson et al., 1998; Douglas and Raven, 2003; Gray, 1992; Ochoa de Alda et al., 2014).

La coévolution entre les plastes primitifs et les premières cellules végétales a donné lieu à différents types de plastes (Leon et al., 2012). Les proplastides sont les progéniteurs de tous les autres types de plastes. Ils ne possèdent pas de couleur ni une morphologie distincte. Les plastes photosynthétiques sont appelés chloroplastes et bien qu'ils soient principalement associés à la photosynthèse au niveau des feuilles, ils sont également présents dans les fruits immatures, les cotylédons et les embryons. Dans des conditions de privation de lumière, les proplastides peuvent se transformer en étioplastes caractérisés par leur couleur jaune en raison de l'accumulation de protochlorophylle. Les proplastides peuvent également évoluer pour donner des chromoplastes ou des leucoplastes. Les chromoplastes contiennent des teneurs élevées en caroténoïdes et se trouvent dans les organes colorés tels que les pétales et les fruits. Les leucoplastes par contre, sont incolores et peuvent être classés en 3 types selon la substance stockée: les oléoplastes (lipides), les protéinoplastes (protéines) ou les amyloplastes (amidon) (Neuhaus and Emes, 2000; Vothknecht and Westhoff, 2001). Ces derniers sont présents dans les tissus de stockage et dans les racines et peuvent se différencier en organites spécialisés impliqués dans la perception de la gravité, ils sont alors appelés statolithes (Sack, 1997 #2673; Kordyum, 2001 #2671}.

Bien que les signaux plastidiaux soient communément associés à des régulations de l'expression des gènes nucléaires codant des protéines plastidiales, il est cependant vraisemblable que les signaux rétrogrades sont apparus avant même le transfert des gènes plastidiaux vers le noyau. En effet, suite à son intégration endosymbiotique et contrairement à la cellule hôte, le chloroplaste primitif aurait nécessité de la lumière pour sa prolifération. Par conséquent, pour maintenir l'association endosymbiotique, la cellule hôte aurait synchronisé sa

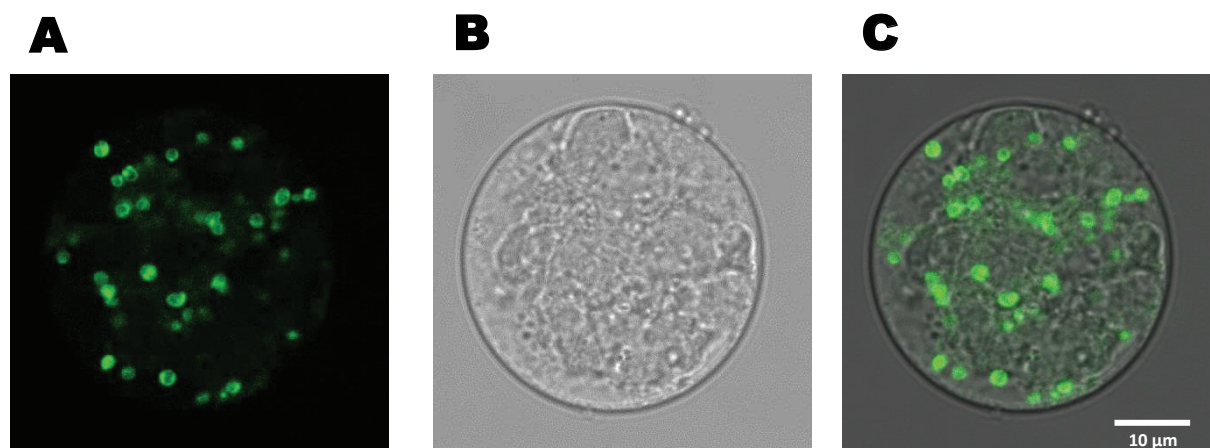


Figure 5.1. Observation microscopique de protoplastes de racines exprimant la protéine de fusion HRS1:GFP.

A) Signal GFP, **B)** Lumière blanche, **C)** Superposition des deux premiers.

prolifération avec la division de l'endosymbiote ce qui suggère qu'un signal rétrograde a été établi depuis les premiers jours de l'évolution des chloroplastes (Tanaka and Hanaoka, 2012). Les signaux rétrogrades générés par les plastides peuvent être classés en plusieurs catégories: l'expression des gènes plastidiaux (Ahlert et al., 2003), les ROS et l'état redox des plastides (Kim et al., 2008; Rochaix, 2001; Triantaphylides and Havaux, 2009), les intermédiaires de la biosynthèse des tétrapyrroles comme le Mg-Protoporphyrine IX (Beck, 2005; Surpin et al., 2002), les métabolites dérivés de plastides tels que le 3-phosphoadénosine 5'-phosphate (PAP), le méthylérythritol cyclodiphosphate (MEcPP), et le β -cyclocitral (Estavillo et al., 2012), l'acide abscissique (ABA) (Baier et al., 2004) et les protéines (Isemer et al., 2012; Sun et al., 2011). De manière intéressante, les plastides peuvent développer certains tubules appelés stromules leur permettant de se connecter physiquement au noyau (Hanson and Sattarzadeh, 2008).

Les protéines sont principalement impliquées dans les signaux antérogrades plutôt que rétrogrades puisque 95% des protéines plastidiales sont codées dans le noyau et importées dans les plastides après avoir été traduites dans le cytoplasme (Barbrook et al., 2006). Celles impliquées dans la signalisation rétrograde sont généralement des FT à double localisation cellulaire telles que WHIRLY1 (Isemer et al., 2012) et PTM (Sun et al., 2011). Contrairement à PTM qui nécessite un clivage protéolytique pour pouvoir être transloquée de la membrane externe du chloroplaste vers le noyau, le mécanisme responsable de la translocation de WHIRLY1 demeure inconnu puisque ses deux formes plastidiale et nucléaire ont le même poids moléculaire (Estavillo et al., 2012). À notre connaissance, les protéines connues pour avoir à la fois une localisation nucléaire et plastidiale ne sont pas nombreuses chez *Arabidopsis* (Krause and Krupinska, 2009). En plus de WHIRLY1 et PTM, on en compte seulement 7 : MFP1 (Samaniego et al., 2006), STEP1 (Kwon and Chung, 2004), CDT1 (Raynaud et al., 2005), ATXR5 (Raynaud et al., 2006) et AT2G44940 (Schwacke et al., 2007), IPT3 (Galichet et al., 2008) et HMR/pTAC12 (Chen et al., 2010).

À l'exception d'APL détecté à la fois au noyau et à la mitochondrie (Carrie et al., 2009), aucune double localisation n'a été rapportée au sein de la famille GARP. Cependant, une localisation plastidiale a été suggérée pour At2g02060 (Melonek et al., 2012) PHL1, OsPHR1 et Os03g45194 (Schwacke et al., 2007) appartenant toutes au sous-groupe G2-like (Safi et al., 2017). Par ailleurs, GLK1 et GLK2 sont impliqués dans la biogenèse et le développement des chloroplastes ainsi que dans la régulation de la machinerie photosynthétique (Fitter et al., 2002; Waters et al., 2009), ce qui suggère que ces deux FT pourraient réguler des gènes chloroplastiques. Ainsi, une expression ectopique de leurs gènes respectifs dans les racines

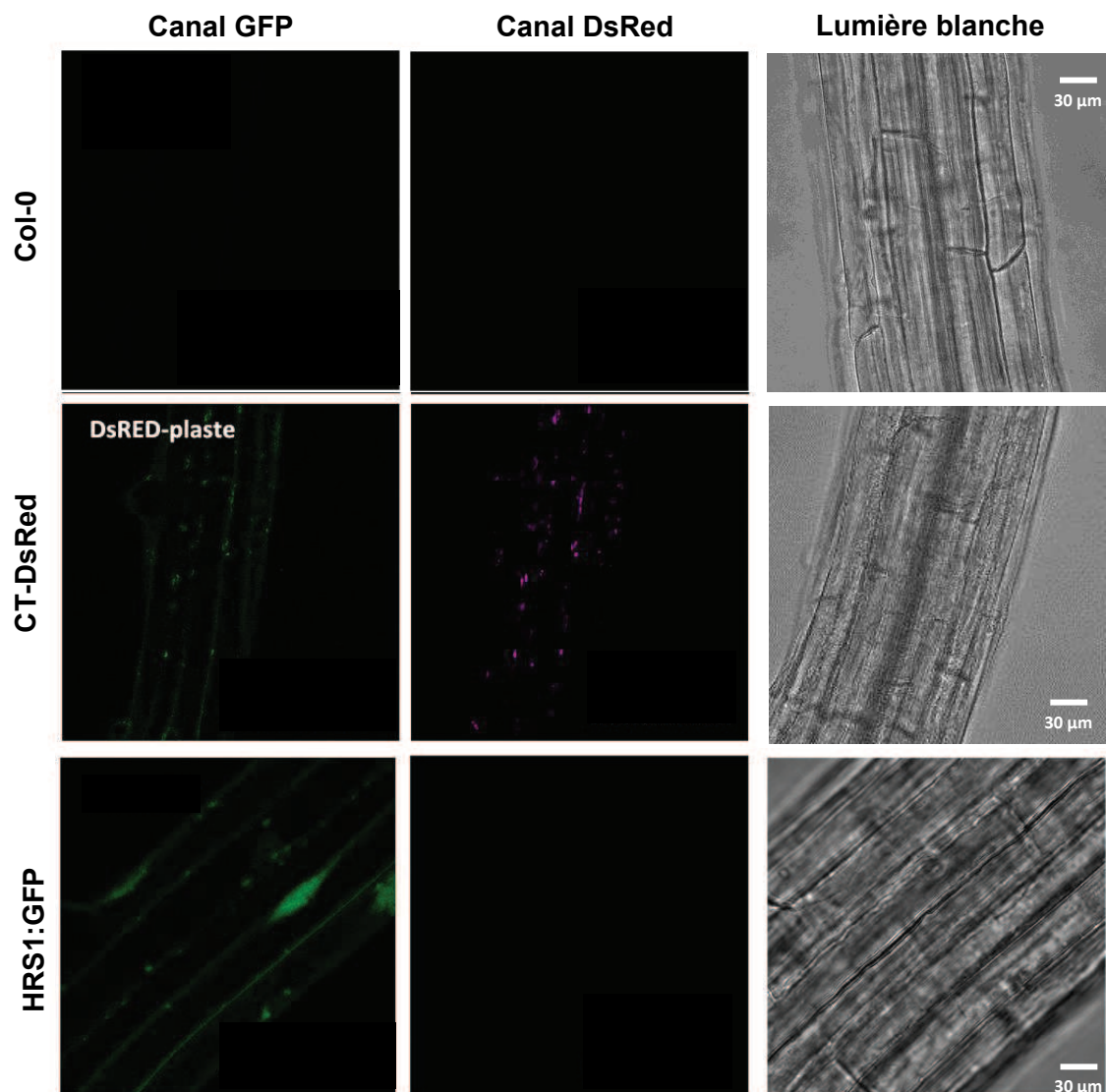


Figure 5.2. Observation au microscope confocale des lignées HRS1:GFP et CT:DsRed.

Les plantes ont été cultivées 1 semaine sur MS/2.

Canal vert : excitation à 488 nm et émission à 500-535 nm.

Canal DsRed: excitation à 546 nm et émission à 586 nm.

La lignée CT:DsRed émet un signal détecté dans le spectre d'émission de la GFP ce qui n'est pas pratique pour des expériences de colocalisation.

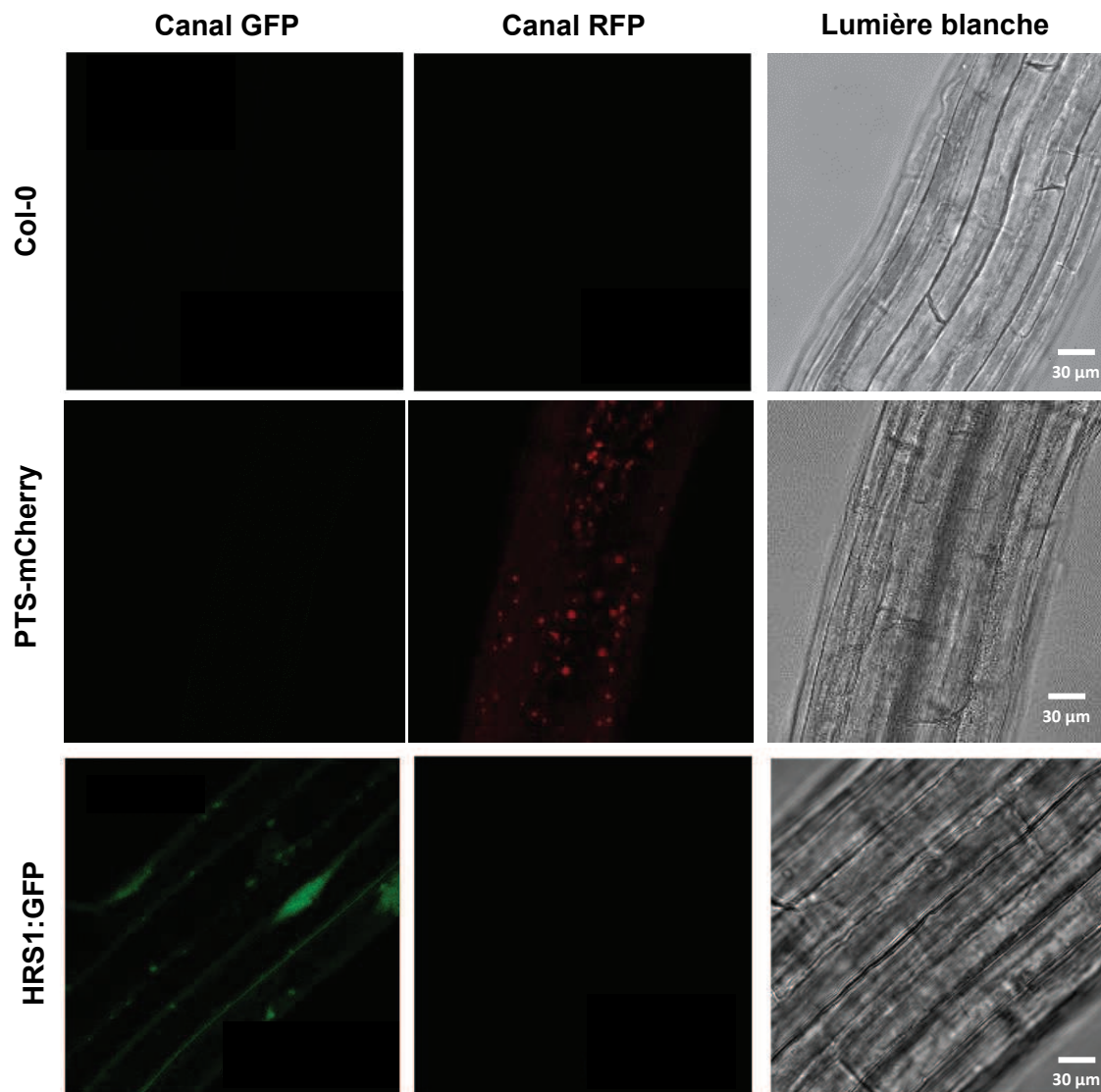


Figure 5.3. Observation au microscope confocale des lignées HRS1:GFP et PTS:mCherry.

Les plantes ont été cultivées 1 semaine sur MS/2.

Canal GFP: excitation à 488 nm et émission à 500-535 nm.

Canal RFP: excitation à 587 nm et émission à 610 nm.

La barre blanche correspond à 30 µm.

Aucun problème de spécificité de signal observé chez les deux lignées.

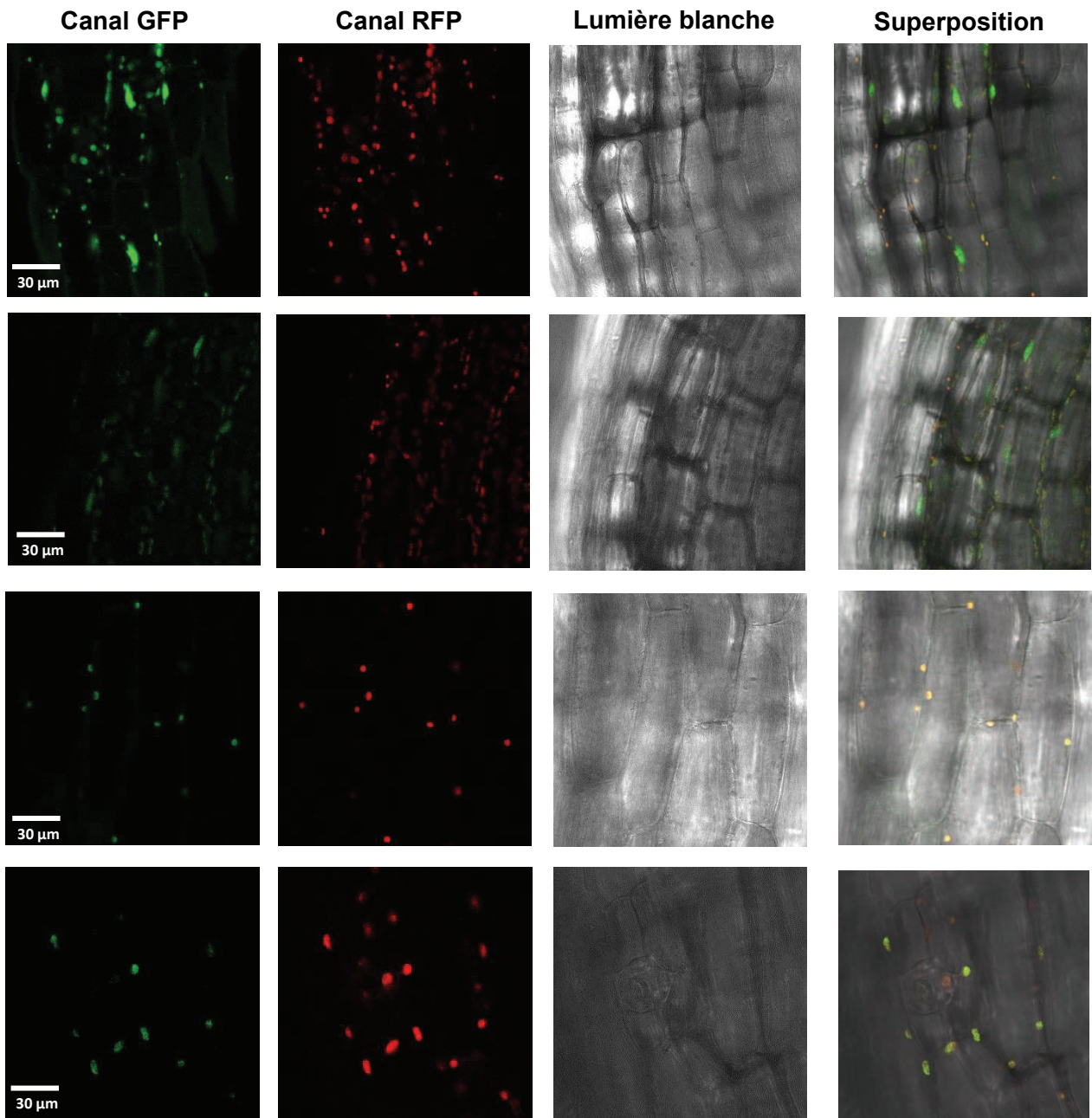


Figure 5.4. Colocalisation des deux protéines HRS1:GFP et PTS:mCherry dans les plastes.

Des plantes issues du croisement HRS1:GFP X PTS:mCherry ont été cultivées 1 semaine sur MS/2.

Canal GFP: excitation à 488 nm et émission à 500-535 nm.

Canal RFP: excitation à 587 nm et émission à 610 nm.

conduit à l'apparition de chloroplastes dans ces organes habituellement non photosynthétiques (Kobayashi et al., 2012).

Dans nos observations microscopiques de la protéine de fusion HRS1:GFP, deux types de signal ont été détectés, un signal nucléaire et un autre signal dans des petits compartiments cellulaires (Figure 1.10) (Medici et al., 2015). De manière intéressante et grâce à l'approche TARGET (Bargmann et al., 2013), des gènes plastidiaux se sont révélés être des cibles potentiellement directes d'HRS1 tels que (AtCg00630, AtCg01090, AtCg01120, AtCg00210 (Medici et al., 2015)) et (AtCg00020, AtCg01120, AtCg01080, AtCg00270 (Safi, submitted)). En tenant compte de toutes ces données nous avons suggéré que HRS1 pourrait être une protéine à double localisation nucléaire et plastidiale.

Mon premier objectif était alors de démontrer que les compartiments cellulaires marqués par la GFP sont effectivement des plastes. Nous voulions par la suite trouver une corrélation entre les différents adressages de la protéine HRS1 (au noyau et aux plastes) et son rôle dans la régulation de la NSR (rôle des HHOs décrit dans le chapitre précédent).

2. Résultats et discussion

Dans le but de confirmer que les marquages sub-cellulaires non-nucléaires observés dans les racines sont des vrais organites et ne sont pas des artéfacts, des protoplastes issus des racines de la lignée exprimant la fusion HRS1:GFP ont été générés. En parallèle, des protoplastes de plantes sauvages ont été transformés par le vecteur contenant la cassette pHRS1:HRS1:GFP. Les constructions stables ainsi que les transitoires ont confirmé que la protéine chimère HRS1:GFP est exprimée dans des petits organites (Figure 5.1). De manière intéressante, très peu de localisation nucléaire a été retrouvée dans les protoplastes exprimant HRS1:GFP. Cette localisation ponctiforme est de loin majoritaire.

J'ai ensuite entrepris une analyse bioinformatique de la protéine. Le tableau 2.9 illustre les outils de prédiction de la localisation cellulaire utilisés. Mis à part TargetLoc qui arrive à prédire une localisation plastidiale d'HRS1 avec un score non significatif, aucun autre logiciel ne prédit HRS1 comme protéine plastidiale. C'est plutôt sa localisation nucléaire qui est prédite. Ces prédictions ne signifient pas que la protéine ne peut pas aller aux plastes puisqu'il a été estimé que ~ 35% des protéines plastidiales ne sont pas prédites comme telles (Kleffmann et al., 2004). Ceci est dû à la diversité des peptides de transit et de l'absence d'une séquence consensus. De plus, plusieurs protéines sont conduites aux plastes dans des vésicules dérivées

PSORT Prediction

(using the form-filling feature of HTML)

Query Information

```
ORIGIN plant
BEGIN
>AT1G13300
MIKKFSNMDY NQKRERCQY IEALEEERRK IHVFORELPL CLDLVTQAIE
AKKRELPEMT TENMYGQPEC SEQTGECGP VLEQFLTIKD SSTSNEEDE
EFDDEHGNHD PDNDSKDNT KSDWLKSVQL WNQPDHPLP KEERLQETM
TRDESMRKDP MVNGGEGRRK EAEKGGGGR KQRCWSSQL HRRFLNALQH
LGPPHVATPK QIREFMKVDG LTNDEVKSHL QKYRLHTRRP RQTVPNNGNS
QTQHFVVVG LWVPQSDYST GKTGATTG STTTTGIYG TMAAPPPQW
PSHSNYRPSI IVDEGSGSHS EGVVVRCS SP AMSSSTRNHY VKNN
```

Alanine 51

Result Information

```
PSORT --- Prediction of Protein Localization Sites
                                         version 6.4(WWW)
HRS1          344 Residues
Species classification: 5

*** Reasoning Step: 1

GvH: Examining signal sequence (von Heine)
Signal Score (-3.5): 0.76
Possible cleavage site: 51
>>> Seems to have no N-terminal signal seq.
```

Figure 5.5. HRS1 possède un site potentiel de clivage.

L'Alanine 51 est prédite par l'algorithme PSORT Prediction, comme un site de clivage possible d'HRS1.

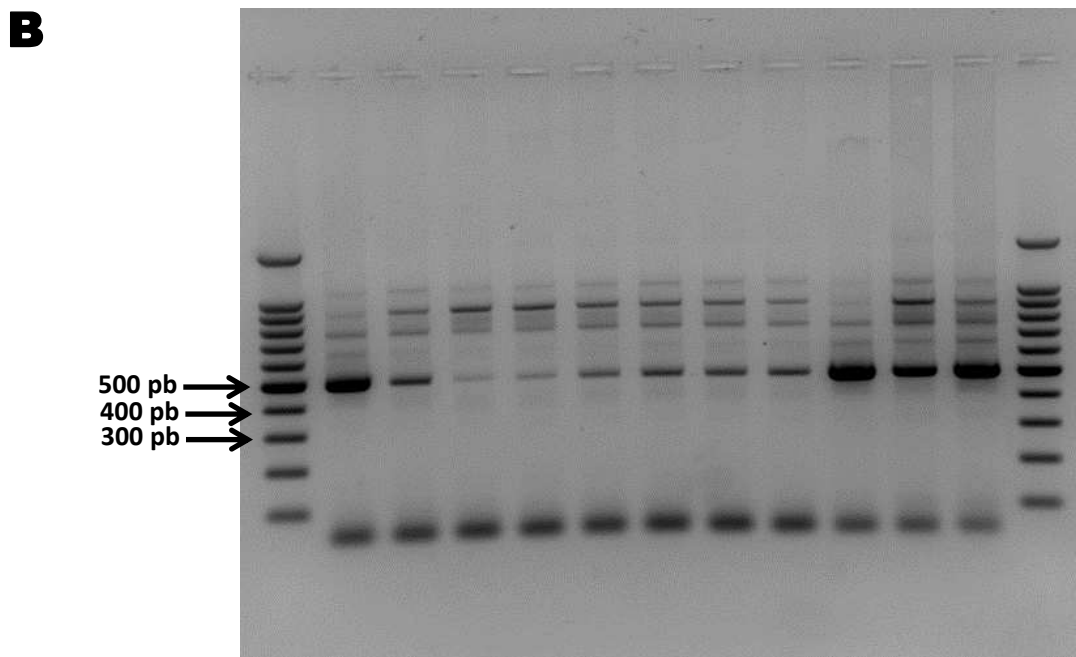
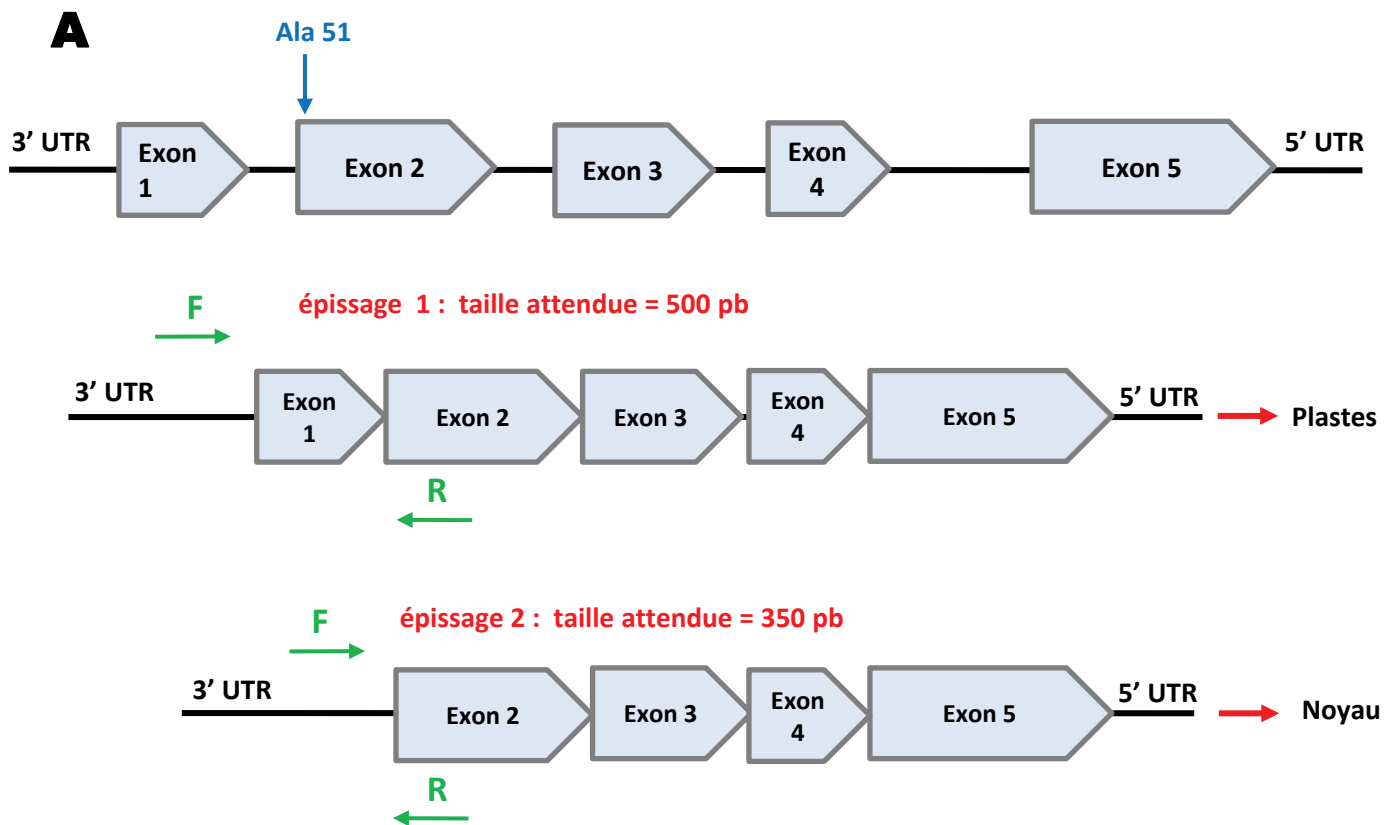


Figure 5.6. *HRS1* semble ne pas être alternativement épissé.

A) Modèle suggérant l'épissage alternatif d'*HRS1* et l'emplacement des amorces.

B) PCR sur des ADNc de plantules d'*Arabidopsis* issus de différentes conditions (feuilles, racines, âge, traitements, source d'azote...).

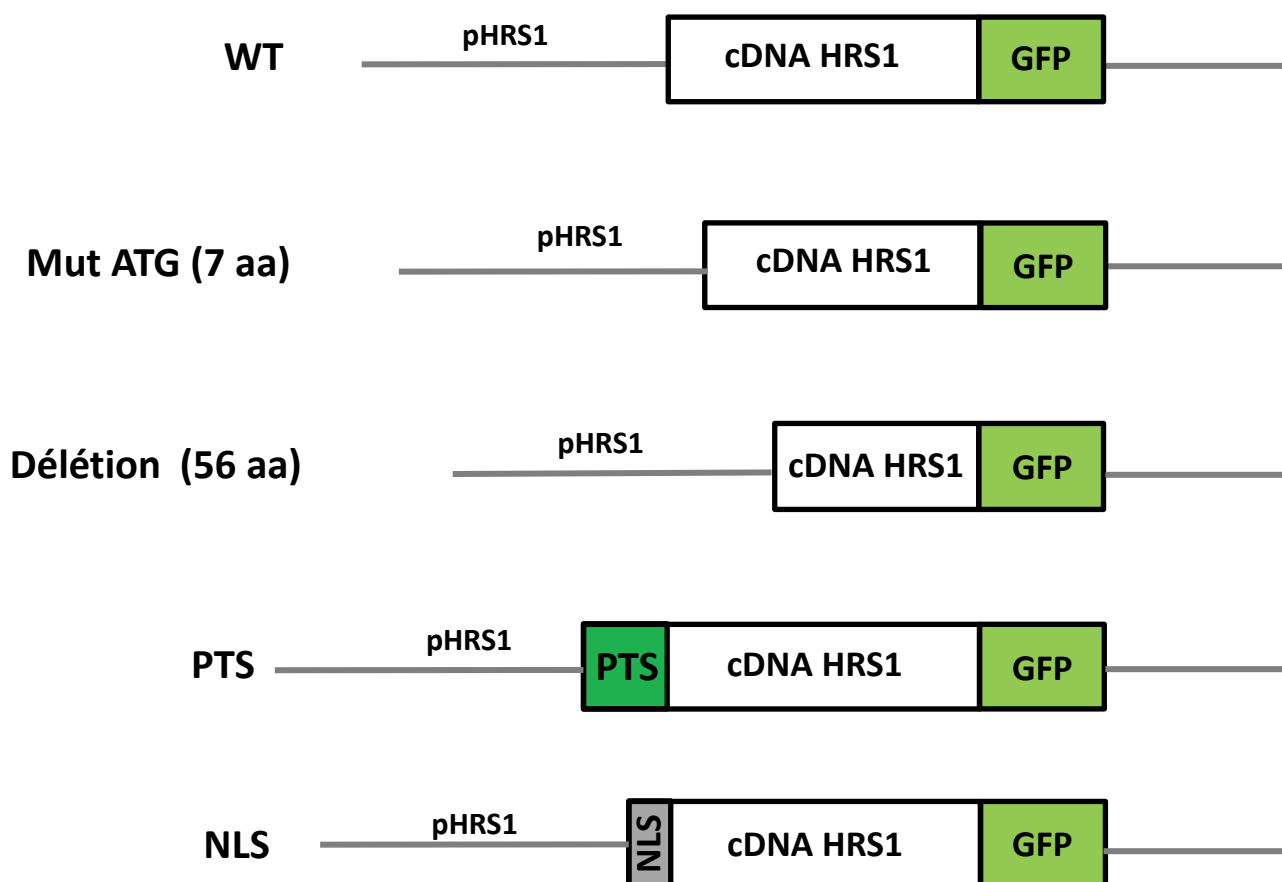


Figure 5.7. Représentation schématique des différentes constructions utilisées pour perturber la localisation cellulaire d'HRS1:GFP.

WT: version sauvage d'HRS1:GFP; Mut-ATG: délétion de 7 acides aminés; Délétion: délétion de 51 acides aminés; PTS: insertion d'une séquence de transit aux plastides; NLS: insertion d'une séquence de localisation nucléaire; pHRS1: promoteur natif d'HRS1 (3 Kb).

du système endomembranaire, qui implique le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Gagat et al., 2013). Récemment, Wollman (Wollman, 2016) a proposé que les peptides signals pourraient avoir une origine antimicrobienne. En effet, des similarités entre peptides antimicrobiens et peptides de transit ont été démontrés à différents niveaux: séquences (Wollman, 2016), structures (Bruce, 2000; Kustanovich et al., 2002) et fonctions (capacité de déstabiliser la bicouche lipidique (Dathe and Wieprecht, 1999; Wieprecht et al., 2000) et activité antimicrobienne (Hugosson et al., 1994)). On peut alors imaginer que la diversité des séquences de transit provient de la diversité des peptides antimicrobiens.

Puisque nous supposons que ces organelles sont des plastides du fait de leur structure (Figure 5.1) et par les arguments évoqués précédents, des croisements pHRS1:HRS1:GFP x CT:DsRed ont été effectués. Les plantes CT:DsRed expriment un peptide d'adressage aux chloroplastes (CT: Chloroplast Targeting) fusionné à la DsRed permettant des études de colocalisation. Contre toute attente, et malgré son nom, j'ai observé que la DsRed émettait un signal très fort détecté même dans le spectre d'émission de la GFP (Figure 5.2), ce qui rend impossible la confirmation de la colocalisation des deux protéines.

Pour cela, d'autres croisements ont été effectués entre la lignée pHRS1:HRS1:GFP et la lignée PTS:mCherry que j'ai générée (PTS: Plastid Targeting Sequence). Cette fois, la mCherry n'est pas détectée dans le canal vert (Figure 5.3). L'étude de colocalisation entre HRS1:GFP et PTS:mCherry a mis en évidence (Figure 5.4) la présence d'HRS1-GFP dans les plastides.

En règle générale, les peptides d'adressages sont situés dans la partie N-terminale de la protéine (Gagat et al., 2013; Patron and Waller, 2007). En particulier, HRS1 possède une Alanine en position 51 qui est un site potentiel de clivage après la translocation aux plastides (PSORT Prediction) définissant ainsi une séquence de transit putative (Figure 5.5).

Par ailleurs, l'épissage alternatif est un phénomène largement observé chez les GARPs avec 97 variants d'épissage pour 56 gènes. Chez la sous-famille HHO, 4 homologues d'HRS1 sur 6 sont alternativement épissés (<https://www.arabidopsis.org/>).

Donc en combinant les deux informations précédentes, nous avons estimé qu'un épissage alternatif du premier intron d'*HRS1* serait un mécanisme élégant d'adressage d'HRS1 au noyau comme observé récemment pour la protéine GLYK dont la version longue est adressée aux chloroplastes alors que la version épissée se trouve dans le cytosol (Ushijima et al., 2017). Pour ce faire, des amorces de part et d'autres du premier exon ont été conçues (Figure 5.6A) pour faire des RT-PCR et éventuellement mettre en évidence ce phénomène. Des ADNc issus de différentes expériences ont été utilisés dans l'espoir de détecter deux bandes :

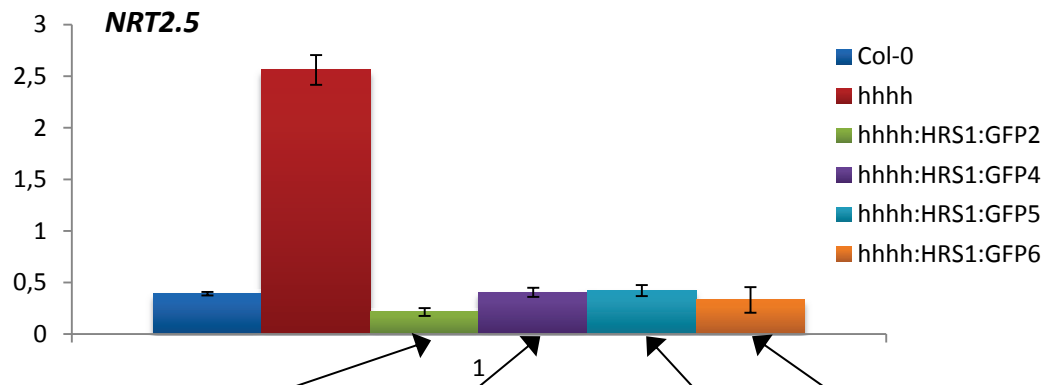
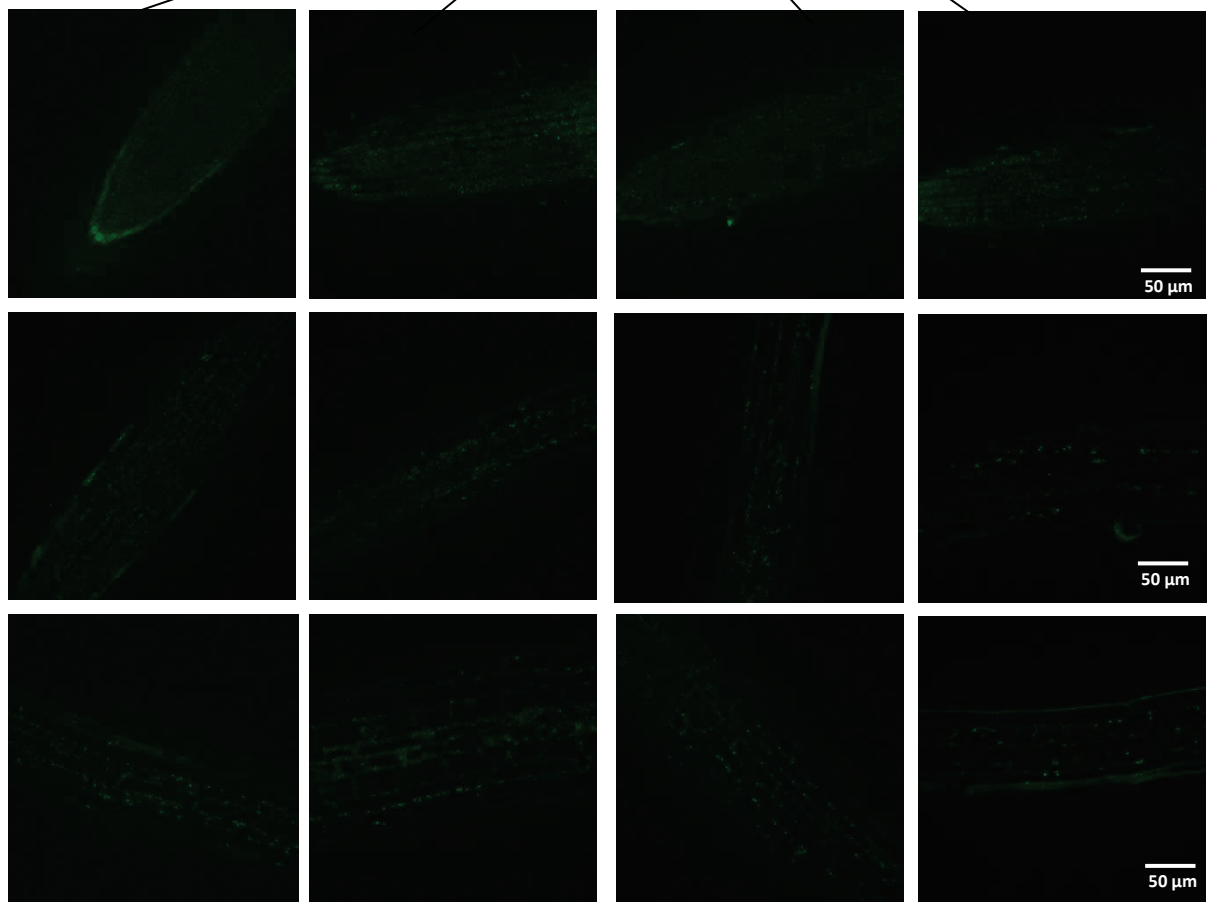
A**B**

Figure 5.8. Corrélation de la localisation cellulaire d'HRS1:GFP à la régulation de l'expression des gènes marqueurs de la NSR.

Les plantes sont cultivées 2 semaines en boîtes de Pétri en présence de 0,5 mM NH_4NO_3 .

A) Accumulation relative des transcrits de *NRT2.5* chez des mutants complémentés par la version sauvage d'HRS1:GFP.

B) Observations microscopiques de plantules exprimant la fusion HRS1:GFP. Chaque ligne représente 3 endroits différents de la même racine en partant de l'apex. Chaque colonne représente une lignée indépendante.

une de ~500 pb correspondant à la forme non-épissée, et une plus courte correspondant à la forme épissée. Malgré la présence de bandes surnuméraires de grandes tailles dues certainement à des artefacts de PCR (Figure 5.6B), aucune bande plus courte n'a été détectée. Donc cette hypothèse bien que probable, n'a pas pu être validée sur ces échantillons et avec cette technique.

Nous avons voulu ensuite explorer la fonction d'HRS1 dans les plastes. Pour ce faire ma stratégie a consisté à forcer l'adressage d'HRS1 en lui ajoutant des séquences de transit nucléaire et plastidiale forts. Ainsi, j'ai créé des constructions par Ω -PCR (Chen et al., 2013), pour lesquelles des séquences PTS (Plastid Targeting Sequence) ou NLS (Nuclear Localization Signal) ont été insérées en amont de la séquence codante d'HRS1 (Figure 5.7). J'ai aussi voulu créer des lignées dépourvues de la séquence N-terminale native d'HRS1 (Figure 5.7) pour tester son rôle dans la localisation d'HRS1. Malgré les difficultés techniques qui nous ont empêchés d'obtenir la construction contenant la plus grande délétion, j'ai obtenu une version mutée du premier ATG qui entraîne une délétion des 7 premiers acides aminés d'HRS1 (Figure 5.7).

La complémentation du quadruple mutant *hrs1;hho1;hho2;hho3* par ces constructions ainsi que par la version sauvage, a permis l'obtention de 4 types de lignées nommées WT, mut-ATG, PTS et NLS. Ces lignées ont été utilisées pour caractériser le rôle d'HRS1 dans les plastes et pour corrélérer les adressages de ce FT et son rôle dans la régulation de la NSR (chapitre 4).

Afin de répondre au mieux à ces questionnements, des observations microscopiques et des mesures d'accumulation des transcrits ont été réalisées en parallèle sur des plantules cultivées pendant une semaine sur 0,5 mM NH_4NO_3 (les mêmes conditions de cultures que celles utilisées dans les expériences de complémentation du quadruple mutant dans l'article). Les figures 5.8-5.11 illustrent le niveau d'expression des marqueurs de la NSR (représentés par *NRT2.5*) chez ces différents génotypes associé à des images qui montrent la localisation de la protéine HRS1:GFP. Comme prévu, toutes les lignées complémentées par la version sauvage de la fusion HRS1:GFP ainsi que toutes les lignées NLS (chez lesquelles HRS1 devrait avoir une localisation purement nucléaire) sont capables de compléter le phénotype du mutant (Figure 5.8 et 5.9). En se basant sur nos résultats (Safi, submitted) et sur ceux de (Kiba, Submitted) qui prouvent que HRS1 régule directement l'expression de *NRT2.4* et *NRT2.5* en se fixant sur leurs promoteurs, une localisation nucléaire d'HRS1:GFP était attendue. Paradoxalement, à l'exception de quelques cellules chez la lignée NLS1 qui ont un signal GFP

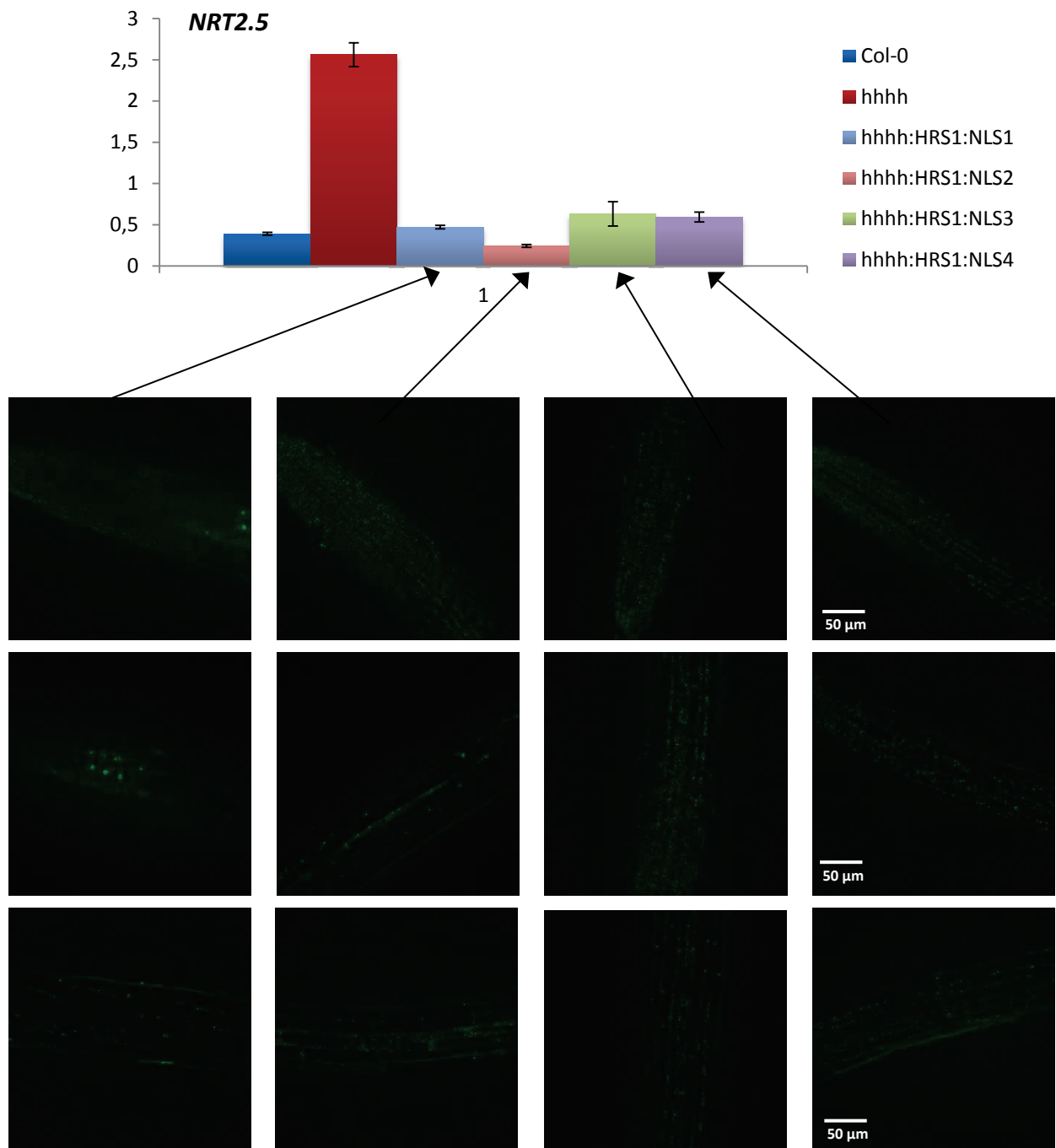
B

Figure 5.9. Corrélation de la localisation cellulaire d'HRS1:GFP à la régulation de l'expression des gènes marqueurs de la NSR.

Les plantes sont cultivées 2 semaines en boîtes de Pétri en présence de 0,5 mM NH_4NO_3 .

A) Accumulation relative des transcrits de *NRT2.5* chez des lignées NLS.

B) Observations microscopiques de plantules exprimant la fusion NLS:HRS1:GFP. Chaque ligne représente 3 endroits différents de la même racine en partant de l'apex. Chaque colonne représente une lignée indépendante.

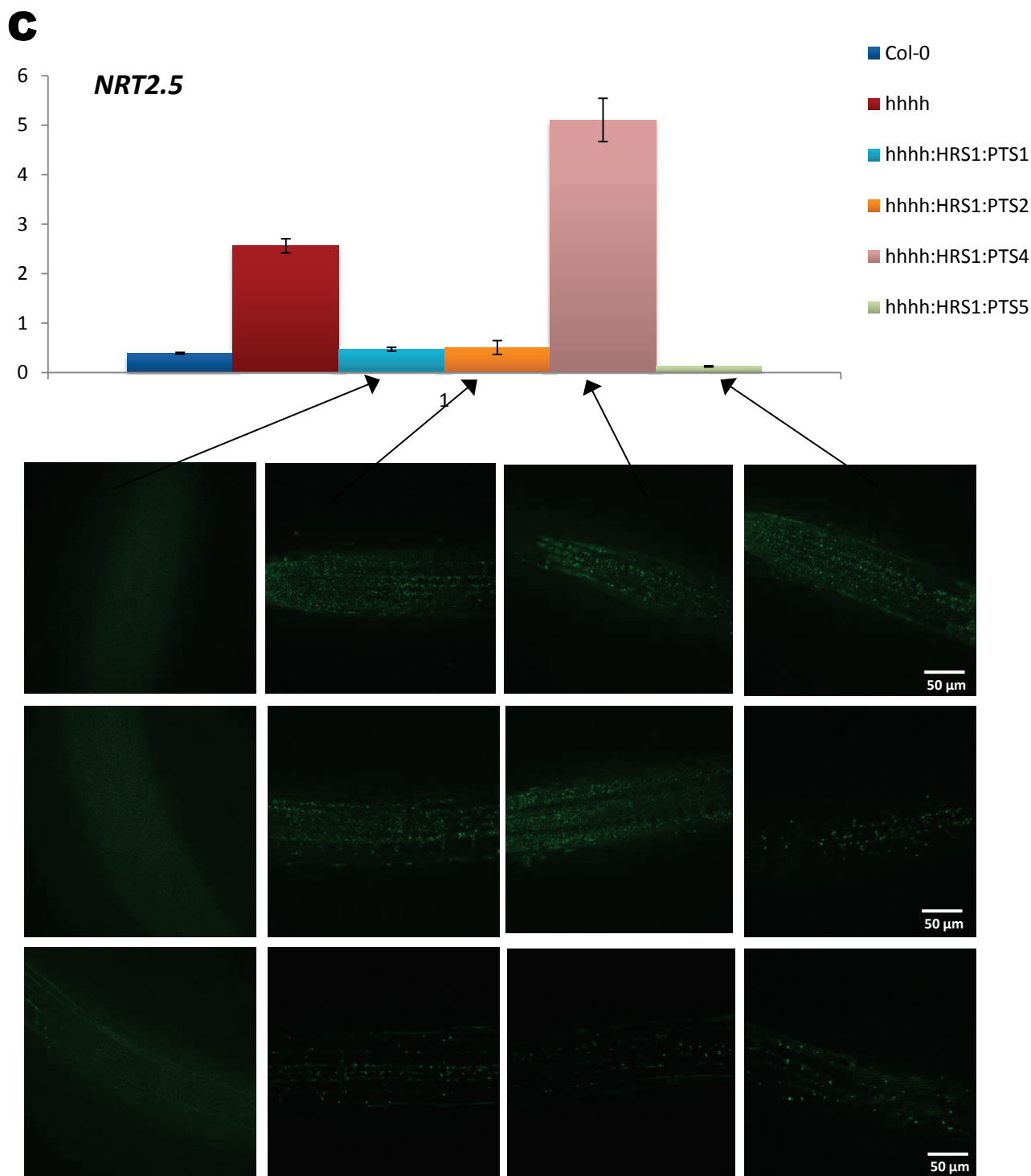


Figure 5.10. Corrélation de la localisation cellulaire d'HRS1:GFP à la régulation de l'expression des gènes marqueurs de la NSR.

Les plantes sont cultivées 2 semaines en boîtes de Pétri en présence de 0,5 mM NH_4NO_3 .

A) Accumulation relative des transcrits de *NRT2.5* chez des lignées PTS.

B) Observations microscopiques de plantules exprimant la fusion PTS:HRS1:GFP. Chaque ligne représente 3 endroits différents de la même racine en partant de l'apex. Chaque colonne représente une lignée indépendante.

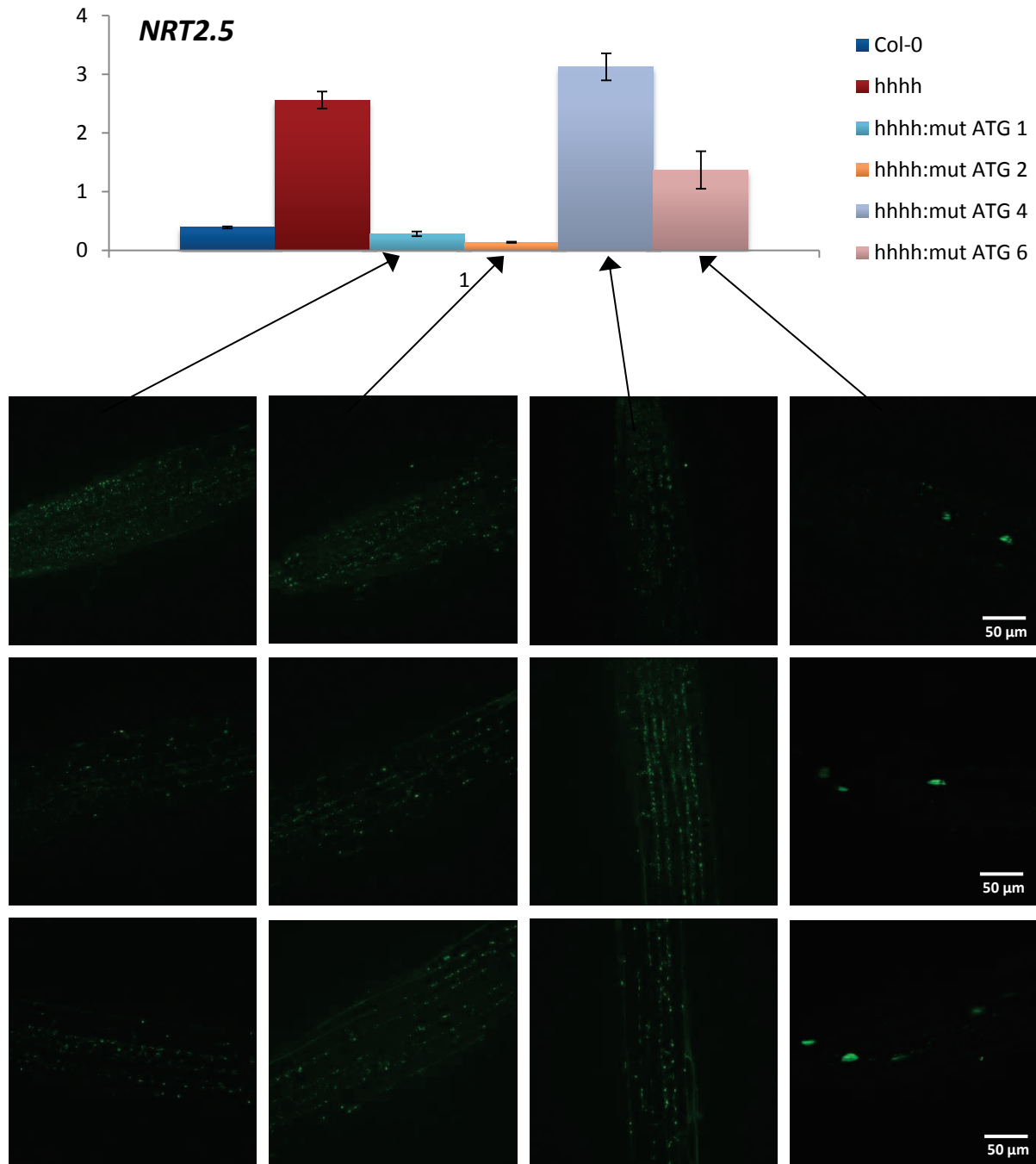
D

Figure 5.11. Corrélation de la localisation cellulaire d'HRS1:GFP à la régulation de l'expression des gènes marqueurs de la NSR.

Les plantes sont cultivées 2 semaines en boîtes de Pétri en présence de 0,5 mM NH_4NO_3 .

A) Accumulation relative des transcrits de *NRT2.5* chez des lignées mut-ATG.

B) Observations microscopiques de plantules exprimant la fusion mut-ATG:HRS1:GFP. Chaque ligne représente 3 endroits différents de la même racine en partant de l'apex. Chaque colonne représente une lignée indépendante.

au niveau du noyau, tout le reste des lignées montrent exclusivement des signaux probablement plastidiaux (Figure 5.8 et 5.9). Chez les lignées PTS, la localisation d'HRS1:GFP est le plus souvent plastidiale, ce qui correspond à nos attentes (Figure 5.10). De manière intéressante, chez PTS2 et PTS5, l'expression d'HRS1 dans les plastes, est associée à des complémentations du mutant (Figure 5.10). Même si les marqueurs de la NSR sont codés par des gènes nucléaires, et que HRS1 régule directement leur expression, il n'est pas impossible que ce dernier pourrait aussi contrôler l'activité de ces gènes indirectement. Comme discuté dans le chapitre 4, HRS1 permet également de réguler la NSR en contrôlant la balance des ROS (Safi, submitted). Étant donné que les plastes constituent des sources importantes de production de ROS (Mittler et al., 2004), la version plastidiale d'HRS1 pourrait ainsi être impliquée dans la régulation de l'accumulation des ROS d'origine plastidiale. Les données de TARGET montrent que 3 gènes plastidiaux dont la fonction pourrait être associée à une production de ROS (AtCg00020, AtCg01080 et AtCg00270), sont des cibles directes d'HRS1 (Annexe).

Cependant, la localisation cellulaire de la protéine et l'expression des gènes ne sont pas toujours en cohérence. En effet, la présence d'HRS1 dans les plastes de la lignée PTS4 n'a pas permis de compléter le phénotype du mutant et inversement, un effet sur l'expression de *NRT2.5* a été observé chez la lignée PTS1 sans qu'il soit associé à un signal plastidial de la GFP (Figure 5.10). Ceci a été également observé chez les lignées mut-ATG1, 2 et 4 chez lesquelles *NRT2.5* est différenciellement exprimé malgré le signal plastidial d'HRS1:GFP (Figure 5.11). Mut-ATG6 est la seule lignée qui affiche un signal exclusivement nucléaire (Figure 5.11). Ceci pourrait être dû à l'abolition du peptide signal présumé ce qui empêche la protéine tronquée d'aller aux plastes. Cependant, l'effet répressif sur l'expression des gènes du HATS est beaucoup plus visible chez les lignées mut-ATG1 et 2 que chez cette lignée (Figure 5.11).

Plusieurs questions se posent à l'issue de ces résultats troublants. Pourquoi voit-on des noyaux dans une lignée mut-ATG et on n'en voit dans aucune lignées NLS ni dans les lignées complémentées par la version sauvage d'HRS1:GFP ? Pourquoi une même localisation cellulaire aboutit à différentes réponses des gènes de la NSR? Pourquoi malgré le signal purement nucléaire de mut-ATG6, l'effet sur l'expression de *NRT2.5* est beaucoup moins marqué que chez les lignées mut-ATG1 et 2 (signal plastidial) ? Pourquoi l'insertion de la cassette pHRS1:HRS1:GFP dans un fond génétique sauvage permet de révéler la double localisation d'HRS1 alors que seulement la version plastidiale est détectée chez le quadruple mutant complémenté par la même construction ? La seule différence entre ces deux dernières lignées est la présence des protéines HHO1, HHO2 et HHO3, ce qui suggérerait que HRS1

		Section 1					
	(1)	1	10	20	30	40	53
AT1G13300	(1)	MIKKFSNMDYNQKRERCQYIEALEEERRKIHVFQRELPLCLDLVTQAIEACK					
MFP1_N-TER1	(1)	-----					
		Section 2					
	(54)	54	60	70	80	90	106
AT1G13300	(54)	RELPEMTTENMYGQPECSEQTTGECGPVLEQFLTIKDSSTSNEEEDDEEFDDHEH					
MFP1_N-TER1	(1)	-----					
		Section 3					
	(107)	107	120	130	140		159
AT1G13300	(107)	GNHDPDNDSEDKNTKSDWLKSVQLWNQPDHPLLPKEERLQQETMTRDESMRKD					
MFP1_N-TER1	(1)	-----					
		Section 4					
	(160)	160	170	180	190	200	212
AT1G13300	(160)	PMVNGGEGGRKREAEKDGGGGGRKQRRWCSSQLHRRFLNALQHLGGPHVATPKQI					
MFP1_N-TER1	(1)	-----					
		Section 5					
	(213)	213	220	230	240	250	265
AT1G13300	(213)	REFMKVDGLTNDEVKSHLQKYRLHTRRPRQTVPNNGNSQTQH FVVV GGLW VVQ					
MFP1_N-TER1	(1)	-----MG FLIG GSCF VPS					
		Section 6					
	(266)	266	280	290	300		318
AT1G13300	(266)	SDYSTGKTTGGATTSSSTTTTGTMAAPPPPPQWPSHSNYRPSIIVDEGSGS					
MFP1_N-TER1	(14)	VPLHSRFLSSPSSSSSSPSSSQFLLC-----					
		Section 7					
	(319)	319	330	344			
AT1G13300	(319)	HSEGVVVRCS SPAMSSSTRNHVYKNN					
MFP1_N-TER1	(42)	-----					

Figure 5.12. Le peptide signal d'HRS1 semble être en C-terminal.

Alignement de la séquence d'HRS1 avec celle du peptide de transit de MFP1 (Jeong et al., 2003).

nécessite une hétérodimérisation avec au moins un de ses homologues pour pouvoir accéder au noyau. L'autre hypothèse possible est qu'au moins un de ces 3 facteurs de transcription est impliqué dans la régulation du transit nucléaire et/ou que l'abolition de ce processus aboutit au clivage rapide de la protéine de fusion. Ce clivage ferait que la GFP soit dirigée vers les plastes et HRS1 vers le noyau. Ce clivage présumé pourrait expliquer nos observations (Figures 5.8-5.11). L'alignement entre la séquence d'HRS1 et celle du peptide signal de MFP1 (Jeong et al., 2003), montre que contrairement à nos attentes, la séquence de transit d'HRS1 pourrait être en partie C-terminale (Figure 5.9). Ainsi, si lors de son clivage, la GFP reste liée à la partie C-terminale d'HRS1, ceci pourrait expliquer mes résultats.

Pour vérifier cette dernière hypothèse, les protéines solubles ont été extraites à partir des racines de plantes cultivées 1 semaine sur ½ MS. Un western blot a été par la suite réalisé et la révélation a été faite grâce à un anticorps anti-GFP. Ce dernier manque de spécificité puisque des bandes ont été détectées chez toutes les lignées testées y compris le sauvage et le quadruple mutant (Figure 5.10A). De manière troublante, le même profil a été révélé pour la plupart des lignées à l'exception de mut-ATG6 (Figure 5.10A). Cette dernière est la seule où on voyait un signal GFP nucléaire. De ce fait, la bande qui la distingue des autres lignées pourrait correspondre à la protéine de fusion HRS1:GFP même si sa taille devrait théoriquement être moins importante. L'absence de bande qui correspond à la version plastidiale d'HRS1:GFP, peut être expliquée par deux hypothèses. La première est que le clivage de la protéine coïncide avec des bandes aspécifiques qu'on trouve même chez les lignées non transformées, et la deuxième est qu'une fois dans les plastes, la protéine de fusion n'est plus dans la phase soluble. Plusieurs données supportent la dernière possibilité. En effet, les chromosomes plastidiaux sont organisés en complexes ADN-protéine appelés nucléoïdes. Ces structures sont accrochées à la membrane interne des plastes et à la membrane thylakoïdienne dans les chloroplastes (Jeong et al., 2003). Étant donné qu'HRS1 est un facteur de transcription qui apparemment régule directement des gènes plastidiaux, on estime qu'il pourrait être associé aux nucléoïdes. Ainsi, il ne serait pas impossible de trouver la version plastidiale d'HRS1:GFP dans la fraction des protéines non solubles. En se basant sur ce raisonnement, j'ai fait un western blot sur les protéines membranaires (microsome). Encore une fois, on est face à un problème de spécificité vu que de nombreuses bandes apparaissent dans toutes les pistes (Figure 5.10B). Et en plus, aucune différence n'est observée entre les lignées transformées par les différentes versions d'HRS1:GFP et les lignées non transformées.

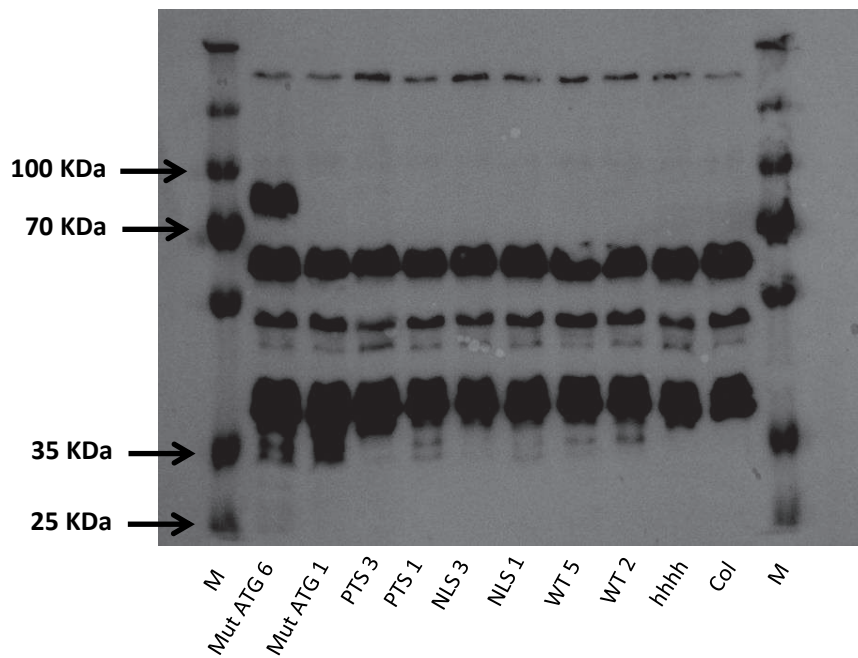
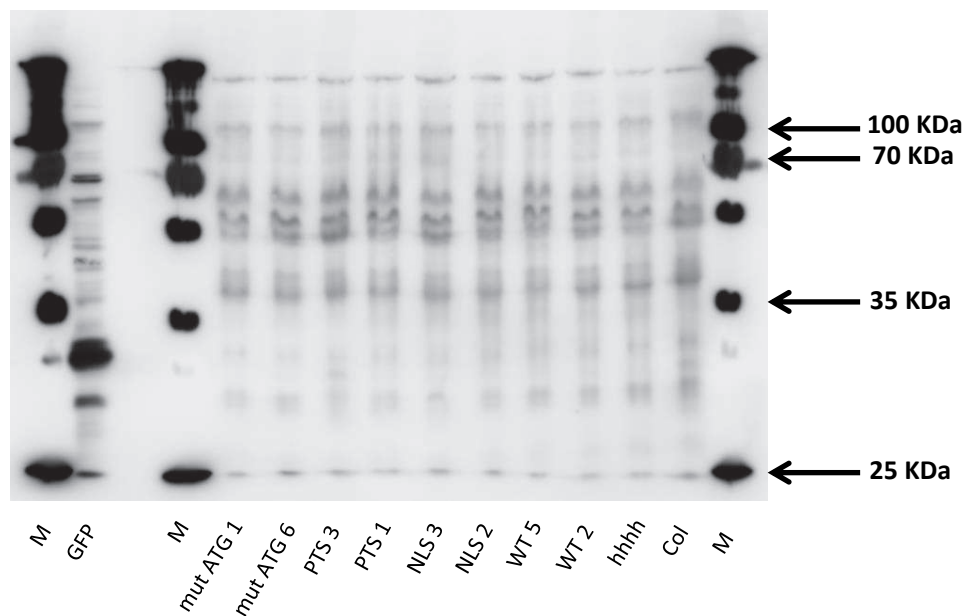
A**B**

Figure 5.13. Western blot sur les différentes formes de la protéine HRS1:GFP.

A) Fraction soluble des protéines.

B) Protéines microsomales.

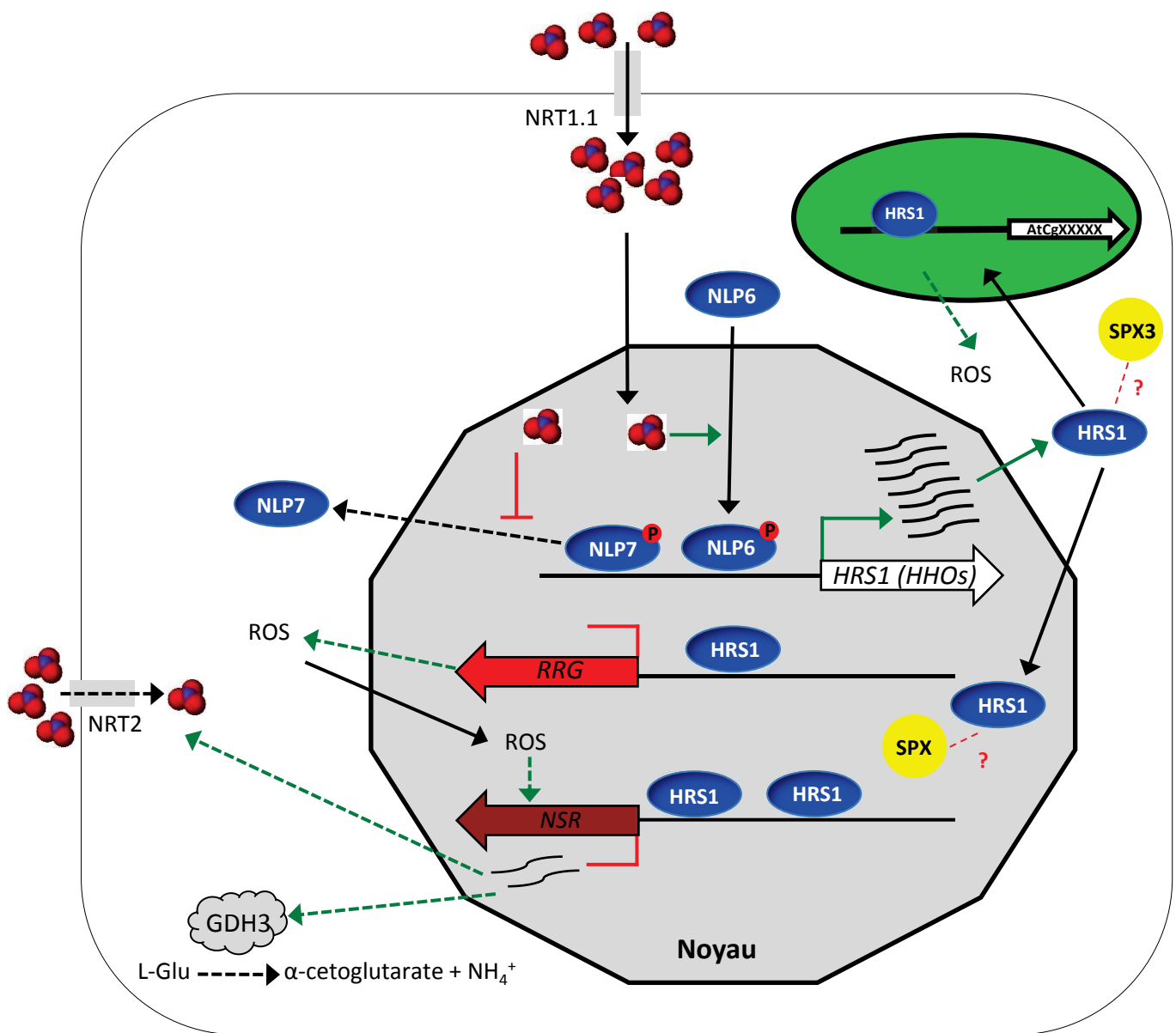
M: marqueur de taille; Col: plante sauvage; hhhh: quadruple mutant; WT: hhhh complémenté par la version non modifiée d'HRS1:GFP.

3. Conclusion et perspectives

De manière encourageante, j'ai pu valider la localisation plastidiale d'HRS1 et la plupart des constructions étudiées (WT, NLS, PTS) permettent une complémentation de la fonction de régulation d'HRS1. Ce qui, si la protéine n'est pas clivée, pourrait être une démonstration d'un rôle régulateur de la NSR par HRS1 dans les plastes. Il a été démontré depuis quelques années qu'un gène codant une protéine plastidiale nommée GDPD1, est impliqué dans le maintien de l'homéostasie du Pi dans des conditions de carence. Un tel phénomène attribué à la nutrition azotée en général et à la NSR en particulier serait à notre connaissance une nouveauté (Cheng et al., 2011).

Cependant, pour tirer cette conclusion il faudra montrer que HRS1 est cependant toujours liée à la GFP. Les expériences de western blots ne sont pas concluantes pour le moment et doivent être reproduites pour détecter la protéine dans les phases solubles ou microsomales. En effet il est connu que la détection des facteurs de transcription par western blot n'est pas un défi facile. De plus, les lignées WT, NLS, PTS et ATG-mut dans un fond sauvage sont en cours d'obtention pour éventuellement comprendre le rôle régulateur de l'adressage d'HRS1 par les autres membres de la famille.

Chapitre 6: Conclusion générale



RRG: ROS Related Genes
 NSR: Nitrate Starvation Response Genes

L'objectif général de mon travail était d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes de signalisation mis en oeuvre lors des changements de la disponibilité en nitrate du milieu extérieur. J'avais pour but de comprendre les mécanismes et de mettre à jour de nouveaux acteurs moléculaires étant impliqués dans l'établissement de "crosstalk" entre les différentes voies de signalisation.

Dans ce sens, je pense que l'objectif général du travail a été atteint, car j'ai pu mettre en évidence le rôle clé des facteurs de transcription de la famille HHOs ainsi que des ROS dans la réponse des plantes à la NSR.

Les résultats validés lors de cette thèse concernent le rôle de la sous-famille HRS1/HHO dans la régulation directe de la réponse des plantes à la carence en azote. En utilisant des expériences de gel retard, l'étude de caractérisation de mutants KO et de surexprimeurs affectés dans les gènes *HRS1*, *HHO1*, *HHO2* et *HHO3*, j'ai pu démontrer que ces facteurs de transcription sont des répresseurs de la réponse à la carence en azote. En se liant sur les promoteurs de leurs gènes cibles, HRS1 (et très probablement ses homologues) inhibent l'expression des gènes codant des transporteurs de nitrate de haute affinité (*NRT2.1*, *NRT2.4* et *NRT2.5*) ainsi que de la glutamate déshydrogénase *GDH3*. Ce mécanisme moléculaire représente un phénomène qui impacte fonctionnellement la physiologie de la plante. En effet les HHOs contrôlent non seulement la capacité des racines à prélever le nitrate mais aussi la croissance des plantes cultivées en présence de nitrate (Figure 4 et Supplementary figure 3 de l'article). J'ai également montré que les HHOs peuvent contrôler la NSR grâce à un mécanisme vraisemblablement parallèle faisant intervenir les ROS. Ces derniers sont indispensables à l'établissement complet de la NSR. Des expériences supplémentaires sont en cours, sur des mutants de NADPH oxydase et des mesures de l'accumulation des transcrits chez les différents génotypes des HHOs sont toutefois nécessaire pour mieux comprendre ce mécanisme.

1. Vers un contrôle "à la carte" des transporteurs via l'édition de gènes?

Ainsi, il semble clair que HRS1 et ses homologues (HHOs) sont des régulateurs majeurs de la NSR. Les HHOs sont impliqués dans la répression rapide des gènes de la NSR lors de la fourniture de nitrate aux plantes. Ce mécanisme permet sans doute de stopper les gènes impliqués dans la réponse des plantes à la carence en azote lorsque le NO_3^- est à nouveau

présent dans la solution du sol. Dans les parties précédentes, nous avons distingué NSR et PNR. La première (NSR) étant mise en place lors du manque de N; et la seconde (PNR) étant mise en place lors de la fourniture de NO_3^- à la plante. Cependant ceci est une sorte de vue de l'esprit. En effet, il est tout à fait légitime de se demander si on peut également considérer les HHOs comme des effecteurs d'une sous-branche de la PNR elle-même. De fait, l'induction de l'expression des HHOs par le nitrate est NRT1.1 et NLP7-dépendante (centraux pour la PNR), et c'est cette induction qui semble permettre la répression des gènes marqueurs de la NSR. En d'autres termes, c'est la présence du nitrate (PNR) qui déclenche l'arrêt de la NSR et cet arrêt se fait très en quelques minutes (un des critères de la PNR) par l'intermédiaire de la sous-famille HRS1/HHO. Dans ce contexte, on pourrait alors considérer les HHOs comme le lien important appartenant à une sous branche de la PNR spécialisée dans la répression rapide et spécifique des marqueurs de la NSR (Figures 2 et 9 de l'article).

Une question générale qui ne trouve pas encore de réponse claire pour le moment est : pour quelle raison la plante réprime-t-elle ses systèmes de transport à haute (voir très haute) affinité lorsque le NO_3^- est à nouveau présent dans le milieu alors que mes résultats montrent que cette répression induit une diminution de : i) la vitesse de transport de NO_3^- et ii) la croissance des plantes (Figure 4 et Supplementary figure 3 de l'article) ? Si l'évolution a maintenu cette voie de signalisation c'est qu'il est possible que cette répression des gènes de la NSR soit nécessaire pour les plantes, au moins dans certaines conditions. Quelques hypothèses peuvent être apportées pour répondre à cette question.

La première est que nous avons montré que *GDH3* est un des gènes réprimés par cette voie. *GDH3* est impliqué dans la remobilisation de l'azote des pools d'acide aminés lors de la carence en azote (Marchi et al., 2013; Masclaux-Daubresse et al., 2006; Robinson et al., 1991). Si ce gène reste très fortement exprimé quand les conditions de nutrition azotée non-limitantes, ceci pourrait créer un cycle futile de l'azote au sein de la plante en nutrition normale. L'azote dans le quadruple mutant serait constamment assimilé aux acides aminés puis recyclé via l'activité GDH, ce qui serait une perte considérable d'énergie pour la plante. Nous n'avons pas exploré cette hypothèse expérimentalement. Cependant, les quadruples mutants ne semblent pas être trop affectés dans leur croissance (bien au contraire). Mais nos observations sont dans des conditions contrôlées de laboratoire, il n'est pas impossible que dans la nature ce cycle futile impacte la survie des plantes. Si cette hypothèse est validée, et dans une perspective d'amélioration biotechnologique des plantes (voir introduction de la thèse), il serait intéressant par exemple de muter spécifiquement les sites de fixation des HHOs dans les promoteurs des gènes de *NRT2.4*, *NRT2.5*, *NRT2.1* pour éviter leur répression tandis que la répression de

GDH3 serait maintenue. Des approches de mutagenèse utilisant la technique CRISPR-Cas9 (Wang et al., 2015), pourraient être envisagées.

Deuxièmement, les expériences de TARGET ainsi que les transcriptomes (Medici et al., 2015) ou les résultats d'autres équipes (Liu et al., 2009; Mito et al., 2011; Nagarajan et al., 2016; Wu et al., 2012) montrent que les HHOs semblent être un carrefour important pour le contrôle de nombreuses voies de signalisations de réponse à différentes situations "stressantes" pour les plantes (réponse au sel, à l'ABA...). Il est donc probable que le quadruple mutant *hrs1;hho1;hho2:hho3* soit intrinsèquement "stressé", ce qui dans des conditions naturelles (pas de laboratoire) peut conduire à une diminution du taux de survie dans l'environnement. Encore une fois, dans ce contexte, travailler sur la derepression spécifique des gènes du transport et de l'assimilation du nitrate pourrait être une solution alternative, maintenant que nous (et d'autres (Kiba, Submitted)) avons mis en évidence les éléments cis-régulateurs des HHOs dans les promoteurs des gènes cibles de cette voie.

En conclusion, malgré sans doute quelques ajustements nécessaires discutés ci-dessus, les résultats du travail de ma thèse ouvrent des perspectives tant sur le plan fondamental que appliqué. Des plantes éditées pourraient voir le jour dans lesquelles les systèmes de transports de nitrate seraient constitutivement dérèprimés. Ces plantes pourraient permettre d'améliorer l'efficacité de l'utilisation de l'azote (NUE). Cette perspective est d'autant plus encourageante lorsque on y regarde de plus près, de fort parallèles existent entre les études sur les gènes *BTB* et *HRS1/HHOs* (Araus et al., 2016). En effet, *BT1* et *BT2* répriment l'expression des gènes codant des transporteurs de haute affinité *NRT2.4* et *NRT2.1* et affectent par la suite le prélèvement du nitrate (Araus et al., 2016). Outre leur effet commun sur la régulation du HATS, ces deux groupes de gènes partagent également la manière dont ils sont régulés. Ils sont tous les deux induits par le NO_3^- (Canales et al., 2014; Sato et al., 2017; Vidal et al., 2013) et leur expression est *NRT1.1* et *NLP6/7*-dépendante (Konishi and Yanagisawa, 2013a; Marchive et al., 2013; Sato et al., 2017).

Par ailleurs, il est possible d'étendre cette perspective biotechnologique à d'autres nutriments essentiels pour la nutrition des plantes. Il est connu que des voies spécifiques des nutriments sont activées en réponse à la carence en K^+ ou en P. Pour le P, des gènes impliqués dans la répression de la voie de carence sont connus (notamment les *SPX*) (Puga et al., 2014; Wang et al., 2014). Mes résultats peuvent permettre d'imaginer que des éléments cis-régulateurs présents dans les promoteurs des gènes pourraient réprimer les systèmes de transport de différents nutriments. La technique d'édition des gènes serait encore une fois une opportunité pour déréguler spécifiquement des systèmes de transports d'ions de toutes sortes (K^+ , Pi , NO_3^-

, NH_4^+ , ...) pour créer des plantes aux capacités de transport finement adaptés à des conditions pédologiques locales.

2. Un rôle fondamental des ROS dans le contrôle de la nutrition?

Plusieurs résultats de ma thèse ainsi que des données de la littérature permettent de mettre en évidence un rôle important des ROS dans la nutrition des plantes. Bien souvent les interventions des ROS pourraient en partie expliquer les résultats négatifs obtenus.

Pour commencer, prenons les expériences de retard sur gel (EMSA) faites pour étudier l'effet présumé de l'interaction entre SPX1 et HRS1 sur la capacité de ce dernier de se fixer à ses motifs cibles (Chapitre 3, Figures 3.1 et 3.2). Malgré le résultat négatif, des perspectives visant à tester d'autres couples de protéines et/ou d'autres motifs reconnus par HRS1 sont envisagés. Il est important de noter que les ROS peuvent affecter les interactions protéines-protéines et la fixation des facteurs de transcription aux promoteurs de leurs gènes cibles (Lindermayr et al., 2010; Viola et al., 2013). C'est le cas du couple NPR1 (NIM1) / TGA1 impliqué dans résistance des plantes aux pathogènes (Despres et al., 2003; Despres et al., 2000; Pieterse and Van Loon, 2004). Le monoxyde d'azote (NO) libéré à partir du S-nitrosogluthathion (GSNO) permet non seulement la S-nitrosylation des deux protéines, mais également de stimuler la fixation de TGA1 sur son motif as-1 (activation sequence-1) en présence de NPR1 (NIM1). En plus, la translocation nucléaire de ce dernier est favorisée par le NO (Lindermayr et al., 2010). L'ensemble de ces données souligne l'importance du NO dans la régulation de l'activité des facteurs de transcription. Un tel mécanisme pourrait intervenir dans le contrôle de l'activité de "binding" d'HRS1. L'utilisation du GSNO dans les expériences d'EMSA pourrait ainsi être envisageable dans le but de vérifier cette hypothèse. Le fait que le GSNO soit métabolisé entre autres par le système thiorédoxine (Broniowska et al., 2013) et que HRS1 régule directement de nombreux gènes de thiorédoxine ainsi que d'autres rédoxines (Annexe), pourrait signifier que HRS1 est effectivement impliqué dans une boucle de rétrocontrôle impliquant les ROS.

Le deuxième exemple est celui des TCP, dont l'activité de fixation à l'ADN est inhibée après incubation de la protéine avec des agents oxydants ou avec des ROS. La capacité de

dimérisation de ces facteurs de transcription est également affectée par ces mêmes conditions (Viola et al., 2013). En se basant sur l'interactome de la famille GARP où les TCP constituent une bonne partie des protéines avec qui le groupe des HHOs interagit (Safi et al., 2017), il est possible que l'interaction HHO/SPX nécessite la participation d'un troisième partenaire, un TCP, dont l'activité serait ROS-dépendante. Dans ce contexte il est important de noter que les TCP sont impliqués dans la réponse primaire au nitrate à travers l'interaction de TCP20 avec NLP7 (Guan et al., 2017).

Ces hypothèses sont renforcées par les données qui montrent que l'activité transcriptionnelle la famille R2R3-MYB est régulée de façon redox-dépendante (Heine et al., 2004), et que cette famille de facteurs de transcription est reliée à la famille GARP dont HRS1 est un membre (Safi et al., 2017).

Donc, et en conclusion, les ROS n'ont pas été en première intention une variable importante des modèles que j'ai développé durant ma thèse. Pourtant i) les phénotypes de répression de la NSR par les scavengers de ROS et ii) les résultats du TARGET d'HRS1, prouvent que ces derniers sont centraux de la réponse des plantes à la carence en N et plus largement aux nutriments. Les difficultés que j'ai rencontrées proviennent des approches expérimentales inefficaces pour mesurer les différentes espèces réactives de l'oxygène et pour étudier leurs accumulations différentielles (données non montrées). Il sera donc important dans les prochaines investigations d'inclure cette variable centrale de la réponse et de développer des protocoles robustes pour l'investigation de l'accumulation des ROS au tissulaire et éventuellement sub-cellulaire.

En effet, les ROS pourraient être la variable explicative des complications rencontrées dans le chapitre 5 de ma thèse. De fait, l'objectif de la troisième partie de cette thèse a consisté étudier la double localisation d'HRS1. J'ai voulu mettre en évidence une corrélation entre la localisation sub-cellulaire d'HRS1 et sa fonction comme régulateur de la NSR. J'ai réussi grâce à des expériences de colocalisation à prouver qu'HRS1 peut également être adressé aux plastides. Malgré la création de versions censées forcer des localisations différentes, j'ai été confronté à l'obtention de résultats pour le moment non-concluants.

Cependant, et encore, les plastides sont le siège d'une intense synthèse de ROS (et NOS). Il sera important d'inclure cette variable explicative dans le modèle en particulier en essayant de déterminer les conditions expérimentales qui favorisent la localisation d'HRS1 aux plastides (dans les protoplastes par exemples [Figure 5.1]). Cette étude a été abordée faute de

temps jusqu'à présent et sans résultats concluants. En conclusion les ROS pourraient encore une fois être une explication des résultats que nous ne comprenons pas jusqu'alors.

Annexe

1. Liste des cibles directes d'HRS1 liées aux ROS (Medici et al., 2015).

Down

- At5g25140** CYP71B13, cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 13
- At5g51440** HSP20-like chaperones superfamily protein
- At4g27670** HSP21, heat shock protein 21
- At2g19310** HSP20-like chaperones superfamily protein
- At3g25230** ATFKBP62, FKBP62, ROF1, rotamase FKBP 1
- At1g52560** HSP20-like chaperones superfamily protein
- At3g50660** CLM, CYP90B1, DWF4, PSC1, SAV1, SNP2, Cytochrome P450 superfamily protein
ATHSP23.6-MITO, HSP23.6-MITO, mitochondrion-localized small heat shock
protein 23.6
- At4g25200** protein 23.6
- At2g29450** AT103-1A, ATGSTU1, ATGSTU5, GSTU5, glutathione S-transferase tau 5
- At5g12030** AT-HSP17.6A, HSP17.6, HSP17.6A, heat shock protein 17.6A
- At2g47730** ATGSTF5, ATGSTF8, GST6, GSTF8, glutathione S-transferase phi 8
- At1g31670** Copper amine oxidase family protein
- At2g29500** HSP20-like chaperones superfamily protein
- At1g59860** HSP20-like chaperones superfamily protein
- At3g26125** CYP86C2, cytochrome P450, family 86, subfamily C, polypeptide 2
- At2g26150** ATHSFA2, HSFA2, heat shock transcription factor A2
- At1g32720** Cytochrome C oxidase polypeptide VIB family protein
- At1g16030** Hsp70b, heat shock protein 70B
- At5g12020** HSP17.6II, 17.6 kDa class II heat shock protein
- At5g59720** HSP18.2, heat shock protein 18.2
- At3g26300** CYP71B34, cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 34
- At1g62180** APR2, APSR, ATAPR2, PRH, PRH43, 5'adenylylphosphosulfate reductase 2
- At1g54050** HSP20-like chaperones superfamily protein
- At3g01900** CYP94B2, cytochrome P450, family 94, subfamily B, polypeptide 2
- At5g56030** AtHsp90.2, ERD8, HSP81-2, HSP90.2, heat shock protein 81-2
- At1g07400** HSP20-like chaperones superfamily protein
- At3g26230** CYP71B24, cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 24
- At1g74310** ATHSP101, HOT1, HSP101, heat shock protein 101
- At1g29700** Metallo-hydrolase/oxidoreductase superfamily protein
- At1g29620** Cytochrome C oxidase polypeptide VIB family protein
- At1g65670** CYP702A1, cytochrome P450, family 702, subfamily A, polypeptide 1

Up

- At2g38380** Peroxidase superfamily protein
- At4g37520** Peroxidase superfamily protein
- At1g56410** ERD2, HSP70T-1, heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein
- At5g51880** 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
- At4g37530** Peroxidase superfamily protein
- At5g57220** CYP81F2, cytochrome P450, family 81, subfamily F, polypeptide 2
- At4g21105** cytochrome-c oxidases;electron carriers
- At1g32330** ATHSFA1D, HSFA1D, heat shock transcription factor A1D
- At2g33210** HSP60-2, heat shock protein 60-2
- At1g76570** Chlorophyll A-B binding family protein
- At1g20870** HSP20-like chaperones superfamily protein
- At2g38390** Peroxidase superfamily protein
- At5g54270** LHCB3, LHCB3*1, light-harvesting chlorophyll B-binding protein 3
- At3g03070** NADH-ubiquinone oxidoreductase-related
- At3g24200** FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein
- At1g06620** 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
- At4g27440** PORB, protochlorophyllide oxidoreductase B

2. Liste des cibles directes d'HRS1 liées aux ROS (Safi et al., submitted).

>C02

- At5g02490** Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein
At5g25140 CYP71B13, cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 13
At3g13730 CYP90D1, cytochrome P450, family 90, subfamily D, polypeptide 1
At5g51440 HSP20-like chaperones superfamily protein
At4g27670 HSP21, heat shock protein 21
At2g19310 HSP20-like chaperones superfamily protein
At1g53540 HSP20-like chaperones superfamily protein
At1g52560 HSP20-like chaperones superfamily protein
At3g28740 CYP81D1, Cytochrome P450 superfamily protein
ATHSP23.6-MITO, HSP23.6-MITO, mitochondrion-localized small heat shock
At4g25200 protein 23.6
At2g29450 AT103-1A, ATGSTU1, ATGSTU5, GSTU5, glutathione S-transferase tau 5
At5g12030 AT-HSP17.6A, HSP17.6, HSP17.6A, heat shock protein 17.6A
At5g37670 HSP20-like chaperones superfamily protein
At4g10250 ATHSP22.0, HSP20-like chaperones superfamily protein
At2g29500 HSP20-like chaperones superfamily protein
ATHS83, AtHsp90-1, ATHSP90.1, HSP81-1, HSP81.1, HSP83, HSP90.1, heat shock
At5g52640 protein 90.1
At2g26150 ATHSFA2, HSFA2, heat shock transcription factor A2
At3g12580 ATHSP70, HSP70, heat shock protein 70
At5g02500 AT-HSC70-1, HSC70, HSC70-1, HSP70-1, heat shock cognate protein 70-1
At1g16030 Hsp70b, heat shock protein 70B
At5g12020 HSP17.6II, 17.6 kDa class II heat shock protein
At5g59720 HSP18.2, heat shock protein 18.2
At3g26300 CYP71B34, cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 34
At1g62180 APR2, APSR, ATAPR2, PRH, PRH43, 5'adenylylphosphosulfate reductase 2
At1g54050 HSP20-like chaperones superfamily protein
At2g25140 CLPB-M, CLPB4, HSP98.7, casein lytic proteinase B4
At3g09440 Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein
At5g56030 AtHsp90.2, ERD8, HSP81-2, HSP90.2, heat shock protein 81-2
At4g24280 cpHsc70-1, chloroplast heat shock protein 70-1
At1g74310 ATHSP101, HOT1, HSP101, heat shock protein 101
At3g46230 ATHSP17.4, HSP17.4, heat shock protein 17.4
At1g65670 CYP702A1, cytochrome P450, family 702, subfamily A, polypeptide 1

>C03

At2g32120 HSP70T-2, heat-shock protein 70T-2
At3g51910 AT-HSFA7A, HSFA7A, heat shock transcription factor A7A
At1g14345 NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein
At1g49390 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
At1g76570 Chlorophyll A-B binding family protein
At3g57620 glyoxal oxidase-related protein
AtCg00020 PSBA, photosystem II reaction center protein A

>C05

At3g62930 Thioredoxin superfamily protein
At2g21910 CYP96A5, cytochrome P450, family 96, subfamily A, polypeptide 5
At1g67110 CYP735A2, cytochrome P450, family 735, subfamily A, polypeptide 2

>C06

At2g29480 ATGSTU2, GST20, GSTU2, glutathione S-transferase tau 2
At1g28430 CYP705A24, cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 24
At4g21580 oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein
At1g03680 ATHM1, ATM1, THM1, TRX-M1, thioredoxin M-type 1

>C07

At4g15380 CYP705A4, cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 4

>C08

At1g72230 Cupredoxin superfamily protein
At2g45580 CYP76C3, cytochrome P450, family 76, subfamily C, polypeptide 3
At4g02450 HSP20-like chaperones superfamily protein

>C09

At3g44190 FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein
At5g61290 Flavin-binding monooxygenase family protein

>C10

At2g37760 NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein
At1g63710 CYP86A7, cytochrome P450, family 86, subfamily A, polypeptide 7
At5g51880 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
At5g25130 CYP71B12, cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 12
At5g57220 CYP81F2, cytochrome P450, family 81, subfamily F, polypeptide 2
At3g03070 NADH-ubiquinone oxidoreductase-related
At5g51060 ATRBOHC, RBOHC, RHD2, NADPH/respiratory burst oxidase protein D
At3g24200 FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein

At3g09940 ATMDAR3, MDAR2, MDAR3, MDHAR, monodehydroascorbate reductase
At4g18880 AT-HSFA4A, HSF A4A, heat shock transcription factor A4A
At1g06620 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein

>C11

At1g67970 AT-HSFA8, HSFA8, heat shock transcription factor A8
At4g00360 ATT1, CYP86A2, cytochrome P450, family 86, subfamily A, polypeptide 2
At1g13150 CYP86C4, cytochrome P450, family 86, subfamily C, polypeptide 4
At3g26230 CYP71B24, cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 24

>C12

At4g39510 CYP96A12, cytochrome P450, family 96, subfamily A, polypeptide 12
At3g50990 Peroxidase superfamily protein
At3g25180 CYP82G1, cytochrome P450, family 82, subfamily G, polypeptide 1
At3g13610 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
At1g20630 CAT1, catalase 1
AtMg00160 COX2, cytochrome oxidase 2
At1g22480 Cupredoxin superfamily protein
At1g15140 FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase
At1g31170 ATSRX, SRX, sulfiredoxin
At3g20960 CYP705A33, cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 33
AtCg01080 NDHG, NADH:ubiquinone/plastoquinone oxidoreductase, chain 6
At2g33210 HSP60-2, heat shock protein 60-2
At1g20620 ATCAT3, CAT3, SEN2, catalase 3
At4g37200 HCF164, Thioredoxin superfamily protein
At4g37830 cytochrome c oxidase-related
AtCg00270 PSBD, photosystem II reaction center protein D
At3g07480 2Fe-2S ferredoxin-like superfamily protein
At3g45810 RBOHJ, RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG J

Bibliographie

- Abel, S., Ticconi, C.A., and Delatorre, C.A. (2002). Phosphate sensing in higher plants. *Physiol Plant* 115:1-8.
- Ahlert, D., Ruf, S., and Bock, R. (2003). Plastid protein synthesis is required for plant development in tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15730-15735.
- Aleksza, D., Horváth, G.V., Sándor, G., and Szabados, L. (2017). Proline Accumulation Is Regulated by Transcription Factors Associated with Phosphate Starvation. *Plant Physiology* 175:555-567.
- Almagro, A., Lin, S.H., and Tsay, Y.F. (2008). Characterization of the Arabidopsis nitrate transporter NRT1.6 reveals a role of nitrate in early embryo development. *Plant Cell* 20:3289-3299.
- Alvarez, J.M., Riveras, E., Vidal, E.A., Gras, D.E., Contreras-Lopez, O., Tamayo, K.P., Aceituno, F., Gomez, I., Ruffel, S., Lejay, L., et al. (2014). Systems approach identifies TGA1 and TGA4 transcription factors as important regulatory components of the nitrate response of Arabidopsis thaliana roots. *Plant J* 80:1-13.
- Andersson, S.G., Zomorodipour, A., Andersson, J.O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U.C., Podowski, R.M., Naslund, A.K., Eriksson, A.S., Winkler, H.H., and Kurland, C.G. (1998). The genome sequence of Rickettsia prowazekii and the origin of mitochondria. *Nature* 396:133-140.
- Antharavally, B.S., Mallia, K.A., Rangaraj, P., Haney, P., and Bell, P.A. (2009). Quantitation of proteins using a dye-metal-based colorimetric protein assay. *Anal Biochem* 385:342-345.
- Apel, K., and Hirt, H. (2004). REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55:373-399.
- Araus, V., Vidal, E.A., Puelma, T., Alamos, S., Mieulet, D., Guiderdoni, E., and Gutierrez, R.A. (2016). Members of BTB Gene Family of Scaffold Proteins Suppress Nitrate Uptake and Nitrogen Use Efficiency. *Plant Physiol* 171:1523-1532.
- Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 141:391-396.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., and Sheen, J. (2002). MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* 415:977-983.
- Aubert, S., Bligny, R., Douce, R., Gout, E., Ratcliffe, R.G., and Roberts, J.K.M. (2001). Contribution of glutamate dehydrogenase to mitochondrial glutamate metabolism studied by ¹³C and ³¹P nuclear magnetic resonance. *Journal of Experimental Botany* 52:37-45.
- Axtell, M.J., Snyder, J.A., and Bartel, D.P. (2007). Common functions for diverse small RNAs of land plants. *Plant Cell* 19:1750-1769.
- Baier, M., Stroher, E., and Dietz, K.J. (2004). The acceptor availability at photosystem I and ABA control nuclear expression of 2-Cys peroxiredoxin-A in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* 45:997-1006.
- Barbier-Brygoo, H., De Angeli, A., Filleur, S., Frachisse, J.M., Gambale, F., Thomine, S., and Wege, S. (2011). Anion channels/transporters in plants: from molecular bases to regulatory networks. *Annu Rev Plant Biol* 62:25-51.
- Barbrook, A.C., Howe, C.J., and Purton, S. (2006). Why are plastid genomes retained in non-photosynthetic organisms? *Trends Plant Sci* 11:101-108.
- Bargmann, B.O., Marshall-Colon, A., Efroni, I., Ruffel, S., Birnbaum, K.D., Coruzzi, G.M., and Krouk, G. (2013). TARGET: a transient transformation system for genome-wide transcription factor target discovery. *Mol Plant* 6:978-980.

- Bauer, W.D. (1981). INFECTION OF LEGUMES BY RHIZOBIA. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 32:407-449.
- Beck, C.F. (2005). Signaling pathways from the chloroplast to the nucleus. *Planta* 222:743-756.
- Beevers, L., and Hageman, R.H. (1980). Nitrate and nitrite reduction in The biochemistry of plants. New York: Stupf, P.K.
- Conn, E.E.
- Bolwell, G.P., and Wojtaszek, P. (1997). Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 51:347-366.
- Bonaldi, K., Li, Z., Kang, S.E., Breton, G., and Pruneda-Paz, J.L. (2017). Novel cell surface luciferase reporter for high-throughput yeast one-hybrid screens. *Nucleic Acids Res* 45:e157.
- Borges, F., and Martienssen, R.A. (2015). The expanding world of small RNAs in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16:727-741.
- Bouguyon, E., Brun, F., Meynard, D., Kubes, M., Pervent, M., Leran, S., Lacombe, B., Krouk, G., Guiderdoni, E., Zazimalova, E., et al. (2015). Multiple mechanisms of nitrate sensing by Arabidopsis nitrate transceptor NRT1.1. *Nat Plants* 1:15015.
- Brandt, B., Brodsky, D.E., Xue, S., Negi, J., Iba, K., Kangasjarvi, J., Ghassemian, M., Stephan, A.B., Hu, H., and Schroeder, J.I. (2012). Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched ABI1 PP2C phosphatase action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:10593-10598.
- Brautigam, K., Dietzel, L., Kleine, T., Stroher, E., Wormuth, D., Dietz, K.J., Radke, D., Wirtz, M., Hell, R., Dormann, P., et al. (2009). Dynamic plastid redox signals integrate gene expression and metabolism to induce distinct metabolic states in photosynthetic acclimation in Arabidopsis. *Plant Cell* 21:2715-2732.
- Briat, J.F., Rouached, H., Tissot, N., Gaymard, F., and Dubos, C. (2015). Integration of P, S, Fe, and Zn nutrition signals in Arabidopsis thaliana: potential involvement of PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1 (PHR1). *Front Plant Sci* 6:290.
- Broniowska, K.A., Diers, A.R., and Hogg, N. (2013). S-NITROSOGLUTATHIONE. *Biochimica et biophysica acta* 1830:3173-3181.
- Bruce, B.D. (2000). Chloroplast transit peptides: structure, function and evolution. *Trends Cell Biol* 10:440-447.
- Bucher, M. (2007). Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytol* 173:11-26.
- Cadenas, E., and Davies, K.J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 29:222-230.
- Camargo, A., Llamas, A., Schnell, R.A., Higuera, J.J., Gonzalez-Ballester, D., Lefebvre, P.A., Fernandez, E., and Galvan, A. (2007). Nitrate signaling by the regulatory gene NIT2 in Chlamydomonas. *Plant Cell* 19:3491-3503.
- Canales, J., Moyano, T.C., Villarroel, E., and Gutierrez, R.A. (2014). Systems analysis of transcriptome data provides new hypotheses about Arabidopsis root response to nitrate treatments. *Front Plant Sci* 5:22.
- Carre, C., Mas, A., and Krouk, G. (2017). Reverse engineering highlights potential principles of large gene regulatory network design and learning. *NPJ Syst Biol Appl* 3:17.
- Carrie, C., Kuhn, K., Murcha, M.W., Duncan, O., Small, I.D., O'Toole, N., and Whelan, J. (2009). Approaches to defining dual-targeted proteins in Arabidopsis. *Plant J* 57:1128-1139.
- Casieri, L., Ait Lahmidi, N., Doidy, J., Veneault-Fourrey, C., Migeon, A., Bonneau, L., Courty, P.-E., Garcia, K., Charbonnier, M., Delteil, A., et al. (2013). Biotrophic transportome in mutualistic plant–fungal interactions. *Mycorrhiza* 23:597-625.

- Castaigns, L., Camargo, A., Pocholle, D., Gaudon, V., Texier, Y., Boutet-Mercey, S., Taconnat, L., Renou, J.P., Daniel-Vedele, F., Fernandez, E., et al. (2009). The nodule inception-like protein 7 modulates nitrate sensing and metabolism in Arabidopsis. *Plant J* 57:426-435.
- Castaigns, L., Marchive, C., Meyer, C., and Krapp, A. (2011). Nitrogen signalling in Arabidopsis: how to obtain insights into a complex signalling network. *J Exp Bot* 62:1391-1397.
- Charrier, B., Champion, A., Henry, Y., and Kreis, M. (2002). Expression profiling of the whole Arabidopsis shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Plant Physiol* 130:577-590.
- Chen, C., and Dickman, M.B. (2005). Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3459-3464.
- Chen, L., Wang, F., Wang, X., and Liu, Y.G. (2013). Robust one-tube Omega-PCR strategy accelerates precise sequence modification of plasmids for functional genomics. *Plant Cell Physiol* 54:634-642.
- Chen, M., Galvao, R.M., Li, M., Burger, B., Bugea, J., Bolado, J., and Chory, J. (2010). Arabidopsis HEMERA/pTAC12 initiates photomorphogenesis by phytochromes. *Cell* 141:1230-1240.
- Cheng, Y., Zhou, W., El sheery, N.I., Peters, C., Li, M., Wang, X., and Huang, J. (2011). Characterization of the Arabidopsis glycerophosphodiester phosphodiesterase (GDPD) family reveals a role of the plastid-localized AtGDPD1 in maintaining cellular phosphate homeostasis under phosphate starvation. *The Plant Journal* 66:781-795.
- Chevalier, F., Pata, M., Nacry, P., Doumas, P., and Rossignol, M. (2003). Effects of phosphate availability on the root system architecture: large-scale analysis of the natural variation between Arabidopsis accessions. *Plant, Cell & Environment* 26:1839-1850.
- Chiu, C.C., Lin, C.S., Hsia, A.P., Su, R.C., Lin, H.L., and Tsay, Y.F. (2004). Mutation of a nitrate transporter, AtNRT1:4, results in a reduced petiole nitrate content and altered leaf development. *Plant Cell Physiol* 45:1139-1148.
- Chopin, F., Orsel, M., Dorbe, M.F., Chardon, F., Truong, H.N., Miller, A.J., Krapp, A., and Daniel-Vedele, F. (2007). The Arabidopsis ATNRT2.7 nitrate transporter controls nitrate content in seeds. *Plant Cell* 19:1590-1602.
- Choudhury, F.K., Rivero, R.M., Blumwald, E., and Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant J* 90:856-867.
- Clarkson, D.T., Gojon, A., Saker, L.R., Wiersema, P.K., Purves, J.V., Tillard, P., Arnold, G.M., Paams, A.J.M., Waalburg, W., and Stulen, I. (1996). Nitrate and ammonium influxes in soybean (*Glycine max*) roots: Direct comparison of ¹³N and ¹⁵N tracing. *Plant Cell Environ.* 19:859-868.
- Clarkson, D.T., and Lüttge, U. (1991). Mineral nutrition: indigestible et repressible nutrient transport systems. *Progress in Botany* 52:61-83.
- Combier, J.P., Frugier, F., de Billy, F., Boualem, A., El-Yahyaoui, F., Moreau, S., Vernie, T., Ott, T., Gamas, P., Crespi, M., et al. (2006). MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes Dev* 20:3084-3088.
- Conn, S.J., Hocking, B., Dayod, M., Xu, B., Athman, A., Henderson, S., Aukett, L., Conn, V., Shearer, M.K., Fuentes, S., et al. (2013). Protocol: optimising hydroponic growth systems for nutritional and physiological analysis of Arabidopsis thaliana and other plants. *Plant Methods* 9:4.
- Corratge-Faillie, C., and Lacombe, B. (2017). Substrate (un)specificity of Arabidopsis NRT1/PTR FAMILY (NPF) proteins. *J Exp Bot* 68:3107-3113.
- Coruzzi, G.M. (2003). Primary N-assimilation into Amino Acids in Arabidopsis. *Arabidopsis Book* 2:e0010.
- Crawford, N.M., and Glass, A.D.M. (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science* 3:389-395.

- Cuadrado, A., and Nebreda, A.R. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J* 429:403-417.
- Cubero-Font, P., Maierhofer, T., Jaslan, J., Rosales, M.A., Espartero, J., Diaz-Rueda, P., Muller, H.M., Hurter, A.L., Al-Rasheid, K.A., Marten, I., et al. (2016). Silent S-Type Anion Channel Subunit SLAH1 Gates SLAH3 Open for Chloride Root-to-Shoot Translocation. *Curr Biol* 26:2213-2220.
- Cuin, T.A., and Shabala, S. (2007). Compatible solutes reduce ROS-induced potassium efflux in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell Environ* 30:875-885.
- Curtis, M.D., and Grossniklaus, U. (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol* 133:462-469.
- Czechowski, v.T. (2005). Nitrogen signalling in *Arabidopsis thaliana* In: Faculty of Mathematics and Natural Sciences of the University of Potsdam University of Potsdam: University of Potsdam, Germany. 148.
- Dathe, M., and Wieprecht, T. (1999). Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim Biophys Acta* 1462:71-87.
- De Angeli, A., Monachello, D., Ephritikhine, G., Frachisse, J.M., Thomine, S., Gambale, F., and Barbier-Brygoo, H. (2006). The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature* 442:939-942.
- Dechorgnat, J., Patrit, O., Krapp, A., Fagard, M., and Daniel-Vedele, F. (2012). Characterization of the Nrt2.6 gene in *Arabidopsis thaliana*: a link with plant response to biotic and abiotic stress. *PLoS One* 7:e42491.
- del Rio, L.A., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Palma, J.M., and Barroso, J.B. (2006). Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiol* 141:330-335.
- Delhon, P., Gojon, A., Tillard, P., and Passama, L. (1995a). Diurnal regulation of NO₃-uptake in soybean plants II. Relationship with accumulation of NO and asparagine in the roots. *Journal of Experimental Botany* 46:1595-1602.
- Delhon, P., Gojon, A., Tillard, P., and Passama, L. (1995b). Diurnal regulation on NO₃⁻ uptake in soybean plants. Changes in NO₃⁻ influx, efflux, and N utilization in the plant during the day/night cycle. *J Exp Bot* 46:1585-1594.
- Demidchik, V., Cuin, T.A., Svistunenko, D., Smith, S.J., Miller, A.J., Shabala, S., Sokolik, A., and Yurin, V. (2010). *Arabidopsis* root K⁺-efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death. *J Cell Sci* 123:1468-1479.
- Demidchik, V., Shabala, S.N., Coutts, K.B., Tester, M.A., and Davies, J.M. (2003). Free oxygen radicals regulate plasma membrane Ca²⁺- and K⁺-permeable channels in plant root cells. *J Cell Sci* 116:81-88.
- Despres, C., Chubak, C., Rochon, A., Clark, R., Bethune, T., Desveaux, D., and Fobert, P.R. (2003). The *Arabidopsis* NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *Plant Cell* 15:2181-2191.
- Despres, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E., and Fobert, P.R. (2000). The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell* 12:279-290.
- Douglas, A.E., and Raven, J.A. (2003). Genomes at the interface between bacteria and organelles. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:5-17; discussion 517-518.
- Drew, M.C. (1975). Comparison of the effects of a localized supply of phosphate, nitrate, ammonium and potassium on the growth of the seminal root system, and the shoot, in barley. *New Phyt* 75:479-490.

- Drew, M.C., and Saker, L.R. (1975). Nutrient supply and the growth of the seminal root system of barley. II. Localized, compensatory increases in lateral root growth and rates of nitrate uptake when nitrate supply is restricted to only part of the root system. *J Exp Bot* 26.
- Duan, K., Yi, K., Dang, L., Huang, H., Wu, W., and Wu, P. (2008). Characterization of a sub-family of Arabidopsis genes with the SPX domain reveals their diverse functions in plant tolerance to phosphorus starvation. *Plant J* 54:965-975.
- Estavillo, G.M., Chan, K.X., Phua, S.Y., and Pogson, B.J. (2012). Reconsidering the nature and mode of action of metabolite retrograde signals from the chloroplast. *Front Plant Sci* 3:300.
- Fagard, M., Launay, A., Clement, G., Courtial, J., Dellagi, A., Farjad, M., Krapp, A., Soulie, M.C., and Masclaux-Daubresse, C. (2014). Nitrogen metabolism meets phytopathology. *J Exp Bot* 65:5643-5656.
- Fan, S.C., Lin, C.S., Hsu, P.K., Lin, S.H., and Tsay, Y.F. (2009). The arabidopsis nitrate transporter NRT1.7, expressed in phloem, is responsible for source-to-sink remobilization of nitrate. *Plant Cell* 21:2750-2761.
- Feys, B.J., Moisan, L.J., Newman, M.A., and Parker, J.E. (2001). Direct interaction between the Arabidopsis disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *EMBO J* 20:5400-5411.
- Filleur, S., Dorbe, M.F., Cerezo, M., Orsel, M., Granier, F., Gojon, A., and Daniel-Vedele, F. (2001). An arabidopsis T-DNA mutant affected in *Nrt2* genes is impaired in nitrate uptake. *FEBS Lett.* 489:220-224.
- Fitter, D.W., Martin, D.J., Copley, M.J., Scotland, R.W., and Langdale, J.A. (2002). GLK gene pairs regulate chloroplast development in diverse plant species. *Plant J* 31:713-727.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M.A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J.D., et al. (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422:442-446.
- Fujii, H., Chiou, T.J., Lin, S.I., Aung, K., and Zhu, J.K. (2005). A miRNA involved in phosphate-starvation response in Arabidopsis. *Curr Biol* 15:2038-2043.
- Gagat, P., Bodyl, A., and Mackiewicz, P. (2013). How protein targeting to primary plastids via the endomembrane system could have evolved? A new hypothesis based on phylogenetic studies. *Biol Direct* 8:18.
- Galichet, A., Hoyerova, K., Kaminek, M., and Gruissem, W. (2008). Farnesylation directs AtIPT3 subcellular localization and modulates cytokinin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiol* 146:1155-1164.
- Gan, Y., Filleur, S., Rahman, A., Gotensparre, S., and Forde, B.G. (2005). Nutritional regulation of ANR1 and other root-expressed MADS-box genes in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 222:730-742.
- Gansel, X., Munos, S., Tillard, P., and Gojon, A. (2001). Differential regulation of the NO₃⁻ and NH₄⁺ transporter genes *AtNrt2.1* and *AtAmt1.1* in Arabidopsis: relation with long-distance and local controls by N status of the plant. *Plant J* 26:143-155.
- Garnett, T., Conn, V., and Kaiser, B.N. (2009). Root based approaches to improving nitrogen use efficiency in plants. *Plant Cell Environ* 32:1272-1283.
- Gaufichon, L., Marmagne, A., Belcram, K., Yoneyama, T., Sakakibara, Y., Hase, T., Grandjean, O., Clement, G., Citerne, S., Boutet-Mercey, S., et al. (2017). ASN1-encoded asparagine synthetase in floral organs contributes to nitrogen filling in Arabidopsis seeds. *Plant J* 91:371-393.
- Geelen, D., Lurin, C., Bouchez, D., Frachisse, J.M., Lelievre, F., Courtial, B., Barbier-Brygoo, H., and Maurel, C. (2000). Disruption of putative anion channel gene AtCLC-a in Arabidopsis suggests a role in the regulation of nitrate content. *Plant J* 21:259-267.
- Geiger, D., Maierhofer, T., Al-Rasheid, K.A., Scherzer, S., Mumm, P., Liese, A., Ache, P., Wellmann, C., Marten, I., Grill, E., et al. (2011). Stomatal closure by fast abscisic acid

- signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1. *Sci Signal* 4:ra32.
- Giehl, R.F.H., Laginha, A.M., Duan, F., Rentsch, D., Yuan, L., and von Wiren, N. (2017). A Critical Role of AMT2;1 in Root-To-Shoot Translocation of Ammonium in Arabidopsis. *Mol Plant* 10:1449-1460.
- Gifford, M.L., Dean, A., Gutierrez, R.A., Coruzzi, G.M., and Birnbaum, K.D. (2008). Cell-specific nitrogen responses mediate developmental plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:803-808.
- Gill, S.S., and Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48:909-930.
- Giots, F., Donaton, M.C.V., and Thevelein, J.M. (2003). Inorganic phosphate is sensed by specific phosphate carriers and acts in concert with glucose as a nutrient signal for activation of the protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* 47:1163-1181.
- Glass, A.D., Shaff, J.E., and Kochian, L.V. (1992). Studies of the Uptake of Nitrate in Barley : IV. Electrophysiology. *Plant Physiol* 99:456-463.
- Gojon, A., Krouk, G., Perrine-Walker, F., and Laugier, E. (2011). Nitrate transceptor(s) in plants. *J Exp Bot* 62:2299-2308.
- Gojon, A., Nacry, P., and Davidian, J.C. (2009). Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. *Current opinion in plant biology* 12:328-338.
- Gonzalez, D.H. (2015). *Plant Transcription Factors Evolutionary, Structural, and Functional Aspects*: Academic Press, Elsevier.
- Gray, M.W. (1992). The endosymbiont hypothesis revisited. *Int Rev Cytol* 141:233-357.
- Grimm, B., Dehesh, K., Zhang, L., and Leister, D. (2014). Intracellular communication. *Mol Plant* 7:1071-1074.
- Gruber, N., and Galloway, J.N. (2008). An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature* 451:293-296.
- Guan, P., Ripoll, J.J., Wang, R., Vuong, L., Bailey-Steinitz, L.J., Ye, D., and Crawford, N.M. (2017). Interacting TCP and NLP transcription factors control plant responses to nitrate availability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:2419-2424.
- Guo, W., Wang, C., Zuo, Z., and Qiu, J.L. (2014a). The roles of anion channels in Arabidopsis immunity. *Plant Signal Behav* 9:e29230.
- Guo, W., Zuo, Z., Cheng, X., Sun, J., Li, H., Li, L., and Qiu, J.L. (2014b). The chloride channel family gene CLCd negatively regulates pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity in Arabidopsis. *J Exp Bot* 65:1205-1215.
- Gutierrez, R.A., Gifford, M.L., Poultney, C., Wang, R., Shasha, D.E., Coruzzi, G.M., and Crawford, N.M. (2007). Insights into the genomic nitrate response using genetics and the Sungear Software System. *J Exp Bot* 58:2359-2367.
- Hanson, M.R., and Sattarzadeh, A. (2008). Dynamic morphology of plastids and stromules in angiosperm plants. *Plant Cell Environ* 31:646-657.
- Harada, H., Kuromori, T., Hirayama, T., Shinozaki, K., and Leigh, R.A. (2004). Quantitative trait loci analysis of nitrate storage in Arabidopsis leading to an investigation of the contribution of the anion channel gene, AtCLC-c, to variation in nitrate levels. *J Exp Bot* 55:2005-2014.
- He, H., Liang, G., Li, Y., Wang, F., and Yu, D. (2014). Two young MicroRNAs originating from target duplication mediate nitrogen starvation adaptation via regulation of glucosinolate synthesis in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol* 164:853-865.
- Hedrich, R. (2012). Ion channels in plants. *Physiol Rev* 92:1777-1811.
- Heine, G.F., Hernandez, J.M., and Grotewold, E. (2004). Two cysteines in plant R2R3 MYB domains participate in REDOX-dependent DNA binding. *J Biol Chem* 279:37878-37885.

- Hellman, L.M., and Fried, M.G. (2007). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat Protoc* 2:1849-1861.
- Herdean, A., Nziengui, H., Zsiros, O., Solymosi, K., Garab, G., Lundin, B., and Spetea, C. (2016). The Arabidopsis Thylakoid Chloride Channel AtCLCe Functions in Chloride Homeostasis and Regulation of Photosynthetic Electron Transport. *Front Plant Sci* 7:115.
- Himelblau, E., and Amasino, R.M. (2001). Nutrients mobilized from leaves of Arabidopsis thaliana during leaf senescence. *Journal of Plant Physiology* 158:1317-1323.
- Ho, C.H., Lin, S.H., Hu, H.C., and Tsay, Y.F. (2009). CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell* 138:1184-1194.
- Hole, D.J., Emran, A.M., Fares, Y., and Drew, M.C. (1990). Induction of nitrate transport in maize roots, and kinetics of influx, measured with nitrogen-13. *Plant Physiol* 93:642-647.
- Hsieh, L.C., Lin, S.I., Shih, A.C., Chen, J.W., Lin, W.Y., Tseng, C.Y., Li, W.H., and Chiou, T.J. (2009). Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate-deficiency in Arabidopsis by deep sequencing. *Plant Physiol*.
- Hsu, P.K., and Tsay, Y.F. (2013). Two phloem nitrate transporters, NRT1.11 and NRT1.12, are important for redistributing xylem-borne nitrate to enhance plant growth. *Plant Physiol* 163:844-856.
- Hu, H.C., Wang, Y.Y., and Tsay, Y.F. (2009). AtCIPK8, a CBL-interacting protein kinase, regulates the low-affinity phase of the primary nitrate response. *Plant J* 57:264-278.
- Hu, R., Zhu, Y., Wei, J., Chen, J., Shi, H., Shen, G., and Zhang, H. (2017). Overexpression of PP2A-C5 that encodes the catalytic subunit 5 of protein phosphatase 2A in Arabidopsis confers better root and shoot development under salt conditions. *Plant Cell Environ* 40:150-164.
- Huang, N.C., Liu, K.H., Lo, H.J., and Tsay, Y.F. (1999). Cloning and functional characterization of an Arabidopsis nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *Plant Cell* 11:1381-1392.
- Hugosson, M., Andreu, D., Boman, H.G., and Glaser, E. (1994). Antibacterial peptides and mitochondrial presequences affect mitochondrial coupling, respiration and protein import. *Eur J Biochem* 223:1027-1033.
- Imes, D., Mumm, P., Bohm, J., Al-Rasheid, K.A., Marten, I., Geiger, D., and Hedrich, R. (2013). Open stomata 1 (OST1) kinase controls R-type anion channel QUAC1 in Arabidopsis guard cells. *Plant J* 74:372-382.
- Isemer, R., Mulisch, M., Schafer, A., Kirchner, S., Koop, H.U., and Krupinska, K. (2012). Recombinant Whirly1 translocates from transplastomic chloroplasts to the nucleus. *FEBS Lett* 586:85-88.
- Ishida, H., Yoshimoto, K., Izumi, M., Reisen, D., Yano, Y., Makino, A., Ohsumi, Y., Hanson, M.R., and Mae, T. (2008). Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. *Plant Physiol* 148:142-155.
- Janssen-Heininger, Y.M., Mossman, B.T., Heintz, N.H., Forman, H.J., Kalyanaraman, B., Finkel, T., Stampler, J.S., Rhee, S.G., and van der Vliet, A. (2008). Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. *Free Radic Biol Med* 45:1-17.
- Jentsch, T.J., Steinmeyer, K., and Schwarz, G. (1990). Primary structure of Torpedo marmorata chloride channel isolated by expression cloning in Xenopus oocytes. *Nature* 348:510-514.
- Jeong, S.Y., Rose, A., and Meier, I. (2003). MFP1 is a thylakoid-associated, nucleoid-binding protein with a coiled-coil structure. *Nucleic Acids Res* 31:5175-5185.
- Jin, J., Tian, F., Yang, D.C., Meng, Y.Q., Kong, L., Luo, J., and Gao, G. (2017). PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. *Nucleic Acids Res* 45:D1040-D1045.

- Johnson, D.S., Mortazavi, A., Myers, R.M., and Wold, B. (2007). Genome-wide mapping of in vivo protein-DNA interactions. *Science* 316:1497-1502.
- Jones-Rhoades, M.W., and Bartel, D.P. (2004). Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell* 14:787-799.
- Joo, J.H., Bae, Y.S., and Lee, J.S. (2001). Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiol* 126:1055-1060.
- Jossier, M., Kroniewicz, L., Dalmas, F., Le Thiec, D., Ephritikhine, G., Thomine, S., Barbier-Brygoo, H., Vavasseur, A., Filleur, S., and Leonhardt, N. (2010). The Arabidopsis vacuolar anion transporter, AtCLCc, is involved in the regulation of stomatal movements and contributes to salt tolerance. *Plant J* 64:563-576.
- Kamthan, A., Chaudhuri, A., Kamthan, M., and Datta, A. (2015). Small RNAs in plants: recent development and application for crop improvement. *Front Plant Sci* 6:208.
- Kant, S., Peng, M., and Rothstein, S.J. (2011). Genetic regulation by NLA and microRNA827 for maintaining nitrate-dependent phosphate homeostasis in arabidopsis. *PLoS Genet* 7:e1002021.
- Ke, Y.H. (2016). HMYB1 interacts with HDA6 and is involved in flowering in Arabidopsis. In: Institute of Plant Biology, College of Life Science National Taiwan University 70.
- Kechid, M., Desbrosses, G., Rokhsi, W., Varoquaux, F., Djekoun, A., and Touraine, B. (2013). The NRT2.5 and NRT2.6 genes are involved in growth promotion of Arabidopsis by the plant growth-promoting rhizobacterium (PGPR) strain *Phyllobacterium brassicacearum* STM196. *New Phytol* 198:514-524.
- Kellermeier, F., Armengaud, P., Seditas, T.J., Danku, J., Salt, D.E., and Amtmann, A. (2014). Analysis of the Root System Architecture of Arabidopsis Provides a Quantitative Readout of Crosstalk between Nutritional Signals. *Plant Cell* 26:1480-1496.
- Kennedy, I.R. (1966). Primary products of symbiotic nitrogen fixation. II. Pulse-labelling of serradella nodules with $^{15}\text{N}_2$. *Biochim Biophys Acta* 130:295-303.
- Kiba, T., Feria-Bourrellier, A.B., Lafouge, F., Lezhneva, L., Boutet-Mercey, S., Orsel, M., Brehaut, V., Miller, A., Daniel-Vedele, F., Sakakibara, H., et al. (2012). The Arabidopsis nitrate transporter NRT2.4 plays a double role in roots and shoots of nitrogen-starved plants. *Plant Cell* 24:245-258.
- Kiba, T., and Krapp, A. (2016). Plant Nitrogen Acquisition Under Low Availability: Regulation of Uptake and Root Architecture. *Plant Cell Physiol* 57:707-714.
- Kiba, T.I., J. Kudo, T. Ueda, N. Konishi, M. Mitsuda, N. Takiguchi, Y. Kondou, Y. Yoshizumi, T. Takagi, M.O. Matsui, M. Yano, K. Yanagisawa, S. Sakakibara, H. (Submitted). Direct repression of nitrogen-starvation responses by the Arabidopsis GARP-type transcription factor AtNIGT1 subfamily members. *The Plant Cell*.
- Kim, C., Meskauskienė, R., Apel, K., and Laloi, C. (2008). No single way to understand singlet oxygen signalling in plants. *EMBO Rep* 9:435-439.
- Kim, H.R., Lee, G.H., Cho, E.Y., Chae, S.W., Ahn, T., and Chae, H.J. (2009). Bax inhibitor 1 regulates ER-stress-induced ROS accumulation through the regulation of cytochrome P450 2E1. *J Cell Sci* 122:1126-1133.
- Kitano, M., Inoue, Y., Yamazaki, Y., Hayashi, F., Kanbara, S., Matsuishi, S., Yokoyama, T., Kim, S.W., Hara, M., and Hosono, H. (2012). Ammonia synthesis using a stable electride as an electron donor and reversible hydrogen store. *Nat Chem* 4:934-940.
- Kleffmann, T., Russenberger, D., von Zychlinski, A., Christopher, W., Sjolander, K., Grissem, W., and Baginsky, S. (2004). The Arabidopsis thaliana chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. *Curr Biol* 14:354-362.
- Kobayashi, K., Baba, S., Obayashi, T., Sato, M., Toyooka, K., Keranen, M., Aro, E.M., Fukaki, H., Ohta, H., Sugimoto, K., et al. (2012). Regulation of root greening by light and auxin/cytokinin signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* 24:1081-1095.

- Konishi, M., and Yanagisawa, S. (2013a). Arabidopsis NIN-like transcription factors have a central role in nitrate signalling. *Nat Commun* 4:1617.
- Konishi, M., and Yanagisawa, S. (2013b). An NLP-binding site in the 3' flanking region of the nitrate reductase gene confers nitrate-inducible expression in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Soil Science and Plant Nutrition* 59:612-620.
- Konishi, M., and Yanagisawa, S. (2014). Emergence of a new step towards understanding the molecular mechanisms underlying nitrate-regulated gene expression. *J Exp Bot* 65:5589-5600.
- Koornneef, M., Hanhart, C.J., Hilhorst, H.W., and Karssen, C.M. (1989). In Vivo Inhibition of Seed Development and Reserve Protein Accumulation in Recombinants of Abscissic Acid Biosynthesis and Responsiveness Mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 90:463-469.
- Kotur, Z., and Glass, A.D. (2015). A 150 kDa plasma membrane complex of AtNRT2.5 and AtNAR2.1 is the major contributor to constitutive high-affinity nitrate influx in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* 38:1490-1502.
- Kotur, Z., Mackenzie, N., Ramesh, S., Tyerman, S.D., Kaiser, B.N., and Glass, A.D. (2012). Nitrate transport capacity of the *Arabidopsis thaliana* NRT2 family members and their interactions with AtNAR2.1. *New Phytol* 194:724-731.
- Kramer, S.B., Reganold, J.P., Glover, J.D., Bohannon, B.J., and Mooney, H.A. (2006). Reduced nitrate leaching and enhanced denitrifier activity and efficiency in organically fertilized soils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:4522-4527.
- Krapp, A., Berthome, R., Orsel, M., Mercey-Boutet, S., Yu, A., Castaings, L., Elftieh, S., Major, H., Renou, J.P., and Daniel-Vedele, F. (2011). *Arabidopsis* roots and shoots show distinct temporal adaptation patterns toward nitrogen starvation. *Plant Physiol* 157:1255-1282.
- Krapp, A., David, L.C., Chardin, C., Girin, T., Marmagne, A., Leprince, A.S., Chaillou, S., Ferrario-Mery, S., Meyer, C., and Daniel-Vedele, F. (2014). Nitrate transport and signalling in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 65:789-798.
- Krause, K., and Krupinska, K. (2009). Nuclear regulators with a second home in organelles. *Trends Plant Sci* 14:194-199.
- Kronzucker, H.J., Siddiqi, M.Y., Glass, A.D., and Kirk, G.J. (1999). Nitrate-ammonium synergism in rice. A subcellular flux analysis. *Plant Physiol* 119:1041-1046.
- Krouk, G. (2017). Nitrate signalling: Calcium bridges the nitrate gap. *Nat Plants* 3:17095.
- Krouk, G., Carre, C., Fizames, C., Gojon, A., Ruffel, S., and Lacombe, B. (2015). GeneCloud Reveals Semantic Enrichment in Lists of Gene Descriptions. *Mol Plant* 8:971-973.
- Krouk, G., Lacombe, B., Bielach, A., Perrine-Walker, F., Malinska, K., Mounier, E., Hoyerova, K., Tillard, P., Leon, S., Ljung, K., et al. (2010a). Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Dev Cell* 18:927-937.
- Krouk, G., Mirowski, P., LeCun, Y., Shasha, D.E., and Coruzzi, G.M. (2010b). Predictive network modeling of the high-resolution dynamic plant transcriptome in response to nitrate. *Genome Biol* 11:R123.
- Krouk, G., Tranchina, D., Lejay, L., Cruikshank, A.A., Shasha, D., Coruzzi, G.M., and Gutierrez, R.A. (2009). A systems approach uncovers restrictions for signal interactions regulating genome-wide responses to nutritional cues in *Arabidopsis*. *PLoS Comput Biol* 5:e1000326.
- Kuruthukulangarakoola, G.T., Zhang, J., Albert, A., Winkler, B., Lang, H., Buegger, F., Gaupels, F., Heller, W., Michalke, B., Sarioglu, H., et al. (2017). Nitric oxide-fixation by non-symbiotic haemoglobin proteins in *Arabidopsis thaliana* under N-limited conditions. *Plant, Cell & Environment* 40:36-50.

- Kustanovich, I., Shalev, D.E., Mikhlin, M., Gaidukov, L., and Mor, A. (2002). Structural requirements for potent versus selective cytotoxicity for antimicrobial dermaseptin S4 derivatives. *J Biol Chem* 277:16941-16951.
- Kwon, C., and Chung, I.K. (2004). Interaction of an Arabidopsis RNA-binding protein with plant single-stranded telomeric DNA modulates telomerase activity. *J Biol Chem* 279:12812-12818.
- Laloi, C., Apel, K., and Danon, A. (2004). Reactive oxygen signalling: the latest news. *Current opinion in plant biology* 7:323-328.
- Lambers, H., Shane, M.W., Cramer, M.D., Pearse, S.J., and Veneklaas, E.J. (2006). Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: Matching morphological and physiological traits. *Ann Bot* 98:693-713.
- Laugier, E., Bouguyon, E., Mauries, A., Tillard, P., Gojon, A., and Lejay, L. (2012). Regulation of high-affinity nitrate uptake in roots of Arabidopsis depends predominantly on posttranscriptional control of the NRT2.1/NAR2.1 transport system. *Plant Physiol* 158:1067-1078.
- Lea, P.J., and Mifflin, B.J. (1974). Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature* 251:614.
- Lea, P.J., Sodek, L., Parry, M.A.J., Shewry, P.R., and Halford, N.G. (2007). Asparagine in plants. *Annals of Applied Biology* 150:1-26.
- Lea, P.J.R., S.A. Stewart, G.R. (1990). The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate, and asparagine.
- Lee, R.B. (1993). Control of net uptake of nutrients by regulation of influx in braley plants recovering from nutrient deficiency. *Annals of Botany* 72:223-230.
- Lee, S.C., Lan, W., Buchanan, B.B., and Luan, S. (2009). A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:21419-21424.
- Lee, T.I., and Young, R.A. (2000). Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet* 34:77-137.
- Lejay, L., Tillard, P., Lepetit, M., Olive, F., Filleur, S., Daniel-Vedele, F., and Gojon, A. (1999). Molecular and functional regulation of two NO₃⁻ uptake systems by N- and C-status of Arabidopsis plants. *Plant J* 18:509-519.
- Leon, P., Gregorio, J., and Cordoba, E. (2012). ABI4 and its role in chloroplast retrograde communication. *Front Plant Sci* 3:304.
- Leran, S., Edel, K.H., Pervent, M., Hashimoto, K., Corratge-Faillie, C., Offenborn, J.N., Tillard, P., Gojon, A., Kudla, J., and Lacombe, B. (2015). Nitrate sensing and uptake in Arabidopsis are enhanced by ABI2, a phosphatase inactivated by the stress hormone abscisic acid. *Sci Signal* 8:ra43.
- Leran, S., Varala, K., Boyer, J.C., Chiurazzi, M., Crawford, N., Daniel-Vedele, F., David, L., Dickstein, R., Fernandez, E., Forde, B., et al. (2014). A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. *Trends Plant Sci* 19:5-9.
- Lewis, O.A.O.P., T.A. (1978). The effect of nitrate feeding levels on the pathway of nitrogen incorporation into photosynthesizing leaf metabolism of *Datura stramonium* L. *Plant and Soil* 49:625-631.
- Leyva-González, M.A., Ibarra-Laclette, E., Cruz-Ramírez, A., and Herrera-Estrella, L. (2012). Functional and Transcriptome Analysis Reveals an Acclimatization Strategy for Abiotic Stress Tolerance Mediated by Arabidopsis NF-YA Family Members. *PLOS ONE* 7:e48138.
- Lezhneva, L., Kiba, T., Feria-Bourrellier, A.B., Lafouge, F., Boutet-Mercey, S., Zoufan, P., Sakakibara, H., Daniel-Vedele, F., and Krapp, A. (2014). The Arabidopsis nitrate

- transporter NRT2.5 plays a role in nitrate acquisition and remobilization in nitrogen-starved plants. *Plant J* 80:230-241.
- Li, H., Yu, M., Du, X.Q., Wang, Z.F., Wu, W.H., Quintero, F.J., Jin, X.H., Li, H.D., and Wang, Y. (2017a). NRT1.5/NPF7.3 Functions as a Proton-Coupled H(+)/K(+) Antiporter for K(+) Loading into the Xylem in Arabidopsis. *Plant Cell* 29:2016-2026.
- Li, J.Y., Fu, Y.L., Pike, S.M., Bao, J., Tian, W., Zhang, Y., Chen, C.Z., Zhang, Y., Li, H.M., Huang, J., et al. (2010). The Arabidopsis nitrate transporter NRT1.8 functions in nitrate removal from the xylem sap and mediates cadmium tolerance. *Plant Cell* 22:1633-1646.
- Li, L., Zheng, W., Zhu, Y., Ye, H., Tang, B., Arendsee, Z.W., Jones, D., Li, R., Ortiz, D., Zhao, X., et al. (2015). QQS orphan gene regulates carbon and nitrogen partitioning across species via NF-YC interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112:14734-14739.
- Li, W., Wang, Y., Okamoto, M., Crawford, N.M., Siddiqi, M.Y., and Glass, A.D. (2007). Dissection of the AtNRT2.1:AtNRT2.2 inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. *Plant Physiol* 143:425-433.
- Li, Y., Krouk, G., Coruzzi, G.M., and Ruffel, S. (2014). Finding a nitrogen niche: a systems integration of local and systemic nitrogen signalling in plants. *J Exp Bot*.
- Li, Z., Wang, R., Gao, Y., Wang, C., Zhao, L., Xu, N., Chen, K.E., Qi, S., Zhang, M., Tsay, Y.F., et al. (2017b). The Arabidopsis CPSF30-L gene plays an essential role in nitrate signaling and regulates the nitrate transceptor gene NRT1.1. *New Phytol* 216:1205-1222.
- Liang, G., He, H., and Yu, D. (2012). Identification of nitrogen starvation-responsive microRNAs in Arabidopsis thaliana. *PLoS One* 7:e48951.
- Lin, S.H., Kuo, H.F., Canivenc, G., Lin, C.S., Lepetit, M., Hsu, P.K., Tillard, P., Lin, H.L., Wang, Y.Y., Tsai, C.B., et al. (2008). Mutation of the Arabidopsis NRT1.5 nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. *Plant Cell* 20:2514-2528.
- Lindermayr, C., Sell, S., Muller, B., Leister, D., and Durner, J. (2010). Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of Arabidopsis thaliana by nitric oxide. *Plant Cell* 22:2894-2907.
- Liu, H., Yang, H., Wu, C., Feng, J., Liu, X., Qin, H., and Wang, D. (2009). Overexpressing HRS1 confers hypersensitivity to low phosphate-elicited inhibition of primary root growth in Arabidopsis thaliana. *J Integr Plant Biol* 51:382-392.
- Liu, K.H., Huang, C.Y., and Tsay, Y.F. (1999). CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of Arabidopsis involved in multiple phases of nitrate uptake. *Plant Cell* 11:865-874.
- Liu, K.H., Niu, Y., Konishi, M., Wu, Y., Du, H., Sun Chung, H., Li, L., Boudsocq, M., McCormack, M., Maekawa, S., et al. (2017a). Discovery of nitrate-CPK-NLP signalling in central nutrient-growth networks. *Nature*.
- Liu, K.H., and Tsay, Y.F. (2003). Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *Embo J*. 22:1005-1013.
- Liu, W., Sun, Q., Wang, K., Du, Q., and Li, W.X. (2017b). Nitrogen Limitation Adaptation (NLA) is involved in source-to-sink remobilization of nitrate by mediating the degradation of NRT1.7 in Arabidopsis. *New Phytol* 214:734-744.
- Liu, Y., and von Wiren, N. (2017). Ammonium as a signal for physiological and morphological responses in plants. *J Exp Bot* 68:2581-2592.
- Loque, D., and von Wiren, N. (2004). Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. *J Exp Bot* 55:1293-1305.
- Ludewig, U., Neuhauser, B., and Dynowski, M. (2007). Molecular mechanisms of ammonium transport and accumulation in plants. *FEBS Lett* 581:2301-2308.
- Ludewig, U., von Wiren, N., and Frommer, W.B. (2002). Uniport of NH₄⁺ by the root hair plasma membrane ammonium transporter LeAMT1;1. *J Biol Chem* 277:13548-13555.

- Lv, Q., Zhong, Y., Wang, Y., Wang, Z., Zhang, L., Shi, J., Wu, Z., Liu, Y., Mao, C., Yi, K., et al. (2014). SPX4 Negatively Regulates Phosphate Signaling and Homeostasis through Its Interaction with PHR2 in Rice. *The Plant Cell* 26:1586-1597.
- Lv, Q.-d., Tang, R.-j., Liu, H., Gao, X.-s., Li, Y.-z., Zheng, H.-q., and Zhang, H.-x. (2009). Cloning and molecular analyses of the *Arabidopsis thaliana* chloride channel gene family. *Plant Science* 176:650-661.
- Ma, Q., Tang, R.J., Zheng, X.J., Wang, S.M., and Luan, S. (2015). The calcium sensor CBL7 modulates plant responses to low nitrate in *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun* 468:59-65.
- Maierhofer, T., Lind, C., Huttl, S., Scherzer, S., Papenfuss, M., Simon, J., Al-Rasheid, K.A., Ache, P., Rennenberg, H., Hedrich, R., et al. (2014). A Single-Pore Residue Renders the *Arabidopsis* Root Anion Channel SLAH2 Highly Nitrate Selective. *Plant Cell* 26:2554-2567.
- Malamy, J.E. (2005). Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell Environ* 28:67-77.
- Mantelin, S., Desbrosses, G., Larcher, M., Tranbarger, T.J., Cleyet-Marel, J.C., and Touraine, B. (2006). Nitrate-dependent control of root architecture and N nutrition are altered by a plant growth-promoting *Phyllobacterium* sp. *Planta* 223:591-603.
- Marchi, L., Degola, F., Polverini, E., Terce-Laforgue, T., Dubois, F., Hirel, B., and Restivo, F.M. (2013). Glutamate dehydrogenase isoenzyme 3 (GDH3) of *Arabidopsis thaliana* is regulated by a combined effect of nitrogen and cytokinin. *Plant Physiol Biochem* 73:368-374.
- Marchive, C., Roudier, F., Castaings, L., Brehaut, V., Blondet, E., Colot, V., Meyer, C., and Krapp, A. (2013). Nuclear retention of the transcription factor NLP7 orchestrates the early response to nitrate in plants. *Nat Commun* 4:1713.
- Marmagne, A., Vinauger-Douard, M., Monachello, D., de Longevialle, A.F., Charon, C., Allot, M., Rappaport, F., Wollman, F.A., Barbier-Brygoo, H., and Ephritikhine, G. (2007). Two members of the *Arabidopsis* CLC (chloride channel) family, AtCLCe and AtCLCf, are associated with thylakoid and Golgi membranes, respectively. *J Exp Bot* 58:3385-3393.
- Marschner, A. (1995). *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press. San Diego.
- Marschner, H. (2012). *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*.
- Masclaux-Daubresse, C., Reisdorf-Cren, M., Pageau, K., Lelandais, M., Grandjean, O., Kronenberger, J., Valadier, M.H., Feraud, M., Joulet, T., and Suzuki, A. (2006). Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco. *Plant Physiol* 140:444-456.
- Mayer, M., Dynowski, M., and Ludewig, U. (2006). Ammonium ion transport by the AMT/Rh homologue LeAMT1;1. *Biochem J* 396:431-437.
- Mayer, M., and Ludewig, U. (2006). Role of AMT1;1 in NH₄⁺ acquisition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol (Stuttg)* 8:522-528.
- Medici, A., and Krouk, G. (2014). The primary nitrate response: a multifaceted signalling pathway. *J Exp Bot* 65:5567-5576.
- Medici, A., Marshall-Colon, A., Ronzier, E., Szponarski, W., Wang, R., Gojon, A., Crawford, N.M., Ruffel, S., Coruzzi, G.M., and Krouk, G. (2015). AtNIGT1/HRS1 integrates nitrate and phosphate signals at the *Arabidopsis* root tip. *Nat Commun* 6:6274.
- Medici, A.S., W. Dangeville, P. Safi, A. Dissanayake, I.M. Saenchai, C. Emanuel, A. Rubio, V. Lacombe, B. Ruffel, S. Tanurdzic, M. Rouached, H. Krouk, G. (submitted). A molecular framework of how Nitrogen controls the Phosphate Starvation Response in plants.
- Melonek, J., Matros, A., Trosch, M., Mock, H.P., and Krupinska, K. (2012). The core of chloroplast nucleoids contains architectural SWIB domain proteins. *Plant Cell* 24:3060-3073.

- Menz, J., Li, Z., Schulze, W.X., and Ludewig, U. (2016). Early nitrogen-deprivation responses in *Arabidopsis* roots reveal distinct differences on transcriptome and (phospho-) proteome levels between nitrate and ammonium nutrition. *Plant J* 88:717-734.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., and Noctor, G. (2010). Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *J Exp Bot* 61:4197-4220.
- Mifflin, B.J., and Lea, P.J. (1976). The path of ammonia assimilation in the plant kingdom. *Trends in Biochemical Sciences* 1:103-106.
- Mignolet-Spruyt, L., Xu, E., Idanheimo, N., Hoeberichts, F.A., Muhlenbock, P., Brosche, M., Van Breusegem, F., and Kangasjarvi, J. (2016). Spreading the news: subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling. *J Exp Bot* 67:3831-3844.
- Miller, A.J., Fan, X., Orsel, M., Smith, S.J., and D.M., W. (2007). Nitrate transport and signalling. *Journal of Experimental Botany* 58:2297-2306.
- Miller, A.J., and Smith, S.J. (1996). Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells. *Journal of Experimental Botany* 47:843-854.
- Miller, G., Schlauch, K., Tam, R., Cortes, D., Torres, M.A., Shulaev, V., Dangl, J.L., and 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., and Mittler, R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ* 33:453-467.
- Misson, J., Raghothama, K.G., Jain, A., Jouhet, J., Block, M.A., Bligny, R., Ortet, P., Creff, A., Somerville, S., Rolland, N., et al. (2005). A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11934-11939.
- Mito, T., Seki, M., Shinozaki, K., Ohme-Takagi, M., and Matsui, K. (2011). Generation of chimeric repressors that confer salt tolerance in *Arabidopsis* and rice. *Plant Biotechnol J* 9:736-746.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7:405-410.
- Mittler, R. (2017). ROS Are Good. *Trends Plant Sci* 22:11-19.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., and Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9:490-498.
- Monachello, D., Allot, M., Oliva, S., Krapp, A., Daniel-Vedele, F., Barbier-Brygoo, H., and Ephritikhine, G. (2009). Two anion transporters AtClCa and AtClCe fulfil interconnecting but not redundant roles in nitrate assimilation pathways. *New Phytol* 183:88-94.
- Monke, G., Seifert, M., Keilwagen, J., Mohr, M., Grosse, I., Hahnel, U., Junker, A., Weisshaar, B., Conrad, U., Baumlein, H., et al. (2012). Toward the identification and regulation of the *Arabidopsis thaliana* ABI3 regulon. *Nucleic Acids Res* 40:8240-8254.
- Moreau, F., Thevenon, E., Blanvillain, R., Lopez-Vidriero, I., Franco-Zorrilla, J.M., Dumas, R., Parcy, F., Morel, P., Trehin, C., and Carles, C.C. (2016). The Myb-domain protein ULTRAPETALA1 INTERACTING FACTOR 1 controls floral meristem activities in *Arabidopsis*. *Development* 143:1108-1119.
- Morot-Gaudry, J.F. (1997). Assimilation de l'azote chez les plantes: Aspects physiologique, biochimique et moléculaire.
- Nagarajan, V.K., Satheesh, V., Poling, M.D., Raghothama, K.G., and Jain, A. (2016). *Arabidopsis* MYB-Related HHO2 Exerts a Regulatory Influence on a Subset of Root Traits and Genes Governing Phosphate Homeostasis. *Plant Cell Physiol* 57:1142-1152.
- Nagatoshi, Y., Mitsuda, N., Hayashi, M., Inoue, S., Okuma, E., Kubo, A., Murata, Y., Seo, M., Saji, H., Kinoshita, T., et al. (2016). GOLDEN 2-LIKE transcription factors for chloroplast

- development affect ozone tolerance through the regulation of stomatal movement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:4218-4223.
- Nakagami, H., Pitzschke, A., and Hirt, H. (2005). Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends Plant Sci* 10:339-346.
- Nakamura, Y., Awai, K., Masuda, T., Yoshioka, Y., Takamiya, K., and Ohta, H. (2005). A novel phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C induced by phosphate starvation in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 280:7469-7476.
- Nakano, Y., Naito, Y., Nakano, T., Ohtsuki, N., and Suzuki, K. (2017). NSR1/MYR2 is a negative regulator of ASN1 expression and its possible involvement in regulation of nitrogen reutilization in *Arabidopsis*. *Plant Sci* 263:219-225.
- Nasholm, T., Kielland, K., and Ganeteg, U. (2009). Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytol* 182:31-48.
- Negi, J., Matsuda, O., Nagasawa, T., Oba, Y., Takahashi, H., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., Hashimoto, M., and Iba, K. (2008). CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* 452:483-486.
- Nelson, B.K., Cai, X., and Nebenfuhr, A. (2007). A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *Plant J* 51:1126-1136.
- Neuhaus, H.E., and Emes, M.J. (2000). Nonphotosynthetic Metabolism in Plastids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:111-140.
- Nguyen, C.T., Agorio, A., Jossier, M., Depre, S., Thomine, S., and Filleur, S. (2016). Characterization of the Chloride Channel-Like, AtCLCg, Involved in Chloride Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 57:764-775.
- Noguero, M., and Lacombe, B. (2016). Transporters Involved in Root Nitrate Uptake and Sensing by *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* 7:1391.
- Nussaume, L., Kanno, S., Javot, H., Marin, E., Pochon, N., Ayadi, A., Nakanishi, T.M., and Thibaud, M.C. (2011). Phosphate Import in Plants: Focus on the PHT1 Transporters. *Front Plant Sci* 2:83.
- O'Brien, J.A., Vega, A., Bouguyon, E., Krouk, G., Gojon, A., Coruzzi, G., and Gutierrez, R.A. (2016). Nitrate Transport, Sensing, and Responses in Plants. *Mol Plant* 9:837-856.
- O'Malley, R.C., Huang, S.S., Song, L., Lewsey, M.G., Bartlett, A., Nery, J.R., Galli, M., Gallavotti, A., and Ecker, J.R. (2016). Cistrome and Epicistrome Features Shape the Regulatory DNA Landscape. *Cell* 165:1280-1292.
- Ochoa de Alda, J.A.G., Esteban, R., Diago, M.L., and Houmard, J. (2014). The plastid ancestor originated among one of the major cyanobacterial lineages. *Nature Communications* 5:4937.
- Ohta, M., Guo, Y., Halfter, U., and Zhu, J.K. (2003). A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C ABI2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11771-11776.
- Okamoto, M., Vidmar, J.J., and Glass, A.D. (2003). Regulation of NRT1 and NRT2 gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. *Plant Cell Physiol*. 44:304-317.
- Orsel, M., Chopin, F., Leleu, O., Smith, S.J., Krapp, A., Daniel-Vedele, F., and Miller, A.J. (2006). Characterisation of a two component high affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis*; physiology and protein-protein interaction. *Plant Physiol*.
- Orsel, M., Eulenburg, K., Krapp, A., and Daniel-Vedele, F. (2004). Disruption of the nitrate transporter genes AtNRT2.1 and AtNRT2.2 restricts growth at low external nitrate concentration. *Planta* 219:714-721.
- Orsel, M., Krapp, A., and Daniel-Vedele, F. (2002). Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in *Arabidopsis*. Structure and gene expression. *Plant Physiol* 129:886-896.
- Ortiz-Ramirez, C., Mora, S.I., Trejo, J., and Pantoja, O. (2011). PvAMT1;1, a highly selective ammonium transporter that functions as H⁺/NH₄(⁺) symporter. *J Biol Chem* 286:31113-31122.

- Ozgur, R., Turkan, I., Uzilday, B., and Sekmen, A.H. (2014). Endoplasmic reticulum stress triggers ROS signalling, changes the redox state, and regulates the antioxidant defence of *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 65:1377-1390.
- Pant, B.D., Musialak-Lange, M., Nuc, P., May, P., Buhtz, A., Kehr, J., Walther, D., and Scheible, W.R. (2009). Identification of nutrient-responsive *Arabidopsis* and rapeseed microRNAs by comprehensive real-time polymerase chain reaction profiling and small RNA sequencing. *Plant Physiol* 150:1541-1555.
- Para, A., Li, Y., Marshall-Colon, A., Varala, K., Francoeur, N.J., Moran, T.M., Edwards, M.B., Hackley, C., Bargmann, B.O., Birnbaum, K.D., et al. (2014). Hit-and-run transcriptional control by bZIP1 mediates rapid nutrient signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:10371-10376.
- Park, B.S., Seo, J.S., and Chua, N.H. (2014). NITROGEN LIMITATION ADAPTATION recruits PHOSPHATE2 to target the phosphate transporter PT2 for degradation during the regulation of *Arabidopsis* phosphate homeostasis. *Plant Cell* 26:454-464.
- Pateman, J.A.K., J. R. (1975). Nitrogen metabolism in The Filamentous Fungi.
- Pathak, R.A., A. Lochab, S. Raghuram, N. (2008). Molecular physiology of plant nitrogen use efficiency and biotechnological options for its enhancement. *Current Science* 94:1394-1403.
- Patron, N.J., and Waller, R.F. (2007). Transit peptide diversity and divergence: A global analysis of plastid targeting signals. *Bioessays* 29:1048-1058.
- Paungfoo-Lonhienne, C., Lonhienne, T.G.A., Rentsch, D., Robinson, N., Christie, M., Webb, R.I., Gamage, H.K., Carroll, B.J., Schenk, P.M., and Schmidt, S. (2008). Plants can use protein as a nitrogen source without assistance from other organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:4524-4529.
- Pei, Z.-M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klüsener, B., Allen, G.J., Grill, E., and Schroeder, J.I. (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406:731.
- Peng, M., Bi, Y.M., Zhu, T., and Rothstein, S.J. (2007a). Genome-wide analysis of *Arabidopsis* responsive transcriptome to nitrogen limitation and its regulation by the ubiquitin ligase gene NLA. *Plant Mol Biol* 65:775-797.
- Peng, M., Hannam, C., Gu, H., Bi, Y.M., and Rothstein, S.J. (2007b). A mutation in NLA, which encodes a RING-type ubiquitin ligase, disrupts the adaptability of *Arabidopsis* to nitrogen limitation. *Plant J* 50:320-337.
- Peng, M., Hudson, D., Schofield, A., Tsao, R., Yang, R., Gu, H., Bi, Y.M., and Rothstein, S.J. (2008). Adaptation of *Arabidopsis* to nitrogen limitation involves induction of anthocyanin synthesis which is controlled by the NLA gene. *J Exp Bot* 59:2933-2944.
- Pieterse, C.M., and Van Loon, L.C. (2004). NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current opinion in plant biology* 7:456-464.
- Planchet, E., Jagadis Gupta, K., Sonoda, M., and Kaiser, W.M. (2005). Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *Plant J* 41:732-743.
- Poirier, Y., and Bucher, M. (2002). Phosphate transport and homeostasis in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Book* 1:e0024.
- Puga, M.I., Mateos, I., Charukesi, R., Wang, Z., Franco-Zorrilla, J.M., de Lorenzo, L., Irigoyen, M.L., Masiero, S., Bustos, R., Rodriguez, J., et al. (2014). SPX1 is a phosphate-dependent inhibitor of PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1 in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:14947-14952.
- Qi, W., Manfield, I.W., Muench, S.P., and Baker, A. (2017). AtSPX1 affects the AtPHR1-DNA-binding equilibrium by binding monomeric AtPHR1 in solution. *Biochem J* 474:3675-3687.

- Raghothama, K.G. (1999). Phosphate Acquisition. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:665-693.
- Rahayu, Y.S., Walch-Liu, P., Neumann, G., Romheld, V., von Wiren, N., and Bangerth, F. (2005). Root-derived cytokinins as long-distance signals for NO₃⁻-induced stimulation of leaf growth. *J Exp Bot* 56:1143-1152.
- Ratel, M. (2002). Rapport sur l'élimination des nitrates des eaux potables. Document Technique FNDAE & SNIDE.
- Rausch, C., and Bucher, M. (2002). Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta* 216:23-37.
- Raynaud, C., Perennes, C., Reuzeau, C., Catrice, O., Brown, S., and Bergounioux, C. (2005). Cell and plastid division are coordinated through the prereplication factor AtCDT1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8216-8221.
- Raynaud, C., Sozzani, R., Glab, N., Domenichini, S., Perennes, C., Cella, R., Kondorosi, E., and Bergounioux, C. (2006). Two cell-cycle regulated SET-domain proteins interact with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in Arabidopsis. *Plant J* 47:395-407.
- Rees, D.C., and Howard, J.B. (2000). Nitrogenase: standing at the crossroads. *Curr Opin Chem Biol* 4:559-566.
- Remans, T., Nacry, P., Pervent, M., Filleur, S., Diatloff, E., Mounier, E., Tillard, P., Forde, B.G., and Gojon, A. (2006). The Arabidopsis NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19206-19211.
- Reyt, G., Boudouf, S., Boucherez, J., Gaymard, F., and Briat, J.F. (2015). Iron- and ferritin-dependent reactive oxygen species distribution: impact on Arabidopsis root system architecture. *Mol Plant* 8:439-453.
- Rhodes, D., Brunk, D.G., and Magalhães, J.R. (1989). Assimilation Of Ammonia by Glutamate Dehydrogenase? In: *Plant Nitrogen Metabolism*--Poulton, J.E., Romeo, J.T., and Conn, E.E., eds. Boston, MA: Springer US. 191-226.
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., et al. (2000). Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290:2105-2110.
- Ristova, D., Carre, C., Pervent, M., Medici, A., Kim, G.J., Scalia, D., Ruffel, S., Birnbaum, K., Lacombe, B., Busch, W., et al. (2016). Combinatorial interaction network of transcriptomic and phenotypic responses to nitrogen and hormones in the Arabidopsis thaliana root. *Sci Signal* 9.
- Ristova, D., Rosas, U., Krouk, G., Ruffel, S., Birnbaum, K.D., and Coruzzi, G.M. (2013). RootScape: a landmark-based system for rapid screening of root architecture in Arabidopsis. *Plant Physiol* 161:1086-1096.
- Riveras, E., Alvarez, J.M., Vidal, E.A., Oses, C., Vega, A., and Gutierrez, R.A. (2015). The Calcium Ion Is a Second Messenger in the Nitrate Signaling Pathway of Arabidopsis. *Plant Physiol* 169:1397-1404.
- Robinson, S.A., Slade, A.P., Fox, G.G., Phillips, R., Ratcliffe, R.G., and Stewart, G.R. (1991). The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. *Plant Physiol* 95:509-516.
- Robinson, S.A., Stewart, G.R., and Phillips, R. (1992). Regulation of glutamate dehydrogenase activity in relation to carbon limitation and protein catabolism in carrot cell suspension cultures. *Plant Physiol* 98:1190-1195.
- Rochaix, J.D. (2001). Posttranscriptional control of chloroplast gene expression. From RNA to photosynthetic complex. *Plant Physiol* 125:142-144.
- Rubin, G., Tohge, T., Matsuda, F., Saito, K., and Scheible, W.R. (2009). Members of the LBD family of transcription factors repress anthocyanin synthesis and affect additional nitrogen responses in Arabidopsis. *Plant Cell* 21:3567-3584.

- Rubio, V., Linhares, F., Solano, R., Martin, A.C., Iglesias, J., Leyva, A., and Paz-Ares, J. (2001). A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev* 15:2122-2133.
- Ruffel, S., Krouk, G., Ristova, D., Shasha, D., Birnbaum, K.D., and Coruzzi, G.M. (2011). Nitrogen economics of root foraging: transitive closure of the nitrate-cytokinin relay and distinct systemic signaling for N supply vs. demand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:18524-18529.
- Ruffel, S., Poitout, A., Krouk, G., Coruzzi, G.M., and Lacombe, B. (2015). Long-distance nitrate signaling displays cytokinin dependent and independent branches. *J Integr Plant Biol*.
- Safi, A., Medici, A., Szponarski, W., Ruffel, S., Lacombe, B., and Krouk, G. (2017). The world according to GARP transcription factors. *Current opinion in plant biology* 39:159-167.
- Safi, A.M., A. Szponarski, W. Marshall-Colon, A. Ruffel, S. Gaymard, F. Coruzzi, G. Lacombe, B. Krouk, G. (submitted). HRS1/HHOs GARP transcription factors and reactive oxygen species are regulators of Arabidopsis nitrogen starvation response. *Molecular Plant*.
- Salsac, L., Chaillou, S., Morot-Gaudry, J.F., Lesaint, C., and Jolivet, E. (1987). Nitrate and ammonium nutrition in plants. *Plant Physiol Biochem* 25:805-812.
- Samaniego, R., Jeong, S.Y., Meier, I., and de la Espina, S.M. (2006). Dual location of MAR-binding, filament-like protein 1 in Arabidopsis, tobacco, and tomato. *Planta* 223:1201-1206.
- Santos, R., Herouart, D., Sigaud, S., Touati, D., and Puppo, A. (2001). Oxidative burst in alfalfa-Sinorhizobium meliloti symbiotic interaction. *Mol Plant Microbe Interact* 14:86-89.
- Sasaki, T., Mori, I.C., Furuichi, T., Munemasa, S., Toyooka, K., Matsuoka, K., Murata, Y., and Yamamoto, Y. (2010). Closing Plant Stomata Requires a Homolog of an Aluminum-Activated Malate Transporter. *Plant and Cell Physiology* 51:354-365.
- Sato, T., Maekawa, S., Konishi, M., Yoshioka, N., Sasaki, Y., Maeda, H., Ishida, T., Kato, Y., Yamaguchi, J., and Yanagisawa, S. (2017). Direct transcriptional activation of BT genes by NLP transcription factors is a key component of the nitrate response in Arabidopsis. *Biochem Biophys Res Commun* 483:380-386.
- Sawaki, N., Tsujimoto, R., Shigyo, M., Konishi, M., Toki, S., Fujiwara, T., and Yanagisawa, S. (2013). A nitrate-inducible GARP family gene encodes an auto-repressible transcriptional repressor in rice. *Plant Cell Physiol* 54:506-517.
- Scaife, A. (1989). A pump/leak/buffer model for plant nitrate uptake. *Plant and Soil* 114:139-141.
- Scheible, W.-R., and Rojas-Triana, M. (2015). Sensing, signalling, and CONTROL of phosphate starvation in plants: molecular players and applications. In: *Annual Plant Reviews Volume 48*: John Wiley & Sons, Inc. 23-63.
- Scheible, W.R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., Schindelasch, D., Thimm, O., Udvardi, M.K., and Stitt, M. (2004). Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of Arabidopsis in response to nitrogen. *Plant Physiol* 136:2483-2499.
- Scherzer, S., Maierhofer, T., Al-Rasheid, K.A., Geiger, D., and Hedrich, R. (2012). Multiple calcium-dependent kinases modulate ABA-activated guard cell anion channels. *Mol Plant* 5:1409-1412.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676-682.
- Schnell, R.A., and Lefebvre, P.A. (1993). Isolation of the Chlamydomonas regulatory gene NIT2 by transposon tagging. *Genetics* 134:737-747.
- Schwacke, R., Fischer, K., Ketelsen, B., Krupinska, K., and Krause, K. (2007). Comparative survey of plastid and mitochondrial targeting properties of transcription factors in Arabidopsis and rice. *Mol Genet Genomics* 277:631-646.

- Secco, D., Jabnourne, M., Walker, H., Shou, H., Wu, P., Poirier, Y., and Whelan, J. (2013). Spatio-temporal transcript profiling of rice roots and shoots in response to phosphate starvation and recovery. *Plant Cell* 25:4285-4304.
- Secco, D., Wang, C., Arpat, B.A., Wang, Z., Poirier, Y., Tyerman, S.D., Wu, P., Shou, H., and Whelan, J. (2012a). The emerging importance of the SPX domain-containing proteins in phosphate homeostasis. *New Phytol* 193:842-851.
- Secco, D., Wang, C., Shou, H., and Whelan, J. (2012b). Phosphate homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the key role of the SPX domain-containing proteins. *FEBS Lett* 586:289-295.
- Segonzac, C., Boyer, J.C., Ipotesi, E., Szponarski, W., Tillard, P., Touraine, B., Sommerer, N., Rossignol, M., and Gibrat, R. (2007). Nitrate efflux at the root plasma membrane: identification of an *Arabidopsis* excretion transporter. *Plant Cell* 19:3760-3777.
- Shen, B., Jensen, R.G., and Bohnert, H.J. (1997). Mannitol Protects against Oxidation by Hydroxyl Radicals. *Plant Physiol* 115:527-532.
- Shimogawara, K., Wykoff, D.D., Usuda, H., and Grossman, A.R. (1999). *Chlamydomonas reinhardtii* mutants abnormal in their responses to phosphorus deprivation. *Plant Physiol* 120:685-694.
- Shin, R., Berg, R.H., and Schachtman, D.P. (2005). Reactive oxygen species and root hairs in *Arabidopsis* root response to nitrogen, phosphorus and potassium deficiency. *Plant Cell Physiol* 46:1350-1357.
- Shin, R., and Schachtman, D.P. (2004). Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8827-8832.
- Shiu, S.H., Shih, M.C., and Li, W.H. (2005). Transcription factor families have much higher expansion rates in plants than in animals. *Plant Physiol* 139:18-26.
- Siddiqi, M.Y., Glass, A.D., Ruth, T.J., and Fernando, M. (1989). Studies of the regulation of nitrate influx by barley seedlings using $^{13}\text{NO}_3^-$. *Plant Physiol* 90:806-813.
- Sims, A.P., and Folkes, B.F. (1964). A Kinetic Study of the Assimilation of (15n) -Ammonia and the Synthesis of Amino Acids in an Exponentially Growing Culture of *Candida Utilis*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 159:479-502.
- Smil, V. (1999). Detonator of the population explosion. *Nature* 400:415.
- Smirnoff, N., and Cumbes, Q.J. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 28:1057-1060.
- Srivastava, H.S., and Singh, R.P. (1987). Role and regulation of L-glutamate dehydrogenase activity in higher plants. *Phytochemistry* 26:597-610.
- Stargell, L.A., and Struhl, K. (1996). Mechanisms of transcriptional activation in vivo: two steps forward. *Trends Genet* 12:311-315.
- Stewart, G.R., Mann, A.F., and Fentem, P.A. (1980). 7 - Enzymes of Glutamate Formation: Glutamate Dehydrogenase, Glutamine Synthetase, and Glutamate Synthase A2 - Mifflin, B.J. In: *Amino Acids and Derivatives*: Academic Press. 271-327.
- Struhl, K., Kadosh, D., Keaveney, M., Kuras, L., and Moqtaderi, Z. (1998). Activation and repression mechanisms in yeast. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63:413-421.
- Sun, X., Feng, P., Xu, X., Guo, H., Ma, J., Chi, W., Lin, R., Lu, C., and Zhang, L. (2011). A chloroplast envelope-bound PHD transcription factor mediates chloroplast signals to the nucleus. *Nat Commun* 2:477.
- Surpin, M., Larkin, R.M., and Chory, J. (2002). Signal Transduction between the Chloroplast and the Nucleus. *The Plant Cell* 14:s327-s338.
- Tanaka, K., and Hanaoka, M. (2012). The early days of plastid retrograde signaling with respect to replication and transcription. *Front Plant Sci* 3:301.
- Taochy, C., Gaillard, I., Ipotesi, E., Oomen, R., Leonhardt, N., Zimmermann, S., Peltier, J.B., Szponarski, W., Simonneau, T., Sentenac, H., et al. (2015). The *Arabidopsis* root stele

- transporter NPF2.3 contributes to nitrate translocation to shoots under salt stress. *Plant J* 83:466-479.
- Tercé-Laforgue, T., Dubois, F., Ferrario-Méry, S., Pou de Crezenzo, M.-A., Sangwan, R., and Hirel, B. (2004). Glutamate Dehydrogenase of Tobacco Is Mainly Induced in the Cytosol of Phloem Companion Cells When Ammonia Is Provided Either Externally or Released during Photorespiration. *Plant Physiology* 136:4308-4317.
- Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R., and Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418:671-677.
- Triantaphylides, C., and Havaux, M. (2009). Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends Plant Sci* 14:219-228.
- Trovato, M., Mattioli, R., and Costantino, P. (2008). Multiple roles of proline in plant stress tolerance and development. *RENDICONTI LINCEI* 19:325-346.
- Tsay, Y.F., Schroeder, J.I., Feldmann, K.A., and Crawford, N.M. (1993). The herbicide sensitivity gene CHL1 of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* 72:705-713.
- Tschoep, H., Gibon, Y., Carillo, P., Armengaud, P., Szecowka, M., Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R., Koehl, K., and Stitt, M. (2009). Adjustment of growth and central metabolism to a mild but sustained nitrogen-limitation in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* 32:300-318.
- Tsukagoshi, H., Busch, W., and Benfey, P.N. (2010). Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* 143:606-616.
- Turano, F.J., Thakkar, S.S., Fang, T., and Weisemann, J.M. (1997). Characterization and expression of NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 113:1329-1341.
- Undurraga, S.F., Ibarra-Henriquez, C., Fredes, I., Alvarez, J.M., and Gutierrez, R.A. (2017). Nitrate signaling and early responses in *Arabidopsis* roots. *J Exp Bot* 68:2541-2551.
- Ushijima, T., Hanada, K., Gotoh, E., Yamori, W., Kodama, Y., Tanaka, H., Kusano, M., Fukushima, A., Tokizawa, M., Yamamoto, Y.Y., et al. (2017). Light Controls Protein Localization through Phytochrome-Mediated Alternative Promoter Selection. *Cell* 171:1316-1325 e1312.
- Vahisalu, T., Kollist, H., Wang, Y.F., Nishimura, N., Chan, W.Y., Valerio, G., Lamminmaki, A., Brosche, M., Moldau, H., Desikan, R., et al. (2008). SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* 452:487-491.
- Vaquerizas, J.M., Kummerfeld, S.K., Teichmann, S.A., and Luscombe, N.M. (2009). A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nat Rev Genet* 10:252-263.
- Vidal, E.A., and Gutierrez, R.A. (2008). A systems view of nitrogen nutrient and metabolite responses in *Arabidopsis*. *Current opinion in plant biology* 11:521-529.
- Vidal, E.A., Moyano, T.C., Krouk, G., Katari, M.S., Tanurdzic, M., McCombie, W.R., Coruzzi, G.M., and Gutierrez, R.A. (2013). Integrated RNA-seq and sRNA-seq analysis identifies novel nitrate-responsive genes in *Arabidopsis thaliana* roots. *BMC Genomics* 14:701.
- Viola, I.L., Güttlein, L.N., and Gonzalez, D.H. (2013). Redox Modulation of Plant Developmental Regulators from the Class I TCP Transcription Factor Family. *Plant Physiology* 162:1434-1447.
- von der Fecht-Bartenbach, J., Bogner, M., Dynowski, M., and Ludewig, U. (2010). CLC-b-mediated NO₃/H⁺ exchange across the tonoplast of *Arabidopsis* vacuoles. *Plant Cell Physiol* 51:960-968.
- von der Fecht-Bartenbach, J., Bogner, M., Krebs, M., Stierhof, Y.D., Schumacher, K., and Ludewig, U. (2007). Function of the anion transporter AtCLC-d in the trans-Golgi network. *Plant J* 50:466-474.
- von Wirén, N., Gazzarrini, S., and Frommer, W.B. (1997). Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. *Plant and Soil* 196:191-199.

- von Wiren, N., Gazzarrini, S., Gojon, A., and Frommer, W.B. (2000). The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. *Current opinion in plant biology* 3:254-261.
- Vothknecht, U.C., and Westhoff, P. (2001). Biogenesis and origin of thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1541:91-101.
- Wang, J.W., Czech, B., and Weigel, D. (2009a). miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 138:738-749.
- Wang, M.Y., Siddiqi, M.Y., Ruth, T.J., and Glass, A.D.M. (1993). Ammonium uptake by rice roots. *Plant Physiol* 103:1259-1267.
- Wang, R., Okamoto, M., Xing, X., and Crawford, N.M. (2003). Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant Physiol* 132:556-567.
- Wang, R., Tischner, R., Gutierrez, R.A., Hoffman, M., Xing, X., Chen, M., Coruzzi, G., and Crawford, N.M. (2004). Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 136:2512-2522.
- Wang, R., Xing, X., Wang, Y., Tran, A., and Crawford, N.M. (2009b). A genetic screen for nitrate regulatory mutants captures the nitrate transporter gene NRT1.1. *Plant Physiol* 151:472-478.
- Wang, Y.Y., and Tsay, Y.F. (2011). *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.9 is important in phloem nitrate transport. *Plant Cell* 23:1945-1957.
- Wang, Z., Hu, H., Huang, H., Duan, K., Wu, Z., and Wu, P. (2009c). Regulation of OsSPX1 and OsSPX3 on expression of OsSPX domain genes and Pi-starvation signaling in rice. *J Integr Plant Biol* 51:663-674.
- Wang, Z., Ruan, W., Shi, J., Zhang, L., Xiang, D., Yang, C., Li, C., Wu, Z., Liu, Y., Yu, Y., et al. (2014). Rice SPX1 and SPX2 inhibit phosphate starvation responses through interacting with PHR2 in a phosphate-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:14953-14958.
- Wang, Z.P., Xing, H.L., Dong, L., Zhang, H.Y., Han, C.Y., Wang, X.C., and Chen, Q.J. (2015). Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in *Arabidopsis* in a single generation. *Genome Biol* 16:144.
- Waters, M.T., Wang, P., Korkaric, M., Capper, R.G., Saunders, N.J., and Langdale, J.A. (2009). GLK transcription factors coordinate expression of the photosynthetic apparatus in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21:1109-1128.
- Wege, S., De Angeli, A., Droillard, M.J., Kroniewicz, L., Merlot, S., Cornu, D., Gambale, F., Martinoia, E., Barbier-Brygoo, H., Thomine, S., et al. (2014). Phosphorylation of the vacuolar anion exchanger AtCLCa is required for the stomatal response to abscisic acid. *Sci Signal* 7:ra65.
- Westhoff, C.M., Ferreri-Jacobia, M., Mak, D.O., and Foskett, J.K. (2002). Identification of the erythrocyte Rh blood group glycoprotein as a mammalian ammonium transporter. *J Biol Chem* 277:12499-12502.
- Wieprecht, T., Apostolov, O., Beyermann, M., and Seelig, J. (2000). Interaction of a mitochondrial presequence with lipid membranes: role of helix formation for membrane binding and perturbation. *Biochemistry* 39:15297-15305.
- Wojtaszek, P. (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J* 322 (Pt 3):681-692.
- Wollman, F.A. (2016). An antimicrobial origin of transit peptides accounts for early endosymbiotic events. *Traffic* 17:1322-1328.
- Wu, C., Feng, J., Wang, R., Liu, H., Yang, H., Rodriguez, P.L., Qin, H., Liu, X., and Wang, D. (2012). HRS1 acts as a negative regulator of abscisic acid signaling to promote timely germination of *Arabidopsis* seeds. *PLoS One* 7:e35764.

- Wykoff, D.D., Grossman, A.R., Weeks, D.P., Usuda, H., and Shimogawara, K. (1999). Psr1, a nuclear localized protein that regulates phosphorus metabolism in *Chlamydomonas*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:15336-15341.
- Xu, N., Wang, R., Zhao, L., Zhang, C., Li, Z., Lei, Z., Liu, F., Guan, P., Chu, Z., Crawford, N.M., et al. (2016). The Arabidopsis NRG2 Protein Mediates Nitrate Signaling and Interacts with and Regulates Key Nitrate Regulators. *Plant Cell* 28:485-504.
- Yamaya, T., Oaks, A., Rhodes, D., and Matsumoto, H. (1986). Synthesis of [N]glutamate from [N]h(4) and [N]glycine by mitochondria isolated from pea and corn shoots. *Plant Physiol* 81:754-757.
- Yan, Y., Shen, L., Chen, Y., Bao, S., Thong, Z., and Yu, H. (2014a). A MYB-domain protein EFM mediates flowering responses to environmental cues in Arabidopsis. *Dev Cell* 30:437-448.
- Yan, Y., Wang, H., Hamera, S., Chen, X., and Fang, R. (2014b). miR444a has multiple functions in the rice nitrate-signaling pathway. *The Plant Journal* 78:44-55.
- Yong, Z., Kotur, Z., and Glass, A.D. (2010). Characterization of an intact two-component high-affinity nitrate transporter from Arabidopsis roots. *Plant J* 63:739-748.
- Zhang, H., and Forde, B.G. (1998). An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* 279:407-409.
- Zhang, H., and Forde, B.G. (2000). Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *J Exp Bot* 51:51-59.
- Zhang, X., Henriques, R., Lin, S.S., Niu, Q.W., and Chua, N.H. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana using the floral dip method. *Nat Protoc* 1:641-646.
- Zhao, M., Ding, H., Zhu, J.K., Zhang, F., and Li, W.X. (2011). Involvement of miR169 in the nitrogen-starvation responses in Arabidopsis. *New Phytol* 190:906-915.
- Zifarelli, G., and Pusch, M. (2010). CLC transport proteins in plants. *FEBS Lett* 584:2122-2127.

Résumé

Les plantes prélèvent l'azote nécessaire à leur croissance essentiellement sous forme de nitrate. Pour faire face aux fluctuations spatio-temporelles de la disponibilité de cet ion dans les sols, ces organismes ont développé des mécanismes d'adaptation spécifiques à chaque situation. La réponse de la plante à l'azote met en jeu plusieurs voies de signalisations qui dépendent des scénarios de variations en azote du milieu. Deux grandes voies de signalisation sont étudiées en particulier dans cette thèse. La Primary Nitrate Response (ou PNR) qui correspond aux réponses rapides (minutes) et nitrate-spécifiques de la plante lors de la fourniture de Nitrate. La Nitrogen Starvation response (ou NSR) qui correspond à la réponse plus lente (jours) qui permet de pallier au manque d'azote dans le milieu. Bien que certains acteurs moléculaires soient connus dans chacune des voies (PNR et NSR); i) la NSR est largement moins bien documentée que la PNR, ii) rien n'est connu concernant la coordination des 2 voies de signalisations. Au cours de ma thèse j'ai pu démontrer qu'un sous groupe de la famille GARP induit lors de la PNR est directement impliqué dans la régulation de la NSR (répression des gènes de transport à haute affinité de nitrate). Ceci fournit à la fois de nouveaux régulateurs de la NSR et un mécanisme de coordination entre les 2 voies de signalisation. Les phénotypes des plantes altérées dans l'expression des gènes de cette famille de facteurs de transcription ouvrent des perspectives d'améliorations biotechnologiques des plantes car ces dernières présentent des capacités de transport du nitrate bien supérieures aux plantes sauvages.

Des résultats quant à la double localisation sub-cellulaire d'HRS1 et du rôle d'HRS1 dans le contrôle du statut redox des plantes sont présentés et discutés dans le contexte du modèle d'interaction entre PNR et NSR proposé précédemment.

Mots clés : Facteurs de transcription, Azote, ROS, nitrate, TARGET

Abstract

Plants take up the nitrogen necessary for their growth mainly in the form of nitrate. To cope with spatio-temporal fluctuations in NO_3^- availability in soils, these organisms have developed adaptation mechanisms specific to each situation. Plant N response involves several signaling pathways that depend on the N variation scenarios of the medium. Two major signaling pathways are studied in this thesis. The Primary Nitrate Response (or PNR) which corresponds to the rapid (within minutes) and nitrate-specific responses of the plant when provided with Nitrate. The Nitrogen Starvation response (or NSR) which corresponds to the slower response (within days) which makes it possible to overcome the lack of N in the medium. Although some molecular actors are known in each of the pathways (PNR and NSR); i) the NSR is significantly less well documented than the PNR, ii) nothing is known about the coordination of the 2 signaling pathways. During my thesis I was able to demonstrate that a subgroup of the GARP transcription factor family induced during PNR is directly involved in the regulation of NSR (repression of transport genes with a very high nitrate affinity). This provides both new NSR regulators and a coordination mechanism between the 2 signaling pathways. The phenotypes recorded for plants altered in this transcription factors family open up perspectives for crop biotechnological improvements because they have nitrate transport capacities far superior to wild plants. Results regarding the subcellular dual localization of HRS1 and the role of HRS1 in controlling the redox status of plants are presented and discussed in the context of the previously proposed PNR-NSR interaction model.

Keywords: Transcription factors, Nitrogen, ROS, nitrate, TARGET