THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT AGRO MONTPELLIER ET DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Intégrative, Diversité et Amélioration des Plantes (BIDAP)

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

Unité de recherche Institut des Sciences des Plantes de Montpellier (IPSiM)

Étude du rôle des nutriments sur le transport de l'auxine au cours du gravitropisme chez *Arabidopsis thaliana*

Présentée par Marion THOMAS
Le 14 février 2023

Sous la direction de Benjamin PÉRET et Fanchon DIVOL

Devant le jury composé de

Sandra BENSMIHEN, Directrice de recherche CNRS, LIPME Toulouse	Rapporteur
Martin CRESPI, Directeur de recherche CNRS, IPS2 Paris-Saclay	Rapporteur
Anna MEDICI, Maître de conférences Montpellier Supagro, IPSiM Montpellier	Examinateur
Antony CHAMPION, Directeur de recherche IRD, DIADE Montpellier	Président du jury
Benjamin PÉRET, Directeur de recherche CNRS, IPSiM Montpellier	Directeur de thèse
Fanchon DIVOL, Ingénieure de recherche CNRS, IPSiM Montpellier	Co-encadrant de thèse

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

L'INSTITUT agro Montpellier

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT AGRO MONTPELLIER ET DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Intégrative, Diversité et Amélioration des Plantes (BIDAP)

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

Unité de recherche Institut des Sciences des Plantes de Montpellier (IPSiM)

Étude du rôle des nutriments sur le transport de l'auxine au cours du gravitropisme chez *Arabidopsis thaliana*

Présentée par Marion THOMAS
Le 14 février 2023

Sous la direction de Benjamin PÉRET et Fanchon DIVOL

Devant le jury composé de

Sandra BENSMIHEN, Directrice de recherche CNRS, LIPME Toulouse	Rapporteur
Martin CRESPI, Directeur de recherche CNRS, IPS2 Paris-Saclay	Rapporteur
Anna MEDICI, Maître de conférences Montpellier Supagro, IPSiM Montpellier	Examinateur
Antony CHAMPION, Directeur de recherche IRD, DIADE Montpellier	Président du jury
Benjamin PÉRET, Directeur de recherche CNRS, IPSiM Montpellier	Directeur de thèse
Fanchon DIVOL, Ingénieure de recherche CNRS, IPSiM Montpellier	Co-encadrant de thèse

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

L'INSTITUT agro Montpellier

~ Tout est possible à qui rêve, ose, travaille
et n'abandonne jamais.

Xavier Dolan

Remerciements

Enfin ! Je suis arrivée pour la première fois à BPMP le 2 janvier 2019. Laissez-moi vous dire qu'à cette époque le monde était différent, IPSiM était BPMP et il n'y avait pas de pandémie ni de covid. Je suis arrivée pour mon stage de Master 2 remplie d'espoir pour le futur. Maintenant on y est enfin, 4 ans après … À quelques pas de finaliser le travail pour lequel je me suis investie pendant les quatre dernières années de ma vie. Et au cours de cette aventure (tant professionnelle qu'humaine), qui est biiiiien loin d'être un long fleuve tranquille, j'ai eu la chance de faire des rencontres formidables qui m'ont challengées et fait grandir. Alors cette partie là elle va être pour eux, pour vous et pour dire merci pour les petits tout et les petits rien qui m'ont permis d'en arriver là. Comme dirait Jean d'Ormesson, merci pour les roses, merci pour les épines.

Dans un premier temps, je veux remercier les membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail : Sandra Bensmihen et Martin Crespi en tant que rapporteurs ; Anna Medici et Antony Champion en tant qu'examinateurs. Merci pour l'intérêt que vous porterez à mon travail et pour les discussions à venir.

J'aimerais aussi remercier les membres de mon comité de thèse, Laurent Laplaze, Alexandre Martinière et Christophe Belin pour leurs nombreux conseils, leur bienveillance et le soutien qu'ils m'ont apporté. S'accompagne aussi un merci tout particulier pour vous Monsieur Belin, vous serez toujours le professeur que j'ai croisé, il y a de cela déjà 10 ans, à la journée d'orientation puis dans cet amphi 5 de la fac de Perpignan, celui qui m'as tant donné l'envie de faire une licence de biologie puis de faire (finalement) un master de biologie végétale et qui m'a même accompagné au cours de cette thèse. Merci sincèrement d'avoir été mon mentor de la première heure, d'avoir suivi mon parcours et d'avoir toujours été de bons conseils !

J'aimerais également remercier Stéphanie Robert et Gabriel Krouk de m'avoir accordé du temps à la suite de mon premier comité de thèse et avec qui j'ai eu des discussions très intéressantes.

Cette thèse a été réalisée au sein de l'équipe Plasticité dont j'aimerais remercier tous les membres aussi bien ceux présents que ceux passés au cours de ces 4 années. Tout d'abord, merci à mes encadrants Benjamin Péret et Fanchon Divol pour m'avoir soutenu pour le concours de l'école doctorale et pour m'avoir confié ce projet de thèse. Benjamin, je te remercie pour ta confiance sur le projet *lasso,* qui m'a permis d'être le quota *Arabidopsis* dans l'équipe Lupin ! Fanchon, je te remercie pour ton accompagnement, cette aventure ne s'est finalement pas déroulée exactement comme prévu mais merci d'avoir tenu jusqu'à la fin avec moi ! Merci à tous les permanents de l'équipe Plasticité : Laurence pour nos échanges qui ont été une grande source de motivation, Esther pour ta présence dans les bons comme les mauvais moments, Patrick pour tes conseils avisés, j'espère que tu profites bien de ta retraite maintenant. Enfin merci à Hélène, j'ai été contente d'assister à ton arrivée dans l'équipe et de pouvoir partager mes derniers moments avec toi. Merci également à tous les non permanents qui sont passés dans l'équipe : Barbara pour tous les bons moments et nos vacances en Espagne, Alexandre merci d'avoir partagé ma joie pour le concours en criant avec moi. Merci à François, Laurent et Tamara (aka Tamtam), notre quatuor pendant ma première année de thèse est l'un de mes plus doux souvenirs. Nos parties de Catane en ligne pendant le confinement et nos soirées à thèmes ont été de vraies bulles de bonheur ! Vous voguez tous vers de nouvelles aventures maintenant mais je voulais vous dire merci ! Laurent partager le labo avec toi c'était vraiment du 5 étoiles ⭐⭐⭐⭐⭐, merci à toi

et Elena pour tous les bons moments partagés ensemble ! Dans l'équipe il y a aussi eu le quatuor Inge, Cléa, et Tamtam (toujours là, la source sur), merci à vous qui avez rendu ma dernière année de thèse plus douce. Merci à toi Inge pour toutes nos discussions et pour tous tes conseils. Clewaw, merci d'avoir été la dernière non permanente avec moi, et pour tout ce qu'on a partagé. Enfin ma tam tam, MERCI, pour tout … Avoir partagé mon bureau avec toi a été une expérience formidable, chanter viser la lune avec toi, nos vacances à Port-Cros et en Espagne, il y aurait tant à dire. Mais surtout merci d'avoir été là à chaque étape, d'avoir était tellement mais tellement plus qu'une collègue ou qu'une simple amie, d'avoir été là dans les meilleurs et même les pires moments. Je te serais toujours reconnaissante et j'espère que nous vivrons encore des tas d'aventures ensemble !

Pendant ma dernière année de thèse j'ai eu la chance de participer à un programme de mentorat avec l'association Femmes et Sciences. Cela m'a permis de faire la rencontre de mon mentor, Julien Capelle, à qui je veux adresser mes plus chaleureux remerciements ! Merci d'avoir été un mentor au top du top, je n'aurais sincèrement rien pu demander de plus ! Merci de m'avoir écouté toutes ces heures, de m'avoir toujours prodigué de bons conseils, de m'avoir redonné confiance en moi, et d'avoir été une bulle d'oxygène tous les mois ! Ce fut un plaisir de pouvoir parler sciences, vie du quotidien, harry potter, marvel et avenir avec toi, ta prochaine mentée aura énormément de chance de t'avoir j'en suis sûre !

J'ai aussi eu la chance au cours de ma thèse de participer et présenter mes travaux pour la première fois à deux congrès : ICAR à Belfast et la SFBV à Montpellier, et je voulais remercier Christian Dubos d'avoir été un super binôme pour moi durant ces deux congrès ! Merci pour tous les bons moments qu'on a partagé à Belfast, pour m'avoir reboosté pour mes derniers mois de thèse, m'avoir donné de bons conseils et m'avoir encouragé à participer à la SFBV !

Au cours de ma thèse j'ai eu l'occasion de faire pas mal de microscopie et je voulais remercier Carine Alcon, je n'aurais pas pu avoir meilleure professeure, merci pour m'avoir formée et toujours bien conseillée !

Je voulais remercier plus globalement tous les membres du laboratoire BPMP/IPSiM, sans qui cette aventure n'aurait pas été la même. Un merci tout particulier à notre groupe des non-permanents, je n'aurais pas la place de tous vous citer ici mais nos afterworks ont été de vraies bulles d'airs et de soutiens au cours de ma thèse !

Enfin cette thèse m'a permis de faire des rencontres qui ont marqué ma vie à tout jamais, car ce sont des amis que j'ai gagnés. Gracias Paloma, pour ta douceur et ta gentillesse, pour toutes nos discussions, et ton soutien ! Merci à mon groupe de boulettes, Anjara, Jordan et Jessica pour tous les bons moments qu'on a partagés et votre soutien pendant l'écriture de cette thèse ! Merci Anjara d'être toujours prête à me faire un câlin et de me faire rire avec tes ewwww ! Puis Djordan et Jess (aka Janot et Ginette), merci du fond du coeur, devenir votre amie m'a rendu tellement plus heureuse au quotidien, votre soutien, vos rires et tous nos moments resteront à jamais gravé dans ma mémoire puis on ira à Fruita ensemble de toute façon ! Djordan tu vas finir ta thèse en beauté je n'en doute pas une seule seconde, ta détermination t'emmènera loin ! Et Ginette tu vas devenir une thésarde au top au Canada, attend toi à me voir débarquer parce que YOLO c'est la vie qu'on a décidé de mener et je sais que tu t'en sortiras comme une chef ! Enfin merci à mes pti canards adorés Kévin et Sylvain (Aka Kev le king du labo et Poppyx ou Pops pour les intimes) ! Kev, merci pour

absolument tout, te rencontrer pendant ma thèse a été une chance formidable ! Merci pour les milliers d'heures d'audio échangés, merci pour la visite de Genève, et il y aurait juste tellement à dire mais toi et moi on sait tout ce qu'il se cache derrière le merci pour tout ! Coquille d'en dire plus, mais merci d'être devenu le meilleur ami que j'aurais pu espérer avoir dans ma vie ! Et Pops mon pti Poppyx, 2023 sonnera nos 10 ans d'amitié, alors merci d'avoir fait toute cette route avec moi, de m'avoir soutenu du début à la fin de cette aventure et d'être toujours si gentil et patient avec moi (même quand je marchais si lentement dans les rues de Paris !)

Pour finir, le dernier mais le plus grand remerciement va à mes parents, merci à vous deux de m'avoir donné toutes les chances dans la vie pour me permettre d'en arriver là, rien n'aurait été possible sans vous ! Alors merci du fond du coeur pour tout !

Table des matières

Introduction Générale 1

L'histoire du mouvement chez les plantes et la plasticité développementale 1

Le système racinaire 2

Le système racinaire d'Arabidopsis Thaliana 3

La racine primaire 3

La zone méristématique 3

La zone de transition 4

La zone d'élongation 4

La zone de différenciation 4

Les racines latérales 5

Le processus de positionnement 5

L'initiation 6

L'organogénèse du primordium 7

L'émergence 8

Le système racinaire chez d'autres espèces végétales 8

Le riz, plante modèle des monocotylédones 8

Le lupin, plante modèle du développement des racines protéoïdes 9

Les nutriments 10

L'architecture du système racinaire en réponse aux nutriments 11

Le phosphore 11

L'azote 12

Le fer 13

Les phytohormones 14

L'auxine, déclencheur du changement 14

Le transport polarisé de l'auxine 17

Les AUX/LAX 18

Focus sur AUX1 18

Les PINs 19

Focus sur PIN2 19

Les outils pour étudier l'auxine 20

Le gravitropisme 21

Racines primaires et gravitropisme 22

La perception de la gravité 22

La transduction du signal 23

La phase précoce de la réponse gravitropique (5 min) 24

La génération du gradient d'informations (30 min) 25

La relocalisation des flux d'auxine (60 min) 26

La fin de l'accumulation d'auxine (120 min) 26

La croissance 27

Racines latérales et gravitropisme 27

Contexte et objectifs de l'étude 30

Chapitre 1 - *pin2* mutant conditionnel dépendant du milieux nutritifs 32

1 - Introduction 32

2 - Résultats 34

2.1 - Article 34

2.2 - Résultats complémentaires **35**
2.2.1 - Description fine de la longueur racinaire et de la sédimentation des grains d'amidon de pin2-2 **35**
2.2.2 - Le phénotype racinaire agravitropique du mutant allélique fsp2-1 **36**
2.2.3- La distribution des racines latérales de pin2-2 **37**
2.2.4- Le phénotype de racine agravitropique de pin2 **39**
2.2.5- Les processus d'élongation et de division cellulaire racinaire de pin2-2 **40**
2.2.6- Analyse de la systémie sur le phénotype conditionnel de pin2-2 **41**
2.2.7- L'accumulation d'auxine dans l'épiderme **42**
2.2.8- L'accumulation de protéines PIN2 et NRT1.1 en réponse aux milieux **43**
3 - Discussion **44**
3.1 - L'originalité du phénotype racinaire agravitropique de pin2 **44**
3.2 - Les nutriments moteur de la réponse à l'auxine chez pin2-2 **46**
3.3 - L'expression ectopique asymétrique de PIN1, une clé pour comprendre la conditionnalité de pin2 **48**
3.4 - Modèle expliquant la conditionnalité de pin2-2 et perspectives **49**
Chapitre 2 - Les autres mutants liés à l'auxine et au gravitropisme **52**
1 - Introduction **52**
2 - Résultats **55**
2.1 - Le phénotype d'autres mutants liés à l'auxine et au gravitropisme **55**
2.2- Les doubles mutants pin2-2 aux1 et pin2-2 pin3 **56**
2.3- Le gravitropisme précoce des aux1, pin3 et leurs doubles mutants avec pin2-2 **57**
2.4- Les conditions osmotiques et la vitesse de croissance, le cas de aux1 **58**
2.5- L'accumulation d'auxine dans l'épiderme et la disponibilité des nutriments, le cas de aux1 **59**
3 - Discussion **60**
3.1 - L'effet des nutriments n'est pas spécifique à pin2-2 **60**
3.2 - Relation entre AUX1, PIN2 et PIN3 **63**
3.3 - aux1 et pin2 des voies différentes menant à la conditionnalité du phénotype **64**
3.4 - Modèle expliquant la conditionnalité de aux1 **65**
Chapitre 3 - L'étude d'inhibiteurs auxiniques, de cytokinines et de brassinostéroïdes sur *pin2* & *aux1* **66**
1 - Introduction **66**
2 - Résultats **69**
2.1- L'importance de l'auxine dans la relation entre gravitropisme et environnement nutritif chez pin2-2 et aux1 **69**
2.2- Crosstalks hormonaux impliqués dans la conditionnalité du phénotype racinaire agravitropique de pin2-2 et aux1 **72**
3 - Discussion **74**
3.1 - L'auxine au coeur de la réponse à la gravité et de la conditionnalité de pin2 et aux1 **74**
3.2 - Cytokinines et brassinostéroïdes entre synergie et effet antagoniste **75**
3.3 - Modèle de l'homéostasie de l'auxine, le rôle des cytokinines et des brassinostéroïdes **78**
Discussion générale, perspectives & Conclusions **79**
1 - Agravitropisme et défaut de gravitropisme **80**

2 - L'importance des nutriments sur la relocalisation asymétrique de l'auxine au cours du gravitropisme **80**

3 - Le transport de l'auxine et son rôle crucial au cours du gravitropisme, le cas de PIN1 **83**

4 - L'importance évolutive du gravitropisme, le cas du riz **86**

5 - Conclusions **88**

Matériels & Méthodes **89**

Matériel biologique végétal **89**

Conditions de cultures **89**

Cultures en serre **89**

Culture in vitro **89**

Les différents traitements des milieux **90**

Traitement au NaCl, Sorbitol et PEG **90**

Traitement de carences nutritives **90**

Traitement avec l'application d'inhibiteurs auxiniques **91**

Traitement avec l'application d'hormones exogènes **91**

Phénotypage **92**

Quantification de la longueur PR et vitesse de croissance **92**

Quantification des racines latérales **92**

Gravistimulation **92**

Gravisplitroot **92**

Imagerie **93**

Coloration à l'iode pour visualiser les grains d'amidon **93**

Gène rapporteur GUS **93**

Observation des phénotypes **93**

Microscopie confocal **94**

Quantification du signal de fluorescence **94**

Observation de NRT1.1:GFP **95**

Analyses statistiques **95**

Annexes : Publication, Communications & Formations **96**

Liste de publication **96**

Communications orales **96**

Formations **96**

Bibliographie **98**

Tables des figures

Introduction

Figure i.1. Les principaux tropismes 1

Figure i.2. Architecture racinaire comparée d'*Arabidopsis* et de *Brachypodium* 2

Figure i.3. Anatomie de l'apex de la racine primaire chez *Arabidopsis thaliana* 3

Figure i.4. Formation des racines latérales 5

Figure i.5. Le processus de positionnement des racines latérales 5

Figure i.6. L'initiation des racines latérales 6

Figure i.7. L'organogenèse et l'émergence des racines latérales 7

Figure i.8. Le système racinaire du riz et du lupin 9

Figure i.9. Les macro et micronutriments dans le sol 10

Figure i.10. L'effet d'une carence en nutriments (P, N, Fe) sur la morphologie des racines 12

Figure i.11. Les différentes phytohormones et leur implication au long du cycle de vie de la plante 14

Figure i.12. L'auxine déclencheur du changement 15

Figure i.13. L'homéostasie de l'auxine 16

Figure i.14. Le transport tissulaire et cellulaire de l'auxine 17

Figure i.15. Structure des différents transporteurs de l'auxine 18

Figure i.16. La protéine PIN2 et sa localisation 19

Figure i.17. DR5 et R2D2 des outils pour étudier l'auxine 20

Figure i.18. Le gravitropisme de la racine primaire 22

Figure i.19. La perception de la gravité 23

Figure i.20. La transduction du signal 24

Figure i.21. La réponse de croissance 27

Figure i.22. Le gravitropisme des racines latérales 28

Figure i.23. La sévérité des phénotypes agravitropiques de *pin2* 30

Chapitre 1 -

Figure 1.1. Description de la racine de *pin2-2* 35
Figure 1.2. Phénotype agravitropique conditionnel du mutant allélique de *pin2-2* : *fsp2-1* 36
Figure 1.3. Distribution des racines latérales de *pin2-2* en MS/2 37
Figure 1.4. Distribution des racines latérales de *pin2-2* en conditions permissives 38
Figure 1.5. Le phénotype racinaire de *pin2-2* en fonction des milieux 39
Figure 1.6. Le phénotype racinaire agravitropique de *pin2-2* en fonction des milieux 40
Figure 1.7. Gravisplitroot du phénotype racinaire agravitropique de *pin2-2*. 41
Figure 1.8. La cinétique de l'accumulation d'auxine dans l'épiderme en fonction des milieux 42
Figure 1.9. PIN2 et NRT1.1 en réponse aux différents milieux nutritifs 43
Figure 1.10. Modèle du phénotype racinaire agravitropique conditionnel de *pin2* 49

Chapitre 2 -

Figure 2.1. Schéma représentatif des différents mutants utilisés au cours de ce chapitre 52
Figure 2.2. Le phénotype de réponse racinaire à la gravité chez des mutants *axrs*, *pgm*, *pins* et *aux1* 55
Figure 2.3. Le phénotype de croissance racinaire agravitropique de *pin2-2 pin3* et *pin2-2 aux1* 56
Figure 2.4. Le phénotype de gravitropisme précoce de *pin2-2, pin3* et *aux1* et des doubles mutants *pin2-2 pin3* et *pin2-2 aux1* dans des conditions permissives et restrictives 57
Figure 2.5. L'effet du stress osmotique et l'étude de la croissance racinaire de *aux1* 58
Figure 2.6. L'accumulation d'auxine en réponse à la disponibilité en nutriments chez le mutant *aux1* 59
Figure 2.7. Modèle du phénotype racinaire agravitropique conditionnel de *aux1* 65

Chapitre 3 -

Figure 3.1. Schéma représentatif plaçant les différentes approches pharmacologiques utilisées au cours de ce chapitre 68
Figure 3.2. L'effet de L-Kynurenine et de l'auxinole sur le phénotype agravitropique conditionnel de *pin2* et *aux1* 69
Figure 3.3. L'effet de TIBA, NPA et 1-NOA sur le phénotype agravitropique conditionnel de *pin2* et *aux1* 71
Figure 3.4. L'effet de la zéatin et de l'épibrassinolide sur le phénotype agravitropique conditionnel de *pin2* et *aux1* 72
Figure 3.5. L'effet de l'épibrassinolide sur le phénotype agravitropique conditionnel de *pin2* et *aux1* 73
Figure 3.6. Modèle de l'effet des cytokinines brassinostéroïdes et inhibiteurs de l'auxine sur le phénotype racinaire agravitropique conditionnel 78

Matériels & Méthodes -

Figure M.1. Composition des milieux 91
Figure M.2. Diagramme circulaire utilisé pour le phénotypage gravitropique de l'apex racinaire lors de la gravistimulation. 92
Figure M.3. Schéma de la réalisation de gravisplitroot 93
Figure M.4. Schéma du montage entre lame et lamelle avec un bloc de milieu 94

Annexes

Figure Supplémentaire 1. Les nouveaux rapporteurs pour étudier l'auxine 96

Listes des abréviations

Unité

a.u → Unité arbitraire
mM → Millimolaire
µM → Micromolaire
µm → Micromètre
cm → Centimètre
Mm → Millimètre
h → Heures

Architecture racinaire

1° LR → Racines latérales de premier ordre
2° LR → Racines latérales de second ordre
AR → Racine adventive
CR → Racine coronaire
EZ → Zone d'élongation
GSA → Gravitropic set-point angle
LR → Racine latérale
MZ → Zone de méristème
PR → Racine primaire
QC → Centre quiescent
RAM → Méristème apical racinaire
RC → Coiffe racinaire
RSA → Architecture du système racinaire

Nutriments

B → Bore
Ca → Calcium
Cl → Chlorure
Cu → Cuivre
Fe → Fer
Fe^{2+} → Fer ferreux
Fe^{3+} → Fer ferrique
$Fe(OH)_3$→ Hydroxides ferriques
K → Potassium
Mg → Magnésium
Mn → Manganèse
Mo → Molybdène
N → Azote
NO → Oxyde nitrique
NO_3^- → Nitrate
NH_4^+ → Ammonium
P → Phosphore
Pi → Phosphate inorganique (HPO_4^{2-})
PO_4^{3-}→ Phosphate
S → Soufre
Zn → Zinc

Hormones et Inhibiteurs

1-NOA → 1-Naphthoxyacetic acid
2,4-D → Acide 2,4-dichlorophénoxy-acétique

4-Cl-IAA → Acide 4-chloroindole-3-acétique
ABA → Acide abscissique
BFA → Brefeldine A
BR → Brassinostéroïdes
CK → Cytokinines
eBR → Épibrassinolide
ET → Éthylène
GA → Gibbérellines
IAA → Acide Indole-3-Acétique / Auxine
IBA → Acide Indole-3-Butyrique
IPyA → Indole-3-pyruvate
JA → Acide jasmonique
L-Kyn→ L-Kynurenine
NAA → Acide 1-naphtalèneacétique
NPA → Acide naphtylphtalamique
PAA → Acide phénylacétique
SA → Acide salicylique
SL → strigolactones
TIBA → Acide triiodobenzoïque
Trp → Tryptophane
tZ → trans-Zeatin

Divers

AAAP → Acides Aminés/Auxine Perméase
ACR4 → ARABIDOPSIS CRINKLY 4
ADN → Acide DésoxyriboNucléique
AFB → Auxin Signaling F-BOX Proteins
AGD12 → ADP-RIBOSYLATION FACTOR GTPase-ACTIVATING PROTEIN
ALF4 → ABERRANT LATERAL ROOT FORMATION 4
ARF1 → ADP-ribosylation factor 1
ARF → AUXIN RESPONSE FACTOR
ARL2 → ARG1-LIKE2
ARN →Acide RiboNucléique
AuxRE → Auxin response elements
Aux/IAA → Auxin/Indole Acetic Acid
ATP → Adénosine TriPhosphate
BIG4 → Brefeldin A-inhibited ARF-guanine-exchange factor
BLOC-1 → BLOC SUBUNIT 1
CLASP → CLIP-ASSOCIATED PROTEIN
CLEL → CLE-LIKE
CUL1 → Cullin 1
CWR → CELL WALL REMODELING
CYCB1.1 → CYCLIN-B1.1
DMSO → Diméthylsulfoxyde
EAR → ERF-associated amphiphilic repressor
ECH → ECHIDNA
EHB1 → ENHANCED BENDING 1
ER → Réticulum endoplasmique
EXP → EXPANSINES
FER → FERONIA
GATA23 → GATA TRANSCRIPTION FACTOR 23
GFP → Green fluorescent protein
Glc-6-P → Glucose-6-phosphate
Glc-1-P → Glucose-1-phosphate
GLV → GOLVEN
IAA28 → INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 28
InsP3 → Inositol 1,4,5-trisphosphate
LAX -> LIKE AUX1

LBD → LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN
LZY → LAZY
MAKR4 → MEMBRANE-ASSOCIATED KINASE REGULATOR 4
MDR → Multiple drug resistance
NLS → Nuclear localization signal
PEG → Polyéthylène glycol
PG → POLYGALACTURONASES
PGM → Phosphoglucomutase
PGP → P-glycoproteins
PID → PINOID
PILs → PIN-likes
PIN → PIN-FORMED
PM → Membrane plasmique
PP2A → SERINE/THREONINE PROTEIN PHOSPHATASE 2A
RBX1 → Ring Box 1
REDOX → Réaction d'oxydoréduction
RLK → RECEPTOR-LIKE KINASE
RGF → ROOT MERISTEM GROWTH FACTOR
RGLG → (RING-finger E3 ligase)
ROS → Espèces réactives de l'oxygène
SCF → SKP, CULLIN, F-BOX
SHY2 → SHORT HYPOCOTYL 2
SKP1 → S-phase kinase-associated protein 1
SLR → SOLITARY-ROOT
SNX1 → SORTING NEXIN 1
TGN → Réseau trans-Golgien
TIR1 → Transport Inhibitor Response 1
TMK → TRANSMEMBRANE KINASE
TPL → TOPLESS
VPS29 → VACUOLAR PROTEIN SORTING 29
XTH → Xyloglucane endotransglucosylases/hydrolases
YFP → Yellow fluorescent protein

Résumé : Les plantes ont la capacité de s'adapter aux facteurs environnementaux grâce à une phytohormone, l'auxine, régulateur majeur du développement et des tropismes. Parmi eux, le gravitropisme est essentiel pour que les racines poussent en suivant le vecteur de gravité à la recherche de nutriments et d'eau dans le sol. L'importance de l'auxine a été démontrée par le phénotype agravitropique racinaire du mutant de transport polarisé de cette phytohormone *pin2*. Un nouvel allèle mutant de PIN2 a permis de révéler que ce phénotype est lié aux nutriments disponibles dans le milieu de culture. Les travaux de cette thèse visent à comprendre quel est l'impact des nutriments sur le lien déjà existant entre gradient d'auxine et gravitropisme, pour moduler l'architecture racinaire. Pour ce faire différents milieux de cultures ont été utilisés pour suivre à l'aide des marqueurs d'auxine DR5 et R2D2 les gradients d'auxine au cours de la réponse à la gravistimulation dans différents mutants. Il est clair que les mutants *pin2* et *aux1*, respectivement transporteurs d'efflux et d'influx d'auxines, répondent à la gravité seulement sur milieux dépourvus de phosphore et d'azote indépendamment de l'osmolarité et de la vitesse de croissance des racines primaires. Dans le mutant *pin2* nous avons pu établir que cette réversion du phénotype agravitropique passe par l'expression asymétrique et ectopique de PIN1 dans l'épiderme. Celle-ci est associée à une restauration de l'accumulation asymétrique d'auxine nécessaire à la réorientation de la racine en fonction de la gravité. Ces observations ainsi que l'utilisation d'inhibiteurs d'auxine ont mis en évidence l'importance de l'homéostasie de l'auxine dans ce processus. Le transport de l'auxine représente le principal levier permettant d'expliquer l'importance des nutriments au cours du gravitropisme. Nous avons également mis en évidence que les cytokinines et les brassinostéroïdes, via leur action en synergie avec l'auxine, ont un effet qui permettrait de moduler le seuil d'auxine pour répondre à la gravité.

Ainsi, les travaux menés au cours de cette thèse ont permis d'apporter de nouvelles connaissances quant aux phénotypes agravitropiques de *pin2* et *aux1* et quant aux effets des nutriments sur le transport de l'auxine au cours du gravitropisme. La régulation de la distribution de l'auxine par la disponibilité des nutriments impacte directement la capacité des racines à piloter leur réponse gravitropique. Cela suggère que définir l'angle de croissance racinaire en modulant la réponse gravitropique peut être contrôlé à la fois génétiquement et environnementalement. Ces observations ouvrent la voie à l'amélioration de l'exploration du sol par les racines avec une meilleure utilisation des ressources.

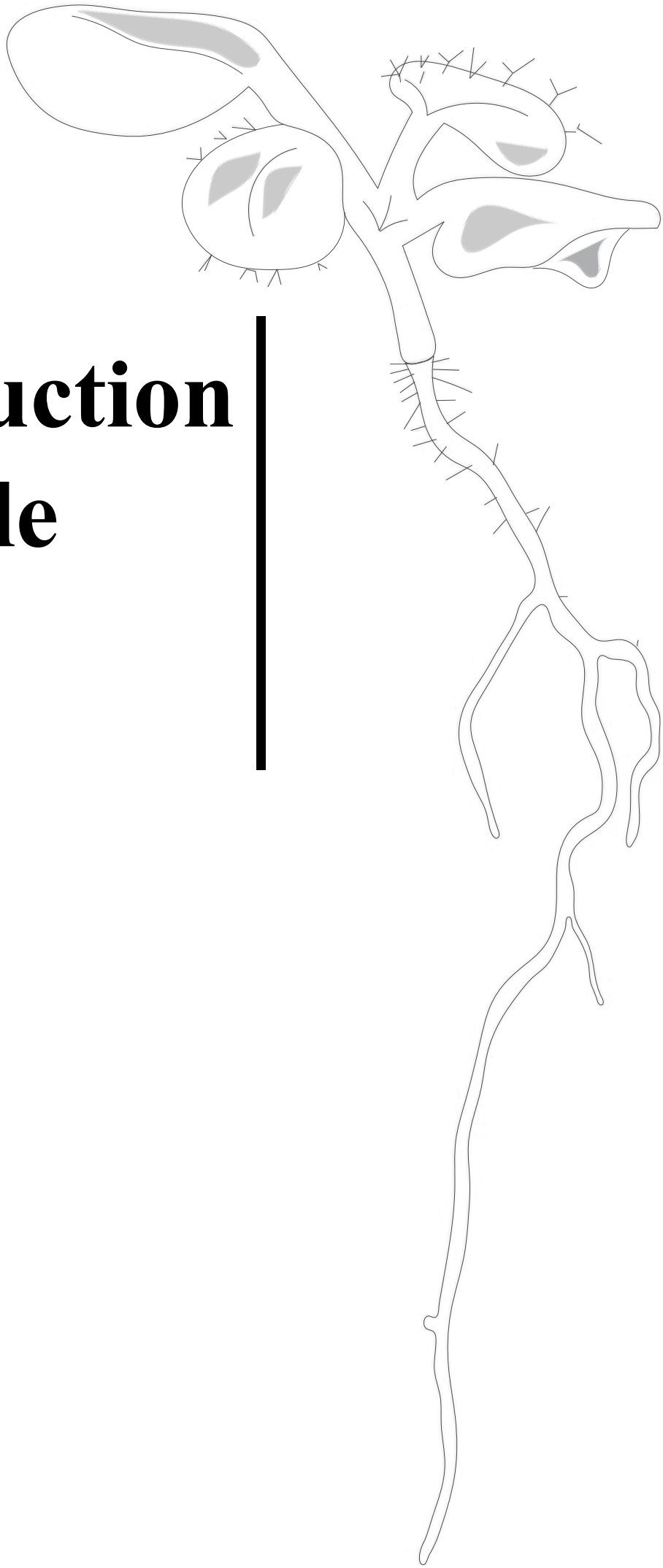
Mots clés : Transport polarisé de l'auxine, Gravitropisme, Nutriments, Phénotype conditionnel, PIN2, AUX1

Abstract: Plants have the capacity to adapt to environmental factors using the phytohormone, auxin, as a major regulator of development and tropisms. Among these responses, gravitropism is essential for plants roots to grow downward in the search for nutrients and water. Importance of auxin was demonstrated by the root agravitropic phenotype of the polarized transport mutant of this phytohormone : *pin2*. A new mutant allele of PIN2 revealed that this agravitropic phenotype is caused by the nutrients available in the culture media. My thesis project aims to understand what is the impact of nutrients on the already existing link between auxin gradient and gravitropism, to modulate root architecture. To do this, different culture media were used to follow auxin gradient, using DR5 and R2D2 probes, during the response to gravistimulation in different mutants. It is clear that *pin2* and *aux1* mutants, transporters of auxin efflux and influx respectively, respond to gravity only on media lacking phosphorus and nitrogen, independently of the osmolarity and the primary roots growth rate. In *pin2* mutant, we were able to establish that this reversion of agravitropic phenotype occurs through the asymmetric and ectopic expression of PIN1 in the epidermis. This is associated with a restoration of the asymmetric accumulation of auxin necessary for the reorientation of the root according to gravity. These observations along with the use of auxin inhibitors have highlighted the importance of auxin homeostasis in this process. Auxin transport represents the main lever for explaining the importance of nutrients during gravitropism. We also demonstrated that cytokinins and brassinosteroïds, through their action in synergy with auxin, have an effect that could modulate the auxin threshold to respond to gravity.

Thus, the work carried out during this thesis has provided new knowledge about the agravitropic phenotype of *pin2* and *aux1* and about the effects of nutrients on auxin transport during gravitropism. The regulation of auxin distribution by nutrient availability directly impacts the ability of roots to drive their gravitropic response. This suggests that setting the root growth angle by modulating the gravitropic response can be both genetically and environmentally controlled. These observations open the way to the improvement of soil exploration by roots with a better use of resources.

Keywords: Polarized auxin transport, Gravitropism, Nutrients, Conditional phenotype, PIN2, AUX1

Introduction générale



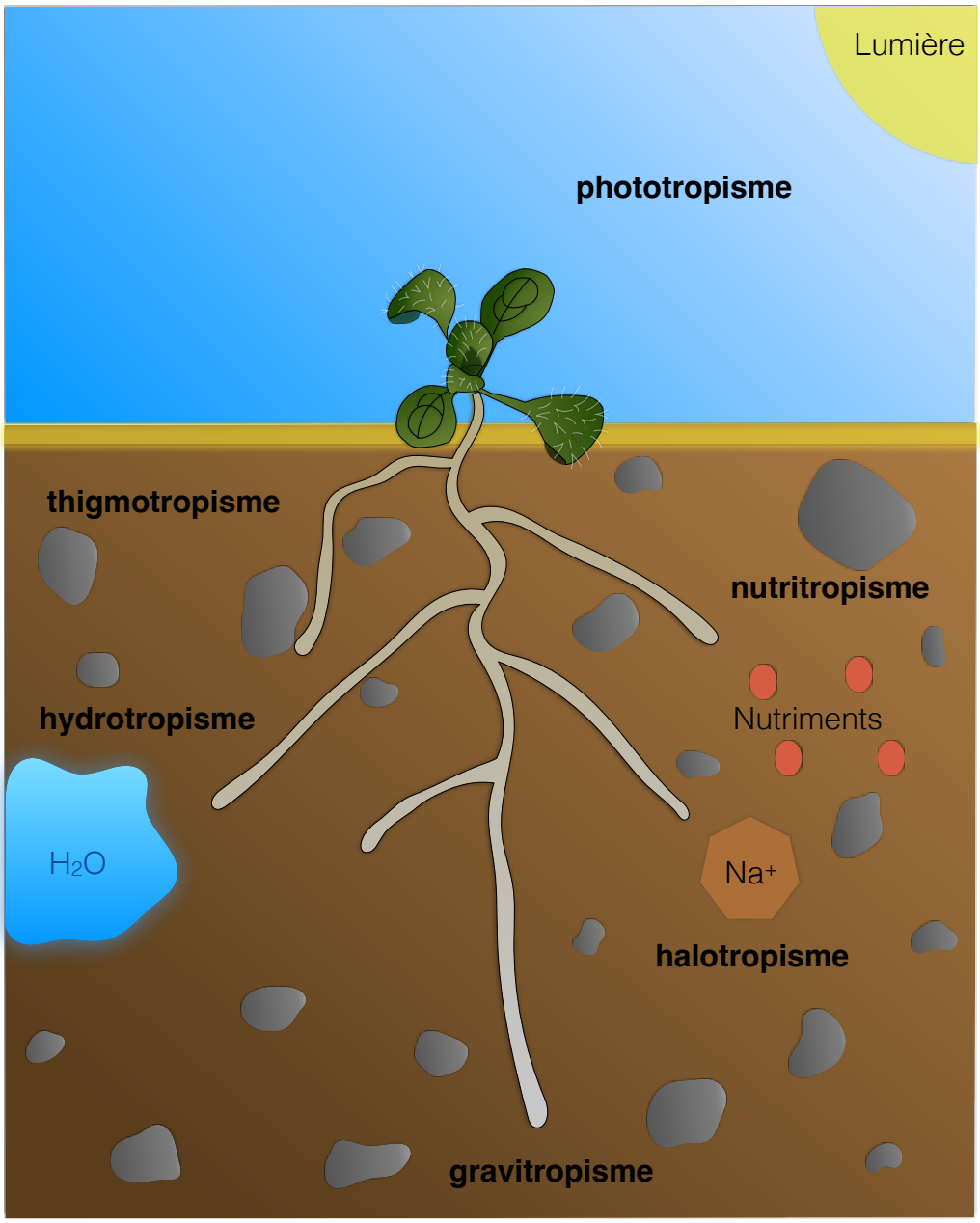


Figure i.1. Les principaux tropismes
Schéma représentatif des différents types de tropismes auxquels fait face la racine : le gravitropisme (Friml et al., 2002), le phototropisme (Goyal et al., 2013 ; Mo et al., 2015), l'hydrotropisme (Jaffe et al., 1985; Miyazawa and Takahashi, 2020), l'halotropisme (Galvan-Ampudia et al., 2013), le thigmotropisme (Migliaccio and Piconese, 2001) et le nutritropisme (Yamazaki et al., 2019).

Introduction générale

L'histoire du mouvement chez les plantes et la plasticité développementale

Les plantes sont des organismes sessiles, qui ne peuvent échapper à leur environnement, et se développent dans un milieu particulièrement fluctuant et hétérogène, le sol. Face à ces conditions environnementales, les plantes ont une capacité d'adaptation remarquable en matière de développement post-embryonnaire, et leurs organes, y compris les racines, ne sont pas immobiles. En effet, les plantes ont un développement dit « continu » grâce aux méristèmes qui sont des massifs cellulaires totipotents en division active et responsable de la morphogenèse. Lors de la germination, une plantule possède deux zones méristématiques, l'une racinaire et l'autre caulinaire. Ceux-ci leur permettent de croître et de produire de nouveaux organes au cours de leur vie. Ainsi, bien que chaque plante ait un plan morphologique de base, sa taille et sa forme finale sont en grande partie déterminées par les conditions spécifiques rencontrées dans son environnement. Le mouvement des plantes fascine les scientifiques, notamment Charles Darwin qui a posé les bases sur l'étude précise des mouvements de différents organes végétaux en réponse à des stimuli directionnels externes, en particulier la gravité et la lumière, dans son livre « The Power of Movement in Plants » (Darwin et Darwin, 1880). Il existe différents types de mouvements chez les plantes, ils peuvent être nastiques donc « des mouvements mécaniques indépendants de la direction en réponse à des stimuli externes », par exemple la réponse thigmonastique qui peut avoir lieu chez les plantes carnivores avec les feuilles de *Mimosa pudica* ou de *Dionaea muscipula* (Pagitz et al., 2012). Il existe également des mouvements tropiques, définis comme « une réponse de croissance directionnelle à un stimulus directionnel » (Gilroy and Masson, 2008). Le concept de tropisme a été introduit il y a 200 ans, lorsque Knight (1806) a postulé que la perception de la gravité d'une plante pourrait moduler sa capacité à diriger les pousses vers le haut et à guider les racines vers le bas. Depuis, de nombreux types de tropismes différents ont été proposés au fil des ans (Figure i.1), les plus étudiés étant le gravitropisme (Friml et al., 2002), le phototropisme (Goyal et al., 2013; Mo et al., 2015), l'hydrotropisme (Jaffe et al., 1985; Miyazawa and Takahashi, 2020), l'halotropisme (Galvan-Ampudia et al., 2013) et le thigmotropisme (Migliaccio and Piconese, 2001). Il existe également des réponses de croissance directionnelle en réponse à différents gradients : magnétique avec le magnétotropisme, électrique avec l'électrotropisme, chimique avec le chémotropisme, thermique avec le thermotropisme, sonore avec le phonotropisme et enfin vers l'oxygène qui s'appelle l'oxytropisme ou vers les nutriments avec le nutritropisme (Yamazaki et al., 2019) (pour

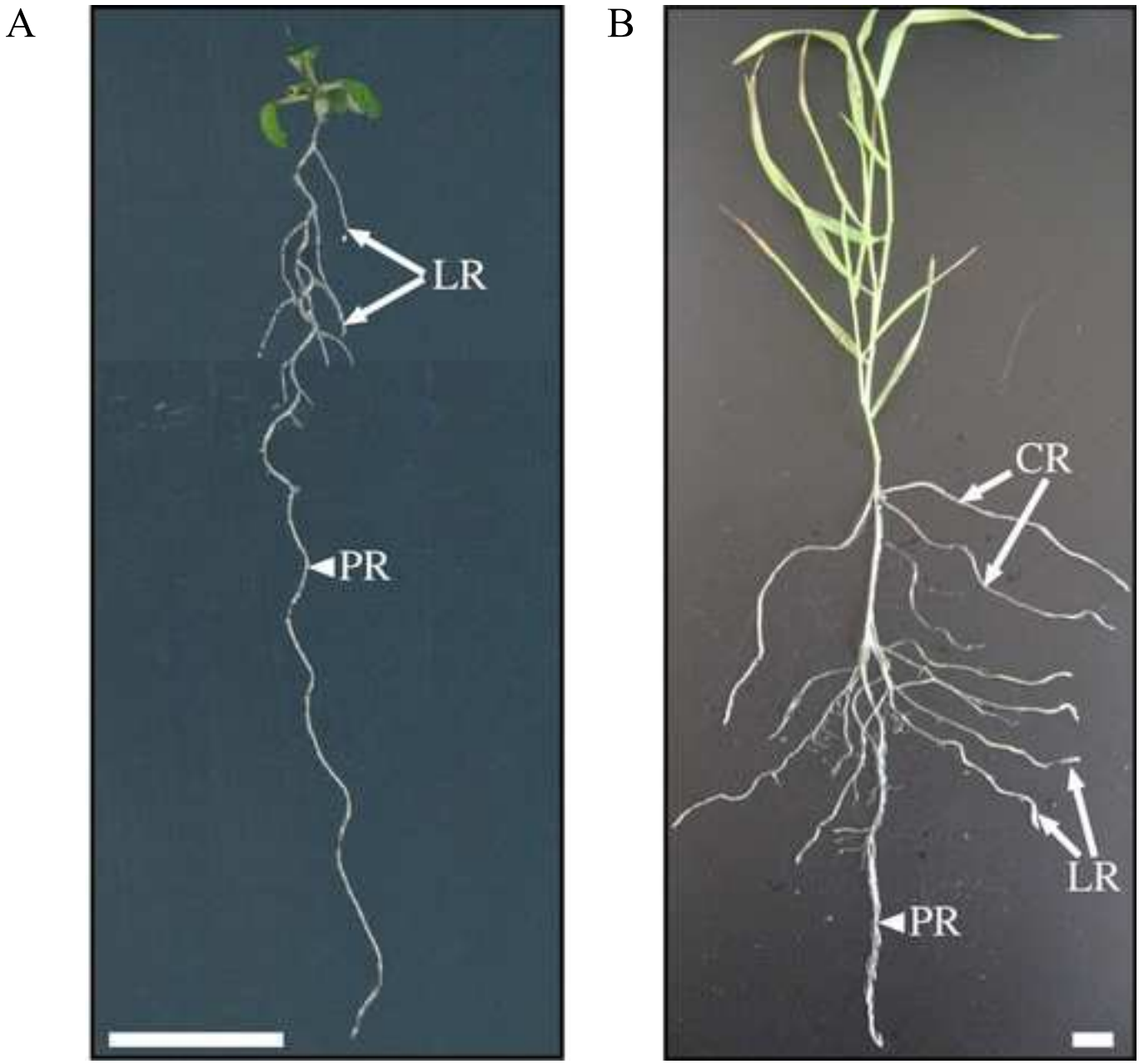


Figure i.2. Architecture racinaire comparée d'*Arabidopsis* et de *Brachypodium*
(**A**) Architecture typique du système racinaire pivotant de dicotylédone chez une plante *Arabidopsis* âgées de 10 jours. *Arabidopsis* ne forme qu'une seule racine primaire (PR) au cours de son développement, qui se ramifie par des racines latérales (LR).
(**B**) Architecture typique du système racinaire fasciculaire de monocotylédone chez une plante *Brachypodium* âgée de 30 jours, composée d'une racine primaire (PR), de racines coronaires (CR) et de racines latérales (LR).
Barres d'échelle = 1 cm. (Pacheco-Villalobos et Hardtke ., 2012)

plus d'informations sur tous ces différents types de tropismes voir la revue de Muthert et al., 2020). Les tropismes peuvent être classés comme "positifs" ou "négatifs", selon la croissance dirigée vers ou loin du stimulus directionnel (Gilroy and Masson, 2008). Les mouvements nastiques et tropiques nécessitent une croissance asymétrique des tissus végétaux. La capacité d'acclimatation des plantes, quand elle se manifeste par un changement de phénotype, est nommée « plasticité phénotypique » et correspond aux différents phénotypes que peut présenter un même génotype (sans variation génétique) dans des environnements différents (Pigliucci, 2001). Lorsque le changement de phénotype résulte d'une interaction fine entre le développement et l'environnement, on parle de « plasticité développementale » (Pigliucci, 1998). Les plantes modulent donc leur architecture racinaire en jouant sur la croissance et la création de nouveaux organes notamment pour répondre à un certain nombre de tropismes. La plasticité développementale confère ainsi une adaptabilité des végétaux à leur milieu. Les questions cruciales soulevées dans ce domaine concernent donc la capacité des végétaux à intégrer les signaux externes, et leur coordination en interne, menant à un changement de développement.

Le système racinaire

Le système racinaire est un excellent modèle pour étudier la plasticité développementale en vue d'améliorer l'acquisition des nutriments. Considéré comme la "face cachée" des plantes, le système racinaire permet d'ancrer les végétaux dans leur environnement et d'aller puiser dans le sol, l'eau et les nutriments nécessaires à leur croissance. Il existe deux principaux types de systèmes racinaires chez les plantes, définis par leur origine de développement et leurs schémas de ramification : les systèmes de racines pivotantes et les systèmes de racines fibreuses/fasciculaires (Figure i.2). Le système de racine pivotante se trouve chez les plantes dicotylédones tels que *Arabidopsis thaliana*, la tomate (*Solanum lycopersicum*) et le pois (*Pisum sativ*a), tandis que le système racinaire fibreuses/fasciculaire se trouve chez les monocotylédones tels que le *Brachypodium distachyon*, le riz (*Oryza sativa*), le blé (*Triticum aestivum*) et le maïs (*Zea mays*) (Atkinson et al., 2014). Dans les systèmes à racine pivotante, le système racinaire typique consiste en une racine primaire (PR) portant un système de racines latérales (LR) ramifiées de manière répétitive. Les systèmes de racine fibreuse, en revanche, consistent en une masse dense de racines adventives (AR), qui peuvent être spécialisées selon les espèces. Chez les céréales tel que le riz, ce sont des racines coronaires (CR) qui se différencient par un motif circulaire tout autour de la tige. Ces racines sont distinctes de la racine primaire et des LRs (Gonin et al., 2019). Étant donné que la racine primaire (racine embryonnaire) meurt à mesure que les monocotylédones vieillissent, les

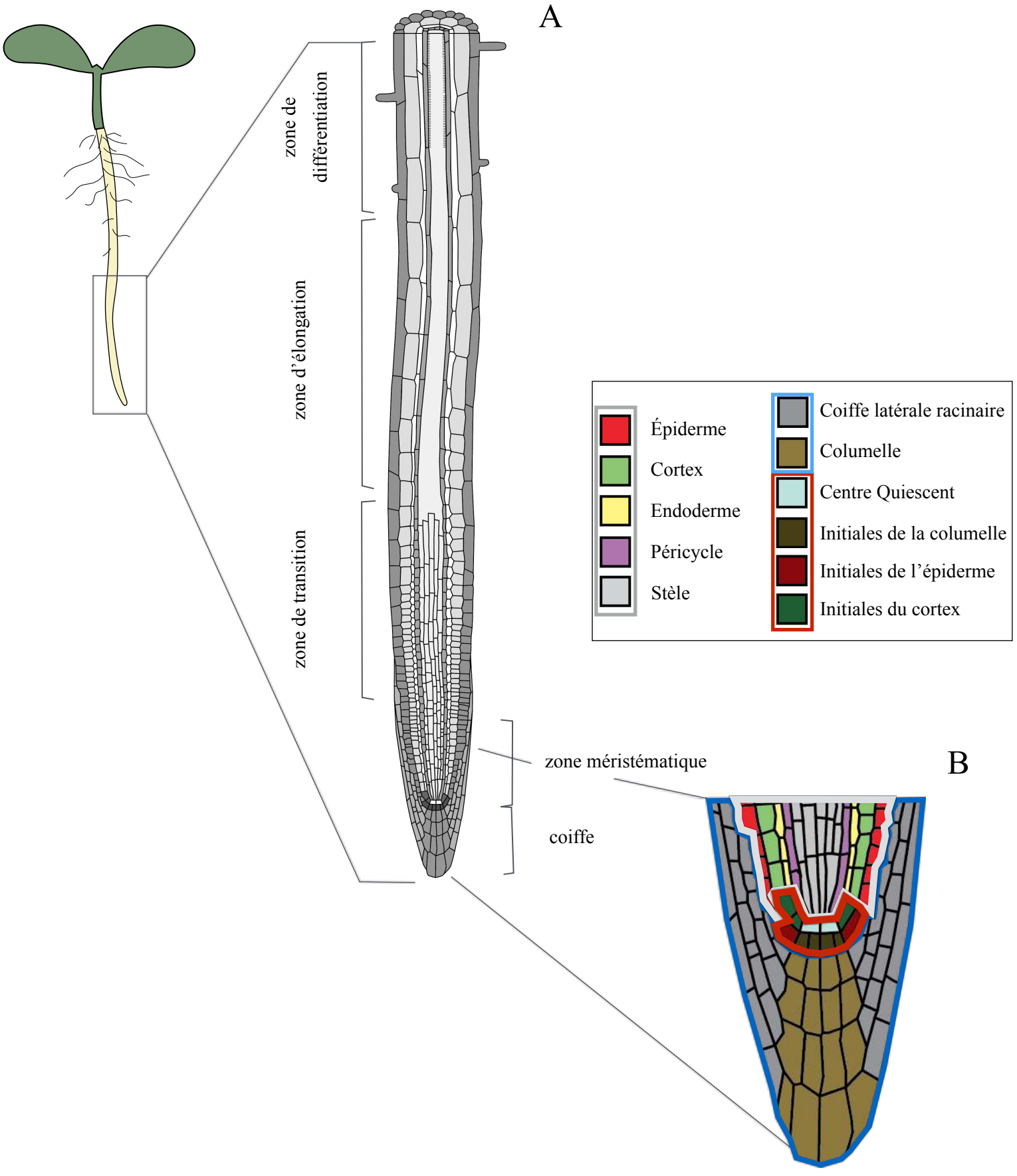


Figure i.3. Anatomie de l'apex de la racine primaire chez *Arabidopsis thaliana*

(**A**) L'apex de la racine primaire présentent 4 zones chez *A. thaliana* : la zone méristématique contenant des cellules en constante division protégée par la coiffe, la zone de transition où les cellules se divisent mais vont aussi lentement croître en longueur et en largeur, la zone d'élongation où la longueur des cellules va croître de manière importante tandis que la largeur de change pas, et enfin la zone de différenciation où les cellules vont commencer à se spécialiser.

(**B**) Le méristème apical racinaire, massif cellulaire totipotent en division active, est composé de 3 zones chez *A. thaliana* : le centre quiescent (CQ) entouré des initiales (bordeaux), la zone de méristème au dessus du CQ (gris) et la coiffe racinaire (bleu) composé de la columelle et de la coiffe latérale racinaire qui permettent de protéger le CQ.

racines adventives sont les principaux tissus racinaires du système racinaire fibreux des plantes monocotylédones.

Le système racinaire d'Arabidopsis Thaliana

La racine primaire

La racine d'*Arabidopsis thaliana* a une anatomie assez simple, ce qui facilite son étude. Elle est composée d'une série de couches monocellulaires autour des tissus vasculaires (xylème et phloème) d'un diamètre d'environ cinq cellules : le péricycle, l'endoderme, le cortex et l'épiderme. De plus, au niveau de l'apex se trouve la coiffe composée des cellules de la columelle et des cellules de la coiffe latérale, et juste au-dessus on retrouve le centre quiescent. Enfin, la racine est constituée de quatre zones distinctes : la zone méristématique protégée par la coiffe, la zone de transition, la zone d'élongation et la zone de différenciation (Dolan et al., 1993; Verbelen et al., 2006; Bennett and Scheres, 2010) (Figure i.3A).

La zone méristématique

Le méristème apical racinaire (RAM), est un massif cellulaire totipotent en division active qui permet un constant renouvellement des cellules (Figure i.3B). Il est à l'origine du développement indéterminé de la racine et il est responsable de la morphogenèse. Le RAM est composé de 3 zones : le centre quiescent (QC) entouré des initiales qui vont former une niches de cellules souches protégées par la coiffe racinaire. Au-dessus du QC se trouve une zone de cellules qui subissent des divisions mitotiques, appelée zone de méristème (MZ). D'un point de vue opérationnel, la MZ est divisé en deux : la MZ apicale, constituée des zones les plus actives, les cellules en division, et une MZ basale, dans laquelle les cellules deviennent plus grosses, se divisent moins fréquemment, et commencent à acquérir des destins distincts. À l'état d'équilibre de croissance de la racine chez l'écotype Columbia-0 (Col-0), le méristème s'étend jusqu'à 200 µm de la jonction à la coiffe racinaire (Verbelen et al., 2006). Le QC, et plus globalement le RAM, est protégé physiquement par la coiffe racinaire (RC) qui permet à la racine de pénétrer dans le sol sans endommager ses cellules. La RC est composée de la columelle, occupant la partie centrale et qui est composée de cellules sans activité mitotique, et de la coiffe latérale racinaire qui l'entoure (Dolan et al., 1993). Les cellules de la columelle et de la coiffe latérale racinaire sont en permanence renouvelées grâce à deux groupes distincts de cellules souches. Les cellules initiales de la columelle

sont situées sous le centre quiescent tandis que les cellules de la coiffe latérale sont produites par les mêmes initiales que les cellules de l'épiderme (Baum and Rost, 1996).

La zone de transition

À la suite de la zone méristématique, la zone de transition est une zone de croissance cellulaire lente en longueur et en largeur. Dans les parties distales de la zone de transition, les cellules conservent leur capacité de division tandis que dans la partie proximale les cellules sont prêtes à une rapide élongation. Il existe plusieurs caractéristiques cytologiques et anatomiques permettant une reconnaissance aisée de cette zone. Les noyaux sont, comme dans le méristème, placés au centre des cellules. Les cellules contiennent de petites vacuoles et les formes des cellules sont approximativement isodiamétriques car la longueur des cellules ne dépasse pas de manière significative leur largeur. Dans les racines en croissance à l'état d'équilibre de l'écotype Col-0, la zone de transition couvre la distance d'environ 200 à 520 µm de la jonction à la coiffe racinaire (Verbelen et al., 2006).

La zone d'élongation

À la suite de la zone de transition, les cellules passent par un allongement cellulaire très rapide sans croissance de la largeur cellulaire qui correspond à la zone d'élongation. En effet, en moins de 3h, la longueur des cellules va jusqu'à quadrupler. Il existe plusieurs caractéristiques cytologiques et anatomiques permettant une reconnaissance de cette zone. Les noyaux sont poussés vers les parois latérales des cellules en raison de la formation très rapide de grandes vacuoles centrales. Dans les racines en croissance à l'état d'équilibre, la zone d'élongation couvre la distance d'environ 520 à 850 µm de la jonction à la coiffe racinaire (Verbelen et al., 2006).

La zone de différenciation

Enfin, à la suite de la zone de transition, se trouve la zone de différenciation dans laquelle les cellules atteignent leur taille finale et prennent leurs fonctions. Les assises cellulaires de la stèle, du cortex, de l'endoderme, du péricycle et de l'épiderme peuvent alors être définies. Cette zone de l'apex racinaire est également caractérisée par une croissance très active des poils absorbants qui ont pour rôle d'augmenter la surface d'absorption de l'eau et des éléments minéraux présents dans la rhizosphère. Dans les racines en croissance à l'état d'équilibre, la zone de différenciation s'étend d'environ 850 à 1500 µm de la jonction à la coiffe racinaire (Verbelen et al., 2006).

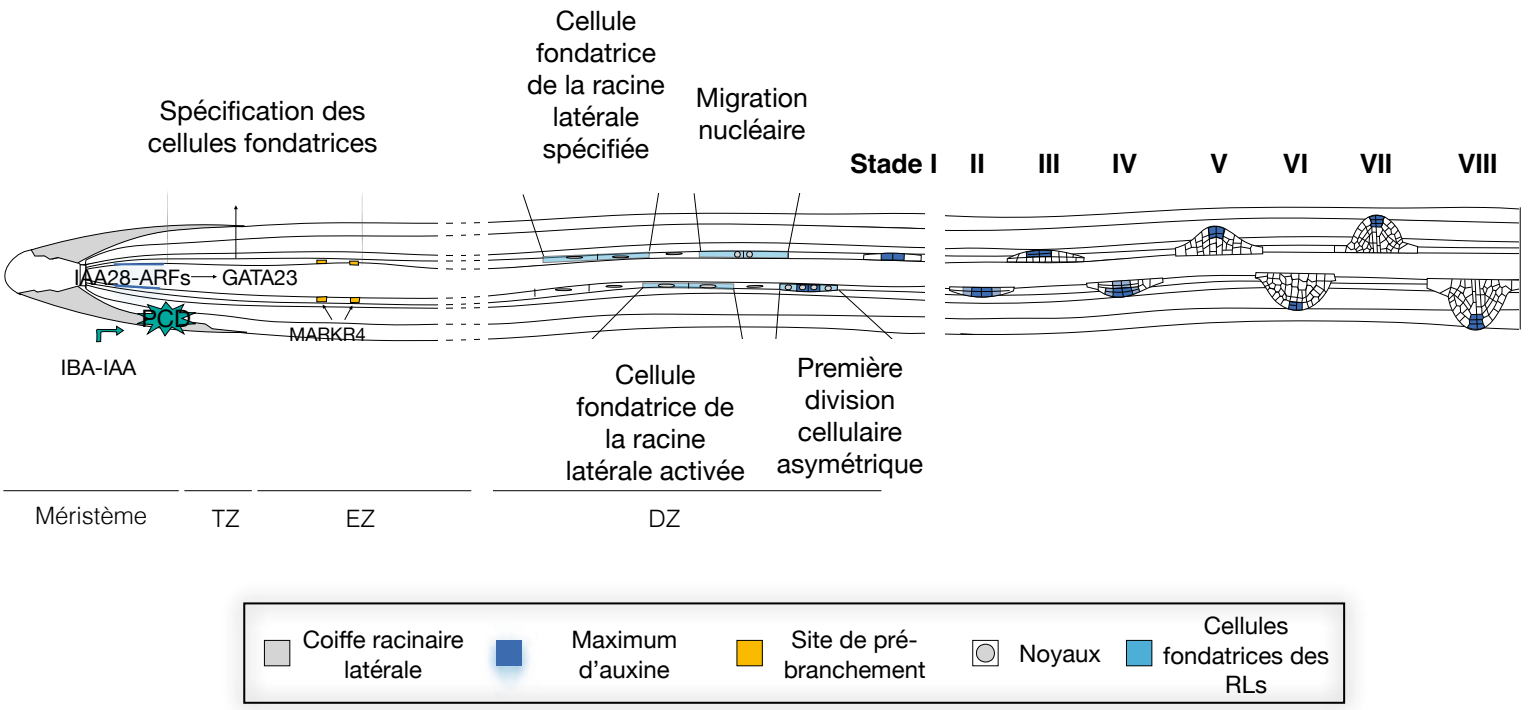


Figure i.4. Formation des racines latérales

La formation des racines latérales est divisée en quatre grandes étapes : le processus de positionnement, l'initiation, l'organogenèse et l'émergence. TZ = Zone de transition, EZ = Zone d'élongation, DZ = Zone de différenciation. PCD= mort cellulaire programmée

(Adapté de Du and Scheres 2017)

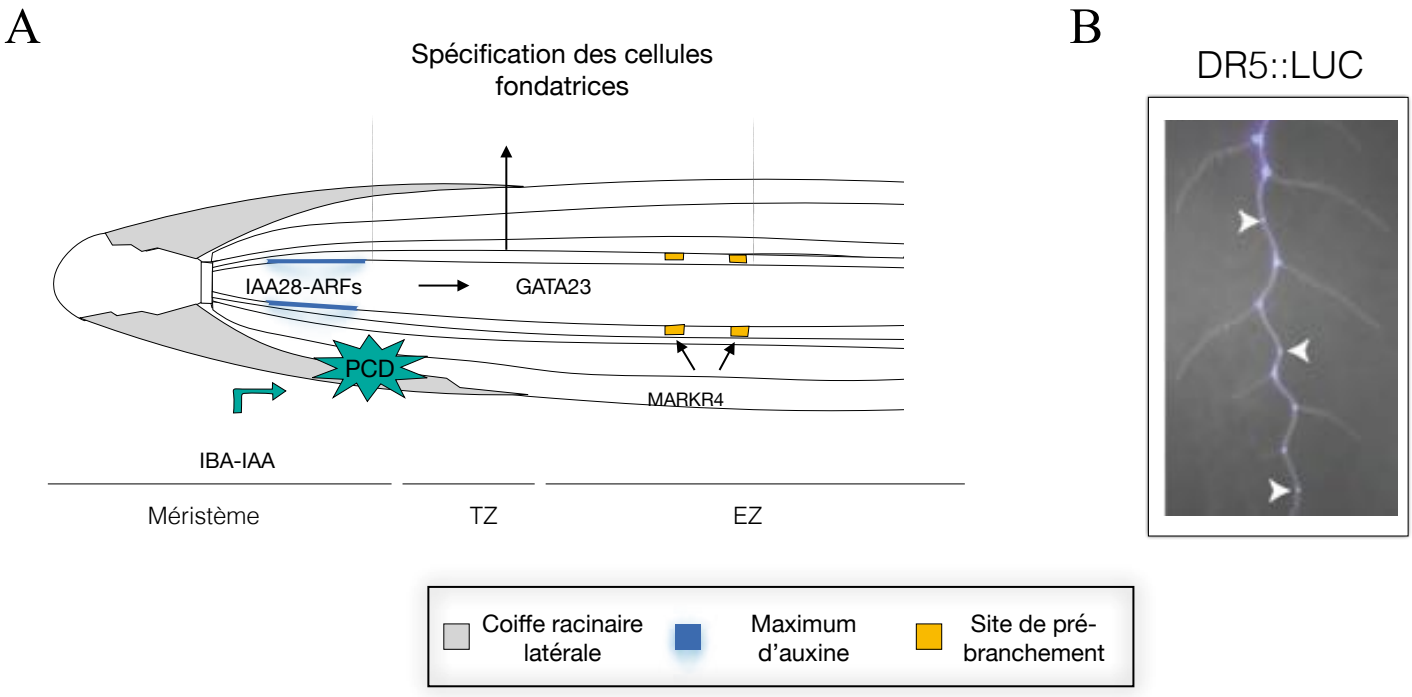


Figure i.5. Le processus de positionnement des racines latérales

(**A**) La conversion spécifique du précurseur d'auxine IBA en IAA dans la coiffe latérale crée une source d'auxine locale et il y a des burst synchrones de mort cellulaire qui libèrent des impulsions d'auxine vers les tissus radiculaires environnants. Cette accumulation locale d'auxine est essentielle pour la zone d'oscillation. Une cascade de signalisation auxinique impliquant IAA28 et ses facteurs de liaison ARF en interaction, contrôle l'expression de GATA23 qui est un facteur de transcription considéré comme le premier marqueur moléculaire de la cellule fondatrice de la racine latérale. Et MARKR4 est nécessaire pour convertir un site de pré-ramification de racine latérale en primordia de racine latérale après l'oscillation. TZ = Zone de transition, EZ = Zone d'élongation, DZ = Zone de différenciation. PCD= mort cellulaire programmée (Adapté de Du and Scheres 2017)

(**B**) Visualisation des oscillations périodiques grâce à l'observation de la luciférase avec le marqueur DR5::LUC (Van Norman et al., 2013)

Les racines latérales

Les cellules du RAM, contrairement au méristème apical caulinaire, ne produisent pas directement de méristèmes secondaires permettant une ramification. Il y a donc une formation *de novo* de racines secondaires, aussi appelées racines latérales, via une dédifférenciation des tissus du péricycle. Les racines latérales se développent à partir des tissus différenciés de la racine primaire et impliquent l'organogénèse de nouveaux méristèmes. La formation des racines latérales est divisée en quatre grandes étapes : le processus de positionnement, l'initiation, l'organogénèse et l'émergence (Figure i.4).

Le processus de positionnement

Le processus de positionnement est décisif pour établir le modèle de ramification du système racinaire avec la position, la spécification et l'activation des cellules fondatrices des racines latérales. La coiffe latérale est un lieu majeur dans ce processus, car elle permet d'intégrer des signaux environnementaux tels que la gravité et les nutriments, et ainsi établir l'accumulation d'une phytohormone : l'auxine (les phytohormones et le rôle de l'auxine seront détaillés dans la quatrième partie de cette introduction). Cette accumulation est générée via la création d'une source locale, avec la conversion spécifique du précurseur d'auxine IBA (Acide Indole-3-Butyrique) en IAA (Acide Indole-3-Acétique), mais également via des burst de mort cellulaire qui libèrent des impulsions d'auxine vers les tissus environnants, créant ainsi un mécanisme oscillatoire également nommé « priming » (Figure i.5A) (Xuan et al., 2015; Xuan et al., 2016). Ces oscillations périodiques ont d'abord été visualisées par De Smet et al., (2007), et correspondent à des impulsions d'auxine qui se produisent dans les cellules du protoxylème du méristème basal avec une périodicité de 15 h déterminant la présence et l'espacement longitudinal des primordia racinaires latéraux (Figure i.5B). La zone d'oscillation couvre la zone de transition et le début de la zone d'élongation de la racine primaire. Toutefois l'oscillation, bien que nécessaire, n'est pas suffisante pour la spécification des cellules fondatrices. Il faut également une cascade de signalisation, liée à l'auxine dans les cellules du péricycle, pour la spécification de ces cellules et convertir un site de pré-branchement de racines latérales en primordium de racine latérale. En effet, tous les sites de pré-branchement ne produisent pas de racines latérales, les cellules marquées par le priming ne sont donc pas toutes destinées à devenir des cellules fondatrices. La cascade de signalisation impliquant IAA28 (INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 28) et plusieurs facteurs de transcription ARF (AUXIN RESPONSE FACTOR) contrôle l'expression de GATA23 (GATA TRANSCRIPTION FACTOR 23) qui est un facteur de transcription considéré comme le premier

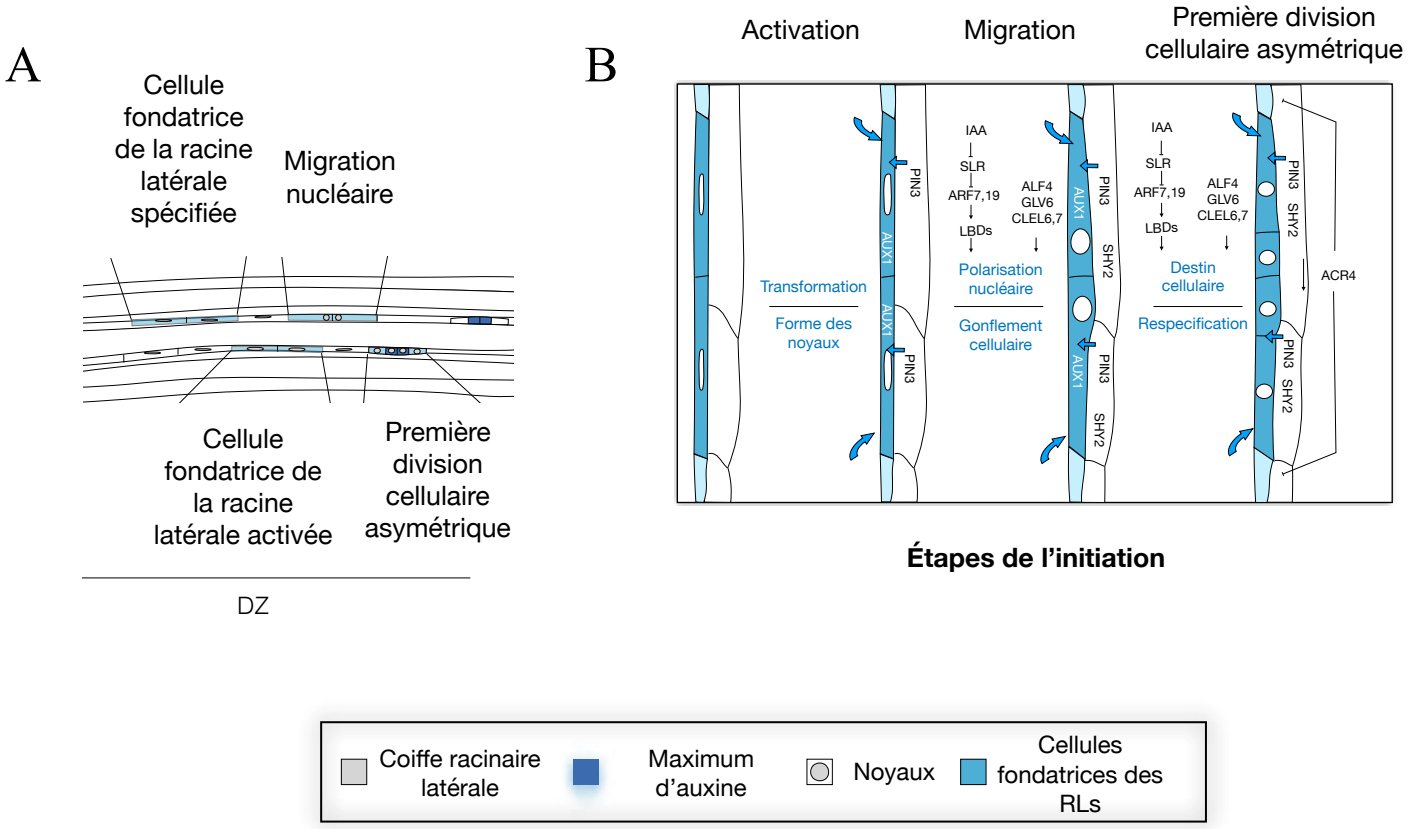


Figure i.6. L'initiation des racines latérales

(**A**) Pour l'initiation des racines latérales, cela débute par des signaux activés dans les cellules fondatrices permettant la migration nucléaire et cela se fini lorsque la première division cellulaire asymétrique est accomplie et que le destin des cellules filles est établis. DZ = Zone de différenciation. (Adapté de Du and Scheres 2017) (**B**) L'initiation débute lorsque l'auxine s'accumule dans les cellules du péricycle spécifiées et active ces cellules. L'initiation se poursuit avec la migration des noyaux des cellules fondatrices du péricycle et dépend de l'induction de l'expression de LBD16 par le module de réponse à l'auxine SLR/ARF7,19. En même temps que les noyaux migrent, l'endoderme subit une perte de son volume cellulaire, ce qui permet l'expansion radiale des cellules du péricycle. Ce processus est régulé par un deuxième module de signalisation de la réponse à l'auxine faisant intervenir SHY2. L'initiation se termine lorsque la première division asymétrique a eu lieu et que l'identité des quatre cellules filles est établie. La re-spécification du destin cellulaire de ces cellules ferait intervenir la signalisation auxinique médiée par SLR. (Adapté de Du and Scheres 2017)

marqueur moléculaire des cellules fondatrices des racines latérales (De Rybel et al., 2010). Et la kinase MAKR4 (MEMBRANE-ASSOCIATED KINASE REGULATOR 4) est également nécessaire pour convertir un site de pré-ramification de RL en primordium (Xuan et al., 2015).

L'initiation

Une fois la cellule fondatrice de la racine latérale spécifiée, il y a l'initiation de la racine latérale. L'initiation provient exclusivement de divisions asymétriques des cellules du péricycle situées en face des pôles de xylème. Cela commence par des signaux activés dans la cellule fondatrice permettant la migration nucléaire et se termine lorsque la première division cellulaire asymétrique est accomplie et que les cellules filles sont établies (Du and Scheres, 2017) (Figure i. 6A). Dans des cellules fondatrices un maximum d'auxine est créé et maintenu via l'activation de la biosynthèse de l'auxine et le transporteur d'influx d'auxine AUX1 (Figure i.6B) (Tang et al., 2017). On trouve également PIN3 (PIN-FORMED 3), transporteur d'efflux d'auxine, transitoirement induit dans les cellules endodermiques recouvrant les cellules fondatrices et créant un reflux d'auxine vers les cellules fondatrices ce qui stimule l'initiation des LRs (Marhavý et al., 2013). Ensuite, la première division cellulaire asymétrique commence avec la migration nucléaire. Un composant de la signalisation de l'auxine important pour l'initiation des LRs est le module SLR - ARF7/ARF19 (SOLITARY-ROOT - AUXIN RESPONSE FACTORs 7 et 19). Dans les cellules fondatrices qui subissent les premières divisions, CYCB1.1 (CYCLIN-B1.1) est fortement exprimé, ce qui marque la transition du cycle cellulaire G2-M, et sa présence est contrôlée par SLR et ARF7/ARF19 (Himanen et al., 2002; Vanneste et al., 2005 ; Okushima et al., 2007). La dégradation induite par l'auxine de SLR dé-réprime les facteurs de transcription ARF7 et ARF19 et permet d'activer l'expression des gènes en aval (Fukaki et al., 2002; Fukaki et al., 2005; Okushima et al., 2005; Wilmoth et al., 2005). Parmi les composants directs en aval d'ARF7 et d'ARF19 on trouve des protéines LBDs (LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN) avec notamment LBD16 qui favorise la migration nucléaire, permettant l'établissement d'une asymétrie dans les cellules fondatrices (Goh et al., 2012). Lors de la migration nucléaire on observe la transcription de GLV6 (GOLVEN6) et lorsque son niveau d'activité est approprié dans les cellules fondatrices, les premières divisions cellulaires asymétriques ont lieu (Fernandez et al., 2015). Indépendamment de la signalisation de l'auxine, la protéine nucléaire ALF4 (ABERRANT LATERAL ROOT FORMATION 4) est nécessaire pour maintenir les cellules du péricycle du pôle de xylème dans un état compétent en mitose, nécessaire à l'initiation de la LR (DiDonato et al., 2004; Dubrovsky et al., 2009). Enfin, la surexpression des peptides mobiles CLEL (CLE-LIKE) (également appelés GLV et

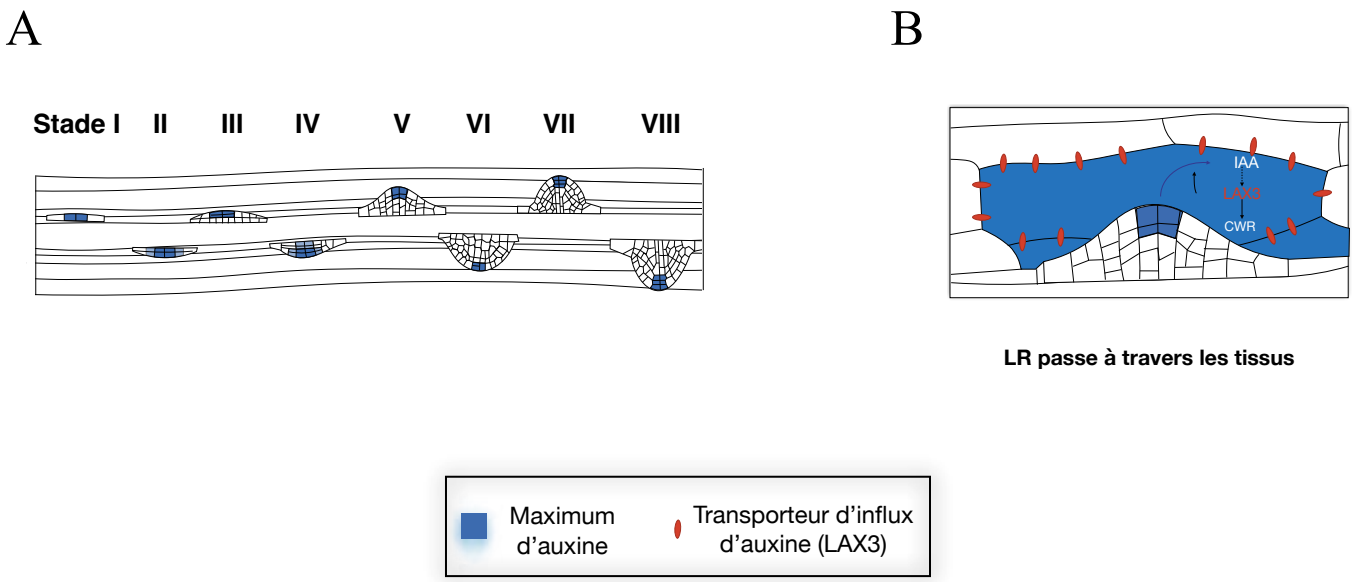


Figure i.7. L'organogenèse et l'émergence des racines latérales

(**A**) Représentation schématique de l'organogenèse des racines latérales au cours des 8 stades successifs de sa formation. (I) L'initiation de la racine débute avec une première division asymétrique et produit deux petites cellules centrales flanquées de deux cellules plus larges. (II) Des divisions périclines dans les cellules du péricycle produisent un primordium formé d'une couche cellulaire interne et externe. Ce primordium traverse l'endoderme. (III-IV) Deux séquences de divisions périclines donnent naissance à un primordium formé de trois puis quatre couches cellulaires, lequel traverse le cortex. (V-VI) La prolifération cellulaire se poursuit dans le primordium qui s'organise. (VII) Le primordium au stade VII est formé de cellules différenciées et son organisation est comparable à celle de la racine primaire. Au stade VIII il y a émergence du primordium. (Adapté de Péret et al., 2009a)

(**B**) La séparation des tissus correspond à la perte d'adhérence des cellules, est assurée par des enzymes de remodelage de la paroi (CWR), des polygalacturonases (PG) et des expansines (EXP) (Lee et al. 2009; Kumpf et al. 2013). L'induction de ces enzymes est dépendante d'une boucle rétroactive positive impliquant l'accumulation de l'auxine et l'expression de LAX3 dans ces cellules (Adapté de Péret et al., 2009b)

RGF -ROOT MERISTEM GROWTH FACTOR) CLEL6 et CLEL7 inhibe l'initiation des LRs en perturbant l'asymétrie des divisions cellulaires fondatrices, probablement via une voie indépendante de l'auxine (Meng et al., 2012). La signalisation de l'auxine médiée par SHY2 (SHORT HYPOCOTYL 2), dans les cellules endodermiques recouvrant les cellules fondatrices, a été signalée comme étant cruciale pour l'initiation des LRs (Vermeer et al., 2014; Vermeer et Geldner, 2015). La dégradation de SHY2 dans l'endoderme induit une rétroaction mécanique avec perte de volume cellulaire pour s'adapter à la turgescence des cellules fondatrices sous-jacentes, permettant ainsi aux divisions cellulaires ultérieures d'initier le primordium de racine latérale (Vermeer et al., 2014). Dans cette optique, l'élimination physique des cellules endodermiques déclenche le gonflement des cellules du péricycle du pôle xylème et leur réintégration dans le cycle cellulaire avec l'activation de l'expression de CYCB1;1 (Marhavý et al., 2016). PIN3 est considéré comme impliqué dans ces changements mécaniques induits par l'auxine (Marhavý et al., 2013). Pour finir, ACR4 (ARABIDOPSIS CRINKLY 4) une RLK (RECEPTOR-LIKE KINASE) localisée sur la membrane, se trouve spécifiquement dans les cellules issues de la première division cellulaire asymétrique des cellules fondatrices, et elle empêche les cellules voisines du péricycle d'être spécifiées en cellules fondatrices (De Smet et al., 2008). À la fin de l’initiation de la racine on observe dans le futur primordium une première division asymétrique qui produit deux petites cellules centrales flanquées de deux cellules plus larges.

L’organogénèse du primordium

Vient ensuite l'organogénèse du primordium des RLs qui correspond à l'établissement de nouveaux méristèmes dans un axe orthogonal à la racine primaire. L’organogénèse des racines latérales est le processus qui contrôle à la fois la structuration et la croissance de cette nouvelle racine. Elle est principalement guidée par des signaux de développement ainsi que des signaux permettant de spécifier les tissus et le méristème *de novo* des racines latérales. Ce développement peut être décomposé en 8 stades (Figure i.7A) (Malamy and Benfey, 1997). Après l'initiation, un primordium de racine latérale (LRP) de stade I est formé et est considéré comme le début de l’organogénèse. Des divisions périclines dans les cellules du péricycle produisent ce primordium formé d’une couche cellulaire interne et externe traversant l’endoderme (Lucas et al., 2013; von Wangenheim et al., 2016). A partir de ce primordium, une série de divisions périclines ordonnées forme un dôme typique avec deux (stade II), puis trois (stade III) et, enfin, quatre couches cellulaires (stade IV). Le primordium franchit ensuite le tissu du cortex (stade III) et atteint l’épiderme (stade VII). Cette nouvelle racine comprend un méristème fonctionnel identique à celui

de la racine primaire, formé d'un centre quiescent entouré de cellules souches. Le primordium au stade VIII est formé de cellules différenciées, il comprend un méristème fonctionnel et son organisation est comparable à celle de la racine primaire (von Wangenheim et al., 2016). L'établissement d'un méristème *de novo* est étroitement associé à l'établissement correct d'un certain nombre de gradient de phytohormones avec notamment un maximum d'auxine dans le primordium.

L'émergence

Le méristème du primordium de LRs est fonctionnel et doit traverser l'épiderme pour émerger de la racine primaire et devenir actif (Figure i.7B). L'émergence des LRs exige un crosstalk entre le primordium et ses tissus environnant, y compris l'endoderme, le cortex et l'épiderme. Il y a donc une séparation des tissus cellulaires et à un allongement cellulaire qui permet la croissance radiale du primordium. La séparation des tissus correspondant à la perte d'adhérence des cellules, et est assurée par des enzymes de remodelage de la paroi (CWR), des polygalacturonases (PG) et des expansines (EXP) (Lee et al., 2009; Kumpf et al., 2013). L'induction de ces enzymes est dépendante d'une boucle rétroactive positive impliquant l'accumulation de l'auxine et l'expression de LAX3 (LIKE AUX1 3) dans ces cellules (Swarup et al., 2008; Péret et al., 2013; Porco et al., 2016). Ce processus dépend de l'auxine et nécessite des voies de signalisation auxine SLR-ARF7. L'émergence s'achève lorsque le primordium des LRs arrive dans le milieu extérieur et s'accompagne d'une reprise de l'activité mitotique dans le méristème.

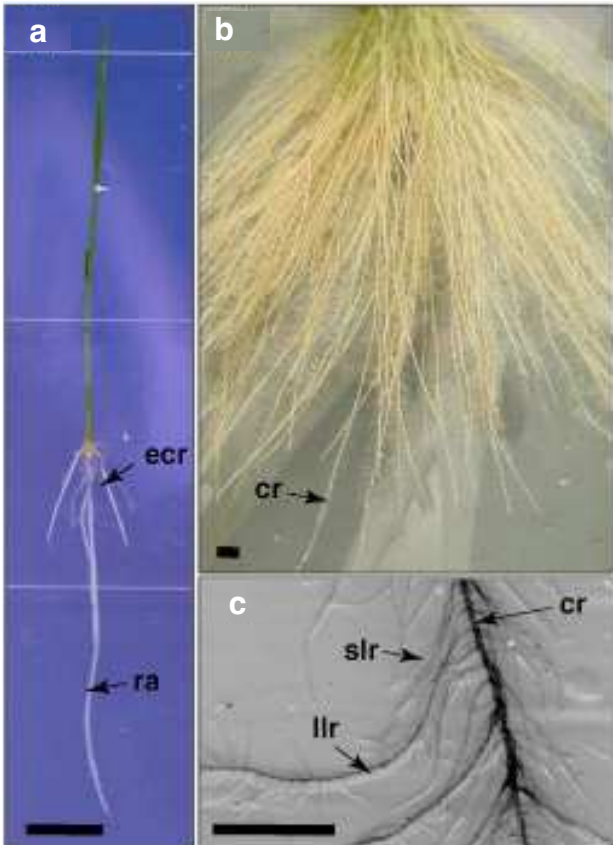
Le système racinaire chez d'autres espèces végétales

Arabidopsis bien qu'étant une source majeure d'informations sur le développement des plantes, en tant que plante modèle des dicotylédones pour l'étude du développement, n'est pas représentatif de la diversité que l'on peut trouver dans les systèmes racinaires du règne végétal. Les monocotylédones peuvent avoir des différences dans la structure de leur système racinaire avec des adaptations spécifiques. Deux exemples sont développés ci-dessous.

Le riz, plante modèle des monocotylédones

Le riz appartient à la famille des graminées (*Poaceae*) avec l'orge, le blé, le maïs et le sorgho, qui sont des cultures céréalières importantes dans l'approvisionnement alimentaire mondial. Il offre divers avantages en tant que plante expérimentale par rapport à d'autres espèces de monocotylédones, telles qu'une petite taille de génome, une séquence de génome connue (Sasaki et

A



B

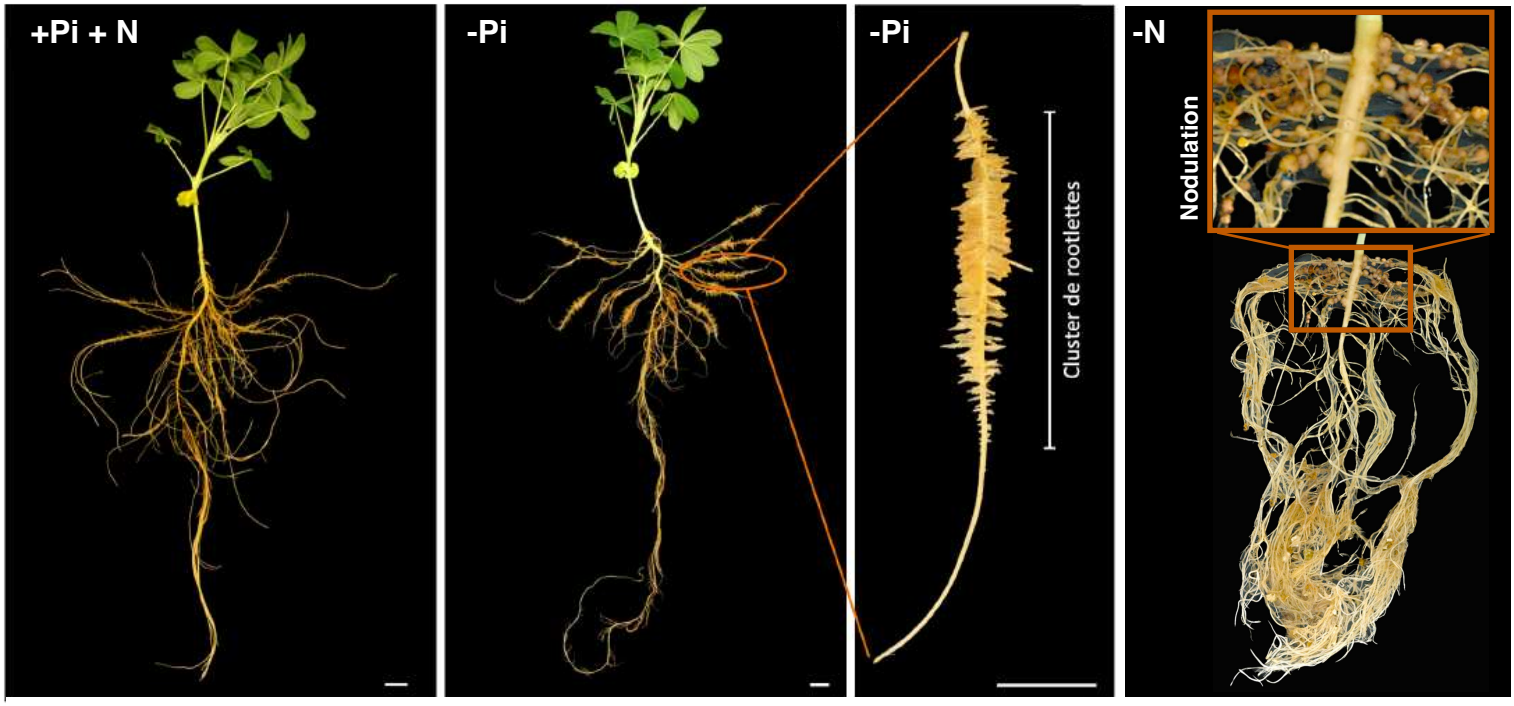


Figure i.8. Le système racinaire du riz et du lupin

(**A**) Architecture et anatomie de la racine de riz. (a) Système racinaire (variété *Nipponbare*) 1 semaine après la germination. (b) Système racinaire 40 jours après la germination. (c) Détail d'une racine coronaire. Barres d'échelle : 1 cm. cr, racine coronaire ; ecr, racine de la couronne embryonnaire, llr, grande racine latérale ; ra, radicule ; slr, petite racine latérale (Coudert et al., 2010)

(**B**) Architecture et anatomie de la racine de lupin blanc (variété *Amiga*) cultivé en présence ou en absence de Pi, 3 semaines après germination et en présence ou en absence de N, 5 semaines après germination. La présence de structures racinaires particulières : - les racines protéoïdes sont observés en absence de Pi - les nodules sont observés en absence de N. Zoom sur la racine protéoïde 16 jours après germination. La racine protéoïde est composée d'un cluster de rootlettes. Zoom sur les nodules 4 semaines après inoculations pour nodulation. Echelle = 1 cm (Adapté de la Thèse de Le Than, 2021)

Burr 2000) et l'autofécondation. De plus, c'est une plante annuelle qui est néanmoins capable de survivre plusieurs années. Il est possible de la transformer avec *Agrobacterium*, et il existe des collections de mutants. Pour ces raisons, le riz est considéré comme une plante modèle des monocotylédones. Le système racinaire du riz se compose de racines séminales, coronaires et latérales, qui peuvent être portées par la tige et par la racine primaire (Figure i.8A) (Rebouillat et al., 2009). Les plantes monocotylédones ont un système racinaire dit fibreux/fasciculaire qui se caractérise par de nombreuses racines coronaires. En effet, un plant de riz cultivé en plein champ a généralement plusieurs centaines (parfois plus de 1 000) racines coronaires (Kawata et al., 1978; Kawashima, 1988). La racine coronaire du riz provient des cellules méristématiques les plus internes, qui sont adjacentes au cylindre périphérique des faisceaux vasculaires de la tige. Ces cellules initiales se différencient progressivement en divers tissus successifs, tels que l'épiderme, l'endoderme, le cortex, la stèle et la coiffe racinaire, pour former l'organisation complète de la racine coronaires.

Le lupin, plante modèle du développement des racines protéoïdes

Le lupin blanc (*Lupinus albus L.*) appartient à la famille des *Fabaceae*. C'est un modèle d'étude intéressant qui offre divers avantages en tant que plante expérimentale, telles que sa capacité à former des structures racinaires adaptées aux carences en azote et en phosphate, ainsi qu'une séquence de génome connue (Hufnagel et al., 2020). En effet, ces plantes ont la capacité de former des nodules fixateurs d'azote ainsi que de développer des racines protéoïdes qui sont des organes dédiés à la remobilisation et à l'absorption du phosphate inorganique (Pi) (Figure i.8B). Les racines protéoïdes ont été décrites comme des racines secondaires comportant un ou plusieurs amas de racines tertiaires avec un développement déterminé, appelées « rootlettes » (Gallardo et al., 2019 ; Le Thanh et al., 2021). Les racines protéoïdes ne sont pas exclusives des lupins, ni même de la famille des *Proteaceae* (dont elles tirent leurs noms car observé pour la première fois chez cette famille), on retrouve donc dans la littérature le terme plus général de « cluster root ». Ces racines spécialisées exsudent de grandes quantités d'acides organiques, de phosphatases et de protons permettant d'améliorer la biodisponibilité et l'absorption de Pi (Neumann and Martinoia, 2002). Chez le lupin blanc, la formation de ces structures est principalement déclenchée par une faible disponibilité du Pi dans le milieu (Gilbert et al., 2000).

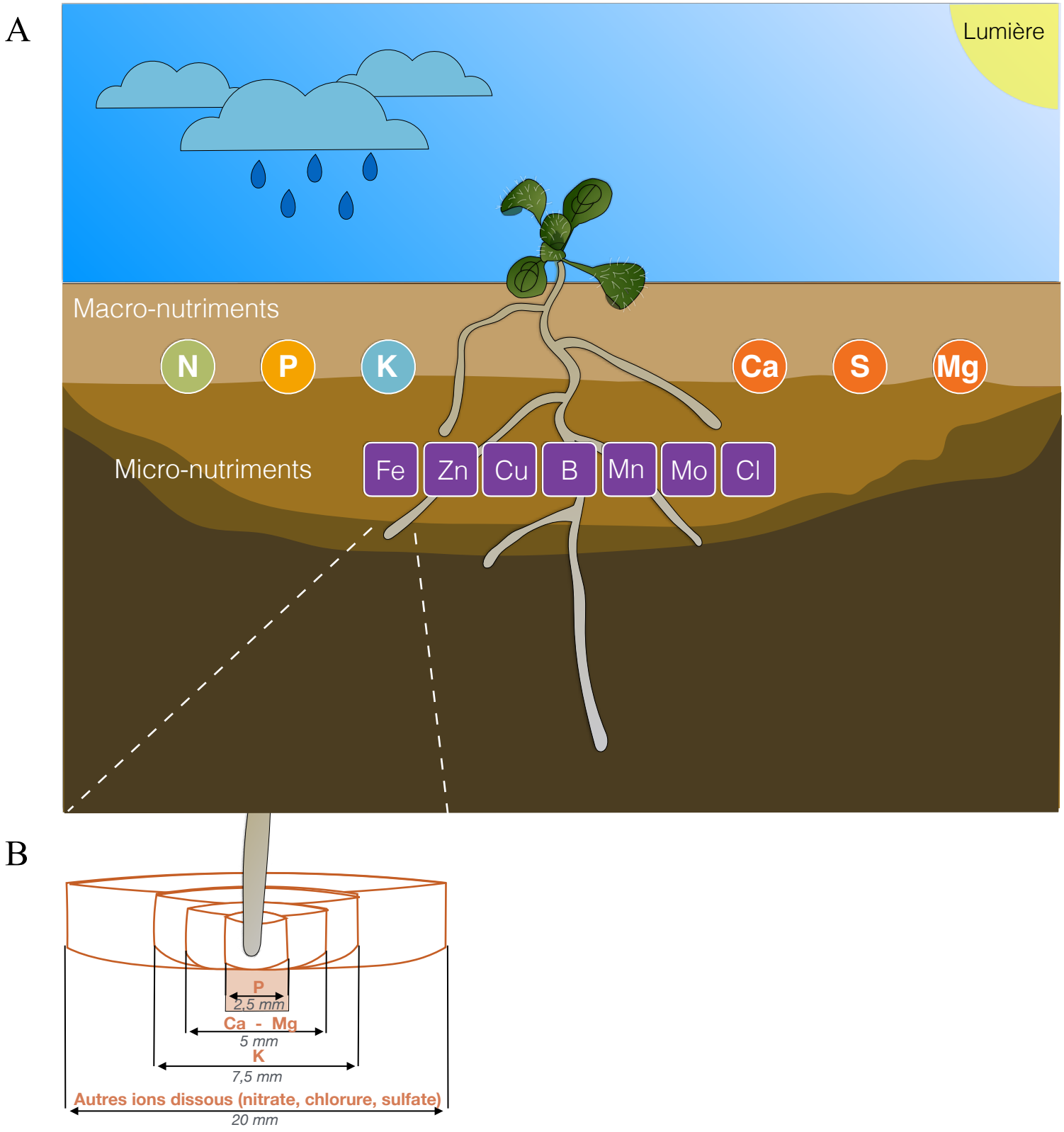


Figure i.9. Les macro et micronutriments dans le sol
Les macro et micronutriments dans le sol avec la biodisponibilité des ions (**A**) et leurs mobilités (**B**).
Adapté de la source = GEMAS

Les nutriments

La croissance et le développement des plantes sont largement déterminés par la disponibilité des nutriments. Il est donc essentiel de comprendre la dynamique de l'absorption, le transport, et l'assimilation des nutriments et leurs interactions biologiques. De nombreuses informations ont été générées au cours des deux dernières décennies sur les adaptations morphologiques et physiologiques des plantes en réponse aux changements de la disponibilité des nutriments minéraux (Maathuis, 2009; Krouk et al., 2011; Gruber et al., 2013; Krouk et Kiba, 2020). Les plantes sont fréquemment soumises à un déséquilibre des nutriments qui affecte négativement plusieurs processus métaboliques. Cependant, elles ont développé des stratégies pour faire face aux carences nutritionnelles. En effet, les racines répondent à la carence en nutriments en développant un système racinaire qui permet une meilleure exploration du sol (Gruber et al., 2013). Bien qu'un grand nombre d'éléments soient naturellement disponibles dans le sol, certains sont plus importants pour la bonne croissance et le bon développement des plantes cultivées. L'azote (N), le phosphore (P), le potassium (K), le calcium (Ca), le soufre (S) et le magnésium (Mg) sont connus comme étant des macro-nutriments (nécessaires en quantités relativement plus importantes), le fer (Fe), le zinc (Zn), le cuivre (Cu), le bore (B), le manganèse (Mn), le molybdène (Mo), et le chlorure (Cl) sont connus comme étant des micro-nutriments (nécessaires en plus petite quantité) pour la croissance et le développement des plantes cultivées (Figure i.9A) (Kumar et al., 2021). Ces nutriments étant acquis via le sol, le système racinaire est essentiel pour les récupérer, d'autant plus qu'ils sont généralement distribués de façon hétérogène, donc la plasticité du système racinaire est essentielle (Figure i.9B). Certains nutriments, en particulier les nutriments plus mobiles comme le nitrate (NO_3^-) tendent à être plus abondants dans les couches les plus profondes du sol, alors que les nutriments immobiles tels que le phosphate (PO_4^{3-}) sont plus abondants dans les couches hautes du sol. Les principaux macronutriments qui limitent la productivité des plantes sont l'azote (N) et le phosphore (P). Les micronutriments, tels que le fer (Fe), qui sont requis en petites concentrations pour la croissance des plantes, deviennent des éléments très limitants dans des conditions de sol particulières. Seule une partie de la quantité totale de nutriments dans le sol peut être absorbée et utilisée par les plantes. Cette proportion varie selon les éléments nutritifs et est affectée par une gamme de facteurs liés au sol, aux plantes et à l'environnement (Marschner, 1995).

L'utilisation d'engrais N et P a été l'un des facteurs clés pour produire suffisamment de matière alimentaire pour nourrir la population humaine en plein essor dans le monde entier, qui est considérée comme l'une des composantes importantes de la révolution verte des années 1960. En effet, la révolution verte a permis d'augmenter la production agricole mondiale. Toutefois, les

conséquences de la révolution verte, bien qu'involontaires, sur l'utilisation de l'eau, la dégradation des sols et le ruissellement chimique ont eu de graves impacts environnementaux au-delà des zones cultivées (Burney et al., 2010). Cette voie d'amélioration de la production agricole a donc atteint sa limite. Il a été suggéré que, pour une deuxième révolution verte, il serait important de comprendre les mécanismes d'assimilation des nutriments ainsi que de comprendre comment la face cachée des plantes, avec l'architecture racinaire, permet aux plantes de s'adapter à leur environnement. En effet, il serait intéressant de comprendre comment augmenter le potentiel de l'architecture racinaire et/ou le transférer d'un système à un autre, ce qui serait essentiel pour les enjeux agronomiques des années futures (Wollenweber et al., 2005; Herder et al., 2010).

L'architecture du système racinaire en réponse aux nutriments

La survie et la performance des plantes dépendent fortement de leur capacité à explorer efficacement le sol à la recherche des minéraux. Ainsi, la croissance du système racinaire est extrêmement importante pour l'adaptation à l'environnement, car cela détermine le volume de sol qu'une plante est capable d'explorer à un instant donné. L'architecture du système racinaire (RSA) représente l'arrangement spatial des racines d'âges et d'ordres différents (Osmont et al., 2007), et est déterminé par des facteurs génétiques et l'intégration de facteurs environnementaux (Malamy, 2005). La composante génétique détermine la morphologie fondamentale et le plan du système racinaire de la plante, tandis que les signaux environnementaux façonnent l'architecture racinaire en modifiant le programme de génétique intrinsèque. L'existence de ce niveau supplémentaire de régulation permet aux plantes d'afficher un haut niveau de plasticité racinaire, qui reflète la forme, la distribution en trois dimensions, le schéma de ramification des racines latérales (LRs) et l'âge des racines primaires (RPs) et post-embryonnaires (Pacheco-Villalobos et Hardtke, 2012). La modulation dynamique du RSA est basée sur la nature intrinsèque du développement des différentes composantes du système racinaire. En effet, la racine primaire (PR) s'établit au cours de l'embryogenèse, tandis que les racines latérales (LRs) qui proviennent de la PR se développent de façon post-embryonnaire (Osmont et al., 2007 ; Péret et al., 2009). Ces changements dynamiques dans le RSA global au fil du temps déterminent la plasticité racinaire et permettent aux plantes de s'adapter efficacement aux contraintes environnementales.

Le phosphore

Le nom phosphore dérive du mot grec φώσφορος (phosphoros), qui signifie « porteur de lumière » et évoque la planète Vénus, l'étoile du berger. Cette origine a été attribuée au fait que le

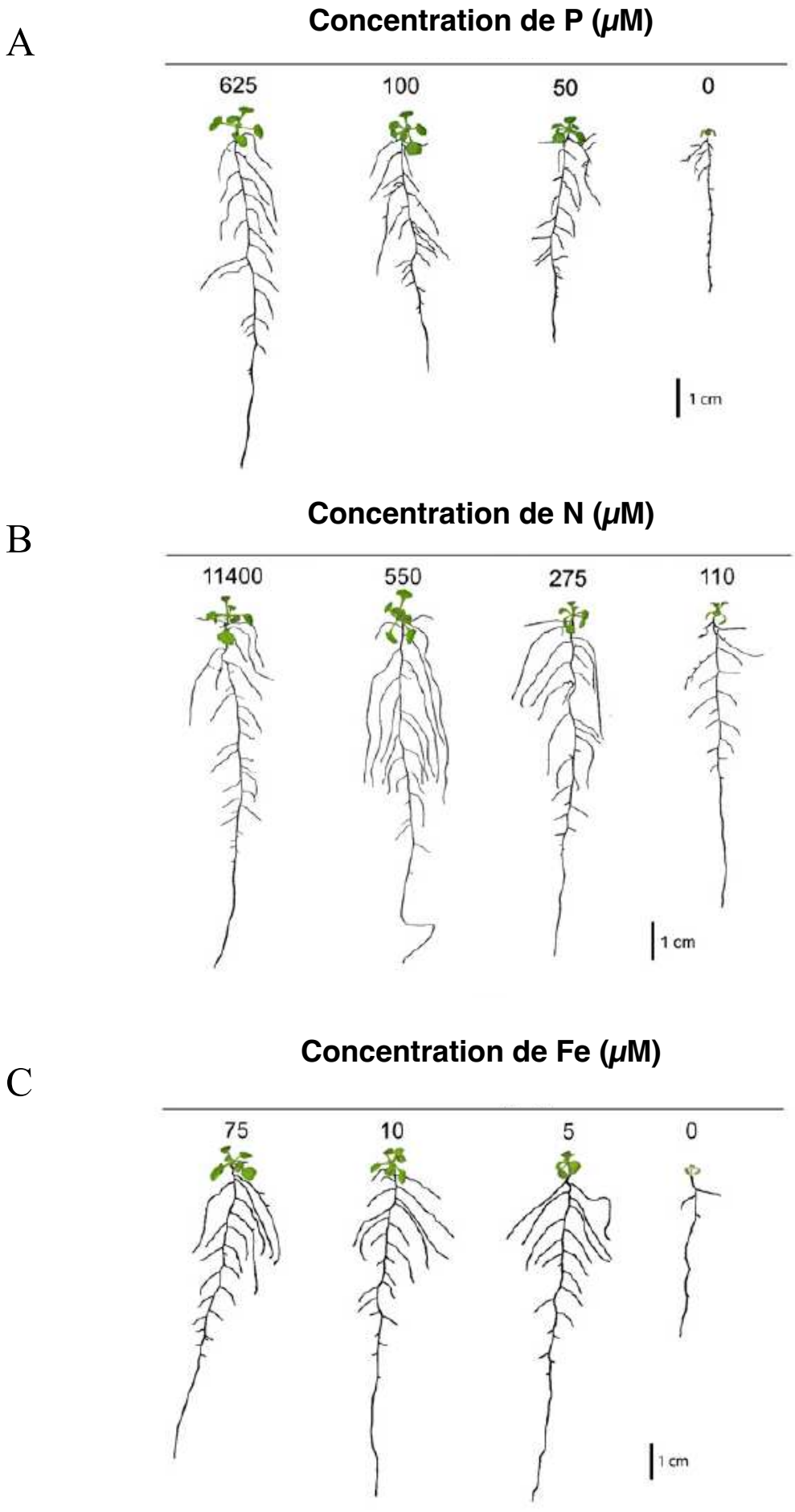


Figure i.10. L'effet d'une carence en nutriments (P, N, Fe) sur la morphologie des racines
(**A**) Plantules soumises à des apports de P différents.
(**B**) Plantules soumises à des apports de N différents.
(**C**) Plantules soumises à des apports de Fe différents.
Adapté de (Gruber et al., 2013).

phosphore blanc émet de la lumière visible dans l'obscurité quand il est exposé à l'air, par chimiluminescence. Le phosphate (PO_4^{3-}), source de phosphore (P), est un élément majeur dans plusieurs composants cellulaires importants (acides nucléiques (ADN, ARN), phospholipides, ATP), et est impliqué dans des processus de régulation essentiels comme les phosphorylations (Rychter and Rao, 2005). Les plantes sont donc très sensibles à la carence en phosphate, l'application de fertilisants minéraux contenant du phosphate est donc devenue incontournable dans l'agriculture conventionnelle. Toutefois ces fertilisants contribuent d'une part à l'épuisement des ressources en phosphore qui sont non renouvelables et conduisent à une eutrophisation des milieux aquatiques. La carence en P chez *Arabidopsis* produit un système racinaire qui est moins profond mais plus fortement ramifié (Figure i.10A). Un tel effet de carence en P sur le RSA a déjà été rapporté (Williamson et al., 2001; López-Bucio et al., 2002; Pérez-Torres et al., 2008). L'analyse détaillé de changement du RSA lors d'une carence ou d'un faible apport en P met en évidence que non seulement la longueur de la PR est inhibée mais la longueur de la zone de formation des LRs dans la PR diminue également (Gruber et al., 2013). La réduction de la longueur de la PR est accompagnée d'une augmentation de la densité de racines latérales de premier ordre (1° LR) en cas de déficience modérée en P (50 mM P), mais diminue lors d'un déficit plus sévère à 0 mM P (Gruber et al., 2013). Semblable à la PR, la longueur moyenne de 1° LR a également diminué avec une diminution de P et est accompagnée par une augmentation de la densité des racines latérales de second ordre (2° LRs) qui a tendance à augmenter même sous déficit sévère en P (0 mM) (Gruber et al., 2013). La taille du système racinaire est donc diminuée lors d'une carence en P et les racines latérales sont en augmentation pour favoriser une croissance plus horizontale.

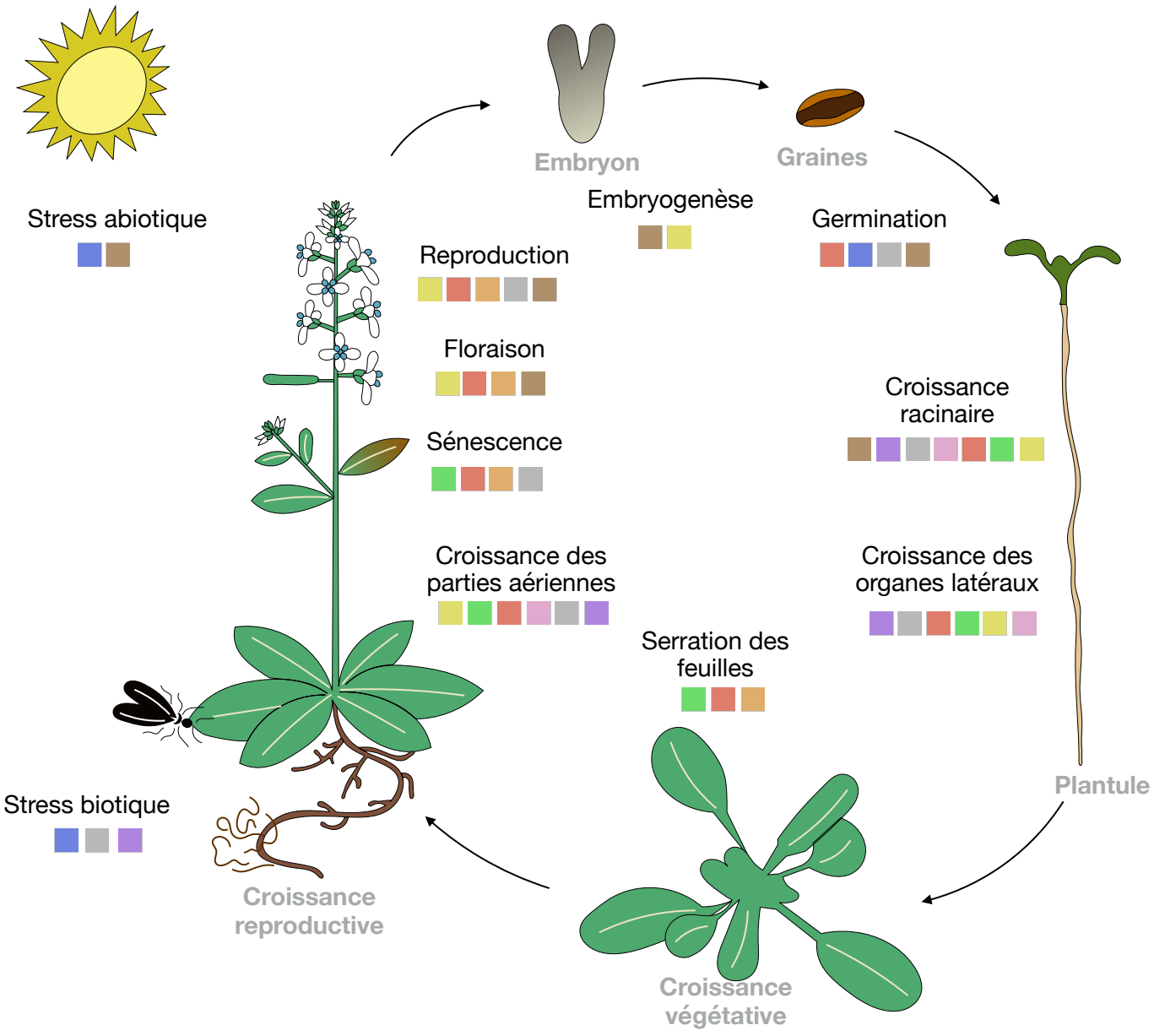
L'azote

Lavoisier a nommé l'azote, composé du a- (privatif) et du radical grec ζωτ- (« vivant »), qui signifie donc « privé de vie », celui-ci est pourtant un élément essentiel du vivant. En effet c'est un élément central pour les acides aminés et les protéines, c'est donc l'un des nutriments essentiels à la plante. L'origine du symbole N est son nom latin nitrogenium provient du grec nitron gennan, qui signifie « formateur de salpêtre » (nitrate de potassium). Le terme anglais nitrogen a conservé cette racine pour désigner l'azote. Les racines absorbent et assimilent l'azote inorganique (N) essentiellement sous la forme de nitrate (NO_3^-) dans les sols en condition aérobie et l'ammonium (NH_4^+) dans des conditions de sol gorgé d'eau (Xu et al., 2012). Les fluctuations spatio-temporelles de la concentration et de la forme dans le sol de N, connus sous le nom de « régimes locaux de N », déclenchent des signaux systémiques pour façonner la croissance et le développement des plantes

en réponse à la disponibilité de N. La carence en N chez *Arabidopsis* stimule la croissance d'un système racinaire plus exploratoire avec des LR plus longues (Figure i.10B). La longueur moyenne de 1° LR est significativement augmentée lors d'une carence modérée en N. En revanche, la longueur de la PR est restée stable à la carence modérée en N et a diminué en cas de carence en N plus sévère (Gruber et al., 2013). De plus, l'ammonium et le nitrate ont différentes propriétés souvent opposées. L'ammonium est décrit comme inhibant l'élongation racinaire et stimulant l'initiation des racines latérales, alors que le nitrate favorise fortement l'allongement des racines latérales via l'élongation (Zhang and Forde, 1998; Lima et al., 2010).

Le fer

Le nom fer provient du latin ferrum traditionnellement rattaché à la famille de sens de firmus (« ferme, solide »). Le fer (Fe) est essentiel car il participe à de nombreux processus biologiques, notamment la photosynthèse et la respiration du fait de ses propriétés d'oxydoréduction, qui lui permet d'accepter et de donner facilement des électrons. Le Fe existe sous deux formes, le fer ferreux qui est la forme réduite (Fe^{2+}) et le fer ferrique qui est la forme oxydée (Fe^{3+}). Le fer est souvent un facteur limitant pour la croissance des plantes du fait de sa faible disponibilité dans le sol. En effet dans le sol le fer est essentiellement présent sous forme d'hydroxydes ferriques ($Fe(OH)_3$) qui est très stables mais peu soluble à pH neutre, donc indisponible pour les plantes. Environ un tiers des terres cultivées mondiales sont calcaires (Mori, 1999), rendant le Fe indisponible donc un facteur limitant pour le rendement et la qualité des cultures. Une carence en Fe chez *Arabidopsis* entraîne généralement une chlorose internervaire qui s'accompagne d'une réduction de la taille des plantes et de la production agricole des espèces cultivées. Cependant, l'excès de Fe est toxique pour les cellules, car le Fe peut provoquer la formation de radicaux hydroxyles hautement réactifs par la réaction de Fenton (Dixon and Stockwell, 2014). Une légère carence en Fe augmente la croissance des racines ; cependant, une carence totale en Fe cause une diminution drastique de la taille des racines (Figure i.10C). La longueur des 1° LR a tendance à augmenter sous carence modérée en Fe, mais en carence sévère la longueur diminue fortement. Malgré les différences dans les composants individuels du RSA, la longueur totale de la racine n'a pas changé lorsque les plantes ont été exposées à une carence modérée en Fe mais considérablement réduite dans des conditions de carence sévère en Fe (Gruber et al., 2013).



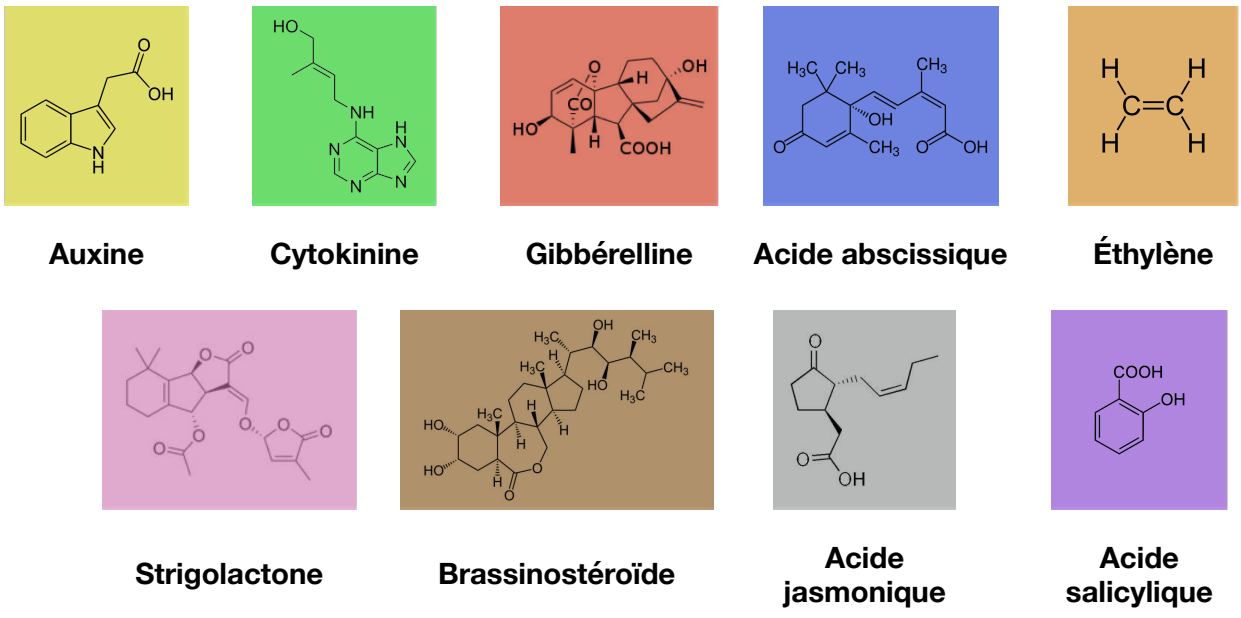


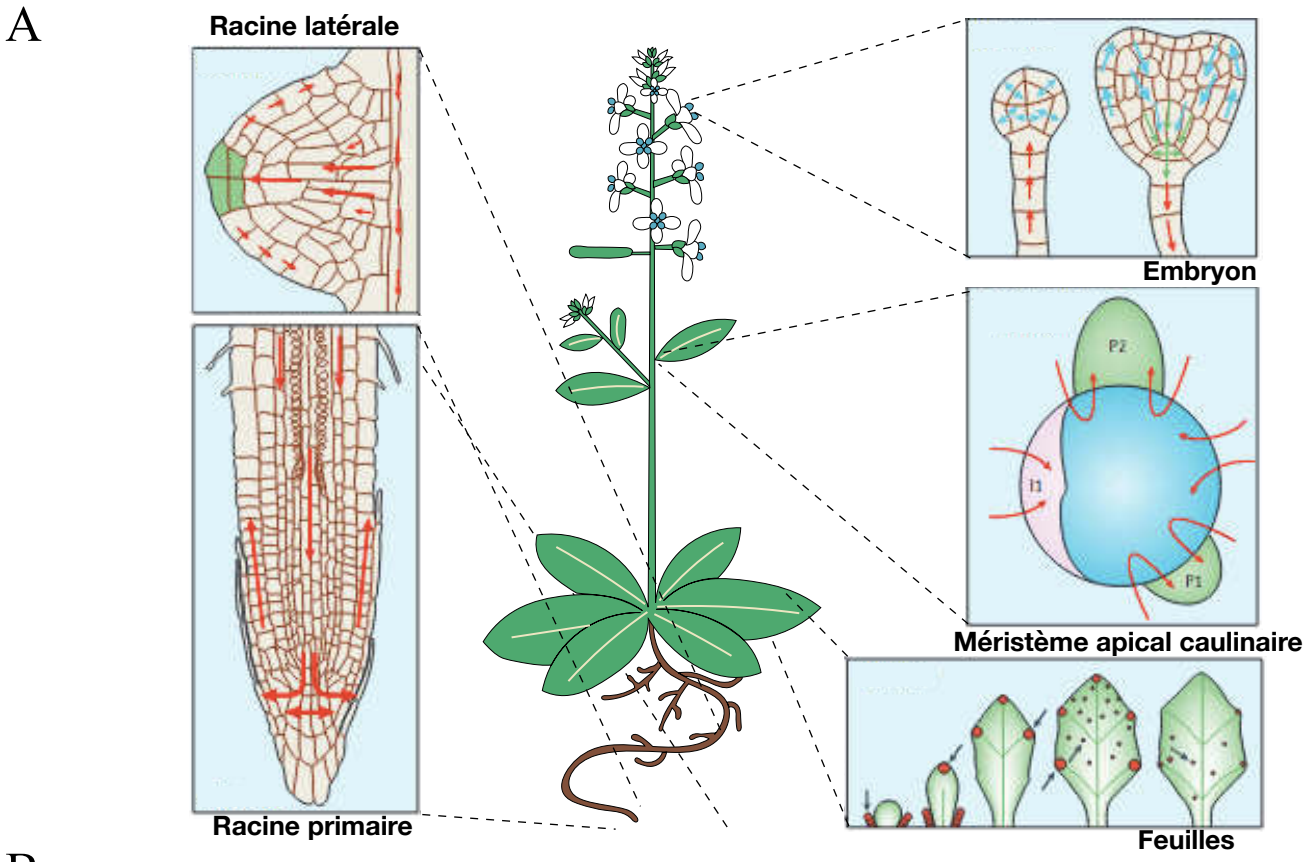
Figure i.11. Les différentes phytohormones et leur implication au long du cycle de vie de la plante
Schéma représentant l'implication des différentes phytohormones lors du cycle de vie de la plante. Les carrés de couleurs représentent les différentes phytohormones associées. Adapté de Depuydt et Hardtke, 2011.

Les phytohormones

Les phytohormones sont un groupe de molécules qui activent divers processus développementaux et métaboliques en réponse à des signaux environnementaux et endogènes. Les hormones végétales peuvent avoir des tissus sources et cibles distincts mais également être produites et agir localement. Elles assurent ainsi une communication à longue portée au niveau de la plante entière, avec divers mécanismes de distribution en fonction de la distance et de la direction du transport. Il existe 9 différentes classes de phytohormones (Figure i.11). Les auxines (IAA), les cytokinines (CK), les gibbérellines (GA), l'acide abscissique (ABA) et l'éthylène (ET) qui sont des phytohormones découvertes au milieu du XXe siècle, tandis que les strigolactones (SL), les brassinostéroïdes (BR), l'acide jasmonique (JA) et l'acide salicylique (SA) sont des phytohormones plus récemment caractérisées. L'interaction entre ces différentes phytohormones est essentielle dans la régulation d'événements physiologiques clés en condition normale mais aussi en réponse aux changements environnementaux. Ces interactions peuvent être antagonistes ou synergiques ou additives dans leurs actions.

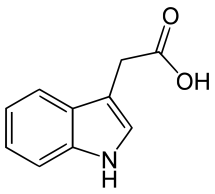
L'auxine, déclencheur du changement

Un des coordinateurs internes du développement des plantes est une phytohormone clé, l'auxine dont l'étymologie provient du grec ancien αὔξη, *auxê* (croissance). Elle contrôle un grand nombre d'étapes du développement végétal, notamment dans divers aspects de la croissance et du développement des plantes, notamment la division, l'allongement et la différenciation cellulaires (Oh et al., 2014; DiMambro et al., 2017), le développement embryonnaire (revu dans Verma et al., 2021), les tropismes des racines et des tiges (Friml et al., 2002), la dominance apicale (examinée dans Kebrom, 2017; Ware et al., 2020) et la formation des fleurs (examinée dans Cucinotta et al., 2021) justifiant son qualificatif de « déclencheur du changement » chez les plantes (Figure i.12A) (Vanneste et Friml, 2009). L'acide indole-3-acétique (IAA) est la molécule d'auxine naturelle la plus abondante dans les cellules. Plusieurs autres composés naturels, tels que l'acide 4-chloroindole-3-acétique (4-Cl-IAA), l'acide indole-3-butyrique (IBA) et l'acide phénylacétique (PAA), ainsi que des molécules synthétiques auxinique (acide 2,4-dichlorophénoxy-acétique [2,4-D], l'acide 1-naphtalèneacétique [NAA], l'acide 3,6-dichloro-2-méthoxybenzoïque et l'acide 4-amino-3,5,6-trichloropicolinique), ont également été identifiés (Figure i.12B) (examinés dans Simon and Petrasek, 2011). Le 4-Cl-IAA se trouve rarement, le PAA semble être beaucoup moins puissant que l'IAA, et l'IBA a des effets de type auxine lorsqu'il est appliqué exogénement mais il semble être plus précurseur d'IAA ou une forme de stockage (examiné dans Cook, 2019). Bien qu'ils aient des



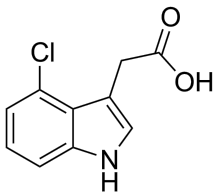
B

Auxines naturelles



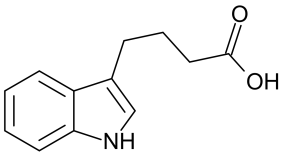
Acide indole-3-acétique

IAA



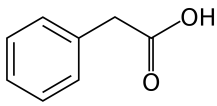
Acide 4-chloroindole-3-acétique

4-Cl-IAA



Acide indole-3-butyrique

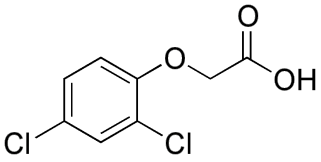
IBA



Acide phénylacétique

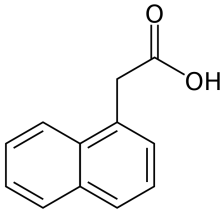
PAA

Auxines synthétiques



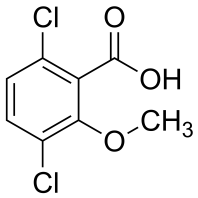
Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

2,4-D



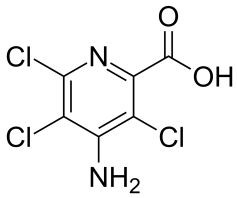
Acide 1-naphtalèneacétique

NAA



Acide 3,6-dichloro-2-méthoxybenzoïque

dicamba



Acide 4-amino-3,5,6-trichloropicolinique

picloram

Figure i.12. L'auxine déclencheur du changement

(**A**) Dans la racine latérale le transport polarisé de l'auxine (flèche rouge) permet son accumulation à l'apex du primordium. Dans la racine primaire, les protéines PINs dirigent le flux d'auxine vers le centre quiescent, puis le redirige vers l'épiderme. Dans le jeune embryon (1 jour), l'auxine est apportée par PIN7 puis redistribuée dans l'embryon. A un stade plus tardif (3 jours), le flux d'auxine s'inverse et l'auxine est exportée de l'embryon. Dans le méristème apical caulinaire. L'auxine est transportée de l'apex caulinaire (en bleu) vers les primordiums de feuilles naissantes (I1) et en développement (P1/P2). Dans les feuilles l'auxine participe à la vascularisation des feuilles et régule leur développement. Dans la feuille, l'auxine est synthétisée (petits points) et s'accumule localement (gros points orange) (adapté de Teale et al., 2006).

(**B**) La formule chimique des principaux types d'auxines naturelles et synthétiques est présentée.

structures chimiques diverses, tous les composés partagent un cycle aromatique et une chaîne latérale de groupe carboxyle. Ces deux éléments permettent la liaison de la molécule de signalisation, médiant la conversion des niveaux d'auxine cellulaire en une réponse cellulaire via des changements de transcription (Tan et al., 2007).

En ce qui concerne la signalisation au niveau cellulaire, la perception de l'auxine dans le noyau régule la transcription de gènes de réponse à l'auxine (Figure i.13). La perception dépend de la formation d'un complexe qui va contenir : une multi-protéine SCF (SKP, CULLIN, F-BOX) (Gray et al., 1999; Gray et al., 2002), une protéine de la famille TIR1/AFB (Transport Inhibitor Response 1/Auxin Signaling F-BOX Proteins) (Dharmasiri et al., 2005; Kepinski and Leyser 2005) et une protéine de la famille des Aux/IAA (Auxin/Indole Acetic Acid) (Luo et al., 2018). Les complexes SCF^{TIR1} sont des ubiquitine ligase E3, qui sont essentielles pour la détection et la transduction des hormones chez les plantes. Ils sont composés de 4 sous-unités : SKP1 (S-phase kinase-associated protein 1), CUL1 (Cullin 1), RBX1 (Ring Box 1) et TIR1, une protéine de 594 acides aminés qui contient en C- terminal un domaine riche en leucine et en N terminal le domaine F-box qui confère la spécificité au complexe SCF^{TIR1}. Ce complexe est impliqué dans la dernière étape de l'ubiquitination des protéines à dégrader par le protéasome 26S. Les sous-unités CUL1 et RBX1 recrutent l'enzyme de conjugaison E2-ubiquitine, tandis que SKP1 sert de pont entre CUL1 et TIR1. TIR1 quant à lui peut interagir avec les Aux/IAA dépendamment de la dose d'auxine. Les protéines Aux/IAA se composent de quatre domaines typiques, à savoir les domaines I à IV. Le domaine I contient un motif EAR de répression amphiphile associée au facteur de liaison des éléments sensibles à l'éthylène. Entre les domaines I et II, un motif NLS de localisation nucléaire a été localisé. Le motif "GWPPV" dans le domaine II est un degron, qui contrôle le turnover des protéines Aux/IAA. Les domaines III et IV forment ensemble un domaine PB1 qui permet les interaction protéine-protéine notamment avec les ARFs (Auxin Response Factors) (Luo et al., 2018). Enfin, les ARFs sont des facteurs de transcription qui régulent la transcription de gènes de réponse à l'auxine (voir revue de Li et al., 2016)

En absence ou en présence d'une faible concentration d'auxine dans la cellule, les facteurs de transcriptions ARFs sont inhibés car ils sont sous forme d'hétérodimères avec les protéines répressives Aux/IAA (Guilfoyle and Hagen, 2007). Toutefois, lorsque l'auxine s'accumule dans la cellule, l'inhibition de la transcription est levée favorisant ainsi la formation du complexe SCF-TIR1/AFB-Aux/IAA. Cette interaction permet la polyubiquitinylation des protéines Aux/IAA par le complexe SCF^{TIR1}, induisant ainsi leur dégradation par le protéasome 26S (Dos Santos Maraschin et al., 2009). Les ARFs alors libres vont se fixer sur les promoteurs, au niveau des éléments de réponse à l'auxine (AuxRE), et initier ou inhiber la transcription des gènes en réponse à l'auxine. Parmi les

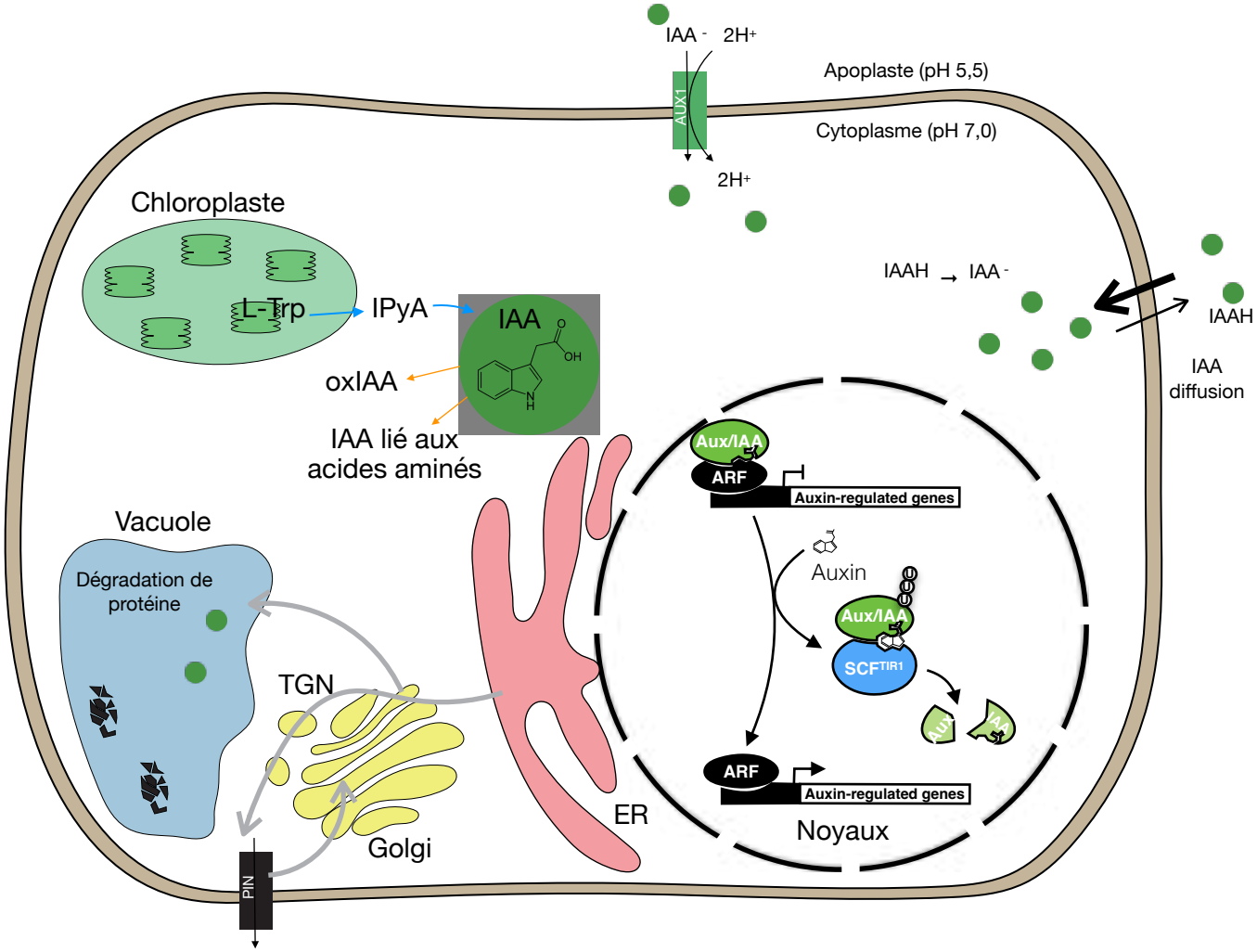


Figure i.13. L'homéostasie de l'auxine

Le principal précurseur de la biosynthèse de l'IAA est le L-tryptophane (L-Trp), synthétisé dans les chloroplastes. La voie de biosynthèse majoritaire de l'IAA est via IPyA. L'IAA libre est soit oxydé, soit conjugué par exemple avec amino acide. IAA peut soit entrer dans les cellules à travers la membrane plasmique avec le symporteur AUX1 ou diffuser à travers le PM dans sa forme protonnée (IAAH). A l'intérieur de la cellule, l'IAA est majoritairement sous forme anionique, nécessitant une exportation, qui est médiée principalement par les protéines PIN. Les protéines PIN subissent une constante cycle endocytaire et sont dégradés dans la vacuole. Dans le noyau à lieu la régulation de la transduction du signal auxinique. En présence d'auxine, induction transcriptionnelle des gènes cibles par la dégradation des répresseurs AUX/IAA. (Adapté de Friml 2022)

gènes de réponse, des Aux/IAAs sont alors transcrits, et une fois traduits, ils peuvent de nouveau inhiber le système ce qui génère donc un feedback. De plus, l'auxine régule la transcription par au moins deux autres mécanismes, dans lesquels des composants de signalisation tels que la kinase transmembranaire (TMK) ou ARF3 (ETTIN) sont impliqués (voir revue McLaughlin et al., 2021). Les mécanismes de transduction du signal auxinique paraissant assez simple au premier abord, permettent une régulation dynamique de la réponse à l'auxine dans chaque tissus grâce à la présence de plusieurs molécules auxiniques et de nombreux gènes codant pour les TIR1/AFB (5), AUX/IAA (29) et ARFs (23) (Dharmasiri et al., 2005; Overvoorde et al., 2005; Chandler, 2016). En effet il existe un grand nombre d'interactions possibles permettant cette régulation. Les 5 protéines TIR1/AFB peuvent potentiellement interagir avec les 29 Aux/IAA, bien qu'il existe des affinités préférentielles pour certaines (Shimizu-Mitao and Kakimoto, 2014). De plus, les Aux/IAA pourraient potentiellement avoir près de 544 interactions différentes avec les ARFs (voir revue de Luo et al., 2018). Les Aux/IAA peuvent également interagir entre elles (Kim et al., 1997). Cette multitude d'interactions explique comment l'auxine à acquis cette place de déclencheur du changement, car cette diversité d'interactions contribue à la diversité de réponses transcriptionnelles qui régulent de nombreuses réponses développementales.

L'homéostasie de l'auxine est particulièrement complexe, intégrant les effets de sa biosynthèse, de son catabolisme, de sa conjugaison et de son transport intercellulaire, mais aussi sa localisation intracellulaire (Figure i.13) (Barbez et al., 2012). L'auxine est principalement synthétisé dans les méristèmes, les jeunes primordia, les tissus vasculaires, et les organes productifs (Cheng et al., 2006; Stepanova et al., 2011; Brumos et al., 2018). Dans les racines, l'auxine est localement synthétisée au niveau des méristèmes de la racine primaire et des racines latérales (Ljung et al., 2005). Plusieurs voies de biosynthèse de l'auxine ont été identifiées (examinés dans Kasahara, 2016). Cependant, la voie la mieux décrite, en raison de son importance dans le développement des plantes, est une voie dépendante du tryptophane (Trp). Le Trp est d'abord converti en indole-3-pyruvate (IPyA) par la famille des aminotransférases de tryptophane (Stepanova et al., 2008 ; Tao et al., 2008 ; Won et al., 2011). Par la suite, l'IAA est produit à partir d'IPyA par les enzymes YUCCA, qui portent une activité flavine monooxygénase (Dai, 2013). L'auxine est principalement retrouvée sous forme conjuguée dans la cellule, ce qui permet son transport, son stockage et sa protection contre la dégradation (voir revue de Ljung, 2013). Ceci régule donc le niveau d'auxine dans la cellule. Les formes conjuguées via des liaisons amides sont majoritaires chez les plantes dicotylédones. En effet, certaines de ces molécules peuvent être hydrolysées et fournir de l'IAA à la

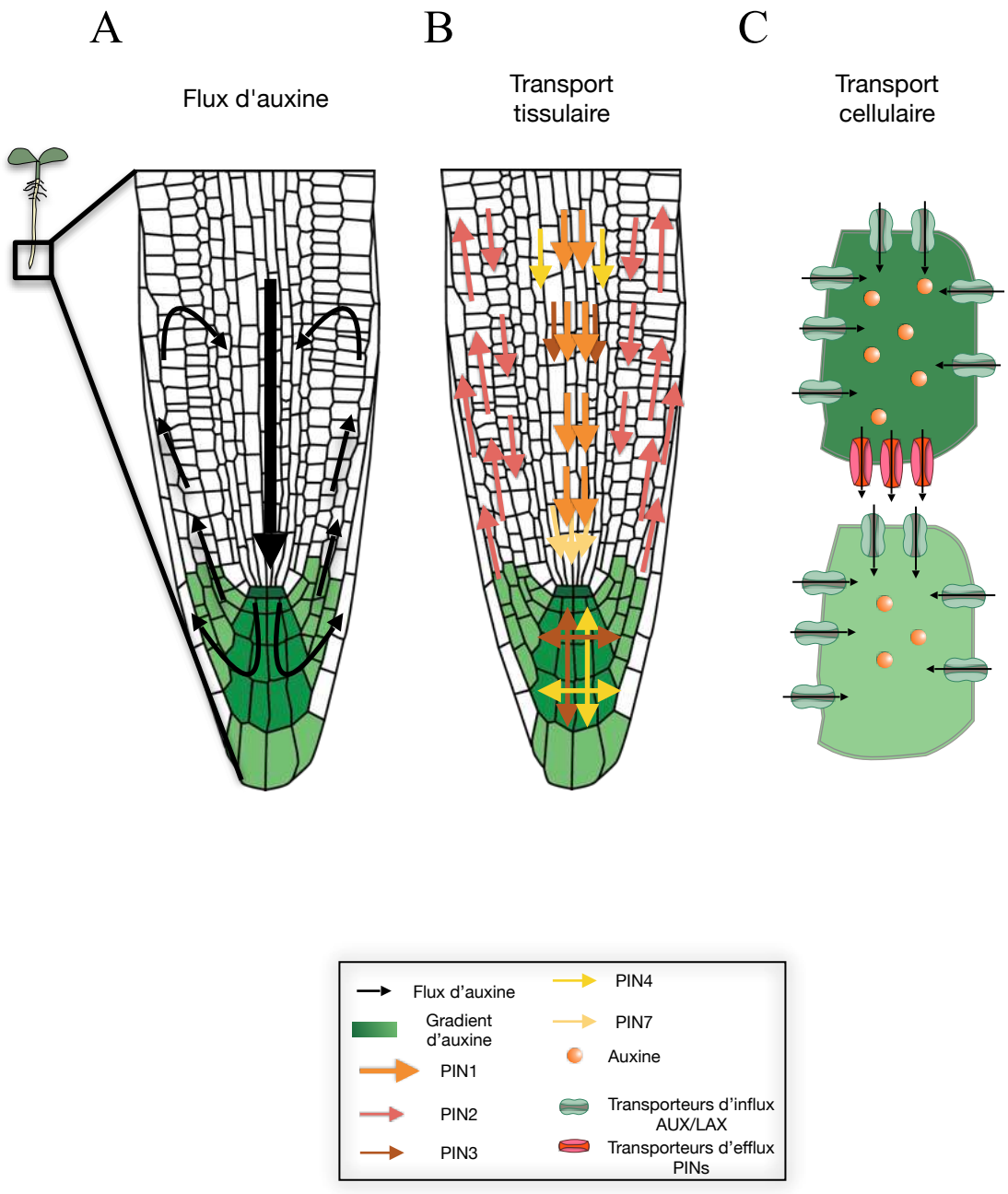


Figure i.14. Le transport tissulaire et cellulaire de l'auxine
(**A**) Les flux d'auxine à l'apex racinaire.
(**B**) Transport de l'auxine avec les PINs et AUX1 à l'apex racinaire.
(**C**) Au niveau cellulaire on retrouve pour l'influx, les protéines AUX/LAX qui agissent comme des symporteurs permettant l'entrée de l'auxine à l'aide du gradient de proton. Pour l'efflux, les protéines PINs sont polarisées et permettent l'écoulement de l'auxine et sa redistribution locale. Ce transport crée un gradient d'auxine.

cellule (Rampey et al., 2004). Les différentes formes d'auxine, libres ou conjuguées, peuvent être dégradées pour réguler les différents pools d'auxine. L'auxine peut également être transporté vers le réticulum endoplasmique par les protéines d'efflux de la famille PIN et PIN-likes (PILs), comme PIN5, PILS2 et PILS5 (voir revue de Barbez and Kleine-Vehn, 2013). Cette compartimentation régule la quantité d'auxine dans le cytoplasme et permet la conjugaison de l'auxine dans le réticulum endoplasmique.

Le transport polarisé de l'auxine

La synthèse de l'auxine ayant majoritairement lieu dans les organes photosynthétiques, tels que les jeunes feuilles, l'auxine doit être transportée des organes sources vers les organes puits (Tromas and Perrot-Rechenmann, 2010). Il existe deux types de transport d'auxine. Le transport longue distance via le phloème considéré comme rapide (5-10 $cm.h^{-1}$) et non polarisé, qui confère un flux des tissus sources vers les tissus puits. Et le transport de cellules à cellules, considéré comme lent (5-10 $mm.h^{-1}$) qui est appelé transport polarisé qui joue un rôle dans l'établissement de gradients d'auxine au sein des tissus (Friml et al., 2002). L'IAA est un acide faible (pKa = 4,75) et son transport polarisé est piloté par un gradient chimiosmotique entre le cytoplasme (neutre) et l'apoplaste (acide), qui est généré par les ATPases de la membrane plasmique (Swarup et al., 2005). Dans l'apoplaste, un déplacement d'équilibre vers la forme protonée et lipophile de l'IAA entraîne une diffusion accrue de l'IAA dans la membrane plasmique (PM) et à l'intérieur de la cellule (Parry et al., 2001). Cependant, même si l'auxine peut pénétrer passivement dans la cellule, l'absorption par transport actif via des transporteurs spécifiques est importante. L'influx d'auxine est alors permis par les protéines AUX/LAX qui agissent comme des symports, permettant l'entrée de l'auxine à l'aide du gradient de protons (Péret et al., 2012). Une fois dans le cytosol, la forme déprotonée et chargée de l'auxine est incapable de sortir de la cellule par diffusion à travers la membrane plasmique. L'exportation de l'auxine est donc assistée par des transporteurs d'efflux, notamment les protéines PINs, qui permettent sa redistribution locale. Il existe également les protéines PGP et MDR, qui participent au transport de l'auxine en moindre quantité. Le transport polarisé de l'auxine, avec son influx et son efflux, est donc indispensable à la mise en place du gradient d'auxine entre cellules et donc au sein d'un tissu. L'ensemble des transporteurs polarisés de l'auxine permettent de créer des flux d'auxine (Figure i.14). Dans le cas du méristème racinaire une boucle de « reflux » est présente pour redistribuer l'auxine , que l'on appelle également modèle de fontaine inversée (Blilou et al., 2005).

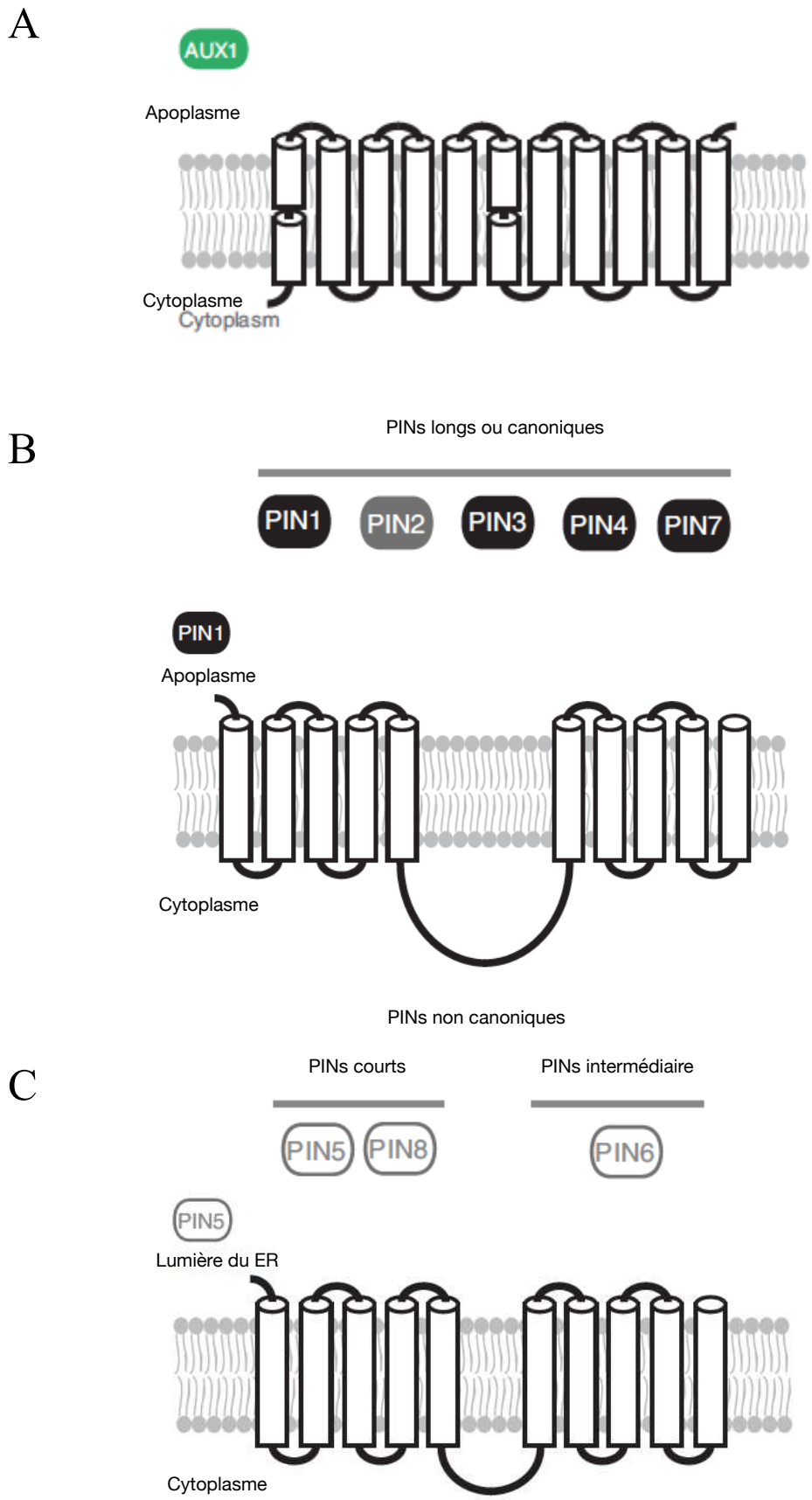


Figure i.15. Structure des différents transporteurs de l'auxine
(**A**) AUX1 et ses 11 hélices α traversant la membrane.
(**B**) La structure des PINs canoniques ou longs avec l'exemple de PIN1.
(**C**) La structure des PINs non canoniques courts ou intermédiaire avec l'exemple de PIN5.
Adapté de Hammes et al., 2022

Les AUX/LAX

Les AUX/LAX sont des transporteurs d'influx d'auxine, qui font partie de la famille des Acides Aminés/Auxine Perméase (AAAP). AUX1 est un membre de la famille AUX/LAX (LIKE AUX1) composée de quatre membres chez *A.thaliana*, avec également LAX1, LAX2 et LAX3 qui partagent 75 % à 80 % d'identité de leurs acides aminés (Swarup and Péret, 2012). La structure cristalline d'un membre de la famille AAAP possède 11 hélices α traversant la membrane avec l'extrémité aminé faisant face au cytosol (Figure i.15A). AUX1 est essentielle pour le gravitropisme et contribue au développement des embryons et des gamétophytes femelles, au développement des racines latérales, au développement des poils racinaires, et à la structuration phyllotaxique (Bennett et al., 1996 ; Grebe et al., 2002; Marchant et al., 2002; Bainbridge et al., 2008; Vandenbussche et al., 2010; Kasprzewska et al., 2015; Panoli et al., 2015). LAX1 agit de manière redondante avec AUX1, LAX2 est impliqué dans le développement embryonnaire et la régulation de la division cellulaire au repos ainsi qu'au motif phyllotaxique (Bainbridge et al., 2008; Péret et al., 2012; Zhang et al., 2013; Fàbregas et al., 2015; Kasprzewska et al., 2015; Panoli et al., 2015; Moreno-Piovano et al., 2017). Le principal rôle physiologique de LAX3 est dans le contrôle de l'émergence des racines latérales (Swarup et al., 2008).

Focus sur AUX1

AUX1 est impliquée dans le transport basipète puis acropète de l'auxine dû à sa présence dans le protophloème, la columelle, les cellules latérales de la coiffe et l'épiderme (Swarup et al., 2001; Swarup et al., 2004; Kleine-Vehn et al., 2006). En effet, AUX1 peut souvent être localisé sur tous les côtés des cellules, mais est régulièrement enrichi au niveau apical de la membrane plasmique des cellules du protophloème, à la fois sur les côtés apical et basal des cellules de l'épiderme, et sans distribution asymétrique prononcée dans les autres types de cellules telles que la coiffe racinaire. Le maintien de la localisation à la membrane plasmique de AUX1 dépend du cytosquelette d'actine et de la composition en stérols des membranes (Kleine-Vehn et al., 2006). AUX1 peut être détecté en partie au niveau de l'appareil de Golgi et des endosomes. Le trafficking d'AUX1 est indépendante de GNOM (activateur des ARFs GTPases qui joue souvent un rôle important dans le trafic membranaire) et résistant à la BFA (la brefeldine A est un inhibiteur puissant et réversible de la formation de vésicules et du trafic de protéines), au moins pour son trafic vers la membrane plasmique (Kleine-Vehn et al., 2006). Le trafic post-Golgi des AUX1 synthétisé *de novo* se produit via une voie ECH (ECHIDNA) dépendante basée sur les vésicules sécrétoires (Boutté et al., 2013). Jonsson et al., (2017) ont étudié le trafic de AUX1 au cours de la formation du crochet apical présent au début du développement des plantules pour protéger le méristème apical de

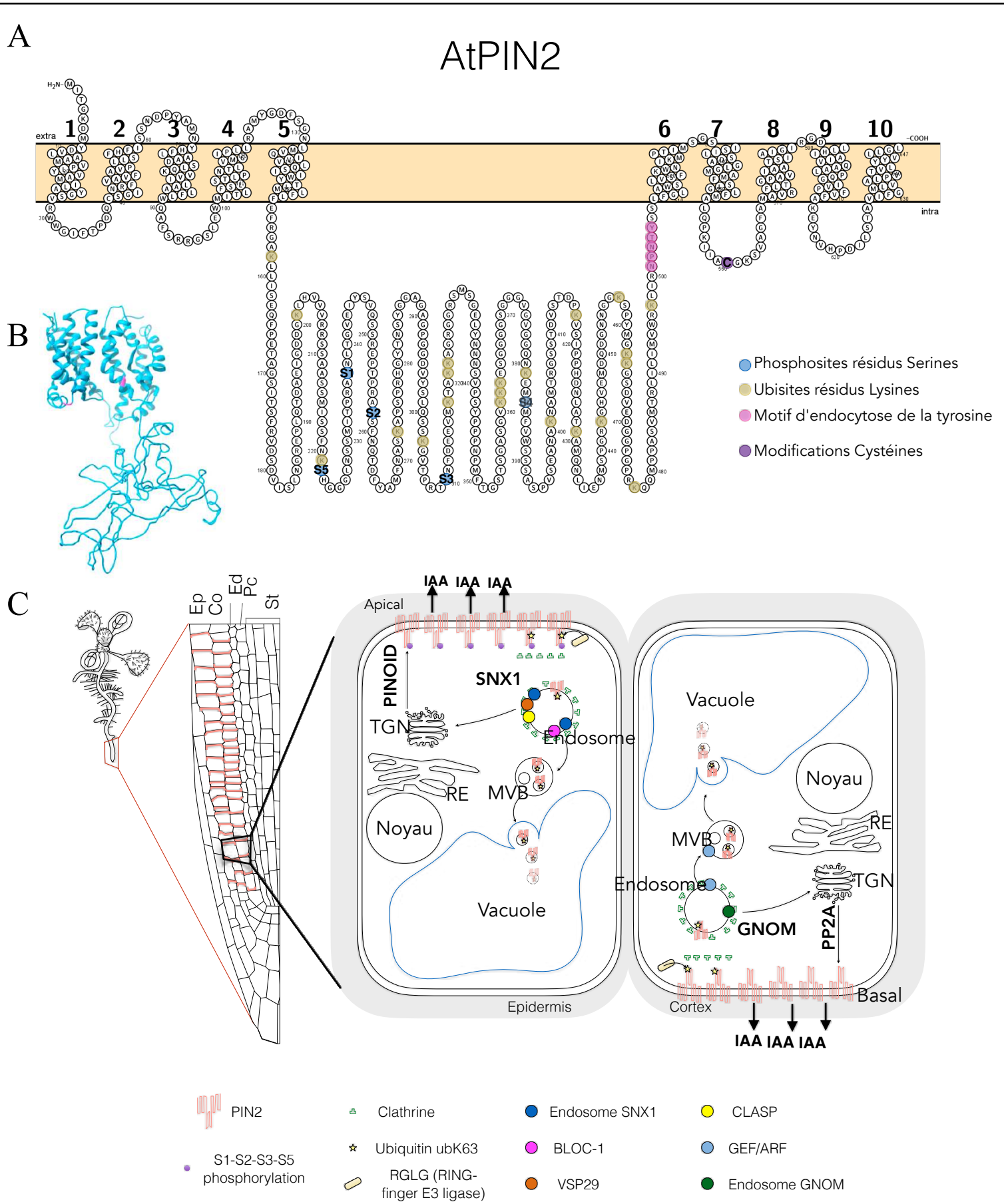


Figure i.16. La protéine PIN2 et sa localisation

(**A**) Schéma de la séquence et structure 2D de PIN2. Les ronds de couleurs indiquent les sites et résidus connus/ prédits et leur rôle au cours du traffic intracellulaire, les codes sont répertoriés à droite (Inspiré de Zwiewka et al., 2019).

(**B**) Modèle 3-D de la prédictions structurelles de PIN2 en diagramme en ruban. La position des cystéines est indiquée en rose (Retzer et al., 2017).

(**C**) Modèle du traffic intracellulaire de PIN2

dommages. Ils ont montré que la localisation d'ARF1 (ADP-ribosylation factor 1) et de BIG4 (Brefeldin A-inhibited ARF-guanine-exchange factor) au niveau du réseau trans-Golgien (TGN) dépend d'ECH et ils interviennent dans la sécrétion d'AUX1 vers la membrane plasmique pendant le développement du crochet apical (Jonsson et al., 2017).

Les PINs

Les protéines PINs (PIN-FORMED) sont des transporteurs d'efflux d'auxine qui peuvent être subdivisés en au moins deux classes de transporteurs : les "longs" canoniques et "courts" ou "intermédiaires" non canoniques (Figure i.15B, C) (Bennett et al., 2014). Chez *Arabidopsis thaliana*, les transporteurs PINs canoniques, PIN1 à PIN4, et PIN7 se distinguent des PINs non canoniques courts PIN5 et PIN8, à travers leurs longues boucles cytoplasmiques qui contiennent des éléments régulateurs absents des transporteurs PINs courts. Le transporteur PIN6 est quant à lui un PIN de longueur intermédiaire. Les transporteurs PINs "longs" sont distribués au niveau des membranes plasmiques de manière polaire dans de nombreux types de cellules.

Focus sur PIN2

PIN2 est une protéine composée de 647 acides aminés avec une structure composée de 10 hélices transmembranaires divisées en 2 blocs de 5 hélices et une longue boucle centrale. Les modifications post-traductionnelles pouvant affecter sa fonctionnalité et sa position sont : la phosphorylation des résidus sérine permettant la localisation de la protéine, l'ubiquitination de la lysine ubK67 permettant sa dégradation, de plus il est probable que les cystéines puissent être modifiées par le statut REDOX provoquant des ponts disulfures impactant la mobilité de la protéine (Löfke et al., 2013). Enfin il existe un motif tyrosine permettant l'endocytose via la clathrine (Kleine-Vehn et al., 2011). Retzer et al., (2017) ont réalisés une prédiction 3D de la forme de la protéine (Figure i.16A). PIN2 est localisé à l'apex de la racine au niveau de la membrane plasmique, basalement dans les cellules du cortex mais apicalement dans les cellules épidermiques (Figure i.16B) (Sauer and Kleine-Vehn, 2019). Au niveau cellulaire, PIN2 est localisé du côté apical dans l'épiderme grâce à l'activité kinase de PID (PINOID) un membre de la famille AGC Ser/thr kinase qui phosphoryle PIN2 (Kleine-Vehn et al., 2009). À l'inverse PIN2 est localisé du côté basal lorsqu'il est déphosphorylé grâce à la phosphatase PP2A (Kleine-Vehn et al., 2009). PIN2 peut être ubiquitiné par RGLG (RING-finger E3 ligase) et déclencher une endocytose clathrine dépendante pour causer sa dégradation. Le complexe rétromère SNX1/VPS29 (SORTING NEXIN 1/ VACUOLAR PROTEIN SORTING 29) et la voie GNOM semblent réguler le tri des PINs, la

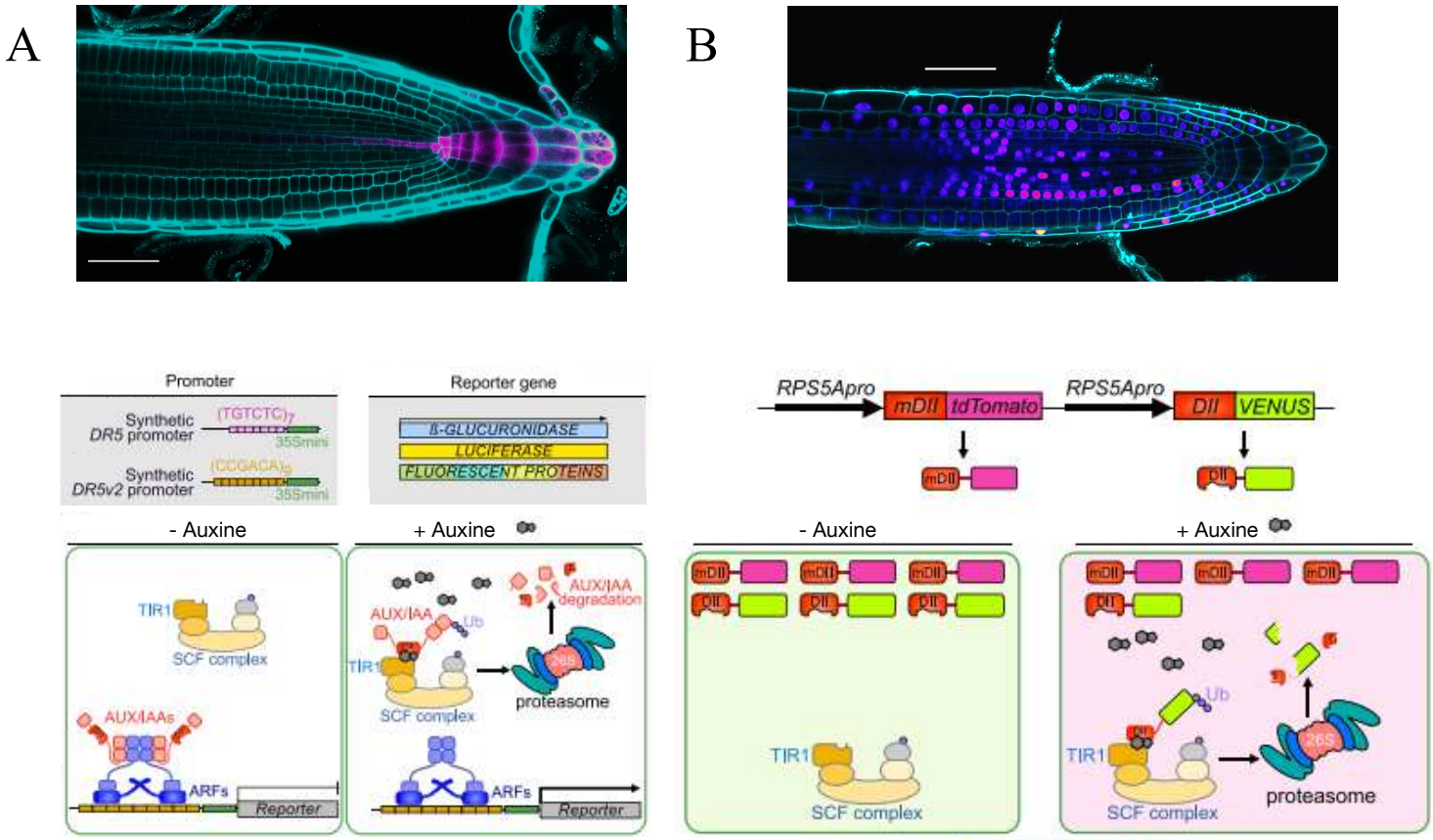


Figure i.17. DR5 et R2D2 des outils pour étudier l'auxine

(**A**) Photographie représentative de DR5:GFP à l'apex racinaire d'*Arabidopsis*. Le promoteur DR5 consiste en 7 répétitions de séquence nucléotidique et un promoteur 35S minimal. et il contrôle l'expression de gènes rapporteurs, tels que GUS, la luciférase et les protéines fluorescentes. Le promoteur DR5v2 consiste en 9 répétitions de séquence nucléotidique qui ont montrés une plus grande affinité pour les protéines ARF conduisant à une sensibilité accrue du rapporteur (Liao et al., 2015). En absence d'auxine, la transcription des gènes sensibles à l'auxine est réprimée par le complexe formé par AUX/IAA et les ARF. En présence d'auxine, il y a une dégradation du répresseur AUX/IAA, les ARF sont alors déréprimés et peuvent réguler la réponse à l'auxine.

(**B**) Photographie représentative de R2D2, rapporteur d'auxine ratiométrique à base de dégron, à l'apex racinaire d'*Arabidopsis*. Un transgène porte à la fois les domaines de l'auxine sensible (DII) et insensibles (mDII) fusionnés à des protéines fluorescentes de différentes couleurs : DII-NLS-3xVENUS et mDII-ntdTomato. R2D2 mesure l'accumulation d'auxine dans une cellule sous la forme d'une baisse du signal de VENUS (vert) par rapport à celui de tdTomato (magenta), dont le niveau est constant. Avec des niveaux élevés d'auxine la dégradation de DII-VENUS s'effectue. Le pattern d'accumulation des protéines de fusion dépend également du promoteur utilisé ; ici, le promoteur RPS5A.

Adapté de Jedlickova et al., 2022

dégradation dans les vacuoles et le recyclage vers la membrane plasmique. La relation précise entre les endosomes précoces, le TGN, les endosomes de recyclage et les endosomes lytiques reste floue et est probablement assez complexe. Au niveau apical, les endosomes SNX1 associé avec VSP29 et CLASP (CLIP-ASSOCIATED PROTEIN) sont stabilisé et vont au TGN pour être recyclé, tandis que les endosomes SNX1 associé a BLOC-1 (BLOC SUBUNIT 1) vont dans les corps multivésiculaires pour être dégradé par la vacuole (Kleine-Vehn et al., 2008; Cui et al., 2010; Ambrose et al., 2013). Au niveau basal, les endosomes GNOM, permettent un recyclage via le TGN et le GEF/ARF provoque une dégradation via la vacuole (Geldner et al., 2003; Kleine-Vehn et al., 2008).

En résumé la bonne localisation de PIN2 dépend de la phosphorylation via PID qui permet la localisation côté apical, le recyclage de PIN2 est alors pris en charge par les endosomes SNX1 et côté basal c'est la déphosphorylation via PP2A qui est importante et le recyclage se passe via l'endosome GNOM.

Les outils pour étudier l'auxine

De nombreux marqueurs ont été générés afin de suivre, bien que de manière indirecte, l'accumulation de cette hormone. La capacité à visualiser la distribution de l'auxine est essentielle pour comprendre comment cette phytohormone régule le développement. Les systèmes de visualisation de l'auxine les plus répandus sont les rapporteurs transcriptionnels, en raison de leur facilité d'action. La création du premier élément de réponse à l'auxine synthétique avec la séquence promotrice DR5 a initié le développement d'une série de biosenseurs pour l'auxine (Ulmasov et al., 1997). DR5 est un élément de réponse à l'auxine synthétique, il a été créé en réalisant une mutagénèse dirigée dans un élément AuxRE provenant du promoteur du gène GH3 du soja ; DR5 est donc induit par la présence d'auxine (Figure i.17A). Dans un premier temps, ce marqueur, formé de 7 à 9 répétitions en tandem de 11 paires de bases incluant le motif canonique TGTCTC, a été fusionné à un promoteur minimal CaMV35S contrôlant l'expression du gène GUS ce qui a donné naissance au rapporteur DR5:GUS (Sabatini et al., 1999). Des améliorations de DR5 ont été faites, comme sa fusion avec la GFP. La découverte de la séquence TGTCGG, qui a une meilleure affinité pour la liaison aux ARFs (Boer et al., 2014), a conduit au développement d'un marqueur de réponse à l'auxine plus sensible, et devient donc DR5v2 (Liao et al., 2015). Ce marqueur est exprimé dans des domaines additionnels comparé au marqueur DR5 et est un bon outil pour visualiser des réponses à l'auxine même faibles dans les tissus de l'embryon en formation ou dans la racine primaire. Cependant, l'expression de ces marqueurs ne reflète pas directement le niveau endogène

d'auxine, mais plutôt sa réponse intégrative dans une voie de signalisation complexe (Chapman and Estelle, 2009). De plus, la résolution temporelle de ces rapporteurs transcriptionnels est limitée, l'activité du rapporteur étant détectable même après une baisse de la transcription du rapporteur causée par une diminution des niveaux d'auxine. Afin de mieux détecter la distribution et la concentration d'auxine dans la cellule, des rapporteurs basés sur le domaine II (DII) ou degron des Aux/IAA ont été conçus, fusionné à la forme à maturation rapide VENUS de la protéine fluorescente jaune, ils permettent de visualiser la dégradation du signal VENUS en présence d'auxine grâce à DII (Brunoud et al., 2012). Cet outil a été amélioré avec une version ratiométrique R2D2 qui permet de visualiser DII-venus mais aussi une version mDII qui n'est pas dégradé en présence d'auxine et permet donc de faire un ratio entre ces deux éléments (Figure i.17B) (Liao et al., 2015).

Dans les outils permettant d'étudier l'auxine il existe également des techniques pour doser l'auxine, par marquage isotopique combiné à la spectrométrie de masse (Ljung et al., 2005) et au tri cellulaire activé par fluorescence de différents types de cellules marquées à la GFP, combiné également à de la spectrométrie de masse (Petersson et al., 2009). Enfin, les outils chimiques ont une grande place dans l'étude de l'auxine et aide à disséquer les différentes facettes de fonctionnement de l'auxine (Ma et al., 2018). Des inhibiteurs comme l'acide naphtylphtalamique (NPA) ont des cibles multiples, y compris un effet de faible affinité sur le trafic médié par l'actine (Zhu et al., 2016), et une forte association d'affinité avec les PINs (Abas et al., 2021). Différents inhibiteurs et approches pharmacologiques seront abordés plus en détails dans le Chapitre 3.

Le gravitropisme

Parmi les signaux environnementaux qui régule le développement d'une plante, le vecteur de gravité est celui qui reste constant tout au long de son développement. La plante ayant besoin d'orienter ses organes pour se positionner dans les ressources environnementales disponibles telles que la lumière et les nutriments du sol, le stimulus gravitationnel est un processus nécessaire pour ancrer la plante à son environnement. À partir du moment où la graine germe, la plantule oriente sa racine émergente de manière à ce qu'elle pousse vers le bas, vers le vecteur de gravité, tandis qu'elle dirige ses parties aériennes vers le haut, à l'opposé du vecteur de gravité. Ce phénomène, appelé gravitropisme, nécessite la réponse coordonnée et l'interaction de différents types de cellules (Sato et al., 2015, Singh et al., 2017).

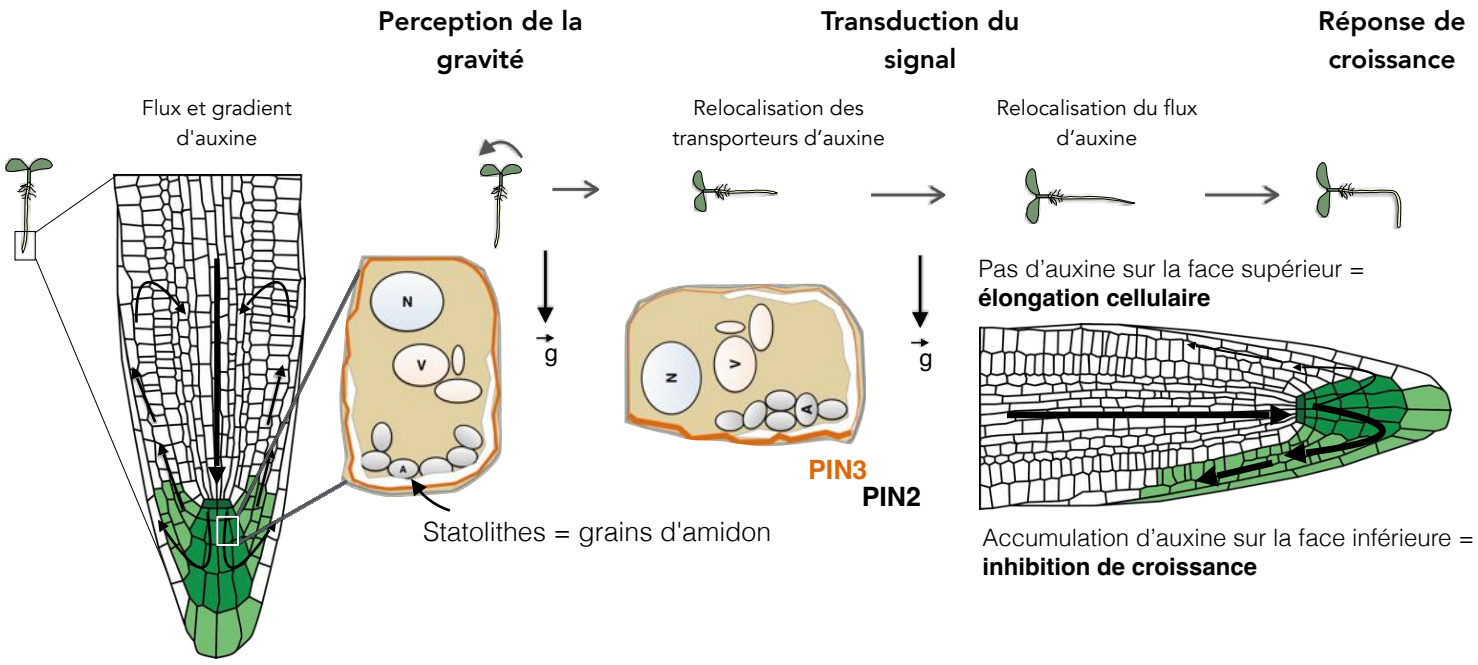


Figure i.18. Le gravitropisme de la racine primaire
Schéma représentatif des composantes du gravitropisme de la racine primaire, divisé en une série d'événements : la perception de la gravité, la transduction du signal et la réponse de croissance, ayant lieu dans des régions spatiallement distinctes (Inspiré de Singh et al., 2017; Konstantinova et al., 2021; Kruse et al., 2022)

Racines primaires et gravitropisme

Le gravitropisme de la racine primaire a traditionnellement été divisé en une série d'événements : la perception de la gravité, la transduction du signal et la réponse de croissance, ayant lieu dans des régions spatialement distinctes (Figure i.18) (Sato et al., 2015, Singh et al., 2017).

La perception de la gravité

Les racines des plantes ont une structure divisée en différentes sections, avec notamment la coiffe racinaire, qui protège le méristème des obstacles dans le sol. Elle agit également comme un capteur qui va guider la croissance, ce qui en fait un site majeur de détection de la gravité dans les racines. En effet, elle est composée de cellules dans la columelle qui sont considérées comme des statocytes. Des plastes spécialisés, les amyloplastes, sont présents dans ce type cellulaire, ils sont remplis d'amidon. Ces grains d'amidon ont une densité suffisamment élevée par rapport au cytosol pour se sédimenter facilement en fonction du vecteur de gravité, ils sont alors nommés statolithes. Au fil des années, ce modèle de perception de la gravité des plantes a été affiné et des hypothèses alternatives ont été proposées :

- Le modèle de pression gravitationnelle (statolithe-pression) a été proposé, la cellule percevrait la gravité suite à la sédimentation en détectant sa flottabilité relative par rapport à celle du milieu environnant entier plutôt que la sédimentation des organites. La détection de la gravité se ferait donc en détectant le poids de l'ensemble de la cellule (Staves 1997).
- Le modèle de tenségrité selon laquelle une perturbation localisée du réseau d'actine peut produire un signal directionnel en modifiant l'équilibre des forces agissant sur les récepteurs de la membrane plasmique (Yoder et al., 2001; Yamoto et al., 2002). Les interactions possibles des amyloplastes avec d'autres composants cellulaires tels que le réticulum endoplasmique, le cytosquelette ou la vacuole sont importantes. Le cytosquelette végétal est un réseau de protéines filamenteuses dynamiques constituées de microfilaments d'actine (F-actine), de microtubules, et d'un certain nombre de protéines accessoires (Blancaflor et al., 2006). Le mouvement des amyloplastes dépend du cytosquelette avec notamment l'actine. En effet les agents pharmacologiques qui perturbent l'actine modifient la dynamique et la sédimentation des amyloplastes que ce soit dans l'espace (Volkmann et al., 1999) ou au sol (Hou et al., 2004; Palmieri and Kiss, 2005; Saito et al., 2005). Une étude plus récente a montré que le latrunculine B, un agent dépolymérisant du cytosquelette inhibant les microfilaments d'actine, inhibait l'élongation cellulaire, en particulier les cellules des

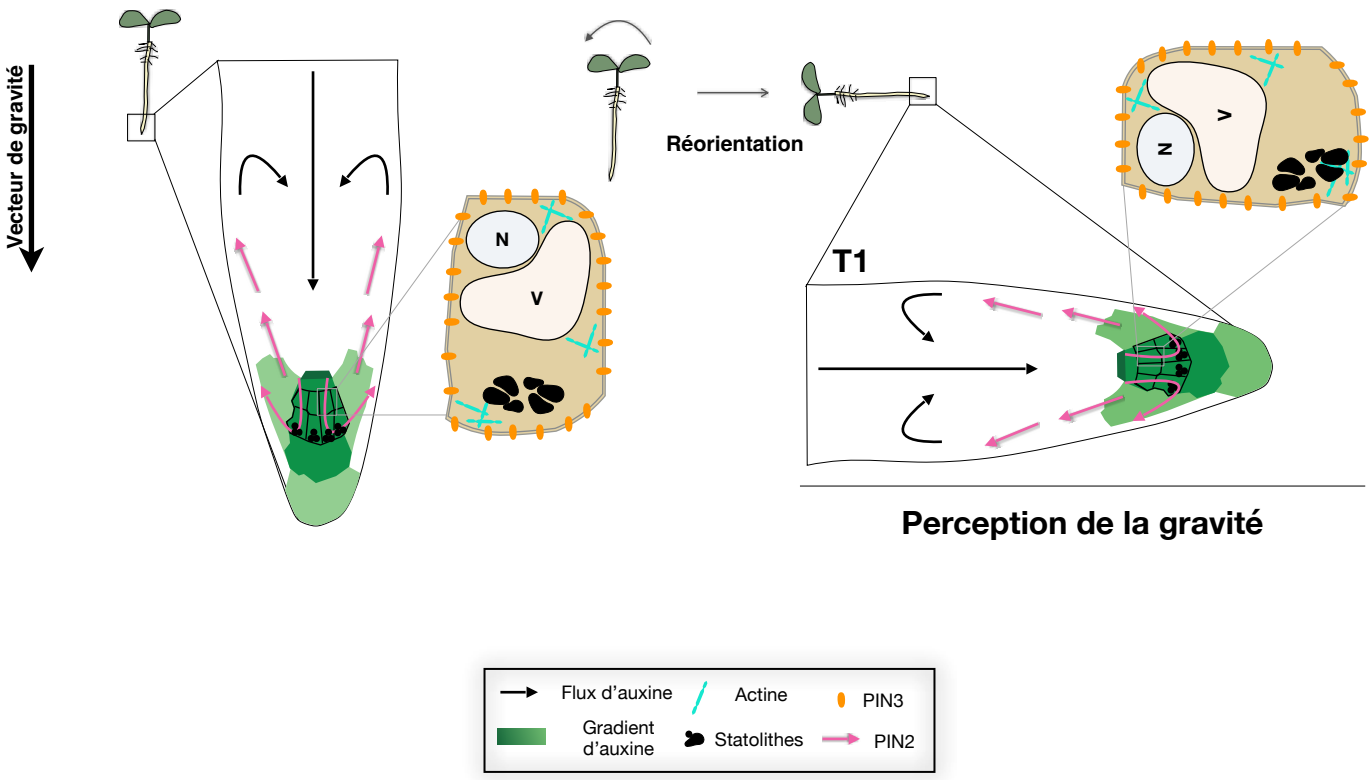


Figure i.19. La perception de la gravité
Modèle de l'amidon-statolithe. La coiffe est composée dans la columelle de cellules qui sont considérées comme des statocytes. Les grains d'amidon sont considérés comme les statolithes, ils ont une densité plus élevée que le cytosol et sédimentent en fonction du vecteur de gravité. Cela initie alors une cascade de signalisation et une voie de transduction qui indique la direction de la gravité. (Inspiré de Singh et al., 2017; Konstantinova et al., 2021; Kruse et al., 2022)

extrémités inférieures des zones de transition et d'élongation, ce qui se manifestait finalement par la facilitation de la courbure gravitropique de la racine primaire (Xu et al.,2021).

- Le modèle des canaux ioniques mécano-sensibles qui, associés à la membrane, pourraient fonctionner comme des récepteurs de gravité dans les statocytes. Bien qu'aucun des canaux ioniques mécano-sensibles des plantes identifiées jusqu'à présent n'ait contribué au gravitropisme. La pression exercée par les statolithes déclencherait l'ouverture de ces canaux au niveau des membranes sensibles. Cela permettrait un flux d'ions Ca^{2+} dans les statocytes, servant de seconds messagers pour déclencher une cascade d'événements qui conduiraient finalement à la polarisation latérale des statocytes (Leitz et al., 2009; Baldwin et al., 2013).
- Le modèle de l'amidon-statolithe est l'hypothèse la plus largement acceptée de la façon dont les plantes perçoivent la gravité (Figure i.19). Celle-ci propose que les plantes au cours du gravitropisme racinaire ressentent la gravité par la sédimentation d'organites, les statolithes, dans des cellules spécialisées, les statocytes, initiant alors une cascade de signalisation et une voie de transduction qui indique la direction de la gravité (Blancaflor and Masson, 2003; Baldwin et al., 2013). Des expériences utilisant des méthodes de centrifugation ont également suggéré que la zone d'élongation pourrait être capable de détecter la gravité (Wolverton et al., 2002).

Enfin, il a été constaté que la graviperception est un événement très précoce dans la vie de la plante. En effet, elle est établie au moment de la germination 11 heures avant l'émergence des racines et, fait intéressant, coïncidait avec le développement d'amyloplastes matures dans les cellules embryonnaires de la columelle (Ma et Hasenstein 2006). Et lorsqu'une plante est réorientée par rapport au vecteur de gravité il faut seulement de quelques secondes à quelques minutes pour observer la sédimentation des statolithes.

La transduction du signal

Les racines montrant une séparation physique entre le site principal de perception de la gravité (la columelle) et le site de réponse de courbure (les zones d'élongation), il faut donc un signal de transduction permettant de transmettre l'information pour qu'une courbure gravitropique se développe (Masson et al., 2002). On ne sait toujours pas exactement comment le mouvement des statolithes dans les cellules sensibles à la gravité est traduite en un signal biochimique ou physiologique qui conduit à une croissance différentielle des organes. Toutefois la réponse gravitropique racinaire commence rapidement après le début d'un stimulus gravitationnel, la phase initiale du gravitropisme ne peut donc pas reposer sur des protéines nouvellement synthétisées et doit donc être non génomique. Même si la cascade signalétique n'est pas entièrement comprise, elle

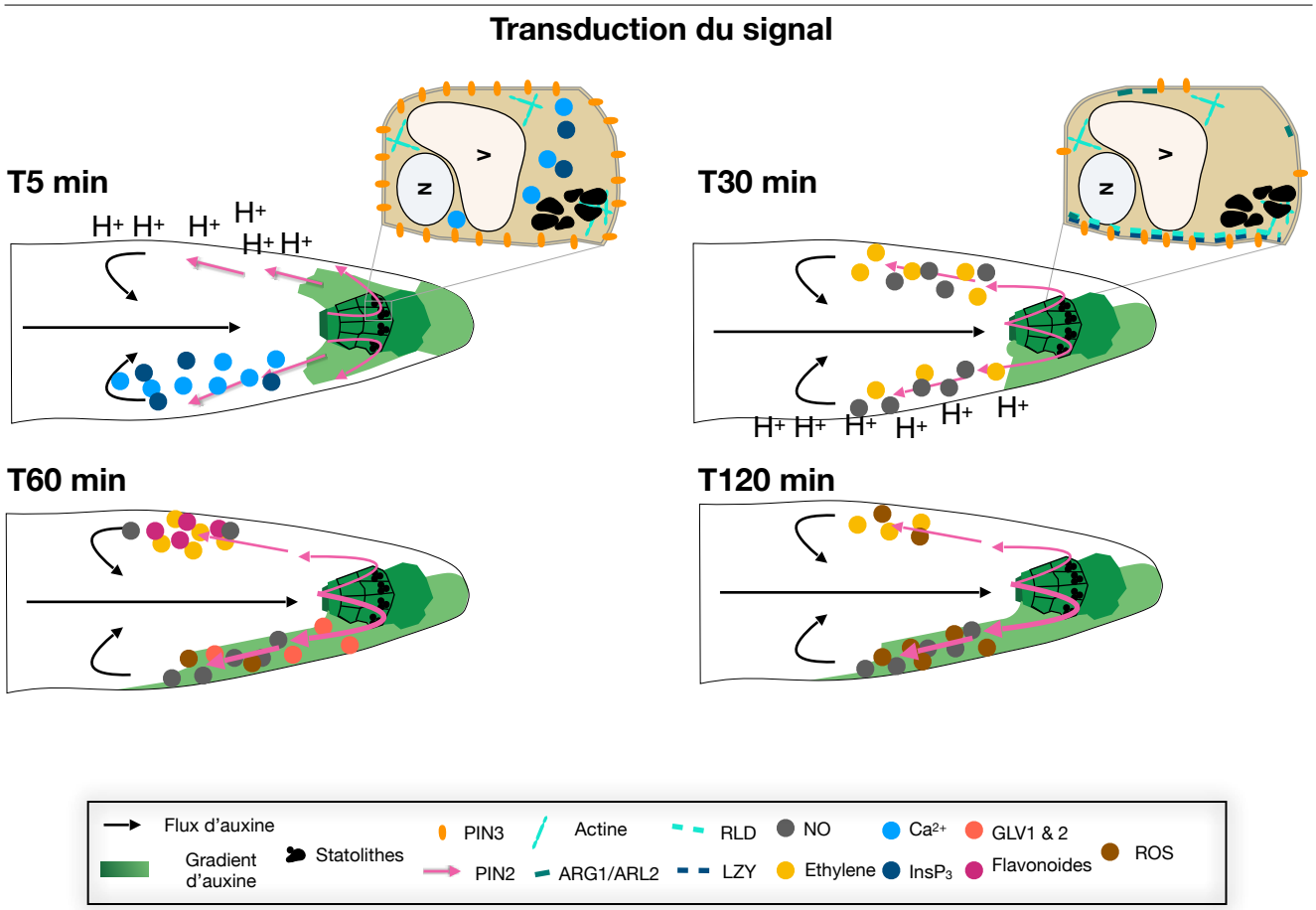


Figure i.20. La transduction du signal

Le site principal de perception de la gravité (la columelle) et le site de réponse de courbure (la zone d'élongation) sont distinct, un signal de transduction transmet l'information et permet, à terme, la courbure gravitropique. Dès 5min après stimulation gravitropique (SG) la phase précoce de la réponse gravitropique à lieu. Le Ca2+ et l'InsP3, messagers secondaires, contribuent à la transduction du signal de gravité ainsi que le gradient de pH asymétrique observé de 5 min à 30 min après SG. Un gradient d'informations est généré 30 min après SG grâce à la relocalisation de transporteurs tels que PIN3, assistée par des acteurs moléculaires (LZYs, RLDs, ARG1/ARL2 et l'éthylène) Après 60 min post SG à lieu la relocalisation des flux d'auxine grâce à la relocalisation de PIN2 assistée par des acteurs moléculaires (GLV1,GLV2 et NO/flavonoïdes). Pour amorcer la fin de l'accumulation d'auxine 120 min après SG, la formation accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) à lieu en bas de la racine et contribuent à la régulation de la courbure gravitropique. (Inspiré de Singh et al., 2017; Konstantinova et al., 2021; Kruse et al., 2022)

implique différents messagers tels que les flux calciques (Ca^{2+}), l'inositol 1,4,5-trisphosphate ($InsP_3$), le pH, l'oxyde nitrique (NO), l'éthylène, des espèces réactives de l'oxygène (ROS), des flavonoïdes, de petits peptides de signalisation et surtout une relocalisation d'un certains nombres de transporteurs d'auxines PINs (Figure i.20).

La phase précoce de la réponse gravitropique (5 min)

La dynamique du Ca^{2+} dans la coiffe racinaire est indéniablement un des signaux les plus importants dans la phase précoce de la réponse gravitropique (Zhao et al., 2022). En effet, le signal calcique transitoire se retrouve dans le côté "inférieur" de la racine dans les 5 minutes environ suivant la réorientation. Le Ca^{2+} affichent des augmentations biphasiques parallèles lors de la gravistimulation avec l'inositol 1,4,5-trisphosphate ($InsP_3$) qui est un second messager soluble. Il propage les flux calciques vers les cellules voisines (Plieth and Trewavas, 2002; Perera et al., 2006; Zhang et al., 2010). Le Ca^{2+} et l'$InsP_3$, sont des seconds messagers conservés au cours de l'évolution, ils contribuent à la transduction du signal de gravité et ils sont également impliqués en tant que modificateurs de la polarité cellulaire et du transport polarisé de l'auxine. Cela met en évidence un point d'intégration potentiel par lequel les stimuli liés à la signalisation Ca^{2+} pourraient influencer le développement médié par l'auxine (Tang et al., 2007; Zhang et al., 2011). Étroitement liés au signal calcique transitoire, un changement dans le gradient de pH est observé de 5 min à 30 min après stimulation gravitropique. Il y a une acidification dépendante du transport de l'auxine dans la face supérieure de la racine et une alcalinisation de la face inférieure (Monshausen et al., 2011). Ces changements asymétriques de pH prennent naissance au niveau de la coiffe latérale racinaire, ils ont également lieu dans les cellules de la columelle, et progressent le long de l'apex racinaire à un rythme comparable au transport de l'auxine (Monshausen et Sievers 2002). L'article de Monshausen et al., (2011) fournit un aperçu de l'importance de AUX1 dans le gravitropisme racinaire. Ils ont montré qu'il existe une augmentation du pH de surface sur le côté inférieur d'une racine gravistimulée. Ce changement de pH n'a pas été observé chez le mutant *aux1* soulignant l'importance de AUX1 dans ce processus. Monshausen et al., (2011) proposent qu'une augmentation du pH apoplastique sur le côté inférieur d'une racine gravistimulée déplace l'équilibre IAA^-/IAAH vers IAA^-, réduisant ainsi le niveau d'IAAH perméable à la membrane. IAA^- ne peut pas entrer dans les cellules par diffusion et nécessite le transport via AUX1. Ils précisent également que l'idée selon laquelle les transporteurs d'influx ne joueraient qu'un rôle secondaire dans la distribution de l'auxine parce que l'IAA protonée est perméable à la membrane, est fausse. Au lieu de cela, les cellules épidermiques des racines exprimant AUX1 sont estimées comme ayant une activité sur les

mouvements d'auxine 15 fois supérieur à la simple diffusion (Swarup et al., 2005; Kramer and Bennett, 2006). Toutefois, l'utilisation d'inhibiteurs chimiques, comme l'acide benzoïque, la bafilomycine A1 (un inhibiteur vacuolaire H + ATPase) ou l'utilisation de protons pour bloquer les changements de pH, entraînent une réduction du gravitropisme racinaire mais ne l'abolissent pas (Scott & Allen, 1999; Fasano et al., 2001). Ce changement du gradient de pH bien qu'important dans le processus ne semble pas suffire pour la transduction du signal.

La génération du gradient d'informations (30 min)

Ainsi, très tôt après l'étape de stimulation gravitropique, un gradient d'informations est généré. Suite à la libération asymétrique de Ca^{2+} dans les statocytes, il y a une activation qui affecte deux protéines interagissant de manière antagoniste pour le gravitropisme : EHB1 (ENHANCED BENDING 1) et AGD12 (ADP-RIBOSYLATION FACTOR GTPase-ACTIVATING PROTEIN). Alors que AGD12 améliore la flexion gravitropique, EHB1 fonctionne comme un régulateur négatif. EHB1 lié au Ca^{2+} se fixe à la membrane et affecte ou entre en compétition avec AGD12 pour la liaison ARF. Différentes formations de vésicules médiées par ARF dans les cellules de la face supérieure par rapport à la face inférieure de la racine vont être générées. Cela participe à détourner le flux d'auxine en affectant la distribution membranaire des transporteurs PIN3/PIN7 (Rath et al., 2020). La transduction du signal se fait en partie grâce à cette relocalisation des protéines PIN-FORMED (PINs), en particulier PIN3 observée 30 min après la stimulation gravitropique (Friml et al ., 2002 ; Rahman et al., 2010). La relocalisation de PIN3 est assistée par plusieurs acteurs moléculaires. Les gènes LZYs (LAZYs) qui altèrent le transport latéral de l'auxine en contrôlant l'expression asymétrique de PIN3 dans la columelle de la coiffe racinaire. En effet chez le triple mutant *lzy2 lzy3 lzy4* les défauts gravitropiques dans les racines sont associés à une altération de l'expression asymétrique de PIN3 dans la columelle (Ge et Chen, 2016; Taniguchi et al., 2017; Nakamura et al., 2019). Les gènes RLDs, qui sont des interacteurs de LZYs, régulent également le flux d'auxine à travers les protéines PINs dans le gravitropisme racinaire et le développement des plantes. Le double mutant *rld1 rld4* présente une diminution du phénotype gravitropique des racines primaires associé à une diminution du signal PIN3-GFP dans les statocytes de la coiffe latérale racinaire (Furutani et al., 2020). Il y a aussi ARG1 et son paralogue ARL2 (ARG1-LIKE2), dont le double mutant présente une relocalisation de PIN3 réduite dans les cellules de la columelle, mettant en lumière leur rôle nécessaires à sa relocalisation (Harrison and Masson, 2008). En parallèle de ces acteurs moléculaires, l'oxyde nitrique (NO) et l'éthylène sont tous les deux produits. Le NO s'accumule sur la face inférieure des racines gravistimulées et

favorise le transport de l'auxine en modulant la signalisation de l'auxine par la S-nitrosylation de TIR1 (Correa-Aragunde et al., 2013; París et al., 2018). La présence d'éthylène permet dans un premier temps de réguler à la hausse PIN3 dans la columelle pour améliorer le transport de l'auxine.

La relocalisation des flux d'auxine (60 min)

La relocalisation des flux d'auxine est possible grâce à la relocalisation de PIN2. La régulation différentielle du trafic de PIN2 entre les faces supérieure et inférieure de la racine à lieu 60 min après la stimulation gravitropique, ce qui est cruciale pour conserver et propager les modifications de la concentration d'auxine initiée par PIN3 dans les cellules de la columelle. PIN2 a une localisation asymétrique, du côté inférieur de la racine il est maintenu à la membrane plasmique grâce à l'inhibition de son endocytose, tandis que du côté supérieur de la racine il est rapidement intériorisé et dégradé (Abas et al., 2006). Les modifications post-traductionnelles, notamment la phosphorylation, et la régulation du trafic jouent un rôle clé pour déterminer la localisation et la polarité de PIN2 (Zhang et al., 2010). En effet, la relocalisation asymétrique de PIN2 est exacerbée par la production dépendante de l'auxine de petits peptides de signalisation GOLVEN1 (GLV1) et GLV2 dans les cellules du côté inférieur, qui déclenchent une voie de réponse qui favorise également l'association de PIN2 avec la membrane plasmique (Whitford et al., 2012). Le récepteur kinase FERONIA (FER) participe également à la bonne distribution de PIN2 en contrôlant la stabilité de l'actine (Dong et al., 2019). Enfin, le NO jouerait également sur la localisation de PIN2, permettant l'accumulation d'auxine sur le côté inférieur de la racine, où le NO est prédominant (París et al., 2018). En effet, l'éthylène étant hautement mobile fini à cause de ses niveaux élevés, par dominer l'environnement sur la face supérieure de la racine et, via la biosynthèse des flavonoïdes, inhibe la biosynthèse de NO à cet endroit ce qui permet son accumulation sur la face inférieure de la racine (Buer et al., 2006). De plus, la réponse gravitropique racinaire nécessite que AUX1 soit exprimé dans les cellule épidermique, pour s'assurer que le gradient d'auxine persiste à travers la zone d'élongation et favorise la croissance asymétrique des racines (Swarup et al., 2005).

La fin de l'accumulation d'auxine (120 min)

Les actions ultérieures inverseraient l'activation du NO pour permettre une formation accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) avec une accumulation qui se produit environ 2 h après la stimulation gravitropique. Il a été démontré que les ROS augmentent en bas de la racine de manière dépendante de l'auxine, où elles contribuent à la régulation de la courbure gravitropique (Krieger et al., 2016). L'accumulation d'auxine finit de s'inverser vers le bas de la racine dans les 4h suivant la

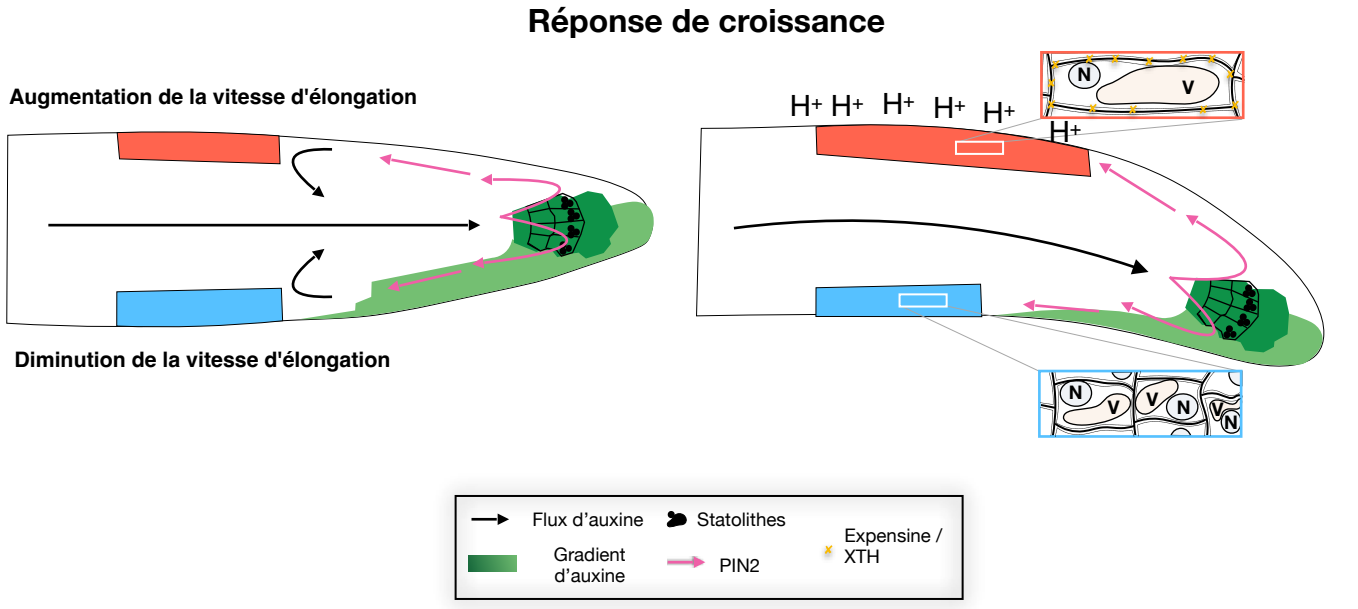


Figure i.21. La réponse de croissance
La courbure gravitropique est due à une croissance différentielle sur les faces supérieure et inférieure de la racine au niveau de la zone d'élongation généré par les flux asymétrique d'auxine à la suite d'une stimulation gravitropique. Cet élongation différentielle est causé par une croissance dépendante du pH, l'augmentation de l'acidité de la paroi cellulaire sur la face supérieur conduit à la rupture des liaisons croisées intermoléculaires entre les polymères de la paroi par les expansines et les xyloglucane endotransglucosylases/hydrolases (XTH). (Inspiré de Singh et al., 2017; Konstantinova et al., 2021; Kruse et al., 2022)

réorientation. Enfin une longue période d'exposition à des niveaux d'auxine plus élevés déclenche le tri vacuolaire de la protéine PIN2 et sa dégradation vacuolaire, contribuant ainsi potentiellement à la dissipation du gradient à la fin d'une réponse gravitropique (Abas et al., 2006).

La croissance

Les flux asymétriques d'auxine de la coiffe latérale racinaire généré par la stimulation gravitropique conduit à un allongement cellulaire différentiel entre les faces supérieures et inférieures de la racine au niveau des zones d'élongation, ce qui entraîne la courbure gravitropique (Figure i.21). Cet allongement cellulaire différentiel est causé par une croissance dépendante du pH. L'épiderme semble être le principal moteur de la courbure de l'extrémité radiculaire. En effet, l'expression d'un répresseur de la réponse auxine (*axr3-1*) dans les cellules épidermiques de l'EZ est suffisante pour oblitérer la réponse gravitropique alors que son expression dans différents types cellulaires a peu d'impact (Swarup et al., 2005). Le flanc supérieur de la zone d'élongation est exposé à des niveaux d'auxine inférieurs lors de la gravistimulation, ce qui entraîne une augmentation de l'acidité de la paroi cellulaire. L'augmentation de l'acidité dans l'apoplaste conduit à la rupture des liaisons croisées intermoléculaires entre les polymères de la paroi par les expansines et les xyloglucane endotransglucosylases/hydrolases (XTH), favorisant l'élongation cellulaire (Monshausen et al., 2011). En fin de compte, l'allongement accru des cellules sur le dessus et la diminution de l'allongement sur le bas entraînent une courbure de la pointe vers le bas. Des études spatio-temporelles du gravitropisme racinaire d'*Arabidopsis* suite à une réorientation de 90° ont été menées, démontrant que le gradient d'auxine généré disparaît lorsque l'apex atteint 50°. À ce stade de la réponse gravitropique, les statolithes sont revenus à leur position de repos du côté distal des statocytes en raison de la morphologie cellulaire. De plus, PIN3 retrouve une distribution symétrique de tous les côtés des statocytes et le gradient latéral d'auxine s'est dissipé. Cela suggère que le retour à la symétrie de l'auxine lors d'une réponse gravitationnelle est sensible à un mécanisme de point de basculement qui se déclenche lorsque la pointe atteint un angle de 50 ° par rapport à la verticale. Pourtant, l'apex racinaire continue de se courber après avoir passé ce point de basculement jusqu'à atteindre la verticale (Band et al., 2012).

Racines latérales et gravitropisme

Si les mécanismes du gravitropisme au niveau des racines primaires sont relativement bien compris, les racines latérales présentent souvent un comportement de croissance plus complexe et moins bien connu. Les racines latérales ont une croissance avec un angle gravitropique défini

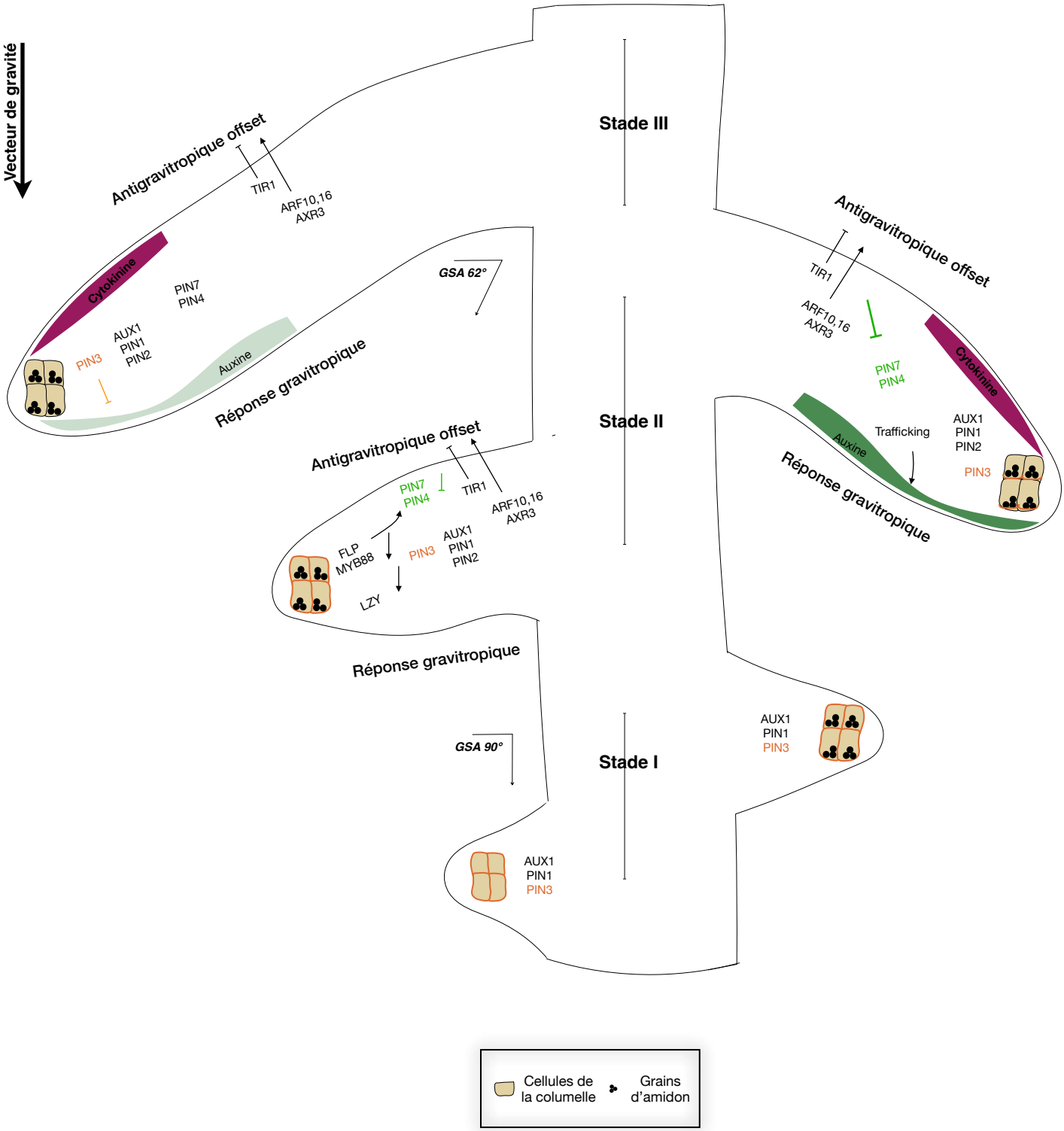


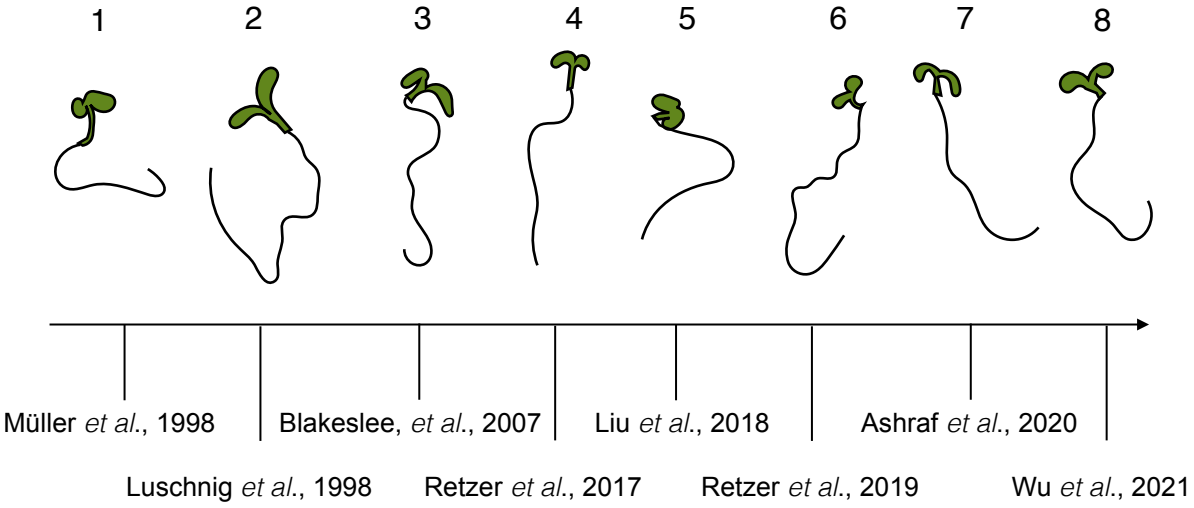
Figure i.22. Le gravitropisme des racines latérales

Les racines latérales ont une croissance avec un angle gravitropique défini (GSA). Le GSA définit la croissance angulaire d'un organe par rapport au vecteur de gravité. À l'émergence, au stade 1, il est de 90 degrés, puis il sera de 62 degrés à la fin du stade 3 ce qui permet l'expansion radiale du système racinaire. Pour mettre en place ce GSA au stade 2 et le conserver, la racine latérale doit subir rapidement des adaptations qui nécessite une réorientation à la fois avec et contre le vecteur de gravité, une combinaison entre la réponse gravitropique et l'antigravitropique offset. L'auxine, au travers de TIR1 qui est un régulateur négatif de l'antigravitropique offset, et ARF10,16 et AXR3 qui sont des régulateurs positifs de ce mécanisme, régule le GSA. La cytokinine participe à supprimer la flexion des organes gravitropiques en jouant sur l'antigravitropique offset avec une réduction de la croissance sur le côté supérieur de la racine latérale qui permet de contrebalancer la répression induite sur la face inférieur par l'auxine. (Inspiré de Waidmann et Kleine Vehn., 2020)

(GSA). Initialement à l'émergence il est de 90 degrés, puis elles s'inclinent légèrement à environ 62 degrés ce qui permet l'expansion radiale du système racinaire (Figure i.22) (Rosquete et al., 2013). Le GSA définit la croissance angulaire d'un organe par rapport au vecteur de gravité. Lorsque la racine latérale est déplacée au-dessus ou en dessous de ce GSA, elle subit rapidement une réponse gravitropique pour revenir à son angle de croissance d'origine. Cela nécessite une réorientation à la fois avec et contre le vecteur de gravité, une combinaison entre la réponse gravitropique et l'antigravitropique offset. Ce mécanisme de décalage antigravitropique dépendant de l'auxine qui fonctionne en tension avec la réponse gravitropique pour générer le GSA. La courbure gravitropique de la racine latérale commence avant la présence des statolithes ce qui indiquerait qu'ils ne sont pas aussi essentiels que chez la racine primaire. L'auxine, au travers de TIR1 qui est un régulateur négatif de l'antigravitropique offset, et ARF10,16 et AXR3 qui sont des régulateurs positifs de ce mécanisme, régule le GSA (Roychoudhry et al., 2013). Mais on observe aussi un rôle essentiel des transporteurs de l'auxine notamment avec PIN3, qui au niveau cellulaire, est également exprimé très tôt dans les primordiums latéraux. Les gènes LZY sont nécessaires pour l'écoulement asymétrique de l'auxine vers la direction de la gravité dans la racine latérale en permettant le modèle d'expression de PIN3 dans les cellules de la columelle (Taniguchi et al., 2017). Il existe également FLP et MYB88 qui fonctionnent de manière complémentaire en déterminant spécifiquement les modèles spatio-temporels de la transcription de PIN3 et PIN7 à travers les éléments cis-régulateurs situés dans leurs promoteurs (Wang et al., 2015). En effet, l'expression de PIN4 et PIN7 commence dans les tissus provasculaires de la racine latérale le premier jour après l'émergence mais il existe une forte inhibition de ces transporteurs d'efflux dans les cellules de la columelle des racines latérales. Enfin il y a une distribution asymétrique de l'auxine caractéristique, similaire à ce que l'on observe dans la racine primaire, ce qui entraîne un allongement cellulaire différentiel et une croissance racinaire descendante. Ce flux d'auxine asymétrique à l'extrémité des racines latérales est provoqué par l'activité et la distribution spécifiques de ces transporteurs d'auxine. Cela signifie donc que le trafic de ces PINs est toujours essentiel, en effet cela est soutenue par le fait que chez le mutant *tno* qui est un mutant impliqué dans le trafficking on observe une réduction de cette réponse asymétrique à l'auxine (Roy and Bassham 2015). Il y a également un effet de la cytokinine qui participe à supprimer la flexion des organes gravitropiques. En effet, cette hormone permet une réduction de la croissance sur le côté supérieur de la racine latérale qui permet de contrebalancer la répression induite sur la face inférieure par l'auxine (Waidmann et al., 2019). Une deuxième transition se produit entre 24 et 48 heures après la levée et correspond au stade III, tandis que l'expression de PIN4 et PIN7 apparaît

dans la coiffe latérale, l'expression de PIN3 va être inhibée dans les cellules de la columelle et une diminution du flux asymétrique de l'auxine est observée (Rosquete et al., 2013). Ainsi, l'activité des PINs, en limitant temporairement les flux asymétriques d'auxine à la pointe des racines latérales, induit des réponses transitoires et différentielles de croissance dans la zone d'élongation et parallèlement l'effet de la cytokinine induit un signal anti-gravitropique spécifique aux racines latérales, par conséquent, elles contrôlent l'architecture racinaire en modulant la flexion des organes gravitropiques et permettent l'expansion radiale du système racinaire d'une manière différente de ce que l'on retrouve chez la racine primaire.

A



B



Figure i.23. La sévérité des phénotypes agravitropiques de *pin2*
(**A**) Dessin représentatif du phénotype du mutant *pin2* tiré de précédentes études 1. Allèle *Atpin2::En701* cultivé sur milieu Murashige et Skoog (MS) (Müller et al., 1998) 2. Allèle *eir1-2* cultivé sur gélose nutritive végétale (PNA) sans saccharose (Luschnig et al., 1998) 3. Allèle non spécifié cultivé sur milieu MS (Blakeslee, et al., 2007) 4. Allèle *eir1-4* cultivé sur milieu MS/2 ou PNS (Retzer et al., 2017) 5. Allèle *N591142* (*pin2-T*) cultivé sur milieu MS (Liu et al., 2018) 6. Allèle *eir1-4* cultivé sur PNS (Retzer et al., 2019) 7. Allèle *eir1-4* cultivé sur milieu Hoagland (Ashraf et al., 2020) 8. Allèle non spécifié cultivé sur milieu MS/2 (Wu et al., 2021) (**B**) Photographie représentative du mutant *pin2-2*

Contexte et objectifs de l'étude

Un crible génétique de réponse au stress salin a été mené en utilisant une population de plantes mutagénisées par ''activation tagging'' (Weigel et al, 2000) chez nos collaborateurs (Estelle Hrabak et Megan Thompson, Université du New Hampshire, USA). C'est ainsi qu'a été identifié le mutant *lasso* possédant un phénotype d'enroulement racinaire fort mais conditionnel, car il est réverté selon le milieu de culture. Lors de précédents travaux dans l'équipe, il a été observé que *lasso* est agravitropique et présente une accumulation d'auxine dans les cellules de la coiffe latérale et de l'épiderme de l'apex racinaire visualisé grâce à l'introgression dans le mutant du marqueur DR5::GFP. Le séquençage du génome du mutant *lasso* (sur population F2 après backcross) a révélé une délétion qui génère un codon stop précocement dans le gène PIN2.

Les mutants dans le gène PIN2 sont connus et étudiés, les premiers ayant été identifiés à partir de divers cribles génétiques en 1998 (Chen et al., 1998; Luschnig et al., 1998; Müller et al., 1998; Utsuno et al., 1998). Cette origine multiple se traduit par les différents noms donnés avant sa caractérisation moléculaire : *wavy 6* (*wav6*), *éthylène-insensible root 1* (*eir1*), *agravitropic 1* (*agr1*) et enfin *pin-formed 2* (*pin2*). Le mutant *pin2* a été décrit comme un mutant agravitropique avec un enroulement de la racine primaire. Une analyse approfondie des descriptions publiées du phénotype de racinaire de *pin2* donne un large éventail de réponses gravitropiques, allant de presque entièrement gravitropiques à une forte perte de réponse gravitropique (Figure i.23A). Cela soulève la question de l'expressivité du phénotype gravitropique chez *pin2*.

L'objectif de ma thèse est donc de comprendre comment l'architecture racinaire peut être impactée par l'environnement en étudiant les modifications du développement racinaire en réponse à des changements nutritionnels. Cette question va être étudiée avec un focus particulier sur le nouveau mutant allélique de PIN2 (que nous avons nommé *pin2-2*), mutant du transport d'efflux d'auxine (Figure i.23B). En effet le phénotype agravitropique de *pin2* peut être réverté par le milieu. Ceci en fait un excellent outil de départ pour étudier l'impact de l'environnement, en particulier des nutriments, sur le lien déjà existant entre gradient d'auxine et gravitropisme. Ma thèse tentera donc de répondre aux questions suivantes :

- Comment le gravitropisme est-il modulé par les nutriments et quel est le rôle de l'auxine dans ce processus ?

- D'autres mutants impliqués dans le gravitropisme ou le transport de l'auxine peuvent-ils être également conditionnels ?
- D'autres hormones peuvent-elles également être impliquées dans la modulation conditionnelle du phénotype agravitropique racinaire ?

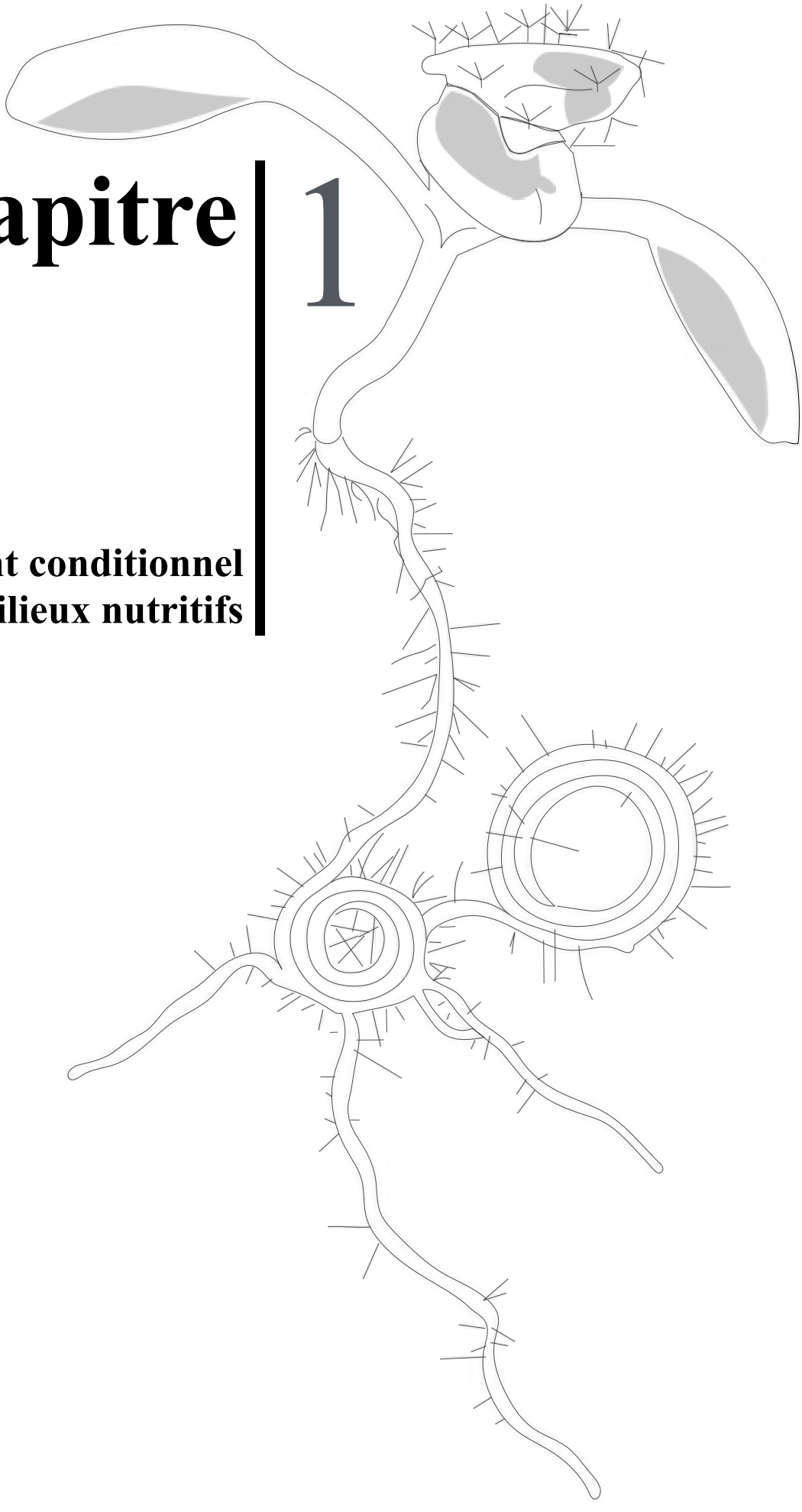
Au cours du premier chapitre, notre but était de comprendre comment le gravitropisme était modulé par les nutriments et quel était le rôle de l'auxine au sein de ce phénomène. Nous avons pu mettre en évidence le phénotype conditionnel du mutant *pin2* sensible à des carences nutritives spécifiques. Cette conditionnalité ne provient pas d'un effet de la pression osmotique, de la vitesse de croissance, ou d'un signal systémique. La conditionnalité du phénotype de *pin2* en conditions permissives proviendrait de la réorientation des flux d'auxine qui à lieu indépendamment de AUX1 et PIN3 mais dépendamment de PIN1 exprimé différentiellement et ectopiquement dans l'épiderme de *pin2*. Le transport de l'auxine est alors modulé grâce à l'expression différentielle de PIN1 qui modifie la réponse gravitropique racinaire ce qui suggère que la réponse tropique a été soumise à une forte pression sélective pour favoriser l'exploration des sols.

Le deuxième axe développé pendant ma thèse avait comme objectif d'élargir notre compréhension de l'implication des conditions de culture sur la réponse gravitropique en déterminant si d'autres mutants pouvaient être affectés de manière similaire à *pin2* par les nutriments au cours de leurs réponses gravitropiques. Nous avons pu mettre en évidence le phénotype conditionnel des mutants *aux1* ainsi que *axr2* bien que celui-ci a été moins étudié. Pour *aux1*, nous avons mis en évidence que cette conditionnalité, tout comme pour *pin2*, n'était pas dû à la pression osmotique ni à la vitesse de croissance mais bien à une sensibilité liée à des carences nutritives spécifiques. Nous avons confirmé que c'est un autre acteur moléculaire que AUX1 ou PIN3 qui pourrait permettre cette conditionnalité et que les conditions permissives permettent de moduler les flux d'auxine.

Le dernier chapitre a permis de mettre en évidence l'importance de l'homéostasie de l'auxine au cours du gravitropisme. Tant par sa biosynthèse qui semble essentielle pour répondre à la gravité mais n'est toutefois pas impliquée dans le mécanisme permettant un effet des conditions permissives, que par sa signalisation qui semble importante pour le phénotype des mutants *pin2-2* et *aux1*. Le transport de l'auxine reste le levier principal permettant d'expliquer l'importance des nutriments au cours du gravitropisme. De plus, les cytokinines et les brassinostéroïdes, pas tant via un effet direct mais plutôt via une action en synergie avec l'auxine et la modulation de son transport, ont un effet qui permettrait de moduler le seuil d'auxine à la suite de la gravistimulation.

Chapitre 1

pin2 mutant conditionnel dépendant du milieux nutritifs



Chapitre 1 - *pin2* mutant conditionnel dépendant du milieux nutritifs

1 - Introduction

Dans ce chapitre l'objectif était une caractérisation du mutant *lasso*, qui s'est révélé être un mutant allélique de *pin2* et a été renommé *pin2-2*. Ce nouveau mutant a permis de mettre en évidence la conditionnalité du phénotype racinaire de *pin2*. Il est décrit dans la littérature comme étant agravitropique. Une analyse approfondie des descriptions publiées donne un large éventail de phénotypes agravitropiques dont la sévérité varie sans n'avoir jamais été décrite. Ceci soulève donc la question de l'expressivité du phénotype agravitropique de *pin2*. Au cours de cette étude j'ai donc tenté d'en faire une caractérisation et d'y apporter des éléments de réponses. Il est important de noter que le gravitropisme racinaire permet de répondre à la gravité et de s'ancrer dans le sol facilitant ainsi l'accès à l'eau et aux nutriments. Une telle croissance directionnelle nécessite donc de détecter et répondre aux changements du vecteur de gravité tout en intégrant les signaux environnementaux. Le mécanisme de réponse gravitropique a été décrit en détail dans l'introduction générale mais il faut retenir que l'auxine à un rôle prépondérant dans le gravitropisme (Friml et al., 2002) et que celui-ci est divisé en trois phases séquentielles :

- la perception du changement de vecteur de gravité permise par les grains d'amidon qui agissent comme des statolithes en sédimentant à l'intérieur des cellules (Blancaflor and Masson, 2003; Baldwin et al., 2013)
- l'établissement d'une distribution asymétrique d'auxine permise par l'altération des flux d'auxine par la relocalisation différentielle des transporteurs d'efflux, en particulier PIN3 et PIN2 (Friml et al., 2002; Rahman et al., 2010)
- la réponse de croissance asymétrique permise par l'augmentation du rapport auxinique des faces supérieures à inférieures qui est responsable de la croissance différentielle et donc de la réorientation de l'apex vers le vecteur de gravité (Sato et al., 2015, Singh et al., 2017).

Les PINs jouent donc un rôle essentiel dans la réponse à la gravité via la relocalisation des flux d'auxine. En effet, la gravistimulation induit des changements dans la localisation polaire de PIN3 dans la columelle racinaire où il se déplace vers la partie inférieure des cellules de la columelle (Friml et al., 2002, Grones et al., 2018). Il y a également une régulation différentielle du trafic de PIN2 entre les surfaces supérieure et inférieure d'une racine gravistimulée qui est cruciale pour maintenir les modifications de la concentration d'auxine de chaque côté de la racine, initiées en

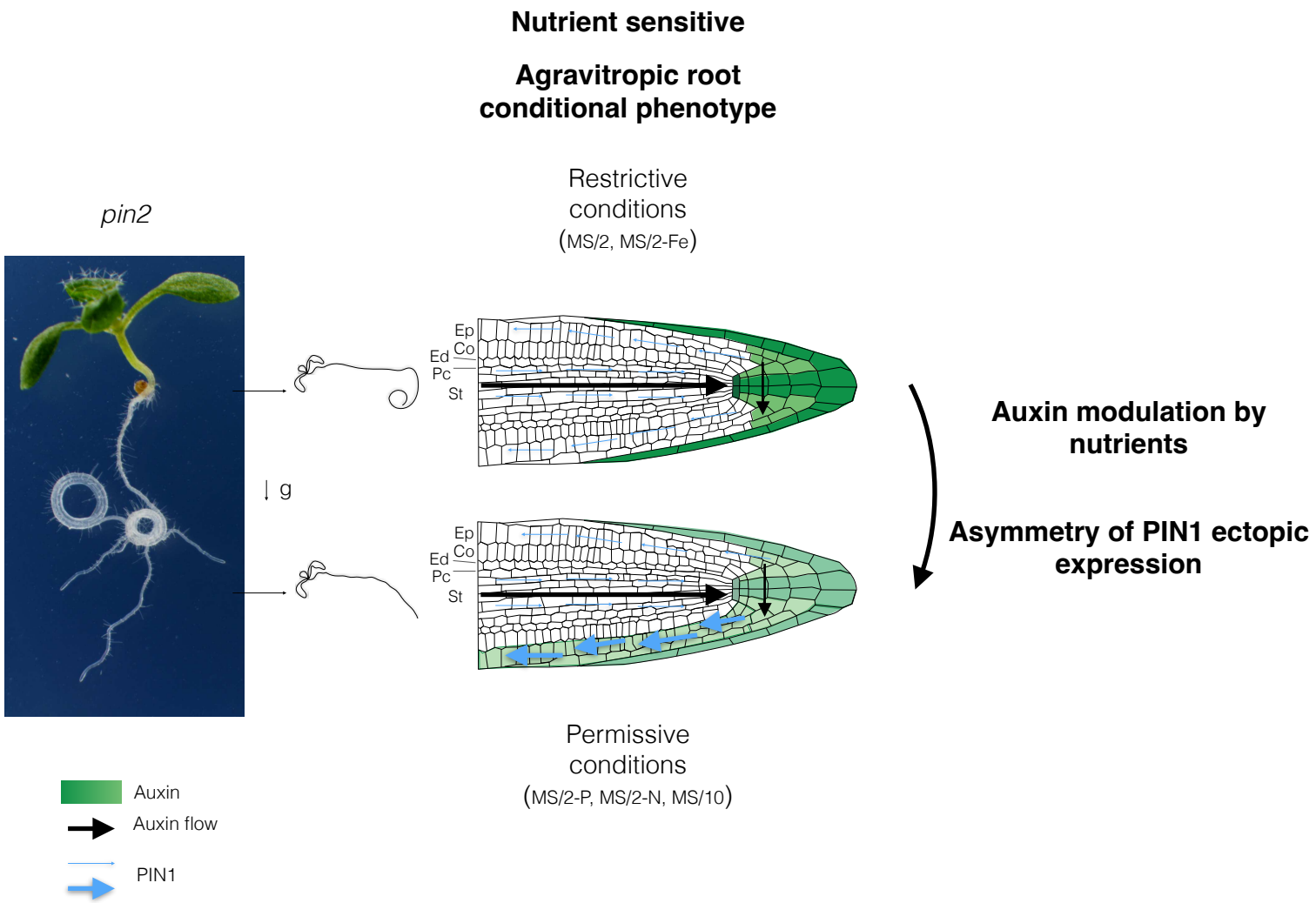
premier lieu par PIN3 dans les cellules de la columelle. Du côté de la racine inférieure, l'endocytose de PIN2 est inhibée, ce qui entraîne le maintien de la membrane plasmique de PIN2 dans les cellules épidermiques en expansion, tandis que du côté de la racine supérieure, PIN2 est rapidement intériorisé et dégradé (Abas et al., 2006). Bien que PIN1 ne joue pas un rôle direct dans l'accumulation différentielle d'auxine, il est chargé de transporter l'auxine synthétisé dans les parties aériennes pour alimenter l'extrémité de la racine. Des études antérieures ont montré que le transport d'auxine et de nutriments peut entrer en compétition, entraînant une croissance ou un développement différentiel dans diverses conditions environnementales. Il a été démontré que le transporteur de nitrate NRT1.1 transporte l'auxine dans des systèmes hétérologues (Krouk et al., 2010). Son rôle de transcepteur suggère également des voies de régulation des protéines PINs. Notre étude ne suggère pas de propriétés de transport concurrents similaires pour les protéines PINs, mais démontre un schéma d'expression différentiel dans diverses conditions. En effet, le phénotype conditionnel de *pin2* se révèle dépendamment des nutriments et cela en fait un excellent outil d'étude pour comprendre la place que peuvent jouer les nutriments sur le transport de l'auxine notamment au cours de la réponse à un changement de vecteur de gravité. De plus, il a été rapporté qu'un stimulus gravitropique peut induire la formation de racines latérales sur le côté externe des racines en flexion (Ditengou et al., 2008). Le mutant *pin2-2* étant agravitropique, ne possède pas de flexion gauche droite nommée 'waving', comme dans les racines de Col-0, mais présente une flexion seulement vers la droite et donc un enroulement de sa racine. Durant le gravitropisme et le waving, le maximum d'auxine se produit du côté interne de la flexion tandis que l'initiation de la racine latérale se produit du côté externe (Lucas et al., 2008). Sachant que la position des primordiums de racines latérales est déterminée par le phénomène de l'oscillation et peut aussi répondre au gravitropisme, nous avons également voulu observer et caractériser l'organisation des racines latérales chez *pin2-2* et voir si les nutriments pouvaient l'impacter.

Ce travail a été présenté sous la forme d'un article scientifique soumis dans Plant Science. Il apporte des connaissances sur la conditionnalité du phénotype agravitropique racinaire de *pin2*, et expose la redondance dans la famille PINs, avec un rôle important pour PIN1 dans la restauration du phénotype de *pin2* en tant qu'adaptation à la disponibilité des nutriments. De plus, des résultats complémentaires sur la caractérisation du mutant *pin2-2* sont présentés dans ce manuscrit de thèse.

2 - Résultats

2.1 - Article

L'article « *pin2* mutant agravitropic root phenotype is conditional and nutrient-sensitive » a été soumis dans Plant Science et accepté avec modifications mineures. La numérotation des pages et des figures est indépendante du reste du manuscrit.



Graphical abstract

pin2 mutant agravitropic root phenotype is conditional and nutrient-sensitive

Marion Thomas [a], Alexandre Soriano [a,1], Claire O'Connor [a], Amandine Crabos [a], Philippe Nacry [a], Megan Thompson [b], Estelle Hrabak [b], Fanchon Divol [a], Benjamin Péret [a]*.

Affiliations

[a] IPSiM, Univ Montpellier, CNRS, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France

[b] Univ New Hampshire, Durham, USA

[1] Present address: AGAP, Univ Montpellier, CIRAD, INRAE, Institut Agro , Montpellier, France

*For correspondence:

benjamin.peret@cnrs.fr (+ 33 (0) 499612859)

Benjamin Péret: 0000-0003-1336-0796

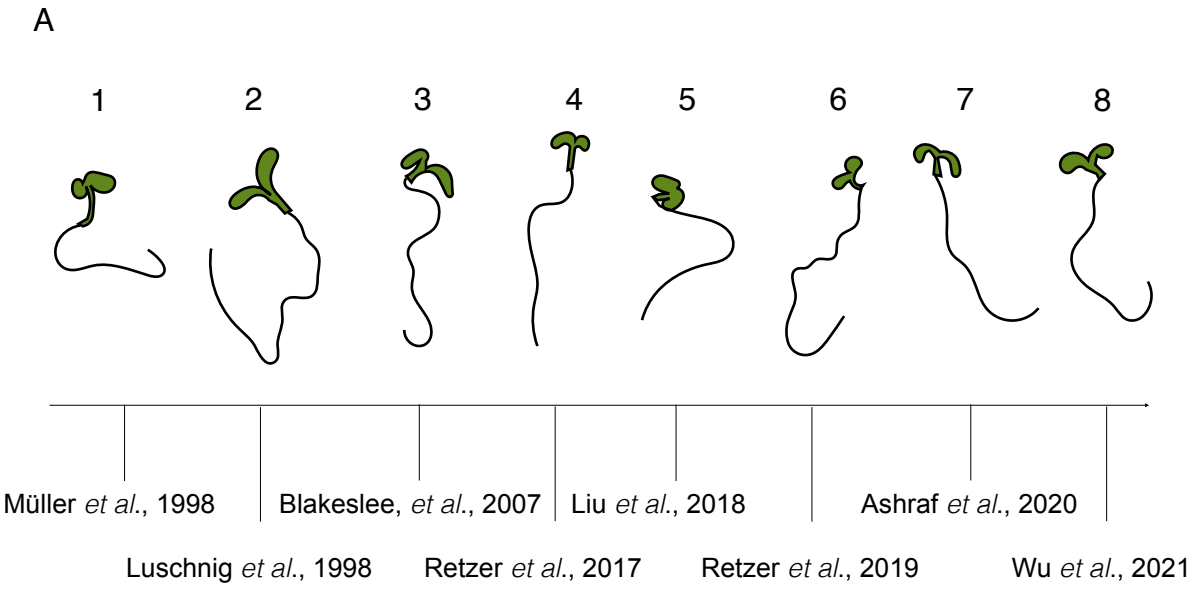
Number of items:

Word count: 5778

Abstract

Plants have the capacity to sense and adapt to environmental factors using the phytohormone auxin as a major regulator of tropism and development. Among these responses, gravitropism is essential for plant roots to grow downward in the search for nutrients and water. We discovered a new mutant allele of the auxin efflux transporter *PIN2* that revealed that *pin2* agravitropic root mutants are conditional and nutrient-sensitive. We describe that nutrient composition of the medium, rather than osmolarity, can revert the agravitropic root phenotype of *pin2*. Indeed, on phosphorus- and nitrogen-deprived media, the agravitropic root defect was restored independently of primary root growth levels. Slow and fast auxin responses were evaluated using DR5 and R2D2 probes, respectively, and revealed a strong modulation by nutrient composition of the culture medium. We evaluated the role of PIN and AUX auxin transporters and demonstrated that neither PIN3 nor AUX1 are involved in this process. However, we observed the ectopic expression of *PIN1* in the epidermis in the *pin2* mutant background associated with permissive, but not restrictive, conditions. This ectopic expression was associated with a restoration of the asymmetric accumulation of auxin necessary for the reorientation of the root according to gravity. These observations suggest a strong regulation of auxin distribution by nutrients availability, directly impacting root's ability to drive their gravitropic response.

Key words: Polar auxin transport, PIN1, PIN2, gravitropism, nutrients, conditional phenotype



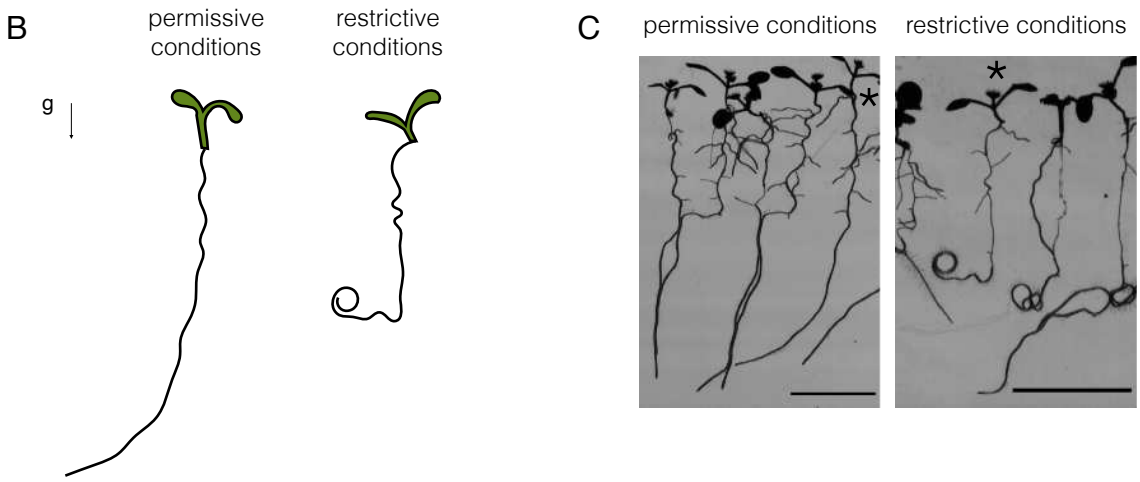


Figure 1. Literature description of the agravitropic root phenotype of *pin2* is heterogeneous

(A) Representative drawing of *pin2* mutant's phenotype drawn from previous reports **1.** Allele *Atpin2::En701* grown on Murashige and Skoog (MS) medium **(**Müller *et al*., 1998) **2.** Allele *eir1-3* grown on unsupplemented plant nutrient agar (PNA) without sucrose (Luschnig *et al*., 1998) **3.** Allele not specified grown on MS medium (Blakeslee, *et al*., 2007) **4.** Allele *eir1-4* grown on MS/2 medium or PNS **(**Retzer *et al*., 2017) **5.** Allele N591142 (*pin2-T*) grown on MS medium (Liu *et al*., 2018) **6-**. Allele *eir1-4* grown on PNS (Retzer *et al*., 2019) **7.** Allele *eir1-4* grown on Hoagland medium (Ashraf *et al*., 2020) **8.** Allele not specified grown on MS/2 medium (Wu *et al*., 2021) **(B)** Representative drawing of *pin2-2* mutant phenotype used in the present study **1.** Plants grown in repressive conditions (MS/10). **2.** Plants grown in permissive conditions (MS/2) **(C)** Representative picture of *pin2-2* in repressive (MS/10) or repressive (MS/2) conditions, stars indicate plants selected for drawing.

1. Introduction

Gravitropism is essential to monitor gravity and allow roots to anchor themselves in the soil, where they navigate heterogeneous environments to uptake water and nutrients. The key phytohormone auxin controls many stages of plant development and tropism, including gravitropism (Friml et al., 2002). The gravitropic response mechanism can be divided into three sequential phases, i) perception of a change in gravity vector, ii) establishment of an asymmetric auxin distribution and iii) asymmetric growth response (Sato et al., 2015, Singh et al., 2017). Roots have been suggested to use a tipping point mechanism to reverse the asymmetric auxin flow at midpoint of bending, allowing to fine tune the root apex position (Band et al., 2012). During the asymmetry acquisition phase, auxin fluxes are altered through the differential relocalization of auxin efflux transporter PIN-FORMED proteins (PINs), in particular PIN3 and PIN2, observed 30 min to 2 h after root reorientation (Friml et al., 2002; Rahman et al., 2010). Gravistimulation induces changes in PIN3 polar localization in root columella where it relocates towards the lower part of the columella cells (Friml et al., 2002, Grones et al., 2018). Differential regulation of PIN2 trafficking between the upper and lower surfaces of a gravistimulated root is crucial to maintain modifications of the concentration of auxin on each side of the root, firstly initiated by PIN3 in the columella cells. On the lower root side, endocytosis of PIN2 is inhibited, resulting in plasma membrane maintenance of PIN2 in expanding epidermal cells, while on the upper root side, PIN2 is rapidly internalized and degraded (Abas et al., 2006). Although PIN1 does not play a direct role in the differential accumulation of auxin, it is responsible for providing an auxin pathway to feed the root tip. The asymmetric redistribution of auxin between the lower and upper part of a gravistimulated root can be revealed by markers like the auxin response reporter DR5 (Ulmasov et al., 1997), the auxin sensor DII (Brunoud et al., 2012) and its ratiometric version R2D2 (Liao et al., 2015). A decrease in the upper to lower auxin ratio is responsible for the differential root growth and thus the reorientation of the apex in the downward direction.

The *pin2* mutant was firstly described as an agravitropic mutant with a curling of the primary root, amongst other phenotypes, identified from various genetic screens (Chen et al., 1998; Luschnig et al., 1998; Müller et al., 1998, Utsuno et al., 1998). This multiple origin is reflected in its various given names prior to its molecular characterization: *wavy 6* (*wav6*), *ethylene-insensitive root 1* (*eir1*), *agravitropic 1* (*agr1*) and finally *pin-formed 2* (*pin2*). An extensive analysis of the published descriptions of *pin2* root phenotype gives a wide range of gravitropic responses, from almost entirely gravitropic to a strong loss of gravitropic response (Fig. 1A). This raises the question of the expressivity of the gravitropic phenotype in *pin2* and other *pin* mutants. In this study, we identified a new allelic mutant in *PIN2* that we named *pin2-2* and revealed that *pin2* phenotype is conditional and nutrient-sensitive, providing an explanation for its phenotypic discrepancy in the scientific literature (Fig. 1B,C).

Previous studies have shown that auxin and nutrient transports can compete, resulting in differential growth or development in various environmental conditions. The nitrate transporter NRT1.1 has been shown to transport auxin in heterologous systems (Krouk et al., 2010) providing an elegant explanation of its lateral root growth phenotype. Its role as a transceptor also suggests pathways for the regulation of PIN proteins. The root coiling on horizontal growth in nitrate deficiency has been shown to be caused by asymmetric auxin response (Chai et al., 2020). Presence of nitrate suppresses asymmetric root growth mediated by the transporter NRT1.1, indeed PIN2-mediated auxin transport is epistatic to NRT1.1 during nitrate deficiency (Chai et al., 2020). Our study does not suggest similar competing properties for PIN proteins but demonstrates a differential expression pattern in various conditions. Indeed, the conditional phenotype of *pin2* is revealed in the presence and absence of phosphate or nitrate and does not result from osmotic variations. Using slow and fast auxin reporters, respectively DR5 and R2D2, we showed that auxin asymmetric accumulation in the root tip is altered by the nutrient's composition of the medium. Further investigation revealed that ectopic expression of *PIN1* rather than changes in *PIN3* or *AUX1* is associated with a reversion of the gravitropic phenotype. Taken together, our study provides insight into the conditional agravitropic phenotype of *pin2* and exposes redundancy in the PIN family, with an important role for PIN1 in restoration of *pin2* phenotype as an adaptation to nutrients availability.

2. Materials and Methods

2.1. Plant materials, growth conditions, quantification of PR length and growth rate

Arabidopsis thaliana Columbia-0 (Col-0) ecotype was used as the wild-type. Mutants and transgenic lines including *pin2*/*eir1-1*/*eir1-4* (Chen et al., 1998; Luschnig et al., 1998), *pin3-5* (Blilou et al., 2005), *pin1-3* (Bennet et al., 1995), *SALK_122916 (*Alonso et al., 2003*)* were described previously. The following transgenic lines were used for expression studies: DR5:GFP (Benkova et al., 2003), R2D2 (Liao et al., 2015), pPIN3::PIN3-GFP (PIN3:GFP) (Dello Ioio et al., 2008), pAUX1::AUX1-YFP (AUX1:YFP) (Swarup et al., 2005), pPIN1::PIN1-GFP (PIN1:GFP) (Omelyanchuk et al., 2016) and were introgressed into the *pin2-2* genetic background by crossing to generate homozygous lines. For seedlings growing on plates, Arabidopsis seeds were surface-sterilized with a solution containing 12.5: 37.5 : 50 (v/v/v) of bleach/water/ethanol for 5 min with agitation. Seeds were rinsed three times with 96% ethanol before drying. Seeds were then germinated on 1/2 Murashige and Skoog basal medium (MS) supplemented with Gamborg's vitamins (Murashige and Skoog Basal Medium M0404 - Sigma Aldrich), 0.8% agar, 1% sucrose, 0.05% MES, pH adjusted to 5.7. Plants were grown under long-day photoperiods (16 h light/8 h dark and a temperature of 21°C with

light intensity of 120 µmol cm^{-2} s^{-1} provided by Osram, Berlin, Germany; 18-W 840 Lumilux neon tubes). For the experiments carried out on the Root Phenotyping platform using the The HIgh Resolution ROot Scanner (HIRROS) setup (Fernandez et al., 2022) the seedlings were grown with 1% agar, under long-day photoperiods with LED lighting (between 40 and 350 µmol m^{-2} s^{-1}) and a temperature of 23°C.

Plants were treated with a supplementation in the medium of 150 mM sorbitol or 75 mM NaCl or a range (0 g/L, 100g/L, 250 g/L) of PEG-8000 (P2139 - Sigma Aldrich) using a protocol described previously (Verslues et al., 2006).
The different medium compositions are in Materials and Methods Supplemental S1.
The primary root (PR) length was quantified using ImageJ software and presented in graphs with n=30 seedlings. The growth rate was calculated using seedling growth for 24h.

2.2. Sequencing

Bulk sequencing of *lasso* mutant was done from an F2 after a backcross with Col-0. Sequencing was produced by BGI with the sequencing platform BGISEQ-500, the read length used was paired-end 100 bp and the data output was 4G clean data per sample. Low quality bases were removed using cutadapt, and reads were mapped on Arabidopsis genome using bwa mem. Then GATK was used to call variants, along with SNPeff to predict their effect, allowing to quickly find differences between *lasso* and Col-0. All the variations (SNP or small deletion or insertion) with a potentially large impact on the structure of a gene was looked.

2.3. Gravistimulation

Seeds were sowed in sterile condition on MS/2 medium then vernalized for 2 days at 4°C in the dark. They were placed in culture chamber in vertical position. After 6 days, the seedlings were transferred to a new plate containing various media or control and rotated 90° with respect to the gravitational vector. A quantification of the position of the apex is carried out at different times and categorized into 8 different orientations on a circular graph (Swarup et al., 2004 ; Petrášek et al., 2006), detail of the category is in Materials and Methods Supplemental S2. Adobe Photoshop CS6 was used to overlay gravistimulation images.

2.4. Confocal imaging, and fluorescence signal quantification

For fluorescence visualization, Leica SP8 (Leica microsystems, Wetzlar, Germany) coupled with the LASX software and equipped either with HC PL APO CS2 40x/1.10 water or HC PL

APO CS2 63x/1.40 oil was used. Image captures were performed with the same confocal settings (gain, laser strength, pinhole) to generate comparable images among different treatments or genetic backgrounds. 6 DAG seedlings were mounted on a slice of medium. Fluorescence signals for GFP (excitation 488 nm, emission 500 to 540 nm), YFP (excitation 514 nm, 520 to 540 nm) and propidium iodide (excitation 561 nm, emission 580 to 630 nm) were detected. For image quantification (R2D2, PIN3:GFP, AUX1:YFP, PIN1:GFP, fluorescence intensity measurements), maximum intensity projections of confocal pictures were used. Roots were observed respectively 30 min, 1h or 1h30 after gravistimulation for PIN3:GFP, PIN1:GFP, AUX1:YFP and R2D2. The image analyzes and quantification were performed using Fiji-ImageJ. The quantification of GFP intensity for DR5:GFP was performed with the Plot Profile. The intensity of the signal was normalized with area when it was different and represented as mean signal intensity in arbitrary units (a.u). For R2D2 , nuclear signal was quantified in the first 9 cells of epidermis layer as previously described (Liao et al., 2015). Minimum 10 to 16 independent biological replicates were performed. For PIN3:GFP, the quantification was done as previously described (Grones et al., 2018). For AUX1:YFP, the quantification was done along a line passing through the lower and upper face of the root in response to 1h30 of gravitropism. For PIN1:GFP at first the quantification was done in a square in the stele after 1h of gravitropism and then in the total epidermis or directly at the plasma membrane.

2.5. Statistical analysis

The number of independent repetitions of experiments, as well as exact sample sizes, is described in the figure legends. Statistical analysis (Student's t-test) were performed using the software R. Statistical significance was tested as described in the figure legends.

3. Results

3.1. Identification of the *lasso (pin2-2)* mutant

A mutant was identified by screening an activation tagging population (Weigel et al., 2000) looking for plants with a skewed root in response to salt stress. This mutant displayed a curled primary root in half MS medium (MS/2) and in presence of NaCl (Fig. S1A). It was named *lasso* to describe the coiling of its root like a rope (Fig. 2A). Further gravistimulation experiments were performed on regular half MS medium supplemented with NaCl or sorbitol to understand how root coiling was impacted. Wild-type Col-0 plants displayed a fully functional response to gravity in all conditions whereas the *lasso* mutant root was agravitropic on MS/2 medium, supplemented or not with NaCl. Intriguingly, gravity response of the mutant was partially restored when grown on MS/2 supplemented with sorbitol (Fig. S1B). No activation tagging T-DNA was found to co-segregate with the *lasso* phenotype.

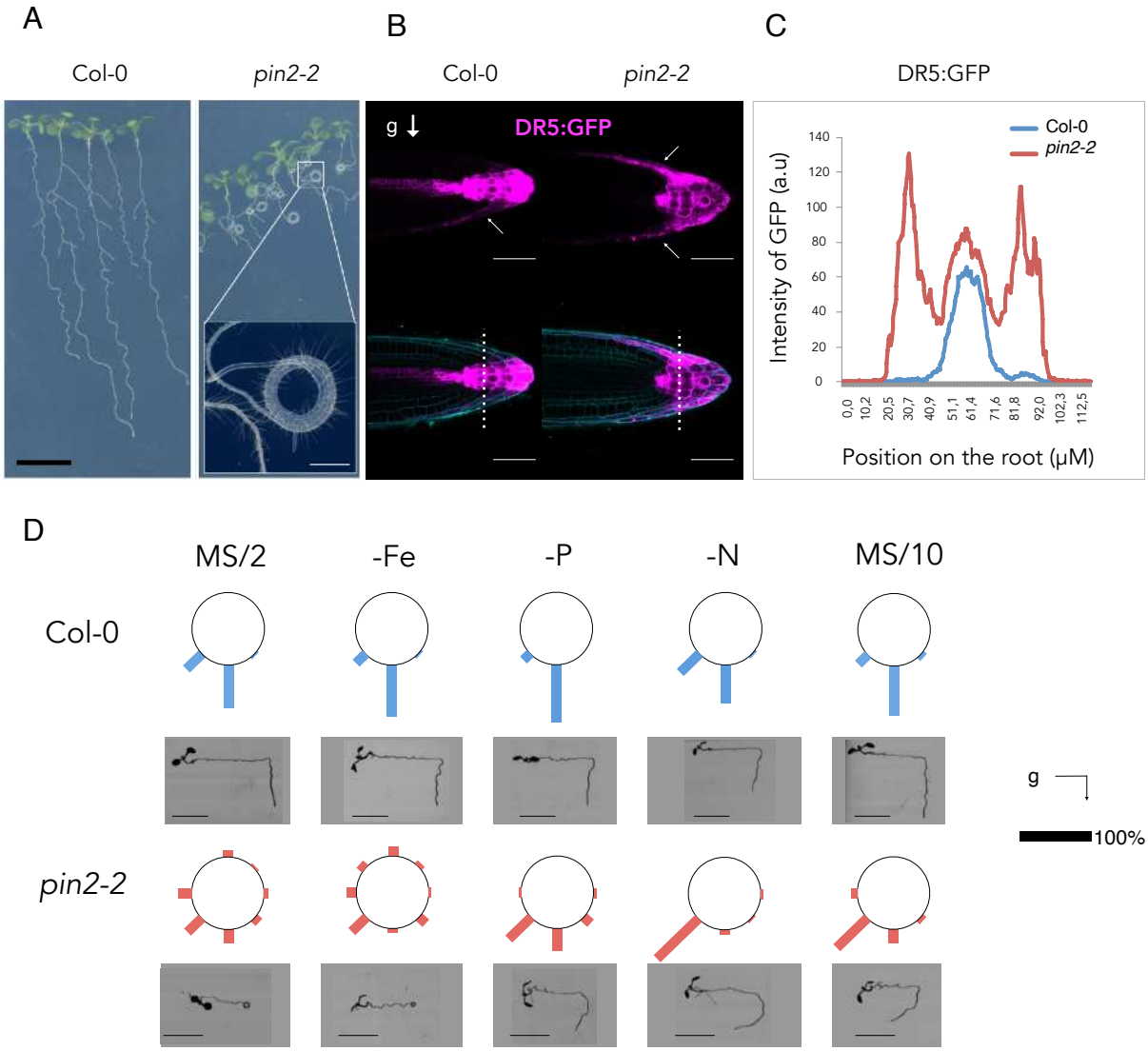


Figure 2. The agravitropic root growth phenotype of *pin2-2* is conditional and nutrient-sensitive

(A) Agravitropic root phenotype of the *pin2-2* mutant allele **(**11-day-old seedlings grown on MS/2 medium). Inlay: zoom in on the "*lasso*" root coil. Black scale bar = 1 cm, white scale bars = 1mm. **(B)** Representative confocal images of the root apex stained with propidium iodide (cyan) of DR5-GFP expressing plants (fuchsia). White arrows indicate auxin accumulation in the lateral root cap. Dotted white lines indicate the position where GFP intensity was measured. Seedlings were grown vertically for 6 days and then transferred horizontally for 4 h on an MS/2 medium. g: gravity vector, scale bar = 50 microns. **(C)** DR5-GFP intensity was quantified with the Plot ImageJ profile and displayed along the position of the root, 16<n<20 **(D)** Gravitropic response of wild-type (Col-0) and *pin2-2* mutants. 6-day-old seedlings were grown on vertical plates then rotated 90° and imaged after 48 hours. Circular diagrams display the primary root apex orientation as colored bars representing the percentage of plants. n=30, scale bar = 1cm.

Instead, bulk sequencing of F2 *lasso* mutants from a wild-type backcross identified a deletion/insertion event in *PIN2* (AT5G57090). A 30bp deletion from C_{638} to A_{668} is replaced by a 19bp insertion (TAACTCCTCCATGATAACG) creating a stop codon in the third exon (Fig. S1C). Introgression of the *proPIN2:PIN2-GFP* construct into the *pin2-2* genetic background fully reverted the agravitropic root phenotype, further confirming the identification of the causal mutation (Fig. S1D). The *lasso* mutant was subsequently renamed *pin2-2* and was shown to also display a 30% reduction in primary root length (Fig. S2A) like previously described *pin2* alleles. Similarly to known *pin2* alleles (Ottenschlager et al., 2003), an accumulation of the auxin reporter DR5-GFP was observed in the root tip (columella and lateral root cap) of the *pin2-2* mutant (Fig. 2B). Upon gravistimulation, a lack of asymmetry in auxin distribution was observed in the *pin2-2* background, compared to wild-type where auxin signal asymmetry is measurable in the lateral root cap (Fig. 2C).

3.2. *pin2* agravitropic root phenotype is conditional and nutrient-sensitive

Since *pin2-2* displays sensitivity to the composition of the medium, we tested whether osmolarity impacts root gravity response in *pin2-2*. Polyethylene glycol (PEG), a non-metabolized polymer, was used to alter osmolarity in the medium. It was previously demonstrated that root growth is increased at 100 g/L of PEG and inhibited at 250 g/L of PEG (Rosales et al., 2019). We therefore used both concentrations to dissociate root growth effects from osmolarity. Position of the root apex was monitored 48h after a 90° reorientation of the vertical plates and grouped into 8 angular sections (Swarup et al., 2004). Wild-type seedlings displayed a normal response to gravity in all conditions tested and the *pin2-2* mutant displayed a strong agravitropic phenotype in all conditions tested (Fig. S1E). Increasing osmotic pressure did not revert the agravitropic phenotype of *pin2-2* mutant suggesting that osmolarity alone does not represent a permissive condition.

In order to determine which nutrient alters *pin2-2* phenotype, we tested the impact of deficiency in three major nutrients, nitrogen (MS/2-N), phosphorus (MS/2-P) and iron (MS/2-Fe). A global dilution of the culture medium was also tested by comparing half MS (MS/2) to one-tenth MS (MS/10). In all conditions tested, wild-type (Col-0) plants responded to gravity (Fig. 2D). The *pin2-2* mutant showed an agravitropic root growth on MS/2 and MS/2-Fe medium, thus defining restrictive conditions. However, when grown on MS/2-P, MS/2-N and MS/10 media the *pin2-2* mutant partially reverted to a wild-type gravitropic response, defining permissive conditions. It is worth noting that although the phenotype difference is unambiguous between the 2 conditions, the response to gravity in permissive conditions is not exactly as total as wild-type. Indeed, the root apex is orientated mostly in sector 6 for *pin2-2* compared to sectors 5 and 6 for wild-type (Fig. 2D). Also, the primary root of the *pin2-*

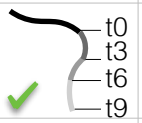
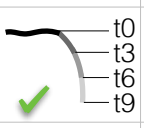
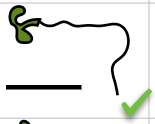
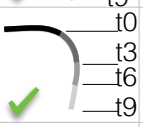
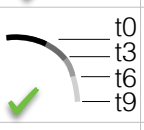
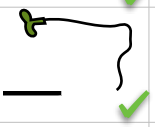
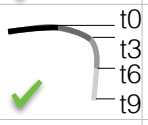
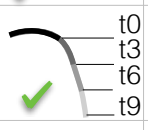
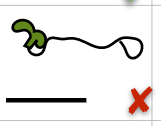
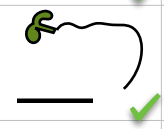
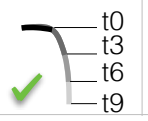
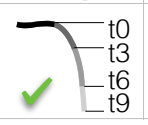
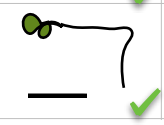
	Early gravitropism (9h)		Gravitropism (48h)		Growth (mm/24h)				
	restrictive conditions	permissive conditions	restrictive conditions	permissive conditions	restrictive conditions		permissive conditions		
	MS/2 , -Fe	-P , -N , MS/10	MS/2 , -Fe	-P , -N , MS/10	MS/2	- Fe	-P	-N	MS/10
Col-0					7,6 +/- 0,03	4,5 +/- 0,05	1,5 +/- 0,02	2,4 +/- 0,03	8,2 +/- 0,03
pin1					6,5 +/- 0,02	4,3 +/- 0,03	0,4 +/- 0,02	1,8 +/- 0,02	6,5 +/- 0,02
pin2					4,5 +/- 0,02	2,9 +/- 0,04	0,6 +/- 0,03	1,2 +/- 0,02	4,2 +/- 0,02
pin3					5,4 +/- 0,02	3,3 +/- 0,04	0,8 +/- 0,02	0,8 +/- 0,02	5,8 +/- 0,03

Table 1. Gravitropic response and growth rate of *pin1*, *pin2* and *pin3* in permissive and restrictive conditions

Summarized table of *pin1*, *pin2-2* and *pin3* early and late gravitropic response and root growth. Early gravitropism: 6-day-old seedlings were subjected to a 90° gravitropic stimulus and imaged at 3, 6 and 9 hours. Representative image of data presented in Figure S4. Gravitropism: 6-day-old seedlings were subjected to a 90° gravitropic stimulus and imaged after 48h. Representative image of data presented in Figure S3. Growth: primary root growth of 6-day-old seedlings was monitored for 24 hours (n=20) and expressed as the average +/- standard error in mm per day. Representative graph of data presented in Figure S5. Green ticks indicate gravity response while a red cross indicates an agravitropic response. Scale bar = 1cm.

2 mutant shows a slight curvature whereas that of the wild-type plants is perfectly straight (Fig. 2D). This conditional phenotype was tested on the available allelic series of *pin2* mutants: *eir1-1*, *eir1-4* and a T-DNA mutant from SALK (*SALK_122916*). All *pin2* alleles tested showed a conditional agravitropic root phenotype with identical permissive and restrictive conditions (Fig. S2B,C). These results confirm that the *pin2* mutant agravitropic root phenotype is conditional and nutrient-sensitive.

3.3. Conditional *pin2* phenotype does not result from defects in growth or early gravitropism and is not observed in *pin1* and *pin3*

We tested whether mutants in the main PIN transporters expressed in the root tip could share a similar conditional root gravitropic phenotype as *pin2* (Table 1). PIN1 controls the main auxin flow to the root tip and PIN3 has been shown to relocalize auxin upon gravistimulation in the columella cells (Omelyanchuk et al., 2016; Friml et al., 2002). In both permissive and restrictive conditions, we observed a wild-type gravitropic response of *pin1* and *pin3,* 48 hours after induction (Fig. S3). We next tested the very early gravitropic response (up to 9 hours) and whether growth defects could be linked with the conditional phenotype of *pin2*. The kinetics of root curvature were monitored 0, 3, 6 and 9 h after gravistimulation (Fig. S4). All mutants tested (*pin1*, *pin2* and *pin3*) showed a root bending response similar to wild-type (Table 1) demonstrating that the early gravitropic response was not altered in any of the 3 *pin* mutants. Growth rate was evaluated over 24 hours post-gravitropic induction and showed a global reduction of root growth for all *pin* mutants tested (Fig. S5). However, no correlation with permissive and restrictive conditions were observed, suggesting that root growth alteration is not responsible for the phenotypic expression and reversion of *pin2* (Table 1). These results suggest that *pin2*, but not *pin1* or *pin3*, display a conditional agravitropic root phenotype that does not involve early gravitropic response or root growth defects.

3.4. Auxin accumulation is modulated by nutrient availability

The late auxin response marker DR5 fused to GFP (Ulmasov et al., 1997) was used to monitor auxin accumulation in the root tip 4 hours after plant gravistimulation. Permissive conditions (MS/10, MS/2-P and MS/2-N) had no effect on the wild-type auxin profile but resulted in a global reduction of the intensity of DR5-GFP both in the central zone and in the lateral root cap of *pin2* compared to restrictive conditions (MS/2 and MS/2-Fe) (Fig. S6). However, no asymmetric accumulation could be revealed using this marker in the mutant plant whereas it was observed in the wild-type plants in both conditions, suggesting either

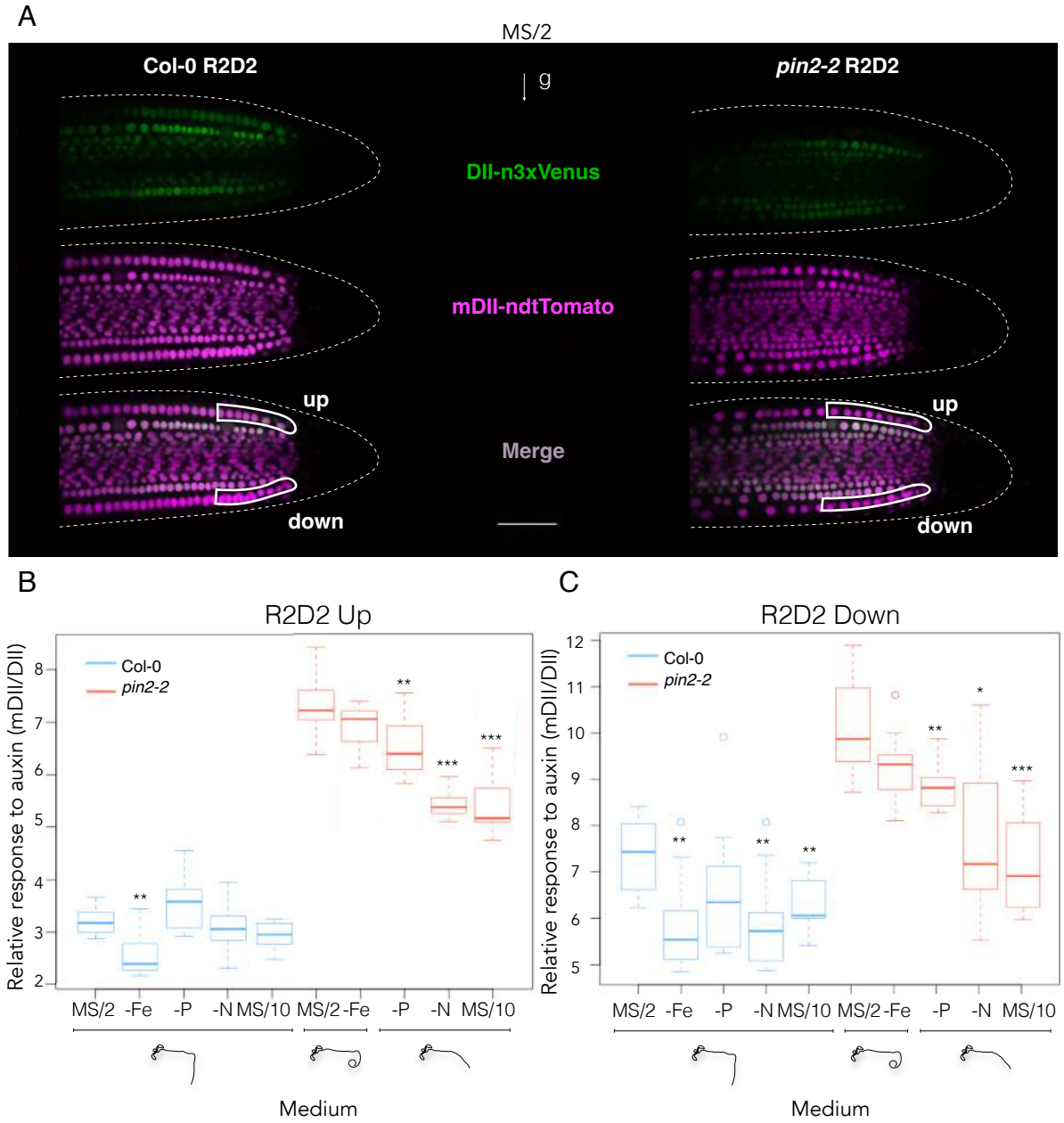


Figure 3. Auxin accumulation is modulated by nutrient availability

(A) Representative confocal image of the ratiometric sensor R2D2 showing DII-n3xVenus (green) and mDII-ndtTomato (purple) signals. White areas represent the first 9 epidermal cells chosen for quantification. 6-day-old seedlings were imaged on a microscopy slide with a block of MS/2 medium 1h30 after gravistimulation. g = gravity vector, scale bar = 50 microns **(B,C)** Quantification of the mDII/DII ratio in the first 9 epidermal cells in the up or down part of the root tip 1h30 after gravistimulus in wild-type (Col-0) and *pin2-2* in various media (MS/2, MS/10, MS/2-P, MS/2-N, MS/2-Fe). The p-values are based on Student's t-tests for a pairwise comparison relative to reference medium (MS/2) $p<0.0001$ (***), $p<0.001$ (**), and $p<0.05$ (*), n=15, error bars represent standard deviation.

that auxin asymmetry is not restored in the *pin2-2* mutant in permissive conditions or that DR5 is not a dynamic enough marker to monitor such changes.

We therefore used the ratiometric version of the DII marker (R2D2) to observe dynamic changes in auxin response as the degron (DII) motif of Aux/IAA is degraded upon auxin application within minutes (Liao et al., 2015). We were able to monitor auxin changes 90 minutes after plant gravistimulation (Fig. 3A,S7A). Data are presented as the mDII/DII (modified non-degraded DII to DII) ratio therefore showing an increase in ratio when more auxin response is occurring and DII is degraded (Fig. 3B,C). Wild-type (Col-0) plants displayed an increased auxin response on the lower epidermal layer (first nine epidermal cells) compared to the upper side (Fig. 3B,C). Some medium compositions slightly altered the auxin response levels in the wild-type plants. Indeed, conditions MS/2-Fe globally reduced both upper and lower auxin response whereas conditions MS/2-N and MS/10 reduced only auxin response in the lower side. These reductions were not associated with any root gravitropic defects. In the *pin2-2* mutant background, auxin signals were also reduced depending on the conditions. Only permissive conditions were associated with a reduction on the auxin response both in the upper and lower epidermal cell files (first nine epidermal cells). In this case, reduction of the mDII/DII ratio was associated with the phenotypic reversion of the root gravitropic response in *pin2-2*. However, this change in auxin response was not associated with a strong reduction of the up to down ratio demonstrating that auxin levels in the *pin2-2* mutant remain high compared to wild-type plants (Fig. S7B). Altogether, these results suggest that a reduction of the auxin signal in the *pin2-2* elevated auxin background would be responsible for the phenotypic reversion.

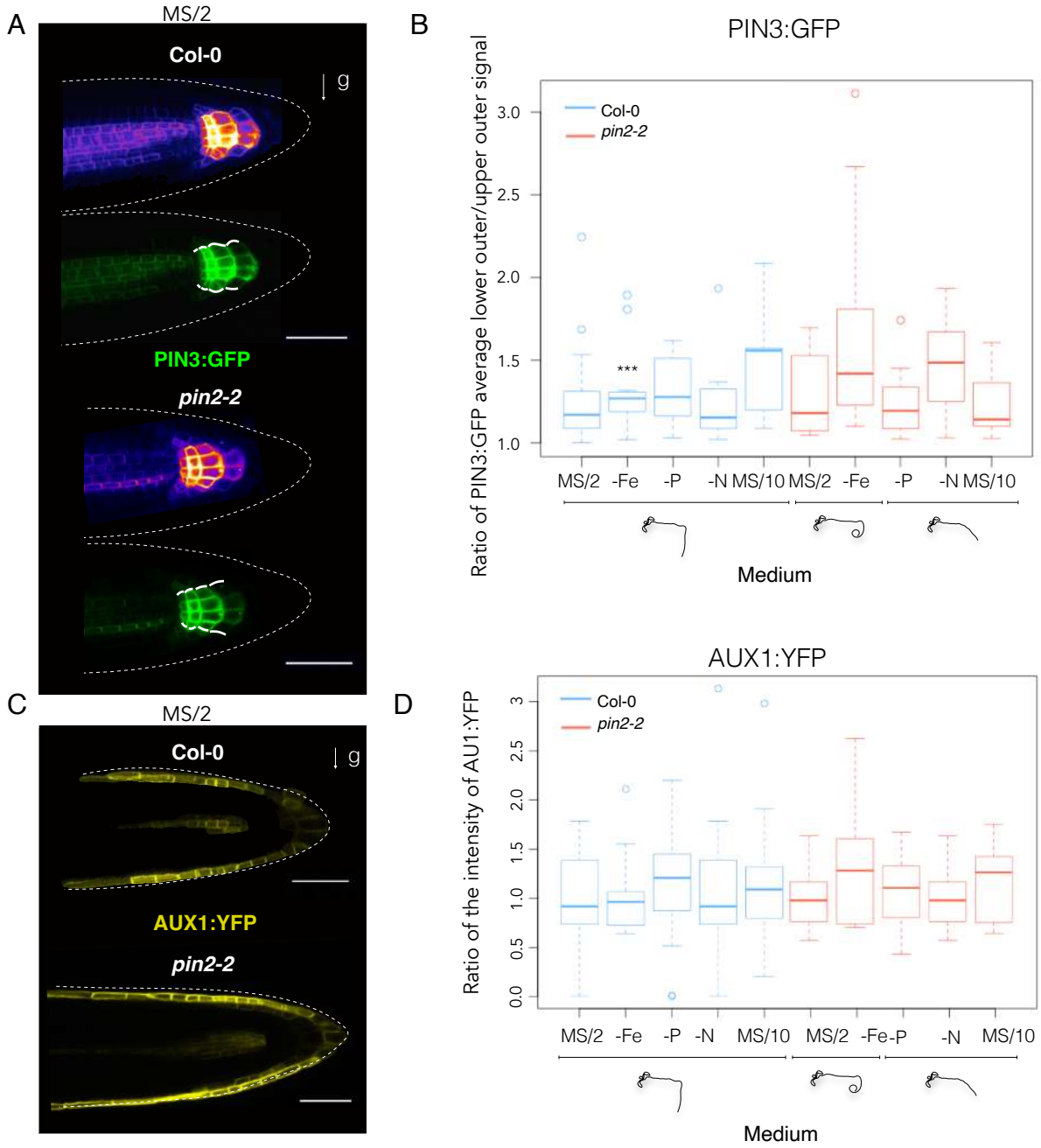


Figure 4. Localization of PIN3 and AUX1 proteins is not altered in the *pin2* mutant background in various growth medium

(A) Representative confocal image of PIN3:GFP. 6-day-old seedlings were transferred on a horizontal microscopy slide with a block of MS/2 medium and imaged 30 min after gravistimulation. White lines represent the position where GFP intensity was measured. g = gravity vector, scale bar = 50 microns **(B)** Graph representing PIN3:GFP average lower outer/upper outer signal ratio after 30min of gravitropism of Col-0 and *pin2-2* in response to different media (MS/2, MS/10, MS/2-P, MS/2-N, MS/2-Fe). The p-values are based on Student's t-tests and the comparison is made for each genotype in MS/2 compared to the different media tested P <0.0001 (***), P <0.001 (**), and P <0.05 (*), n=15, error bars represent standard deviation **(C)** Representative confocal image of AUX1:YFP. 6-day-old seedlings were transferred on a horizontal microscopy slide with a block of MS/2 medium and imaged 90 min after gravistimulation. g = gravity vector, scale bar = 50 micron **(D)** Graph representing the intensity of AUX1:YFP on the lower and upper face of the root in response to 1h30 of gravitropism of Col-0 and *pin2-2* in response to different media (MS/2, MS/10, MS/2-P, MS/2-N, MS/2-Fe). The p-values are based on Student's t-tests and the comparison is made for each genotype in MS/2 compared to the different media tested p<0.0001 (***), p<0.001 (**), and p<0.05 (*), n=15, error bars represent standard deviation.

3.5. PIN3 and AUX1 protein accumulation is not altered in *pin2*

In order to identify a molecular mechanism responsible for the changes in auxin response in various nutrient conditions, we monitored the expression of the PIN3 and AUX1 proteins, two key players of the root gravitropic response in plants (Friml et al., 2002; Grones et al., 2018). The PIN3:GFP reporter line was used to monitor PIN3, which is localized to the plasma membrane in the columella and known for its rapid relocation following gravistimulation. In both the wild-type (Col-0) and *pin2-2* backgrounds, observation of PIN3-GFP after 30 minutes of gravistimulation (Fig. 4A,S8) showed a greater accumulation on the lower side independently of the medium composition used (Fig. 4B). We next used the AUX1:YFP reporter line to monitor AUX1 accumulation, an auxin influx transporter localized in the lateral root cap and epidermis whose expression mediates auxin transport from the root cap towards the epidermal cells during the gravitropic response (Bennet et al., 1996 ; Swarup et al., 2001). Observation of AUX1-YFP in both the wild-type (Col-0) and *pin2-2* backgrounds after 1h30 of gravistimulation (Fig. 4C,S9A) showed no changes in localization pattern. The measure up to down ratio was close to 1, suggesting the absence of asymmetric distribution of AUX1 (Fig. 4D). Medium composition still had an impact on AUX1:YFP intensity without affecting this ratio (Fig. S9B). These results show that the symmetry of AUX1 and PIN3 protein accumulation profiles is not affected by either the *pin2-2* mutation or changes in medium composition, and likely do not play a role in the conditional reversion of the *pin2* phenotype.

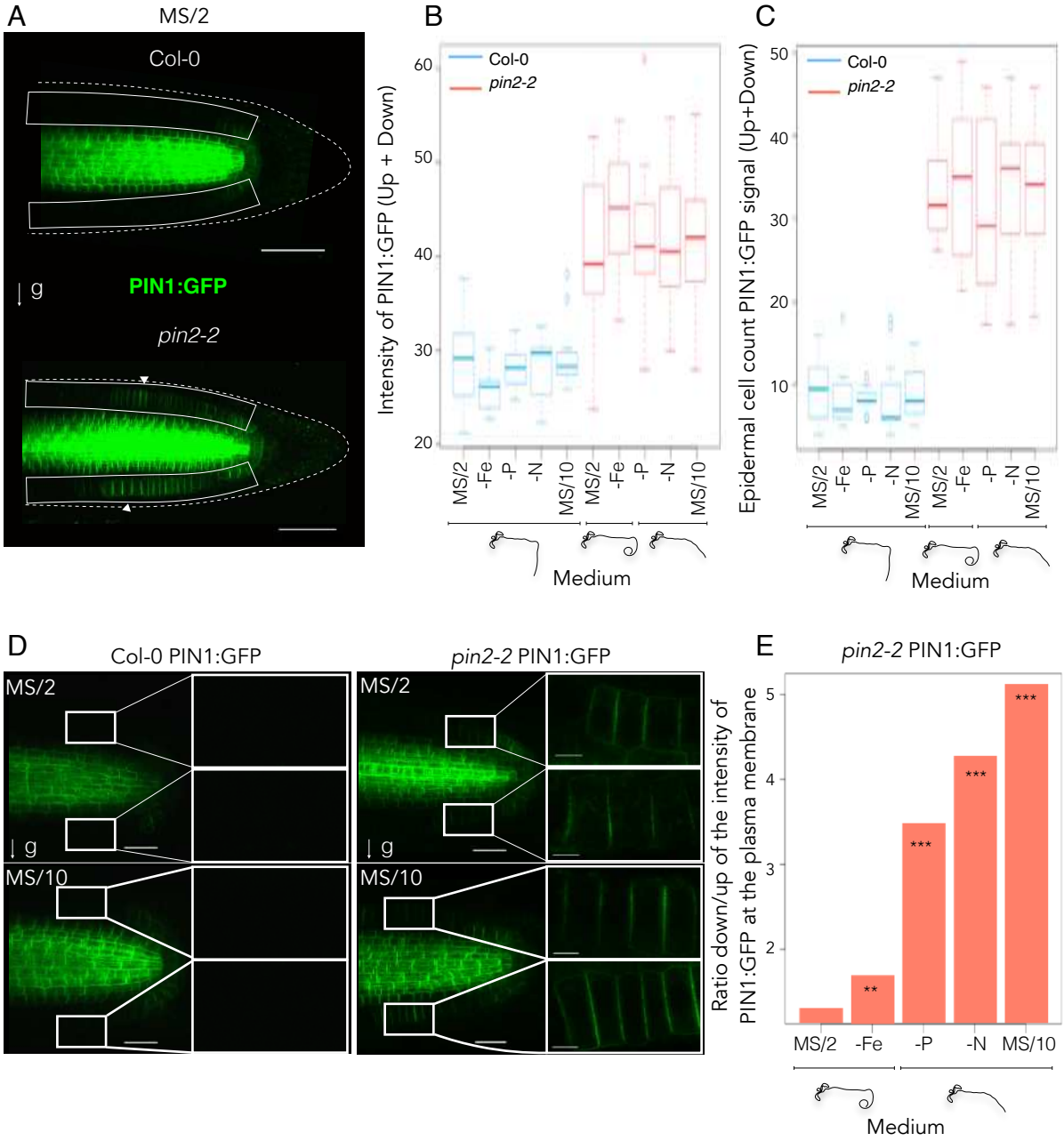


Figure 5. PIN1 is present in the epidermis in the *pin2* mutant background and is modulated by nutrient availability

(A) Representative confocal image of PIN1:GFP in Col-0 and *pin2-2*. 6-day-old seedlings were transferred on a horizontal microscopy slide with a block of MS/2 medium and imaged 1h after gravistimulation. White squares represent the position where GFP intensity was measured. g = gravity vector, scale bar = 50 micron. **(B)** Graph representing the mean of intensity of PIN1:GFP up + down in response to 1h of gravitropism in Col-0 and *pin2-2* in response to different media (MS/2, MS/10, MS/2-P, MS/2-N, MS/2-Fe). The p-values are based on Student's t-tests and the comparison is made for each genotype in MS/2 compared to the different media tested P <0.001 (b), and P <0.05 (a), n=15, error bars represent standard deviation. **(C)** Graph representing the epidermal cell count with PIN1:GFP signal (up+down) in response to 1h of gravitropism in Col-0 and *pin2-2* in response to different media. The p-values are based on Student's t-tests and the comparison is made for each genotype in MS/2 compared to the different media tested P <0.0001 (c), P <0.001 (b), and P <0.05 (a), n=15, error bars represent standard deviation. **(D)** Representative confocal image of PIN1:GFP in Col-0 and *pin2-2*. 6-day-old seedlings were transferred on a horizontal microscopy slide with a block of MS/2 medium and imaged 1h after gravistimulation. White squares represent a zoom of up and down epidermis. g = gravity vector, scale bar = 20 micron and scale bar in the zoom = 5 micron. **(E)** Graph representing the ratio down/up of the intensity of PIN1:GFP at the plasma membrane in response to 1h of gravitropism in Col-0 and *pin2-2* in response to different media. The p-values are based on Student's t-tests and the comparison is made for each genotype in MS/2 compared to the different media tested P <0.0001 (***), P <0.001 (**), and P <0.05 (*), 10<n<16

3.6. Ectopic expression of PIN1 in the epidermis is associated with the phenotypic reversion of *pin2*

We next monitored the localisation of PIN1 using the PIN1-GFP reporter line (Huang et al., 2010). The auxin efflux transporter is present in the basal plasma membrane in the stele cells where it directs auxin transport to the apex (Omelyanchuk et al., 2016). Expression of PIN1-GFP was observed 1 hour after gravistimulation. A decrease in the presence of PIN1 in the stele was observed on MS/2-Fe, MS/2-P, MS/2-N, MS/10 in wild-type plants (Fig. S10A,B). There was a reduction in PIN1 accumulation in the stele in *pin2-2* compared to Col-0 but because auxin levels remain high in the *pin2-2* columella (Fig. 2B), this suggests that this reduction has no impact on auxin accumulation in the tip.

Previous reports have shown that ectopic expression of PIN1 can be seen in the epidermal cells in the *pin2* mutant background (Vieten et al., 2005). We therefore monitored PIN1 protein localization in the epidermis and found that there is no accumulation in wild-type plants in this tissue that could be detected by laser scanning confocal microscopy (Fig. 5A,S10C). Quantification therefore provided a background noise level to which other conditions were compared (Fig. 5B,C). In the *pin2-2* mutant background, in all condition tested, the signal of epidermal PIN1-GFP was systematically detected (Fig. 5B) and the number of cells with a positive GFP signal was between 30 and 40 compared to less than 10 in wild-type (equivalent to noise level – Fig. 5C). Using higher magnification, we were able to confirm PIN1-GFP signal at the membrane of epidermal cells in the *pin2-2* mutant only (Fig. 5D). Quantification of this signal revealed that PIN1-GFP is expressed almost symmetrically in restrictive conditions (MS/2 and MS/2-Fe) with a ratio of 1 to 1.5 and a strong asymmetry is established in permissive conditions (MS/2-P, MS/2-N and MS/10) with a ratio value ranging from 3 to 5 (Fig. 5E). These observations demonstrate that nutrient composition can alter PIN1 protein accumulation in the *pin2* mutant background, associated with a restoration of the root gravitropic response.

4. Discussion

4.1. PIN proteins play a complex and redundant role in physiology and development

Despite being a well-characterized family of proteins, PINs still keep secrets regarding their mode of action. Recently, the structures and mechanisms of PIN1, PIN3 and PIN8 were reported (Yang et al., 2022; Su et al., 2022, Ung et al., 2022) but how their biochemical activity is further integrated in a complex multicellular organism, largely controlled by direct environmental interactions remains poorly understood. The early identification of *pin* mutants led to the description of major developmental events controlled by this redundant family of genes and to a better understanding of the underlying role of the major phytohormone auxin (reviewed by Krecek et al, 2009; Sauer and Kleine-Vehn, 2019). Surprisingly, the *pin2*

mutant phenotype has suffered a lack of detailed description at the root level and has certainly come across as a weak gravitropic mutant due to the heterogeneity of observations, as reflected in the literature and summarized in Figure 1.

4.2. The *pin2* mutant lacks the ability to establish asymmetric auxin response…

Here, we report that *pin2* root agravitropic phenotype is conditional and nutrient-sensitive, providing an explanation for previous observations. Our study pinpoints that the wide heterogeneity of growth conditions used in the many laboratories involved (nutrients but also light intensity, temperature, photoperiod etc…) strongly affects conclusions about the role of given protein/gene families. In the case of *pin2*, we demonstrate that early response to gravity is intact (Table 1). However, *pin2* roots coil like a lasso in restrictive conditions after this brief period of gravitropic primary root growth (Fig. 1B,2A). The intensive coiling of this mutant suggests a loss of the ability to establish asymmetric auxin flows and probably also to return to a symmetric repartition. Indeed, it is well known that *pin2* accumulates auxin at the root tip (Ottenschläger et al., 2003) due to the lack of transport back towards the epidermis, where it is normally expressed (Blilou et al., 2005). This overaccumulation of auxin triggers events that are unique amongst other agravitropic mutants such as *aux1*. Indeed, the *aux1* mutant root is agravitropic from germination onward. This is due to the lack of auxin transport from the lateral root cap towards the epidermis (Swarup et al., 2005), however no overaccumulation of auxin is present in the root tip suggesting that the rapidity of auxin redistribution rather than its actual long-term transport is responsible for the agravitropic phenotype. In the present study, we found that AUX1 protein accumulation profile was not altered in the *pin2* mutant background suggesting that this protein does not contribute to the conditionality of the phenotype. The high levels of auxin in the *pin2* mutant apex most likely prevent the action of other PIN transporters (such as PIN3) to promote asymmetric redistribution of auxin. In the first few days of *pin2* mutant growth, plants still manage to grow along the gravity vector, probably due to the time it takes to build up the auxin accumulation in the apex. Then the primary root starts to coil continuously.

4.3. …but nutrients can revert *pin2* phenotype by modulating auxin fluxes

The reversibility of *pin2* root phenotype suggests that environmental conditions can modify auxin fluxes within the plant. It has been reported previously that nutrients can alter the gravitropic response of plants. Indeed, studies on the effect of nitrate on primary root coiling have shown that *pin2* mutants are less sensitive to nitrate-induced coiling (Chai et al., 2020). Since these experiments were performed on horizontal plates, they encompass both gravitropic and thigmotropic responses, and their effect in the longer term. This study nevertheless suggests a link between gravitropism and nutrient availability.

This result is reminiscent of the ability of the nitrate transporter NRT1.1 to transport auxin competitively, providing an explanation for the lateral root growth phenotype of the *chl1/nrt1.1* mutant (Krouk et al., 2010). Here, we observed the ectopic expression of PIN1 in the epidermal cells in the *pin2* mutant background as reported previously (Vieten et al., 2005) and seen in the wild-type background upon application of aluminium or flavonols (Li et al., 2021; Santelia et al. al., 2008). Interestingly, the asymmetric distribution of PIN1 in this tissue remains at a ratio value close to 1-1.5 in restrictive conditions. However, in permissive conditions, this up-to-down ratio is higher (3 to 5) suggesting that the subsequent restoration of asymmetric auxin fluxes would be responsible for the phenotypic change. Although PIN1 accumulation in the apical membrane of the epidermal cells is always at least slightly asymmetric, we suggest the existence of a threshold value below which no phenotypic restoration occurs (in restrictive conditions) and above which agravitropic restoration happens (in permissive conditions). This ratio threshold is situated between 2 and 3. Subsequent studies should further define how changes in nutrient composition can modulate PIN1 expression in a direct or indirect manner. In this study, we limited the analysis to major nutrients such as nitrate, phosphate and iron because they are major elements regulating root growth and development (Xuan et al., 2017; Liu 2021; Liang 2022). We defined permissive conditions based on a widely used medium, which is the half-diluted Murashige and Skoog medium but virtually infinite modulations of medium composition could be tested.

Since both nitrate and phosphate starvations, as well as one tenth diluted MS, define permissive conditions, we did not investigate the downstream pathways of particular elements. Numerous regulators have been identified as regulators of starvation response to nitrate (Kiba et al., 2018) and phosphate (Rouached et al., 2010) and even common elements are known (Ristova and Kopriva, 2022). However, no molecular link has been shown between these pathways and PIN1 expression in the root epidermis. Further studies should provide more information towards this goal. These would help understand how gravitropism is modulated by nutrients in the *pin2* mutant.

Indeed, our observations show that the phenotypic change only occurs in the mutant background, pinpointing the need for the ectopic expression of PIN1 in this context for a plant root facing an heterogeneous soil. This observation fits with known characteristics of the PIN gene family. Indeed, PIN genes are known to show strong redundancy and changes in expression based on auxin induction (Vieten et al., 2005). Moreover, our results show that in the wild-type plants, nutrients have a measurable impact on auxin response (using R2D2 reporter) that could be the basis for a fine modulation of root gravitropism in soil where numerous factors can be altered simultaneously (nutrients, physical contact, water…). These observations suggest that the relation between root tropisms and nutrients, but also water and physical stress should be further investigated.

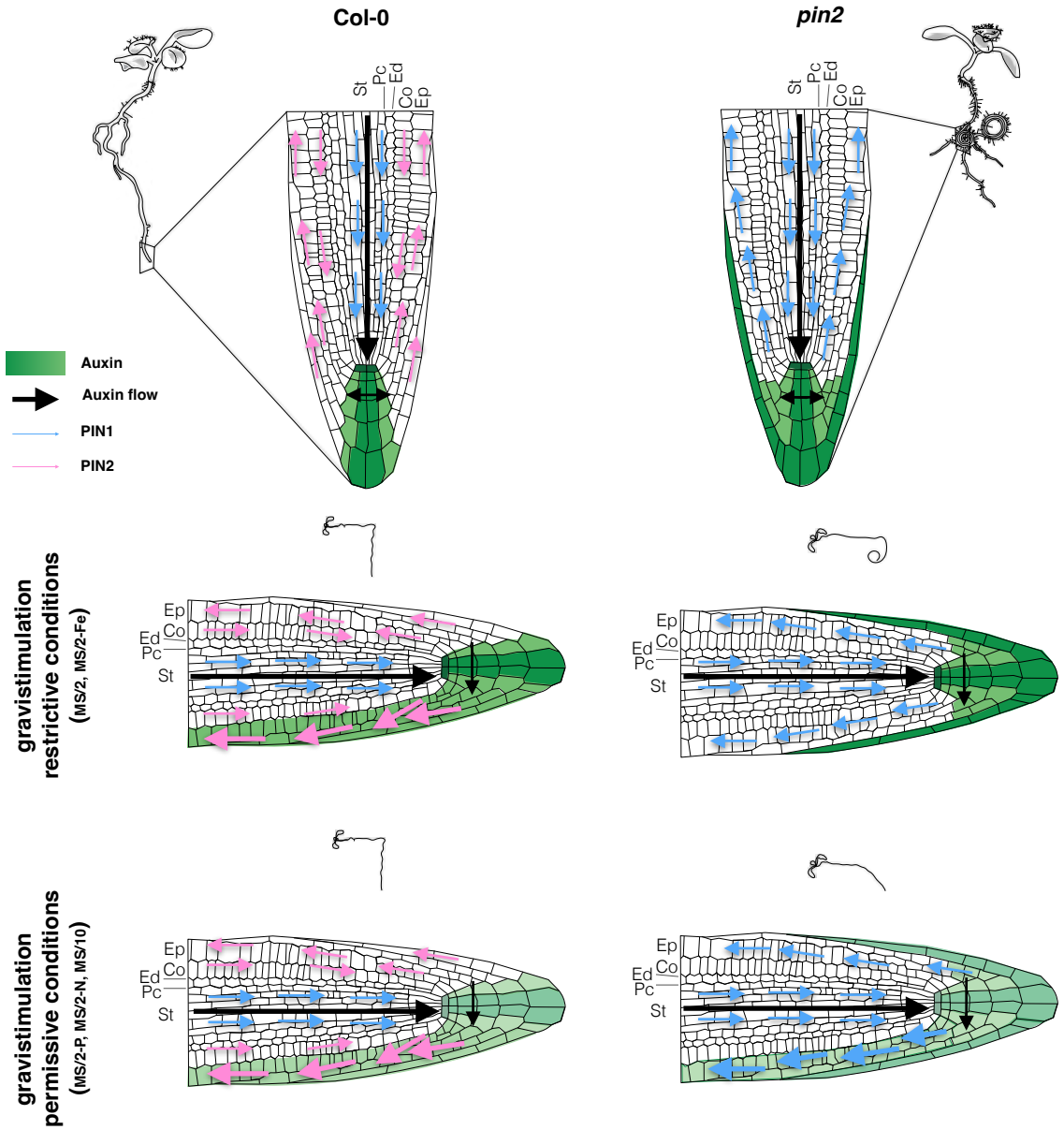


Figure 6. A model for *pin2* conditional agravitropic root phenotype

Proposed model explaining how epidermal ectopic expression of *PIN1* in the *pin2* mutant in permissive conditions re-establishes asymmetrical auxin fluxes. In the wild-type (Col-0) background, PIN2 protein localization in the epidermis drives auxin fluxes and promotes asymmetrical distribution after a gravistimulus in all conditions tested in this study (restrictive and permissive conditions). In the *pin2* mutants, PIN1 ectopic expression in the epidermis is observed in all conditions tested. In permissive conditions, PIN1 up-to-down ratio reaches a threshold value and restores an asymmetric auxin flux that is responsible for the gravitropic response. This mechanism is absent in restrictive conditions where *pin2* root still grows agravitropically and forms a lasso shape.

5. Conclusion

In this study, we provide evidence for a conditional phenotype of the *pin2* mutant and a link between nutrients and auxin transport/response (Fig. 6). Modulation of auxin transport through differential PIN expression in various environmental conditions alters root gravitropic response and suggests that this tropic response has been under strong selective pressure to promote a fine-tuning of soil exploration. Interestingly, the rice mutant in *PIN2*, *Ospin2,* as well as that of *AUX1*, *Osaux1* are not totally agravitropic, but instead display a root growth angle defect (Inahashia et al., 2018, Giri et al., 2018). This suggests that defining root growth angle by modulating the gravitropic response can be controlled both genetically and environmentally. These observations open the way to improving root exploration in crops for a better use of resources.

Funding

This research was supported by Institut Agro Montpellier and the GAIA doctoral school via a doctoral grant.

Credit authorship contribution statement

BP, FD, and MaT contributed to conception and design of the study. MaT, FD, CO performed the acquisition, analysis and interpretation of data. AC and PN were in charge of creating and maintaining the phenotyping platform for dynamic root growth analysis. AS and FD analyzed the sequencing of the *lasso* mutant. MeT and EH contributed to the initial forward genetics screen to discover the new *lasso* mutant. BP and MaT wrote the article.

Acknowledgments

We also acknowledge Prof. Hidehiro Fukaki (Kobe University, Japan) and Tatsuaki Goh (Nara, Japan) for sharing their *eir1-1* and *eir1-4* seeds. We acknowledge the imaging facility MRI, member of the France-BioImaging infrastructure supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04, “Investments for the future”) and especially Dr Carine Alcon for her valuable comments and technical assistance on microscopy imaging.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

Abas L, Benjamins R, Malenica N, Paciorek T, Wi J, Anzola JCM, Sieberer T, Luschnig C (2006) Intracellular trafficking and proteolysis of the Arabidopsis auxin-e fflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. Nat. Cell Biol. 8:

Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, et al (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. Science (80-) **301**: 653–657

Ashraf MA, Umetsu K, Ponomarenko O, Saito M, Aslam M, Antipova O, Dolgova N, Kiani CD, Nehzati S, Tanoi K, et al (2020) PIN FORMED 2 Modulates the Transport of Arsenite in Arabidopsis thaliana. Plant Commun **1**: 100009

Band LR, Wells DM, Larrieu A, Sun J, Middleton AM, French AP, Brunoud G, Sato EM, Wilson MH, Peřet B, et al (2012) Root gravitropism is regulated by a transient lateral auxin gradient controlled by a tipping-point mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A **109**: 4668–4673

Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jürgens G, Friml J (2003) Local, efflux-dependent a module for plant organ formation. Cell **115**: 591–602

Bennett SRM, Alvarez J, Bossinger G, Smyth DR (1995) Morphogenesis in pinoid mutants of Arabidopsis thaliana. Plant J **8**: 505–520

Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Ok RL, Mravec J, Titapiwatanakun B, Sauer M, Makam SN, Cheng Y, Bouchard R, Adamec J, et al (2007) Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in Arabidopsis. Plant Cell **19**: 131–147

Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K, Scheres B (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. Nature **433**: 39–44

Brunoud G, Wells DM, Oliva M, Larrieu A, Mirabet V, Burrow AH, Beeckman T, Kepinski S, Traas J, Bennett MJ, et al (2012) A novel sensor to map auxin response and distribution at high spatio-temporal resolution. Nature **482**: 103–106

Chai S, Li E, Zhang Y, Li S (2020) NRT1.1-Mediated Nitrate Suppression of Root Coiling Relies on PIN2- and AUX1-Mediated Auxin Transport. Front Plant Sci **11**: 1–12

Chen RJ, Hilson P, Masson PH, Sedbrook J, Rosen E, Caspar T (1998) The Arabidopsis thaliana AGRAVITROPIC 1 gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. Proc Natl Acad Sci U S A **95**: 15112–15117

Fernandez R, Crabos A, Maillard M, Pradal C (2022) High-throughput and automatic structural and developmental root phenotyping on Arabidopsis seedlings. bioRxiv 2022.07.13.499903; doi: https://doi.org/10.1101/2022.07.13.499903

Friml J, Wisniewska J, Benkova E, Mendgen K, Palme K (2002) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in ArabidopsisFriml, Jiří; Wiśniewska, Justyna; Benková, Eva; Mendgen, Kur Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3

516 mediates tropism in Arabidopsis. Lett to Nat **415**: 1–4
517 **Giri J, Bhosale R, Huang G, Pandey BK, Parker H, Zappala S, Yang J, Dievart A,**
518 **Bureau C, Ljung K, et al** (2018) Rice auxin influx carrier OsAUX1 facilitates root hair
519 elongation in response to low external phosphate. Nat Commun **9**: 1–7
520 **Grones P, Abas M, Hajný J, Jones A, Waidmann S, Kleine-Vehn J, Friml J** (2018)
521 PID/WAG-mediated phosphorylation of the Arabidopsis PIN3 auxin transporter
522 mediates polarity switches during gravitropism. Sci Rep **8**: 1–11
523 **Huang F, Zago MK, Abas L, van Marion A, Galván-Ampudia CS, Offringa R** (2010)
524 Phosphorylation of conserved PIN motifs directs Arabidopsis PIN1 polarity and auxin
525 transport. Plant Cell **22**: 1129–1142
526 **Inahashi H, Shelley IJ, Yamauchi T, Nishiuchi S, Takahashi-Nosaka M, Matsunami M,**
527 **Ogawa A, Noda Y, Inukai Y** (2018) OsPIN2, which encodes a member of the auxin
528 efflux carrier proteins, is involved in root elongation growth and lateral root formation
529 patterns via the regulation of auxin distribution in rice. Physiol Plant **164**: 216–225
530 **Dello Ioio R, Nakamura K, Moubayidin L, Perilli S, Taniguchi M, Morita MT, Aoyama T,**
531 **Costantino P, Sabatini S** (2008) A genetic framework for the control of cell division
532 and differentiation in the root meristem. Science (80-) **322**: 1380–1384
533 **Kiba T, Inaba J, Kudo T, Ueda N, Konishi M, Mitsuda N, Takiguchi Y, Kondou Y,**
534 **Yoshizumi T, Ohme-Takagi M, et al** (2018) Repression of nitrogen starvation
535 responses by members of the arabidopsis GARP-type transcription factor NIGT1/HRS1
536 subfamily. Plant Cell **30**: 925–945
537 **Křeček P, Skůpa P, Libus J, Naramoto S, Tejos R, Friml J, Zažímalová E** (2009) Protein
538 family review The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters - Křeček et
539 al. - 2009 - Genome Biology.pdf. GenomeBiology 1–11
540 **Krouk G, Lacombe B, Bielach A, Perrine-Walker F, Malinska K, Mounier E, Hoyerova**
541 **K, Tillard P, Leon S, Ljung K, et al** (2010) Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1
542 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. Dev Cell **18**: 927–937
543 **Li C, Liu G, Geng X, He C, Quan T, Hayashi KI, De Smet I, Robert HS, Ding Z, Yang ZB**
544 (2021) Local regulation of auxin transport in root-apex transition zone mediates
545 aluminium-induced Arabidopsis root-growth inhibition. Plant J **108**: 55–66
546 **Liang G** (2022) Iron uptake, signaling, and sensing in plants. Plant Commun **3**: 100349
547 **Liao CY, Smet W, Brunoud G, Yoshida S, Vernoux T, Weijers D** (2015) Reporters for
548 sensitive and quantitative measurement of auxin response. Nat Methods **12**: 207–210
549 **Liu D** (2021) Root developmental responses to phosphorus nutrition. J Integr Plant Biol **63**:
550 1065–1090
551 **Liu H, Liu B, Chen X, Zhu H, Zou C, Men S** (2018) AUX1 acts upstream of PIN2 in
552 regulating root gravitropism. Biochem Biophys Res Commun **507**: 433–436

Luschnig C, Gaxiola RA, Grisafi P, Fink GR (1998) EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in Arabidopsis thaliana. Genes Dev **12**: 2175–2187

Müller A, Guan C, Gälweiler L, Tänzler P, Huijser P, Marchant P, Parry G, Bennett M, Wisman E, Palme K (1998) AtPIN2 defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control. EMBO J **17**: 6903–6911

Omelyanchuk NA, Kovrizhnykh V V., Oshchepkova EA, Pasternak T, Palme K, Mironova V V. (2016) A detailed expression map of the PIN1 auxin transporter in Arabidopsis thaliana root. BMC Plant Biol **16**: 1–12

Ottenschläger I, Wolff P, Wolverton C, Bhalerao RP, Sandberg G, Ishikawa H, Evans M, Palme K (2003) Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. Proc Natl Acad Sci U S A **100**: 2987–2991

Petrášek J, Mravec J, Bouchard R, Blakeslee JJ, Abas M, Seifertová D, Wiśniewska J, Tadele Z, Kubeš M, Čovanová M, et al (2006) PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. Science (80-) **312**: 914–918

Rahman A, Takahashi M, Shibasaki K, Wu S, Inaba T, Tsurumi S, Baskin TI (2010) Gravitropism of Arabidopsis thaliana Roots Requires the Polarization of PIN2 toward the Root Tip in Meristematic Cortical Cells . Plant Cell **22**: 1762–1776

Retzer K, Akhmanova M, Konstantinova N, Malínská K, Leitner J, Petrášek J, Luschnig C (2019) Brassinosteroid signaling delimits root gravitropism via sorting of the Arabidopsis PIN2 auxin transporter. Nat Commun. doi: 10.1038/s41467-019-13543-1

Retzer K, Lacek J, Skokan R, Del Genio CI, Vosolsobě S, Laňková M, Malínská K, Konstantinova N, Zažímalová E, Napier RM, et al (2017) Evolutionary conserved cysteines function as cis-acting regulators of arabidopsis PIN-FORMED 2 distribution. Int J Mol Sci. doi: 10.3390/ijms18112274

Ristova D, Kopriva S (2022) Sulfur signaling and starvation response in Arabidopsis. iScience **25**: 104242

Rosales MA, Mauel C, Nacry P (2019) Abscisic Acid Coordinates Dose-dependent Developmental and Hydraulic Responses of Roots to Water Deficit. Plant Physiol. doi: 10.1104/pp.18.01546

Rouached H, Arpat AB, Poirier Y (2010) Regulation of phosphate starvation responses in plants: Signaling players and cross-talks. Mol Plant **3**: 288–299

Santelia D, Henrichs S, Vincenzetti V, Sauer M, Bigler L, Klein M, Bailly A, Lee Y, Friml J, Geisler M, et al (2008) Flavonoids redirect PIN-mediated polar auxin fluxes during root gravitropic responses. J Biol Chem **283**: 31218–31226

Sato EM, Hijazi H, Bennett MJ, Vissenberg K, Swarup R (2015) New insights into root gravitropic signalling. J Exp Bot **66**: 2155–2165

Sauer M, Kleine-Vehn J (2019) PIN-FORMED and PIN-LIKES auxin transport facilitators. Dev. doi: 10.1242/dev.168088

Singh M, Gupta A, Laxmi A (2017) Striking the Right Chord: Signaling Enigma during Root Gravitropism. Front Plant Sci **8**: 1–17

Su N, Zhu A, Tao X, Ding ZJ, Chang S, Ye F, Zhang Y, Zhao C, Chen Q, Wang J, et al (2022) Structures and mechanisms of the Arabidopsis auxin transporter PIN3. Nature. doi: 10.1038/s41586-022-05142-w

Swarup R, Kargul J, Marchant A, Zadik D, Rahman A, Mills R, Yemm A, May S, Williams L, Millner P, et al (2004) Structure-function analysis of the presumptive Arabidopsis auxin permease AUX1. Plant Cell **16**: 3069–3083

Swarup R, Kramer EM, Perry P, Knox K, Leyser HMO, Haseloff J, Beemster GTS, Bhalerao R, Bennett MJ (2005) Root gravitropism requires lateral root cap and epidermal cells for transport and response to a mobile auxin signal. Nat Cell Biol **7**: 1057–1065

Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle T (1997) Creation of a Highly Active Synthetic AuxRE. Society **9**: 1963–1971

Ung KL, Winkler M, Schulz L, Kolb M, Janacek DP, Dedic E, Stokes DL, Hammes UZ, Pedersen BP (2022) Structures and mechanism of the plant PIN-FORMED auxin transporter. Nature. doi: 10.1038/s41586-022-04883-y

Utsuno K, Shikanai T, Yamada Y, Hashimoto T (1998) AGR, an Agravitropic locus of Arabidopsis thaliana, encodes a novel membrane-protein family member. Plant Cell Physiol **39**: 1111–1118

Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu JK (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. Plant J **45**: 523–539

Vieten A, Vanneste S, Wiśniewska J, Benková E, Benjamins R, Beeckman T, Luschnig C, Friml J (2005) Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. Development **132**: 4521–4531

Wu Y, Chang Y, Luo L, Tian W, Gong Q, Liu X (2022) Abscisic acid employs NRP-dependent PIN2 vacuolar degradation to suppress auxin-mediated primary root elongation in Arabidopsis. New Phytol **233**: 297–312

Xuan W, Beeckman T, Xu G (2017) Plant nitrogen nutrition: sensing and signaling. Curr Opin Plant Biol **39**: 57–65

Yang Z, Xia J, Hong J, Zhang C, Wei H, Ying W, Sun C, Sun L, Mao Y, Gao Y, et al (2022) Structural insights into auxin recognition and efflux by Arabidopsis PIN1. Nature. doi: 10.1038/s41586-022-05143-9

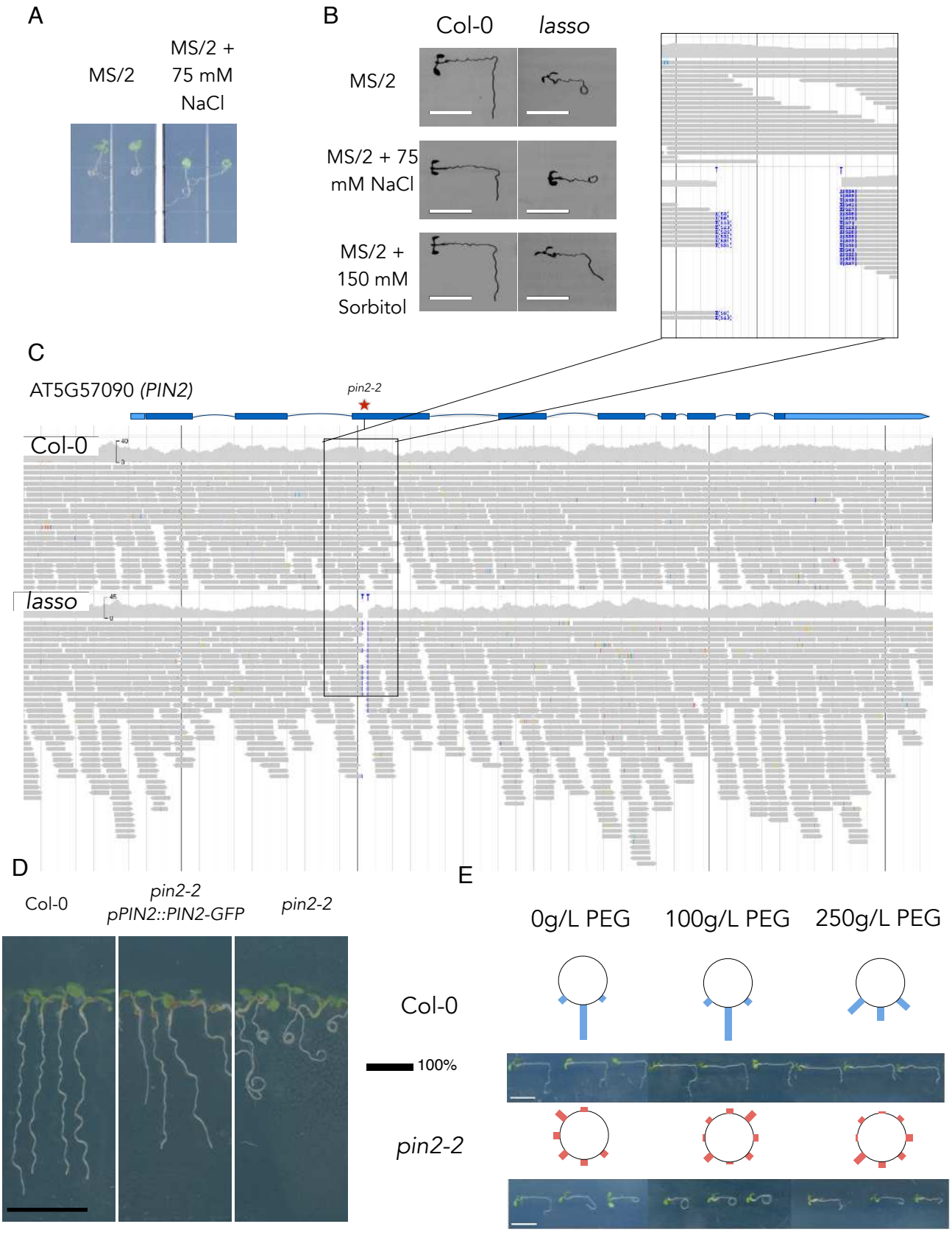


Figure S1. A new allele of *pin2* mutant discovered in a forward genetics screen

(A) Representative picture of the new mutant *lasso* on a forward genetics screening on MS/2 and MS/2 supplemented with 75 mM of NaCl. **(B)** Representative picture of Col-0 and *lasso* on MS/2 and MS/2 supplemented with 75 mM of NaCl or 150 mM of Sorbitol. 6-day-old seedlings were transferred on medium and subjected to a 90° gravitropic stimulus and imaged after 48h in the phenotyping robot HIRROS. **(C)** Representation of the PIN2 gene with alignment of reads for Col-0 and *lasso*. The inlay represents a zoom of the *pin2-2* mutation area noted with the red star on the gene. **(D)** Represensative picture of 7-day-old seedlings of Col-0 and *pin2-2* and the introgression of *proPIN2:PIN2-GFP* construct into *pin2-2* genetic background. scale bar = 1cm **(E)** Osmotic stress mimicked with the presence of a range of PEG for Col-0 and *pin2-2*. 6-day-old seedlings were transferred on medium and subjected to a 90° gravitropic stimulus and imaged after 48h. Circular diagrams display the primary root apex orientation as colored bars representing the percentage of plants. n=15, scale bar = 1cm

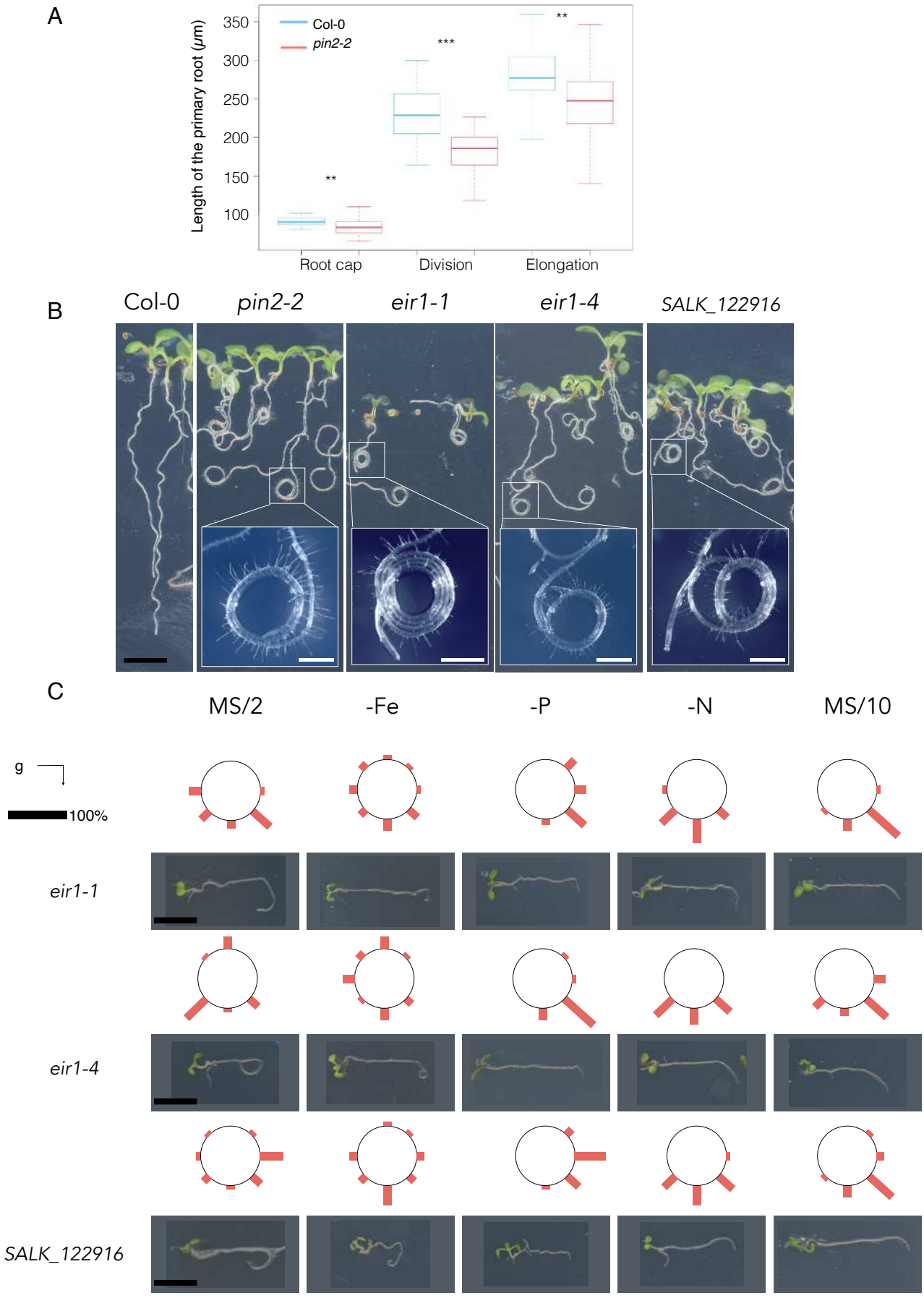


Figure S2. Several *pin2* allelic mutants have a conditional agravitropic phenotype

(A) Graph representing length of Col-0 and *pin2-2* primary root in MS/2. The p-values are based on Student's t-tests and the comparison is made between Col-0 and *pin2-2* P<0.0001 (***), P <0.001 (**), and P <0.05 (*), n=15, error bars represent standard deviation. **(B)** Representative picture of 10-day-old seedlings of Col-0, *pin2-2*, *eir1-1*, *eir1-4* and *SALK_122916* mutants on MS/2. Inlay: zoom in on the root coil. **(C)** Gravitropic response *eir1-1*, *eir1-4* and *SALK_122916* mutants. 6-day-old seedlings were grown on vertical plates then rotated 90° and imaged after 48 hours. Circular diagrams display the primary root apex orientation as colored bars representing the percentage of plants. n=15, scale bar = 1cm.

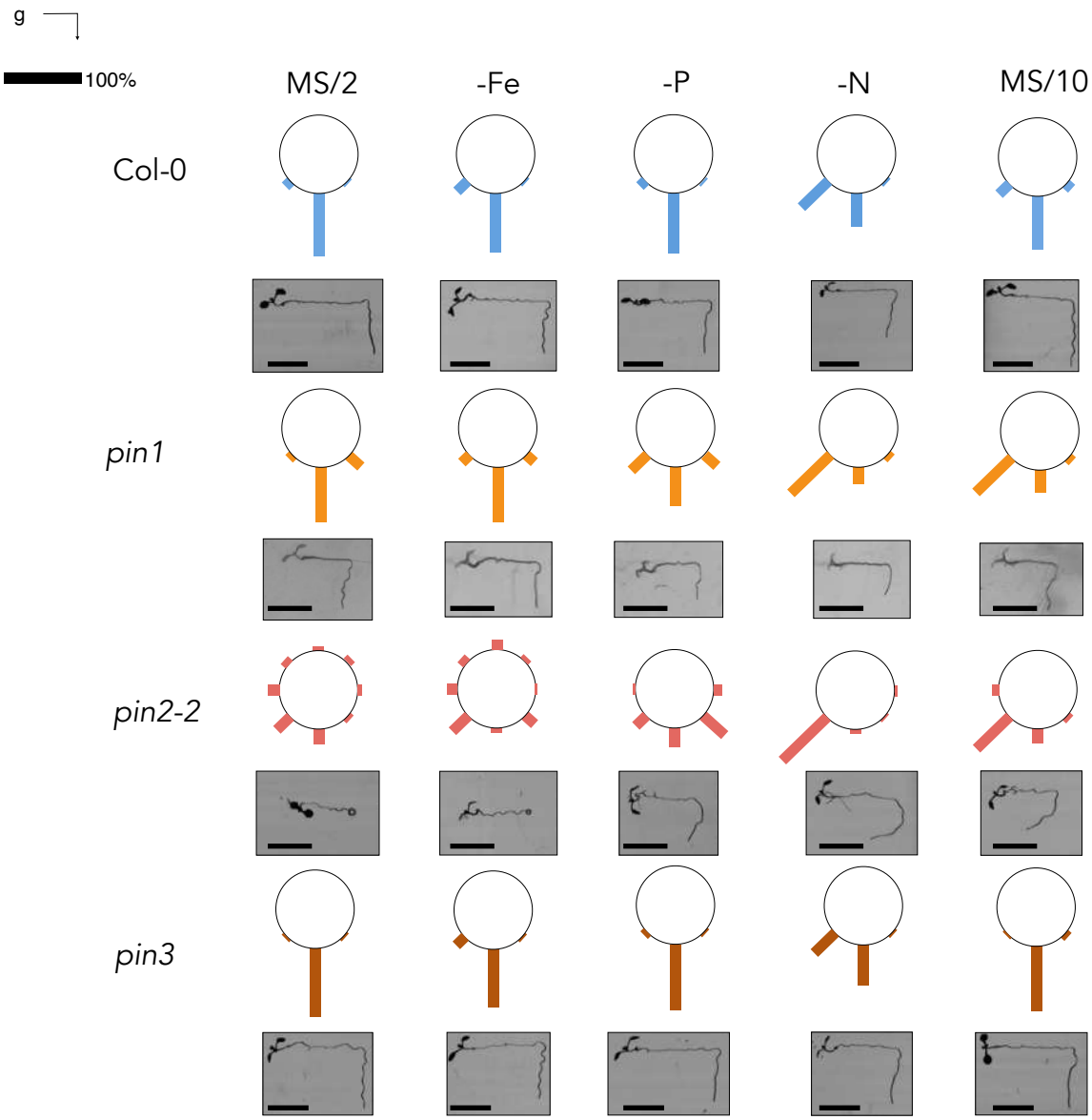


Figure S3. Gravitropism response of *pin1*, *pin2* and *pin3* in permissive and restrictive conditions

Representative image of 6-day-old seedlings of Col-0, *pin1*, *pin2-2* and *pin3* mutants subjected to a 90° gravitropic stimulus and imaged after 48h in response to different nutrient deficient media (MS/2, MS/2-Fe, MS/2-P, MS/2-N, MS/10). Circular diagrams display the primary root apex orientation as colored bars representing the percentage of plants.15<n<30, scale bar = 1cm.

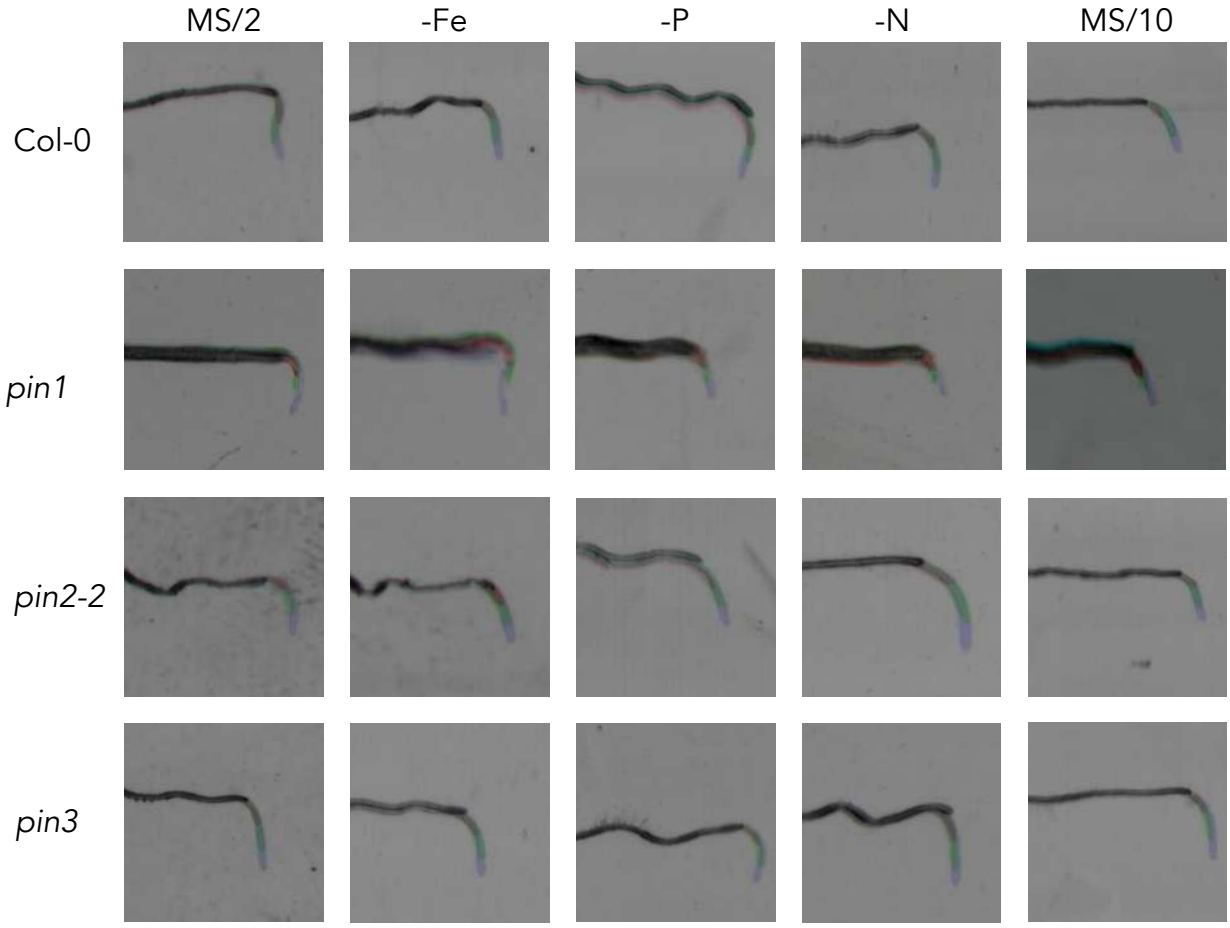


Figure S4. Early gravitropism of *pin1*, *pin2* and *pin3* in permissive and restrictive conditions

Representative image of 6 day-old seedlings of Col-0, *pin1*, *pin2-2* and *pin3* mutants subjected to a 90° gravitropic stimulus and imaged at 3, 6 and 9 hours in response to different nutrient deficient media (MS/2, MS/2-Fe, MS/2-P, MS/2-N, MS/10).

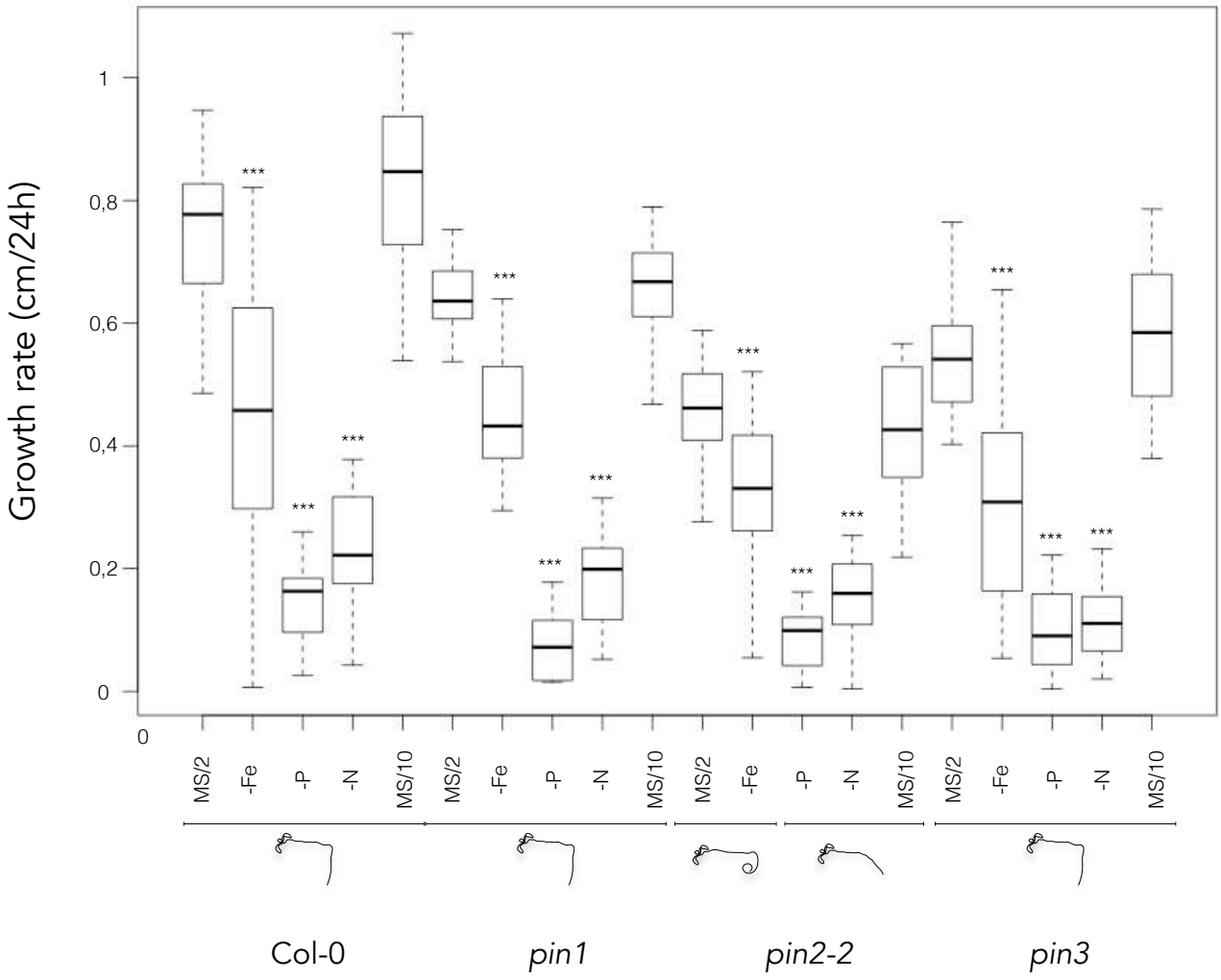


Figure S5. Growth rate of *pin1*, *pin2* and *pin3* in permissive and restrictive conditions

Graph representing the primary root growth of 6 day-old seedlings of Col-0 , *pin1*, *pin2-2* and *pin3* mutants monitored for 24 hours (15<n<30) *2* in response to different media (MS/2, MS/10, MS/2-P, MS/2-N, MS/2-Fe) . The p-values are based on Student's t-tests and the comparison is made for each genotype in MS/2 compared to the different media tested P <0.0001 (***), P <0.001 (**), and P <0.05 (*), error bars represent standard deviation.

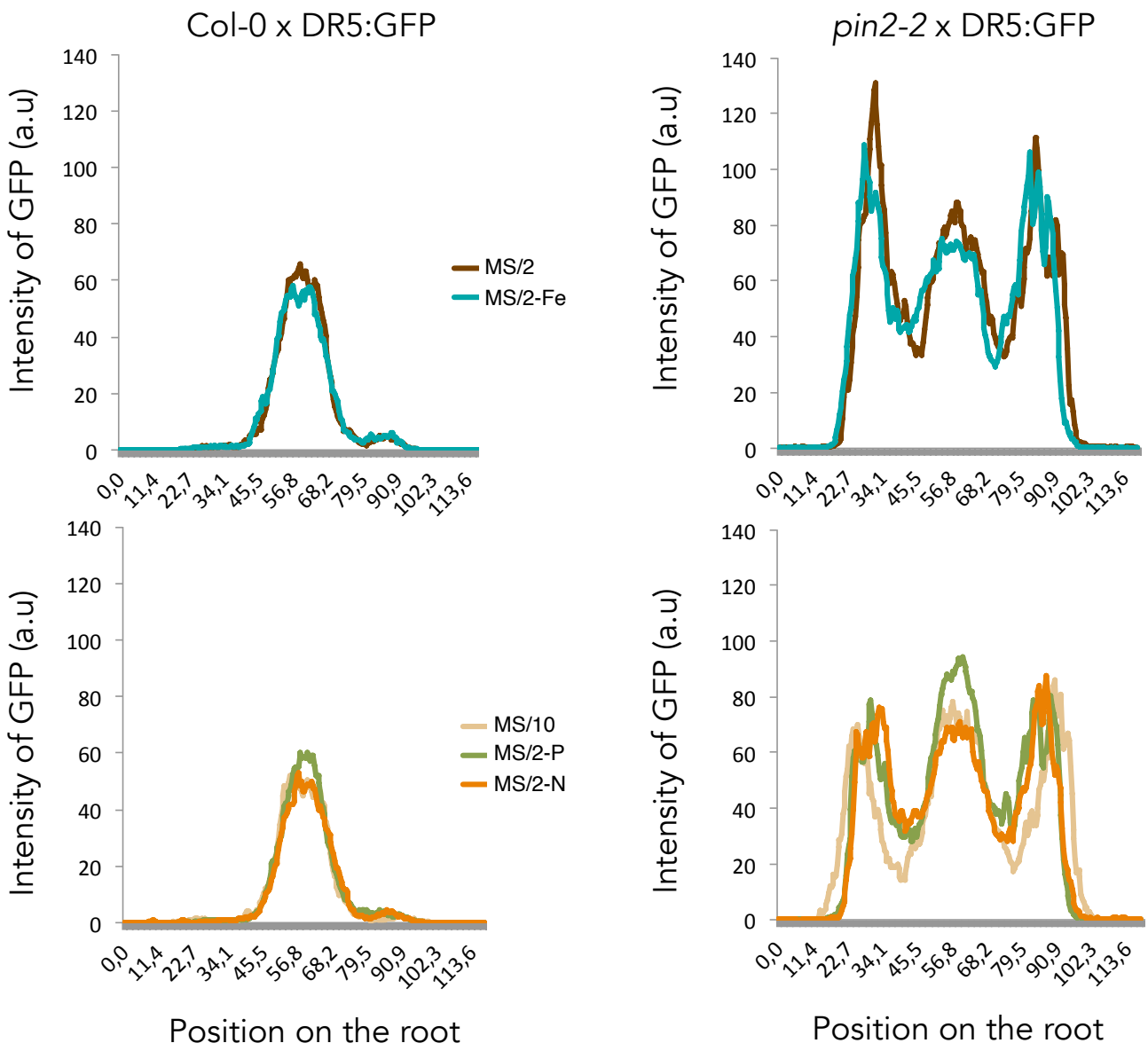
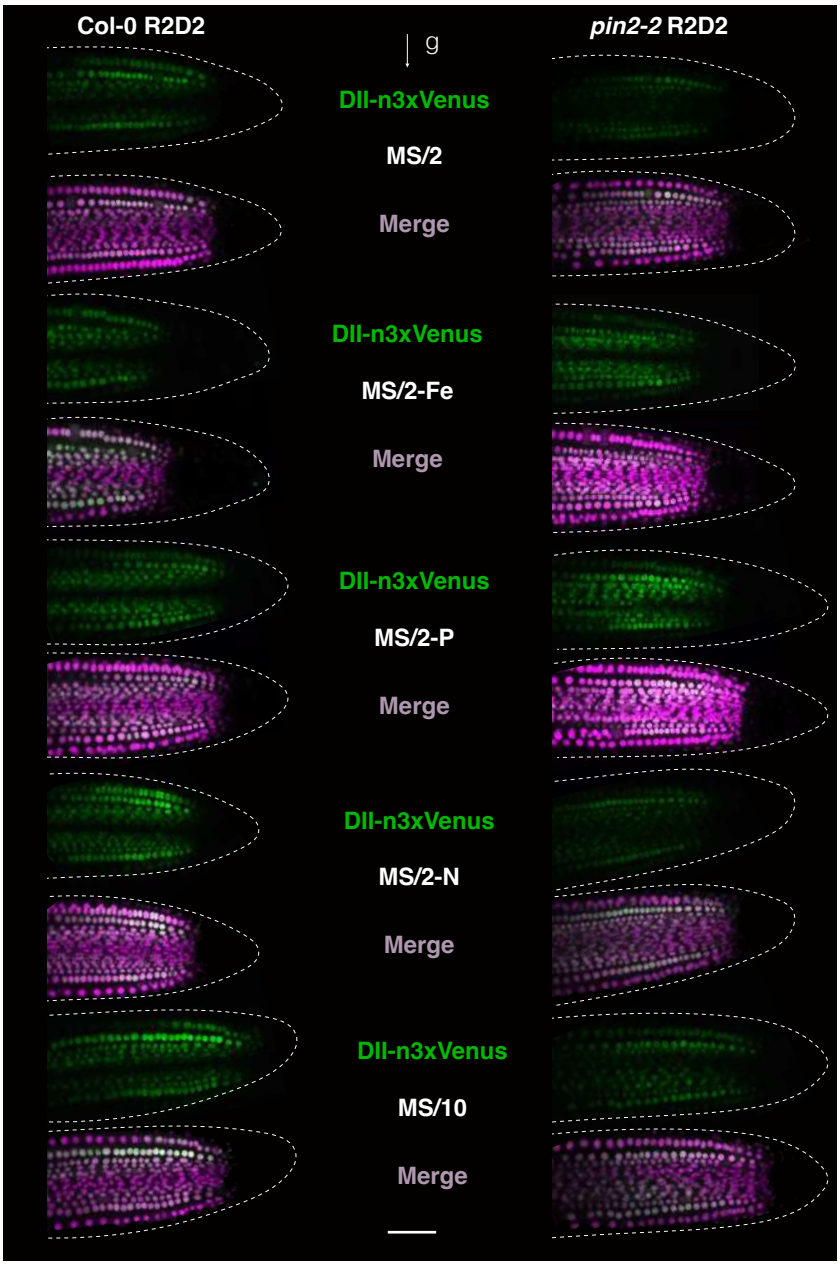


Figure S6. Auxin accumulation is modulated by nutrient availability

Seedlings of Col-0 and *pin2-2* were grown for 6 days vertically and then transferred horizontally for 4 h on the different medium. DR5-GFP intensity was quantified with the Plot ImageJ profile and displayed along the position of the root, 16<n<20

A



B

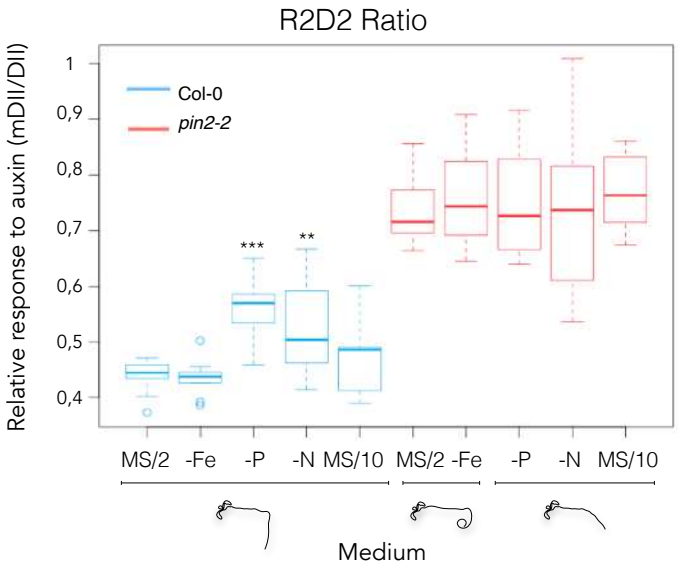


Figure S7. Auxin accumulation is modulated by nutrient availability

(A) Representative confocal image of the ratiometric sensor R2D2 showing DII-n3xVenus (green) and mDII-ndtTomato (purple) signals in Col-0 and *pin2-2* in response to various media (MS/2, MS/10, MS/2-P, MS/2-N, MS/2-Fe). 6-day-old seedlings were imaged on a microscopy slide with a block of MS/2 medium 1h30 after gravistimulation. g = gravity vector, scale bar = 50 microns **(B)** Quantification of the lower/upper ratio of mDII/DII ratio in the first 9 epidermal cells in the up or down part of the root tip 1h30 after gravistimulus in wild-type (Col-0) and *pin2-2* in various media (MS/2, MS/10, MS/2-P, MS/2-N, MS/2-Fe). The p-values are based on Student's t-tests for a pairwise comparison relative to reference medium (MS/2) $p<0.0001$ (***), $p<0.001$ (**), and $p<0.05$ (*), n=15, error bars represent standard deviation.

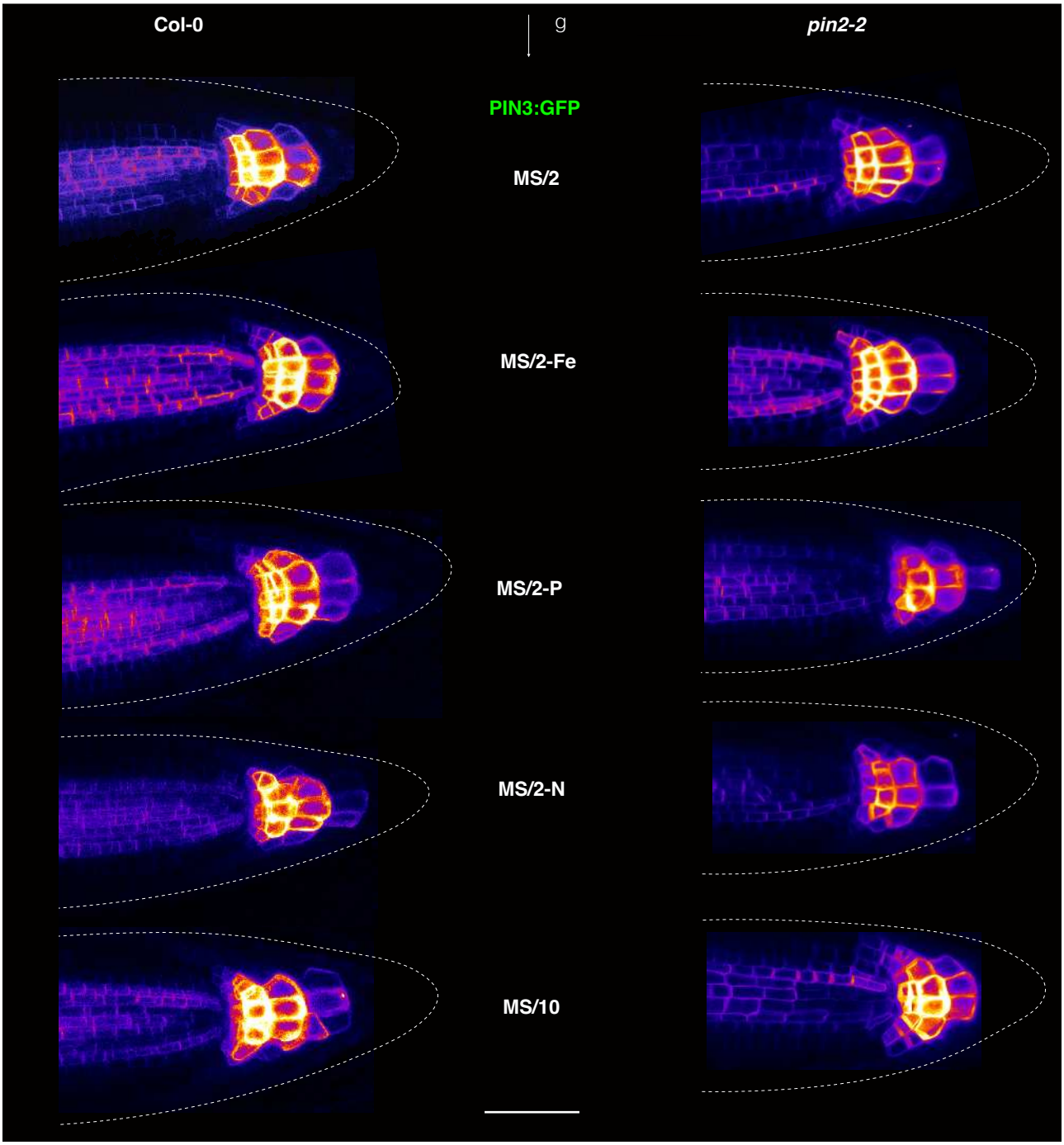


Figure S8. Localization of proteins is not altered in the *pin2* mutant background in various growth medium

Representative confocal image of PIN3:GFP in response to various media (MS/2, MS/10, MS/2-P, MS/2-N, MS/2-Fe). 6-day-old seedlings were transferred on a horizontal microscopy slide with a block of medium and imaged 30 min after gravistimulation. g = gravity vector, scale bar = 50 micron

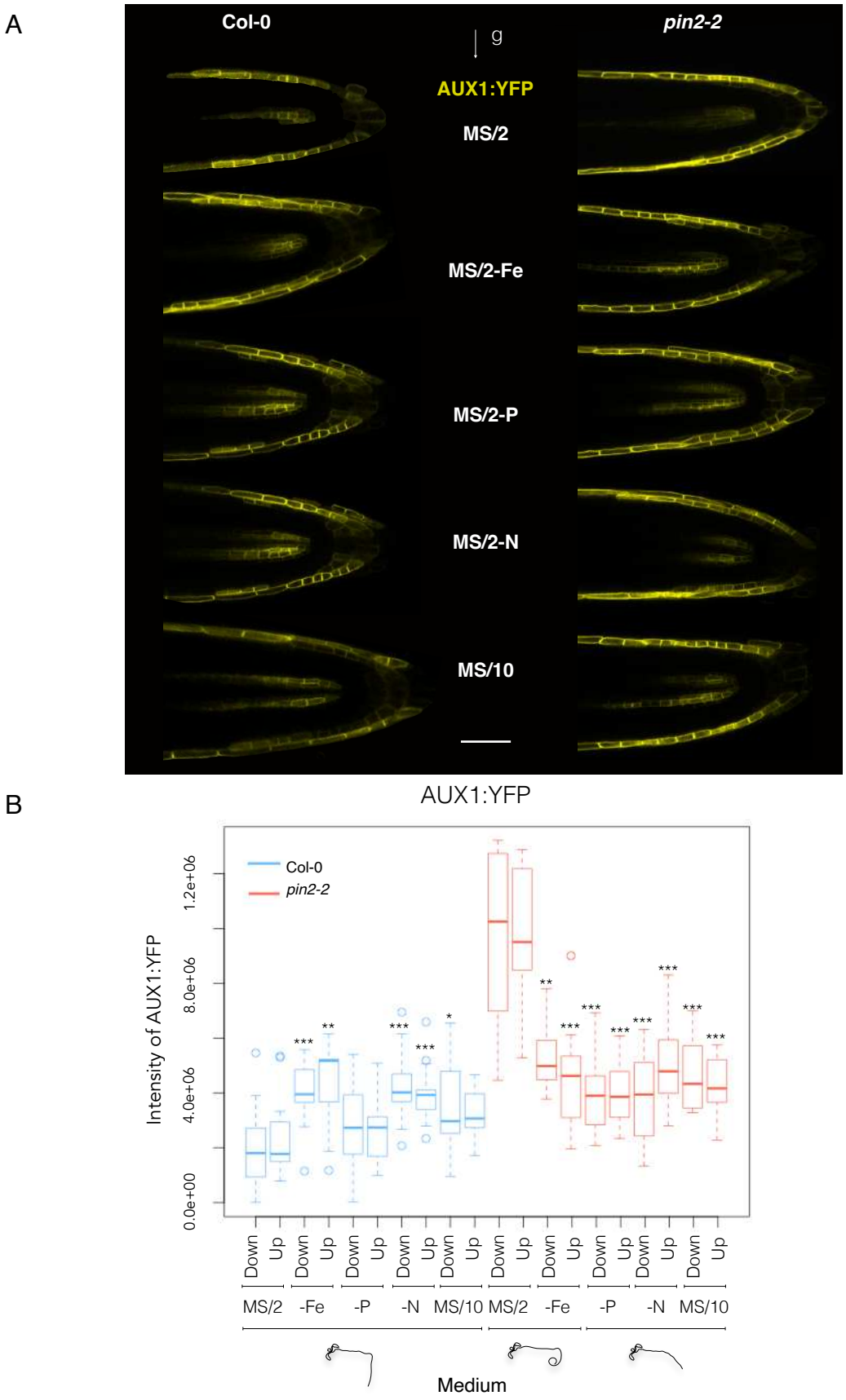


Figure S9. Localization of AUX1 proteins is not altered in the *pin2* mutant background in various growth medium

(A) Representative confocal image of AUX1:YFP. 6-day-old seedlings were transferred on a horizontal microscopy slide with a block of various medium and imaged 90 min after gravistimulation. g = gravity vector, scale bar = 50 micron. **(B)** Graph representing the intensity of AUX1:YFP on the lower and upper face of the root in response to 1h30 of gravitropism of Col-0 and *pin2-2* in response to different media (MS/2, MS/10, MS/2-P, MS/2-N, MS/2-Fe). The p-values are based on Student's t-tests and the comparison is made for each genotype in MS/2 compared to the different media tested $p<0.0001$ (***), $p<0.001$ (**), and $p<0.05$ (*), n=15, error bars represent standard deviation.

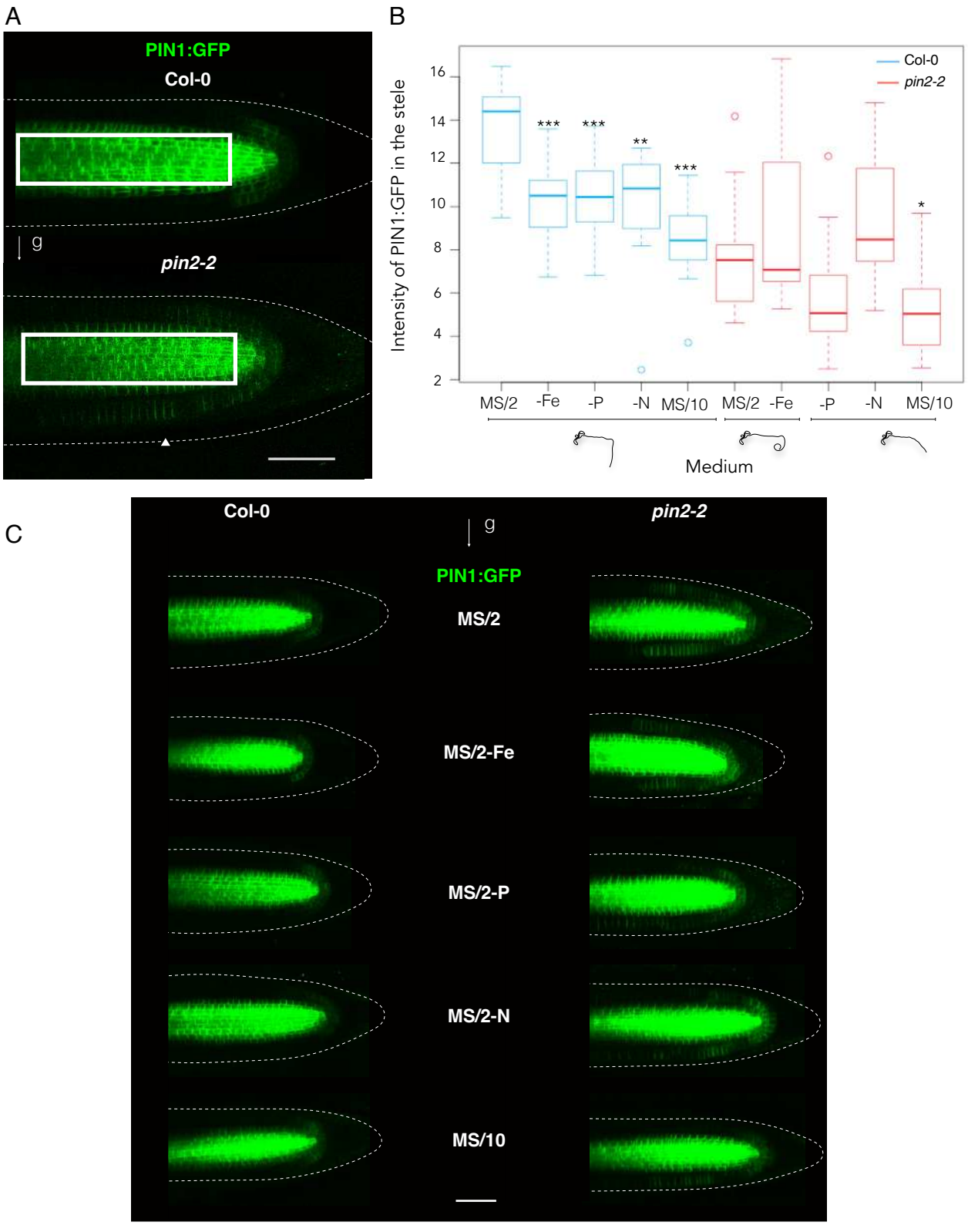


Figure S10. PIN1 is present in the epidermis in the *pin2* mutant background and is modulated by nutrient availability

(A) Representative confocal image of PIN1:GFP in Col-0 and *pin2-2*. 6-day-old seedlings were transferred on a horizontal microscopy slide with a block of MS/2 medium and imaged 1h after gravistimulation. White squares represent the position where GFP intensity was measured. g = gravity vector, scale bar = 50 micron. **(B)** Graph representing the mean of intensity of PIN1:GFP in the stele in response to 1h of gravitropism in Col-0 and *pin2-2* in response to different media (MS/2, MS/10, MS/2-P, MS/2-N, MS/2-Fe). The p-values are based on Student's t-tests and the comparison is made for each genotype in MS/2 compared to the different media tested P <0.001 (b), and P <0.05 (a), n=15, error bars represent standard deviation. **(C)** Representative confocal image of PIN1:GFP in Col-0 and *pin2-2* in response to different media (MS/2, MS/10, MS/2-P, MS/2-N, MS/2-Fe). 6-day-old seedlings were transferred on a horizontal microscopy slide with a block of medium and imaged 1h after gravistimulation. g = gravity vector, scale bar = 50 micron

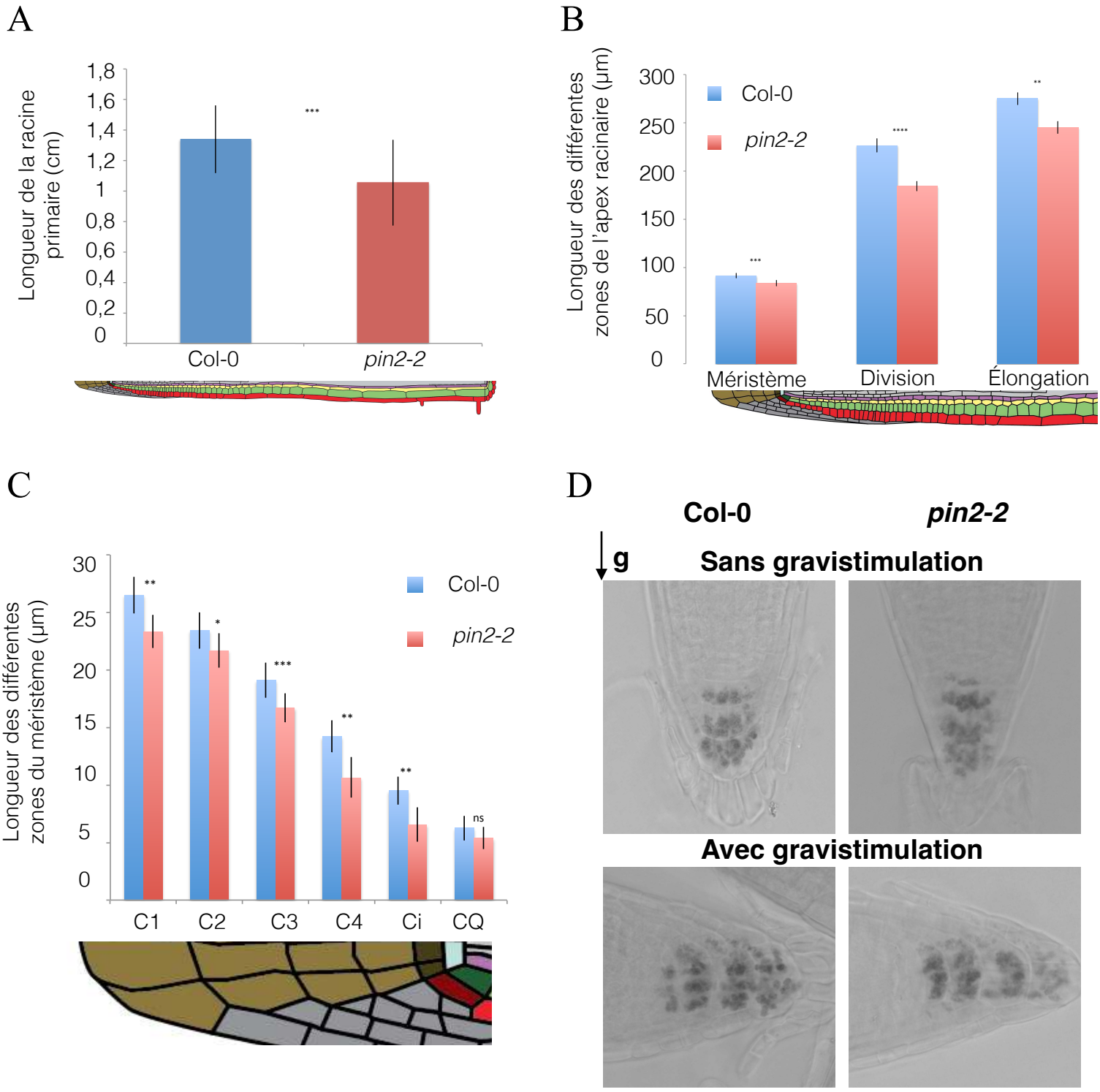


Figure 1.1. Description de la racine de *pin2-2*

(**A**) Graphique représentant la longueur de la racine primaire de plantules de Col-0 et *pin2-2* de 7 jours sur milieux MS/2.

(**B**) Graphique représentant la longueur des différentes zones de l'apex de la racine primaire de plantules de Col-0 et *pin2-2* de 7 jours sur milieux MS/2.

(**C**) Graphique représentant la longueur des différentes cellules du méristème de la racine primaire de plantules de Col-0 et *pin2-2* de 7 jours sur milieux MS/2.

(**D**) Image représentative d'apex racinaire de Col-0 et *pin2-2*. Visualisation de la sédimentation des grains d'amidon chez Col-0 et *pin2-2*. Focus sur la coiffe racinaire contenant les cellules de la columelle avec les grains d'amidons colorés au lugol avant et après 10 min de gravistimulation. g = vecteur gravité.

Les p-values sont basées sur les tests t de Student pour une comparaison par paires entre Col-0 et *pin2-2*. p<0,0001 (***), p<0,001 (**) et p<0,05 (*), n = 15, les barres d'erreur représentent l'écart type.

2.2 - Résultats complémentaires

Les résultats présentés dans l'article ci-dessus (cf. section 2.1) montrent un nouveau mutant allélique du transporteur d'efflux d'auxine PIN2, qui met en évidence la conditionnalité du phénotype racinaire agravitropique qui est sensible aux nutriments. Dans cette partie des résultats complémentaires sont présentés avec une description racinaire du mutant *pin2-2*.

2.2.1 - Description fine de la longueur racinaire et de la sédimentation des grains d'amidon de pin2-2

Dans un premier temps, une description fine de la racine de *pin2-2* a été faite en milieu contrôle MS/2. La longueur totale de la racine primaire de Col-0 et *pin2-2* a été mesurée (Figure 1.1A) et a mis en évidence une réduction de 30% de la taille de *pin2-2* comparé à Col-0. Pour plus de précision la description a été poussée au niveau de l'apex racinaire, les longueurs des différentes zones : le méristème, la zone de division et la zone d'élongation ont été mesurées (Figure 1.1B). Une réduction significative de la longueur de la racine du mutant *pin2-2* vis à vis de Col-0 est observée quel que soit la zone. Le méristème, lieu senseur des changements d'orientation du vecteur de gravité, a été également caractérisé de manière plus poussée. La longueur des différentes cellules composant le méristème a été mesurée avec les cellules de C1 à C4, les cellules initiales et le centre quiescent (Figure 1.1C). La longueur des cellules est significativement réduite pour *pin2-2* excepté le centre quiescent qui reste d'une longueur similaire à celle de Col-0. De plus, les grains d'amidon dans les cellules de la columelle ont été observés sans et avec gravistimulation grâce à une coloration au lugol (Figure 1.1D). Pour Col-0 sans gravistimulation les grains d'amidon sont sédimentés au fond des cellules en direction du vecteur de gravité et avec gravistimulation les grains d'amidon vont se relocaliser et sédimenter en suivant la direction du vecteur de gravité contre la paroi des cellules. Pour *pin2-2*, les grains d'amidon sont également présents et ont le même comportement de sédimentation que pour Col-0 avec une sédimentation suivant le vecteur de gravité. Ces résultats indiquent donc que *pin2-2* malgré une longueur racinaire réduite et son phénotype agravitropique a des grains d'amidon fonctionnels qui sédimentent correctement suivant le vecteur de gravité.

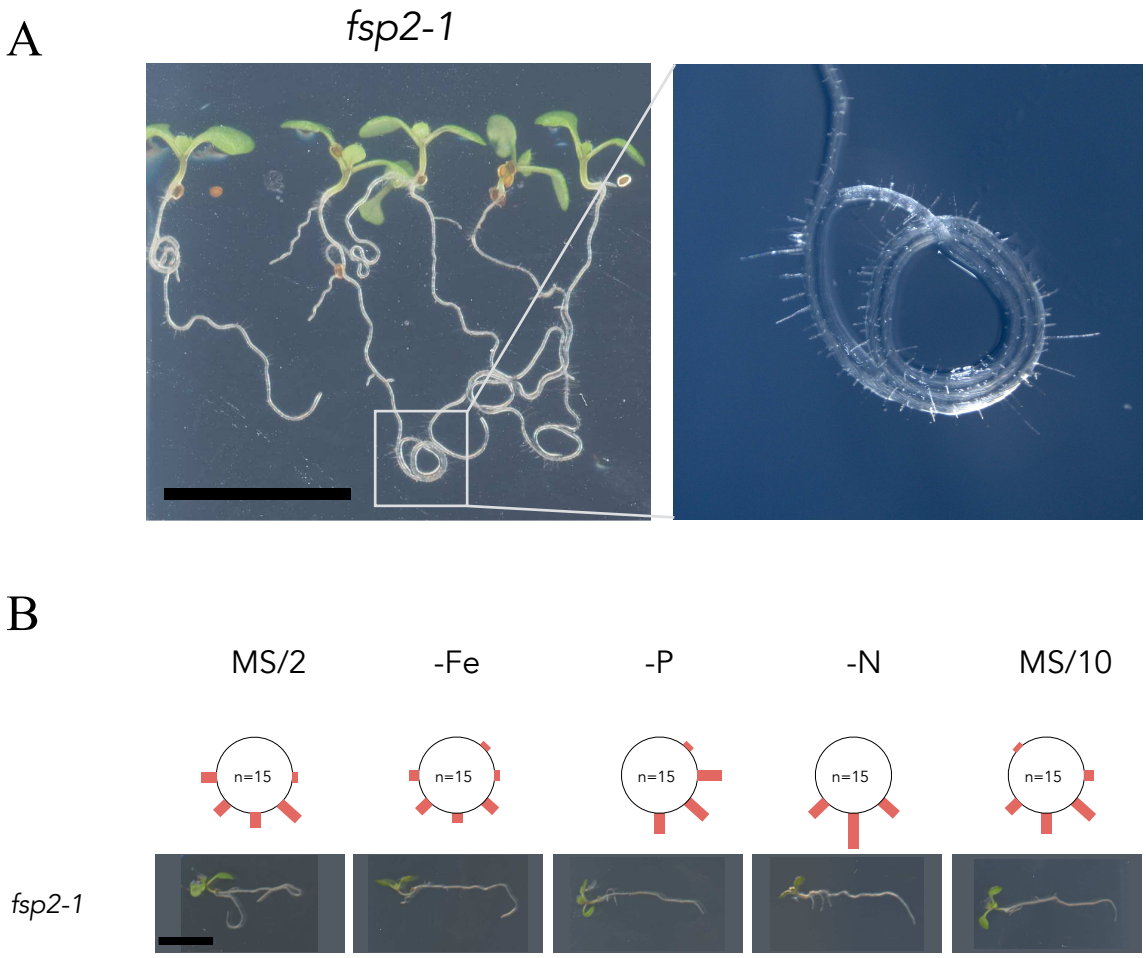


Figure 1.2. Phénotype agravitropique conditionnel du mutant allélique de *pin2-2* : *fsp2-1*
(**A**) Image représentative de plantules de 11 jours d'un mutant allélique de *PIN2* : *fsp2-1* sur MS/2. Zoom avant sur l'enroulement de la racine. barre d'échelle = 1 cm.
(**B**) Réponse gravitropique du mutant *fsp2-1* à différents milieux (MS/2, MS/2-Fe, MS/2-P, MS/2-N, MS/10). Images après 48 heures de gravistimulation. Les diagrammes circulaires affichent l'orientation de l'apex de la racine primaire sous forme de barres colorées représentant le pourcentage de plantes. n = 15, barre d'échelle = 1 cm.

2.2.2 - Le phénotype racinaire agravitropique du mutant allélique fsp2-1

Dans l'article plusieurs mutants alléliques sont observés, nous avons également observés le mutant *fsp2-1* fournis par notre collaborateur Tatsuaki Goh (Nara, Japan), qui est pour le moment non publié mais qui a une substitution d'acide aminé au domaine transmembranaire de PIN2, avec un défaut de transport d'auxine (Figure 1.2A). Ce mutant a également montré un phénotype racinaire agravitropique avec des conditions restrictives (MS/2, MS/2-Fe) mais conditionnel en conditions permissives (MS/2-P, -N, MS/10) (Figure 1.2B). Ce résultat confirme que le phénotype racinaire agravitropique de *pin2* est conditionnel et sensible aux nutriments.

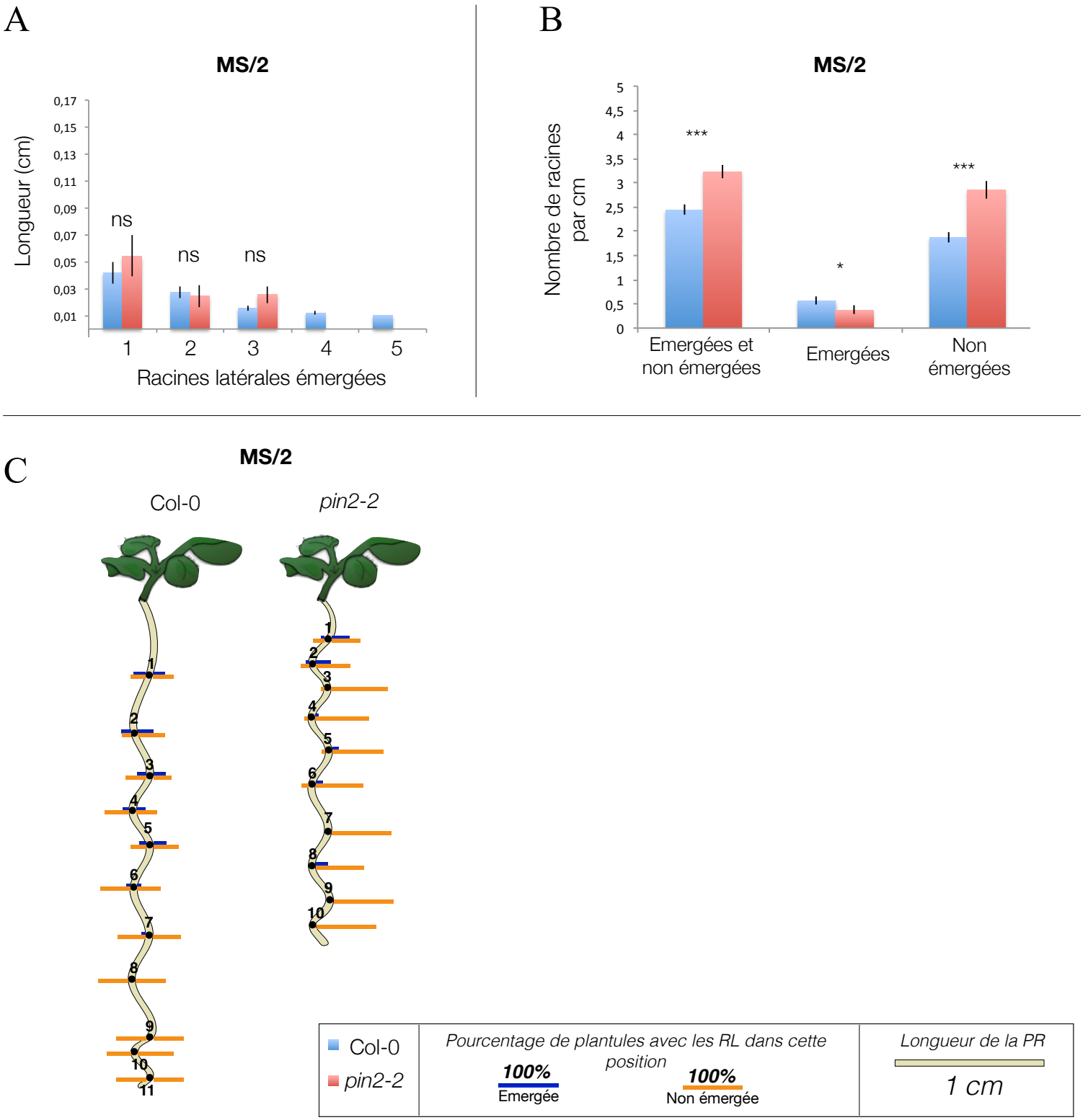


Figure 1.3. Distribution des racines latérales de *pin2-2* en MS/2

Position et stade de développement des racines latérales sur des plantules Col-0 et *pin2-2* de 9 jours sur milieu MS/2. Les p-values sont basées sur les tests t de Student pour une comparaison par paires entre Col-0 et *pin2-2*. p<0,0001 (***), p<0,001 (**) et p<0,05 (*), n=20, les barres d'erreurs représentent l'erreur standard.

(**A**) Longueur des racines latérales émergées selon leur ordres d'émergence sur la racine primaire

(**B**) Densité racinaire des racines latérales

(**C**) Représentation de la distribution des racines primaires et latérales

Les nombres en noir représente l'enchainement positionnel des racines latérales et leur espacement moyen est également représenté.

2.2.3- La distribution des racines latérales de pin2-2

Nous avons réalisé un descriptif détaillé des racines latérales sur des plantules de 9 jours, sur un milieu de culture contrôle (MS/2), où *pin2-2* a un phénotype agravitropique (Figure 1.3). Ces observations ont été faites au macroscope, directement en boite sur les milieux de culture pour ne pas perdre la répartition droite/gauche et l'enroulement des racines, sur des plantules dotées du marqueur DR5:GFP afin de rendre la visualisation plus facile. Nous nous sommes intéressés à la longueur des racines latérales, pour voir s'il y avait une différence de croissance entre Col-0 et *pin2*, sachant que la racine primaire présente une réduction de taille de 30% chez *pin2*. Toutefois, pour les racines latérales, ce n'est pas le cas nous n'observons pas de différence significative (Figure 1.3A). Nous avons également regardé la densité racinaire (Figure 1.3B). Le mutant *pin2-2* a une densité racinaire plus importante, notamment via ses racines latérales non émergées. Pour finir, nous avons étudié la distribution des racines latérales le long de la primaire en observant l'espacement entre chaque latérale et la distribution gauche/droite des racines émergées et non émergées (Figure 1.3C). Chez *pin2-2* on peut observer que la localisation des émergées est plus aléatoire que chez Col-0, et que les racines latérales se trouvent en grande majorité à droite, sur la face extérieure de la courbure.

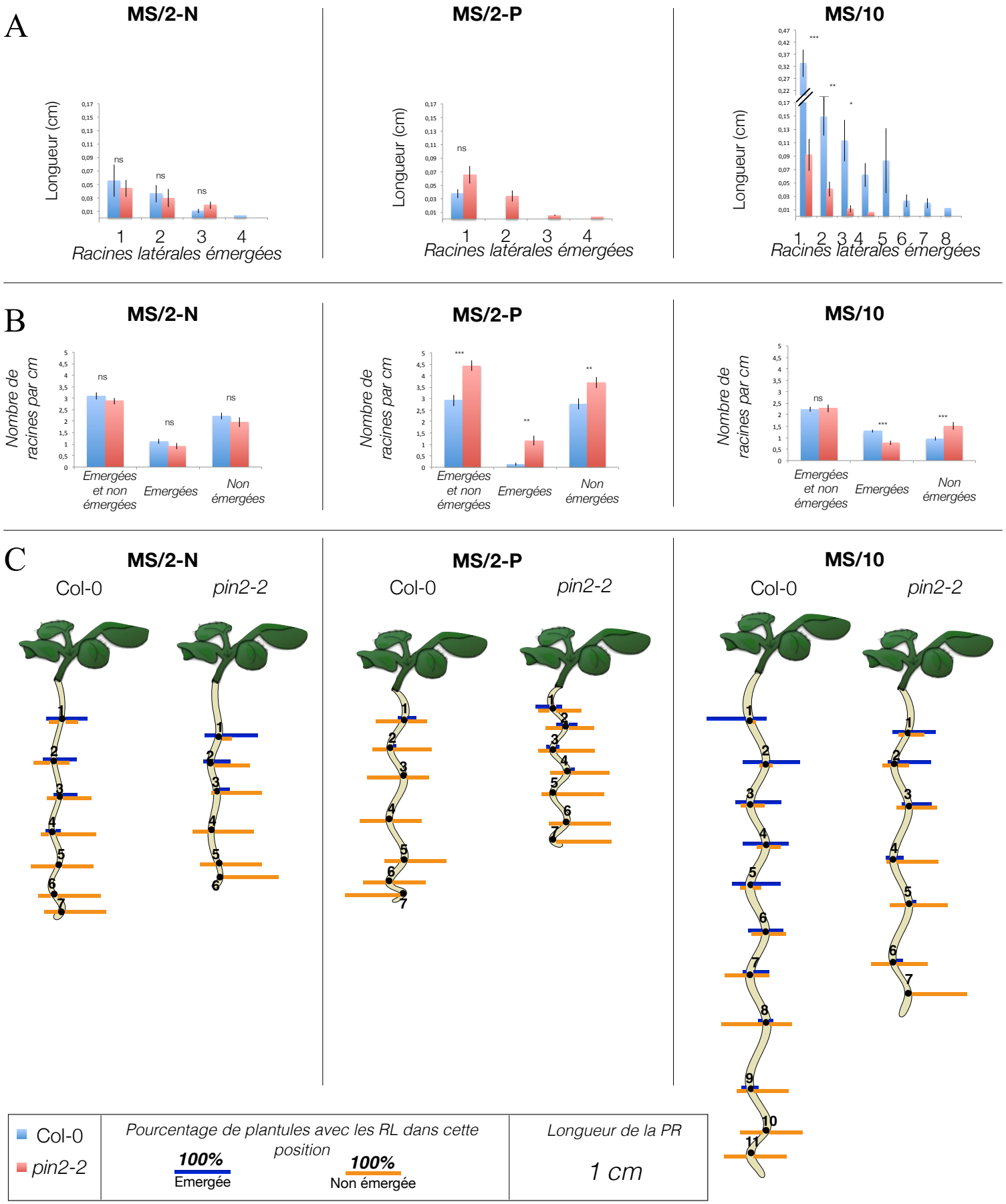


Figure 1.4. Distribution des racines latérales de *pin2-2* en conditions permissives

Position et stade de développement des racines latérales sur des plantules Col-0 et *pin2-2* de 9 jours sur milieu MS/2-N, -P, MS/10. Les p-values sont basées sur les tests t de Student pour une comparaison par paires entre Col-0 et *pin2-2*. p<0,0001 (***), p<0,001 (**) et p<0,05 (*), n=20, les barres d'erreurs représentent l'erreur standard.

(**A**) Longueur des racines latérales émergées selon leur ordres d'émergence sur la racine primaire

(**B**) Densité racinaire des racines latérales

(**C**) Représentation de la distribution des racines primaires et latérales

Les nombres en noir représente l'enchainement positionnel des racines latérales et leur espacement moyen est également représenté.

Nous avons ensuite voulu observer ces trois caractéristiques (longueur des racines latérales, densité racinaire et distribution des racines latérales) en fonction des conditions permissives (MS/2-P, -N et MS/10). Pour ce faire, nous avons fait germer directement les graines sur ces milieux sans réaliser de transfert. Pour le milieu MS/2-N, chez *pin2-2* nous n'observons pas de différences significatives quant à la longueur des racines latérales (Figure 1.4A) et la densité racinaire (Figure 1.4B). Toutefois, pour la distribution des racines latérales, la distribution est toujours localisée au niveau du côté externe de la courbure, malgré le fait que *pin2-2* ait une réponse partielle à la gravité et que cette courbure ne soit plus présente (Figure 1.4C). Pour le milieu MS/2-P, nous n'observons pas de différences significatives quant à la longueur des racines latérales (Figure 1.4A), mais nous observons des différences significatives quant à la densité racinaire avec une augmentation de la densité, que ce soit des émergées ou des non émergées, chez *pin2-2* (Figure 1.4B). Enfin, concernant la distribution des racines latérales, la distribution est également majoritaire au niveau du côté externe de la courbure, malgré la réponse partielle à la gravité de *pin2-2* (Figure 1.4C). Pour finir, avec le milieu MS/10 nous observons des différences significatives quant aux longueurs des racines latérales (Figure 1.4A). En effet, les racines latérales sont plus longues chez Col-0 que chez *pin2-2*. À contrario, la densité racinaire totale n'est pas significativement différente, car il y a un équilibre entre le fait que Col-0 ait une densité de racines émergées significativement plus élevée que chez *pin2-2*, mais celui-ci a une densité de racines non émergées plus élevée significativement que Col-0 (Figure 1.4B). Néanmoins, malgré le fait que *pin2-2* ne s'enroule plus en MS/10 on observe encore une distribution majoritaire au niveau de ce qui aurait dû être le côté externe de la courbure (Figure 1.4C).

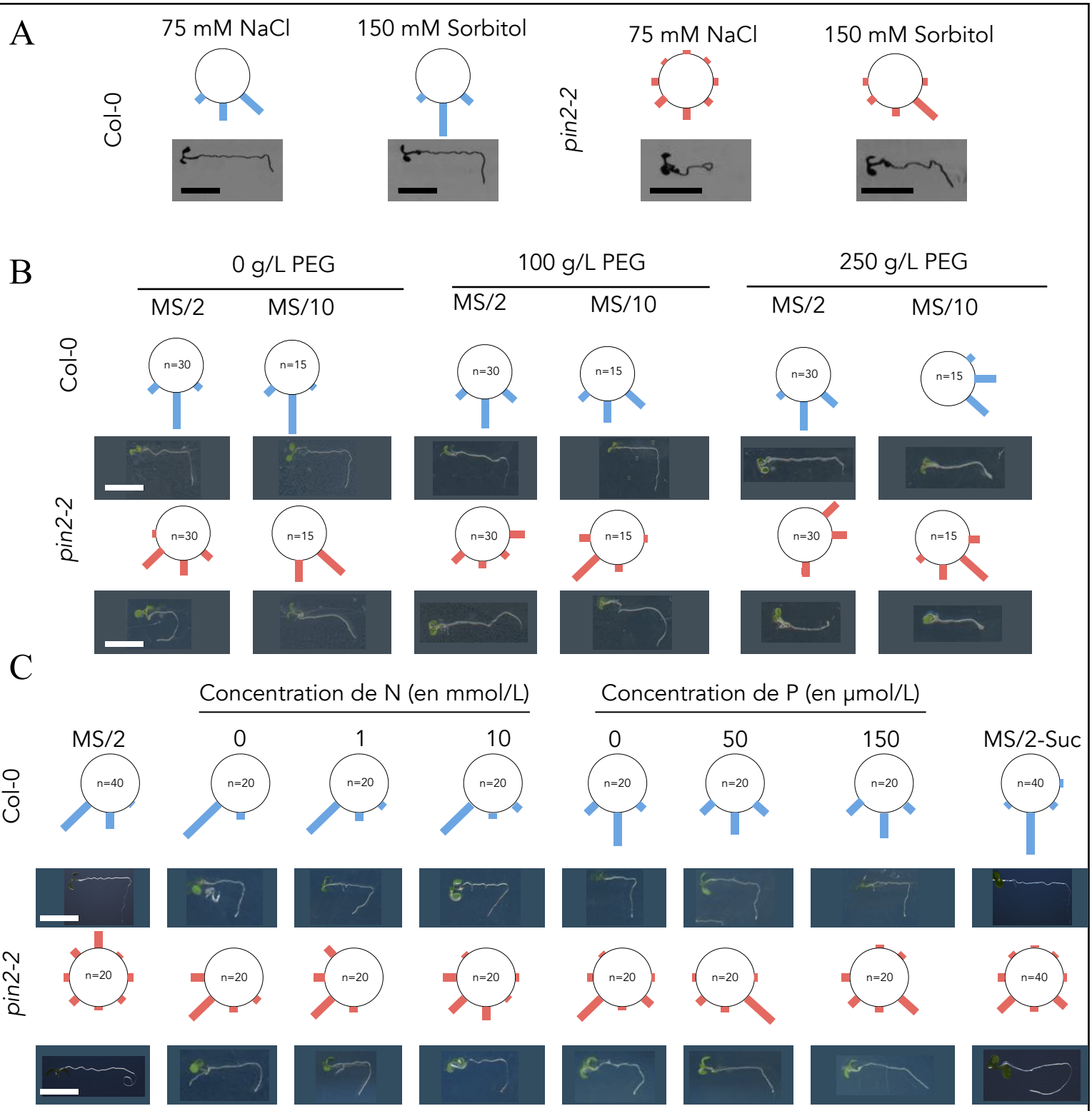


Figure 1.5. Le phénotype racinaire de *pin2-2* en fonction des milieux

(**A**) Réponse gravitropique de Col-0 et *pin2-2*, en présence de 75 mM de NaCl ou 150 mM de sorbitol sur milieux MS/2. Images après 48 heures de gravistimulation dans le robot de phénotypage HIRROS. Les diagrammes circulaires affichent l'orientation de l'apex de la racine primaire sous forme de barres colorées représentant le pourcentage de plantes. n=30 , barre d'échelle = 1 cm.

(**B**) Réponse gravitropique de Col-0 et *pin2-2* avec un stress osmotique imité avec via la présence d'une gamme de PEG sur milieux nutritif MS/2 et MS/10. Images après 48 heures de gravistimulation. Les diagrammes circulaires affichent l'orientation de l'apex de la racine primaire sous forme de barres colorées représentant le pourcentage de plantes. n=15, barre d'échelle = 1cm

(**C**) Réponse gravitropique de Col-0 et *pin2-2* à de faibles concentrations en N et P ainsi qu'en carence en sucrose (MS/2-Suc). Images après 48 heures de gravistimulation. Les diagrammes circulaires affichent l'orientation de l'apex de la racine primaire sous forme de barres colorées représentant le pourcentage de plantes. 40<n<15, barre d'échelle = 1 cm.

2.2.4- Le phénotype de racine agravitropique de pin2

Des expériences de gravistimulation ont été réalisées sur différents milieux afin de mieux comprendre la sensibilité du phénotype agravitropique. La position de l'apex racinaire est suivie 48h après une réorientation à 90° des boîtes verticales et regroupées en 8 position possibles (Swarup et al., 2004). Dans un premier temps le milieu contrôle MS/2 a été supplémenté avec du NaCl ou du sorbitol pour comprendre comment l'enroulement des racines est impacté car initialement le mutant *pin2-2* a été identifié via un crible en réponse au stress salin (Figure 1.5A). Les plantes Col-0 ont une réponse fonctionnelle à la gravité dans toutes les conditions alors que la racine de *pin2-2* est agravitropique sur milieu MS/2 supplémenté ou non avec du NaCl. Curieusement, la réponse à la gravité de *pin2-2* est partiellement restaurée en présence de sorbitol. Le mutant *pin2-2* affichant une sensibilité à la composition du milieu, l'osmolarité a été testée pour savoir si elle avait un impact sur son phénotype agravitropique. Le polyéthylène glycol (PEG), un polymère non métabolisé, a été utilisé pour modifier l'osmolarité dans les milieux MS/2 ainsi que MS/10 (Figure 1.5B). Nous avons utilisé deux concentrations (100 et 250 g/L) pour dissocier les effets de croissance des racines de l'osmolarité (Rosales et al., 2019). Col-0 répond à la gravité en MS/2 et MS/10 dans toutes les concentrations de PEG testées et *pin2-2,* dans toutes les concentrations de PEG testées, a un phénotype agravitropique sur MS/2 et un phénotype gravitropique en MS/10. L'augmentation de la pression osmotique n'a donc pas modifié le phénotype du mutant *pin2-2* en MS/2 ou MS/10, ce qui suggère que l'osmolarité seule ne représente pas une condition permissive et que sa présence combinée à une condition permissive n'impact pas le phénotype. Le mutant *pin2-2* affichant une sensibilité à la composition en nutriment du milieu, des gammes de N (0,1,10 mmol/L) et P (0,50,150 µmol/L) ont été testées afin de voir si une faible présence de ces nutriments peuvent avoir un effet similaire à la carence totale, de plus une carence en sucre (saccharose) en tant que photosynthétat a été testée (Figure 1.5C). Col-0 a une réponse normale à la gravité dans toutes les concentrations de N et P testés et en absence de saccharose. Pour *pin2-2* on observe une réponse partielle à la gravité pour toutes les concentrations de N et P testées et en absence de saccharose.

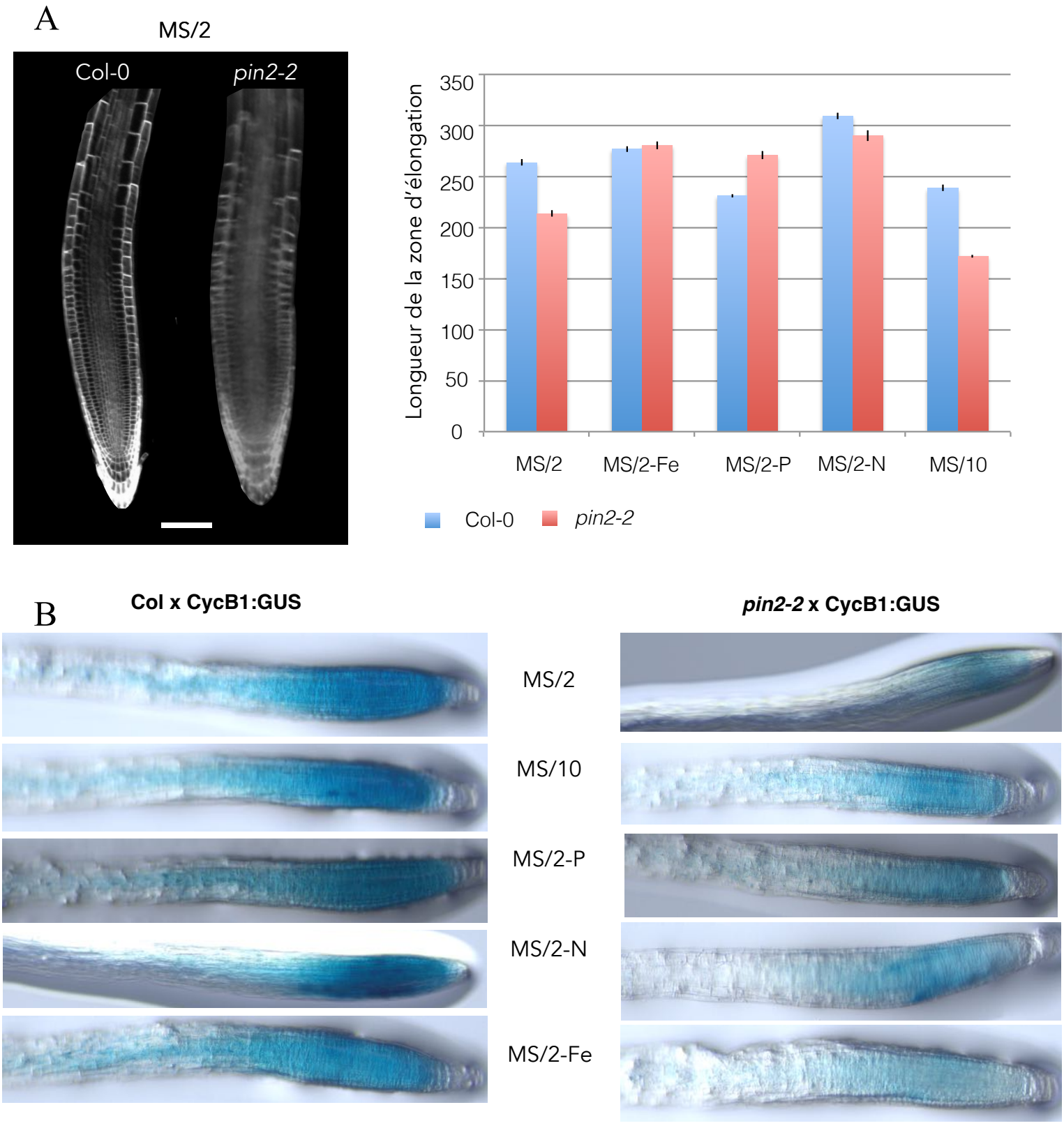


Figure 1.6. La croissance racinaire de *pin2-2 en fonction des milieux*

(**A**) Image représentative du marqueur SPR1pro:tdTomato:Lti6b qui permet le marquage de la membrane plasmique pour observer la zone d'élongation de plantules de Col-0 et *pin2-2* de 7 jours, barre d'échelle = 50μM. Graphique représentant la longueur de la zone d'élongation de Col-0 et *pin2-2* en réponse à différents milieux (MS/2, MS/2-Fe, MS/2-P, MS/2-N, MS/10). n=10

(**B**) Image représentative du marqueur CyclineB1:GUS permettant d'observer la division cellulaire des plantules Col-0 et *pin2-2* de 7 jours en réponse à différents milieux (MS/2, MS/2-Fe, MS/2-P, MS/2-N, MS/10).

2.2.5- Les processus d'élongation et de division cellulaire racinaire de pin2-2

Afin de comprendre quel mécanisme permet à *pin2-2* d'avoir un phénotype conditionnel sensible aux nutriments, nous avons observé si la vitesse de croissance pouvait être impliquée, ce résultat étant disponible dans l'article. En complément nous avons également observé les deux composantes de la vitesse de croissance : l'élongation et la division. L'élongation a été observée l'aide du marqueur SPR1pro:tdTomato:Lti6b qui permet le marquage de la membrane plasmique, chez Col-0 et *pin2-2* en réponse aux différents milieux (Figure 1.6A) et de la même manière aucun lien n'a pu être établi. La division a été observée avec le marqueur CyclineB1:GUS chez Col-0 et *pin2-2* en réponse aux différents milieux (Figure 1.6B), et encore une fois aucune corrélation n'a pu être établie entre milieu de réversion et réduction de division. Toutefois on observe de manière généralisé une réduction de la division chez *pin2-2* qui ne semble pas dépendre des différents milieux nutritifs.

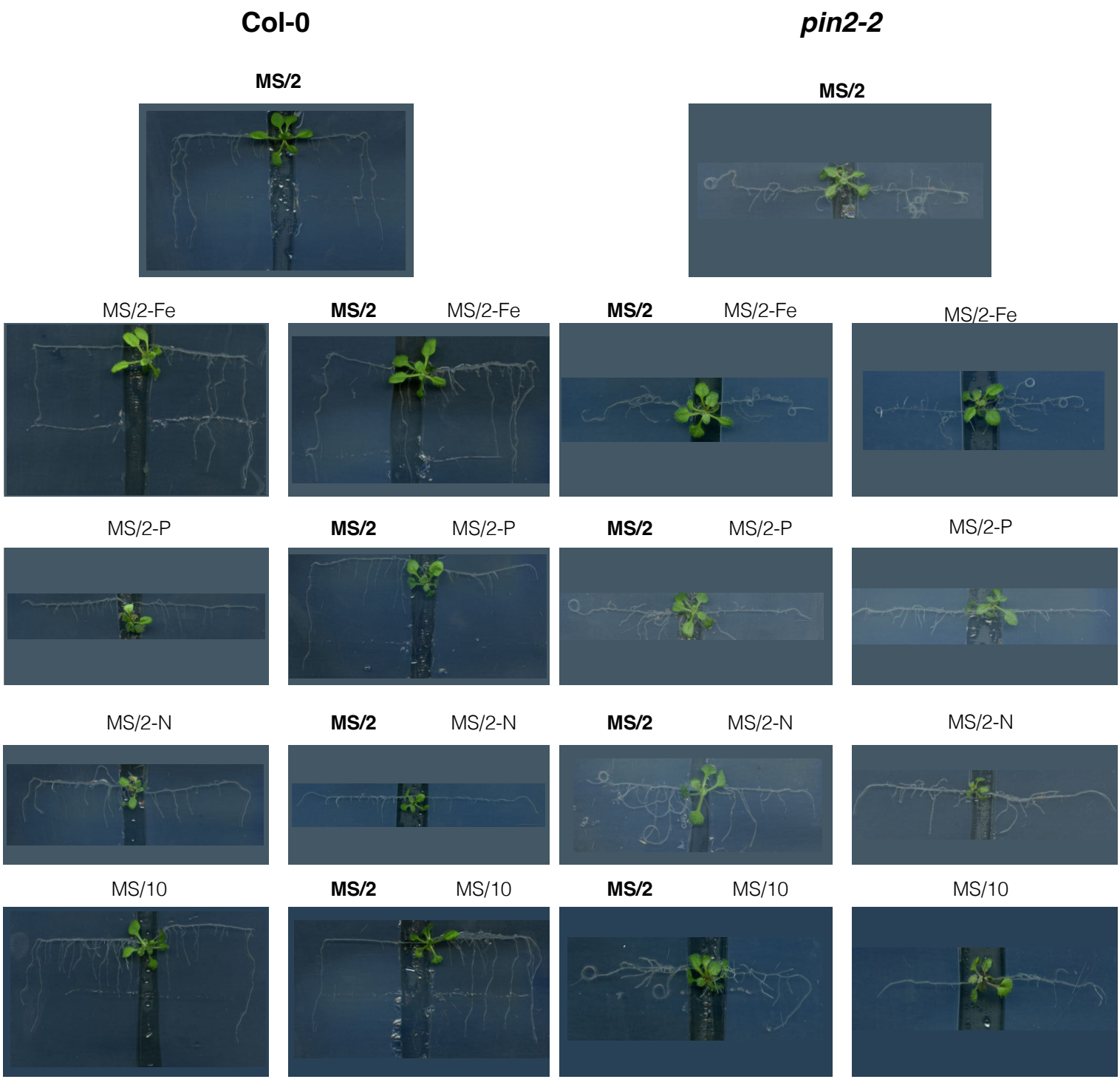


Figure 1.7. Gravisplitroot du phénotype racinaire agravitropique de *pin2-2*
Images représentatives de gravisplitroot sur des plantules de Col-0 et *pin2-2* en réponse à différents milieux (MS/2, MS/2-Fe, MS/2-P, MS/2-N, MS/10). Les plantules ont germées sur MS/2, la racine primaire a été coupées à 7 jours puis à 14 jours il y a un transfert sur les différents milieux en gravistimulant de chaque côté pendant 48h.

2.2.6- Analyse de la systémie sur le phénotype conditionnel de pin2-2

Afin de mieux appréhender le mécanisme permettant à *pin2-2* d'avoir un phénotype conditionnel sensible aux nutriments, nous avons voulu déterminer si cette conditionnalité du phénotype est un processus local ou systémique. Pour cela la technique du splitroot a été combinée avec la gravistimulation (Figure 1.7). Le splitroot est une technique où une plante, dont la racine primaire est coupée transversalement, a deux sections racinaires qui sont séparées sur deux environnements distincts. Le grand avantage de ce système est qu'il permet le traitement différencié de systèmes racinaires séparés et indépendants, tout en partageant une partie aérienne commune. Ceci permet la discrimination des mécanismes de régulation systémiques versus locaux. Les différents milieux ont été testés ainsi que leurs combinaisons avec MS/2. Pour Col-0 dans toutes les conditions testées et leurs combinaisons une réponse à la gravité est observée, l'apex étant dirigé vers le bas. Pour *pin2-2*, on observe le phénotype agravitropique en MS/2 et une réversion en conditions permissives. Toutefois quand on combine MS/2 d'un côté et conditions permissives de l'autre on observe un phénotype agravitropique ainsi qu'une réversion respectivement. Les mêmes résultats ont été observés sur tous les milieux testés sauf MS/2-Fer qui ne permet pas une réversion du phénotype. La conditionnalité du phénotype agravitropique du mutant *pin2-2* est donc dépendante d'un mécanisme local.

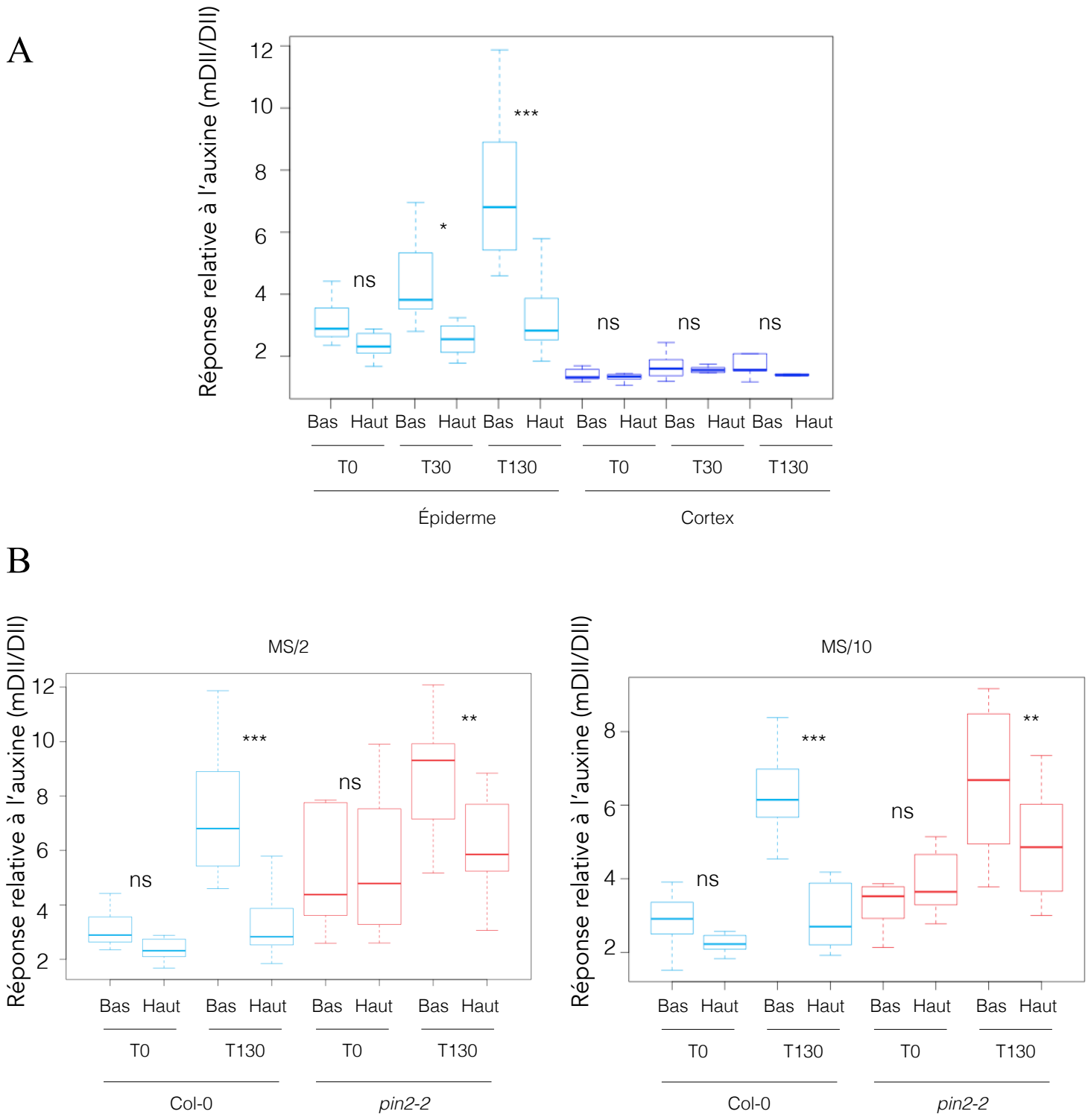


Figure 1.8. La cinétique de l'accumulation d'auxine dans l'épiderme en fonction des milieux
(A) Quantification du rapport mDII/DII dans les 9 premières cellules de l'épiderme et du cortex de la partie haute et basse de la pointe radiculaire au cours d'une cinétique de gravistimulation dans des plantules Col-0 en MS/2. Les valeurs p sont basées sur les tests t de Student pour une comparaison par paires entre partie haute et basse (MS/2) p<0,0001 (***), p<0,001 (**) et p<0,05 (*) , n = 15, les barres d'erreur représentent l'écart type.
(B) Quantification du rapport mDII/DII dans les 9 premières cellules de l'épiderme de la partie haute et basse de la pointe radiculaire au cours d'une cinétique de gravistimulation dans des plantules Col-0 et *pin2-2* en MS/2 et MS/10 . Les valeurs p sont basées sur les tests t de Student pour une comparaison par paires entre partie haute et basse (MS/2) p<0,0001 (***), p<0,001 (**) et p<0,05 (*) , n = 15, les barres d'erreur représentent l'écart type.

2.2.7- L'accumulation d'auxine dans l'épiderme

Pour étudier le rôle de l'auxine dans la conditionnalité du phénotype racinaire agravitropique de *pin2* nous avons utilisé une lignée exprimant le gène rapporteur R2D2 que nous avons introgressé dans le fond génétique mutant *pin2-2*. Dans l'article nous avons pu mettre en évidence que certaines compositions de milieux ont légèrement modifié les niveaux du signal d'auxine chez Col-0, ces réductions n'étant toutefois associées à aucun défaut gravitropique racinaire tandis que chez *pin2-2* une réduction du signal d'auxine grâce aux conditions permissives serait responsable de la réversion phénotypique. Ces résultats ont été acquis en observant les cellules de l'épiderme 90 minutes après gravistimulation. Toutefois pour déterminer ces conditions nous avions au préalable réalisé une cinétique dans l'épiderme et dans le cortex (Figure 1.8A). Cela nous a permis d'observer que dans le cortex il n'y a pas de différence au cours du temps entre face supérieure et inférieure malgré la gravistimulation toutefois pour l'épiderme on peut observer une symétrie entre face supérieur et inférieur à T0 mais une asymétrie qui débute dès 30 min de gravistimulation et qui est optimale 90 min post gravistimulation. De plus, des cinétiques ont également été réalisées chez Col-0 et *pin2-2* en réponse aux différents milieux (Figure 1.8B,C). Avant gravistimulation on observe une symétrie entre face supérieur et inférieur toutefois après 1h30 post gravistimulation l'asymétrie est présente.

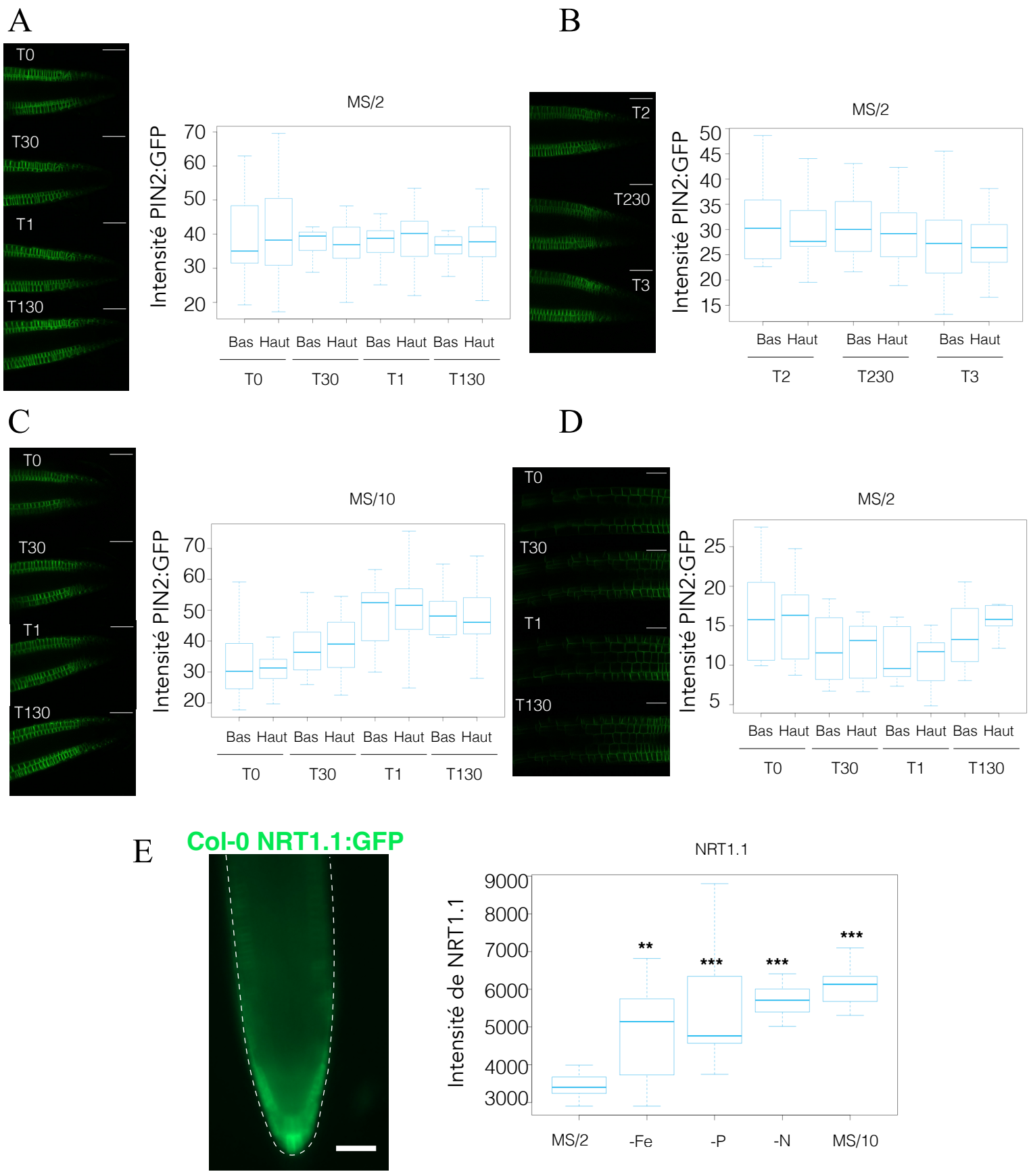


Figure 1.9. PIN2 et NRT1.1 en réponse aux différents milieux nutritifs

(A-D) Image représentative de PIN2:GFP au cours de cinétiques de la réponse gravitropique au niveau de l'apex racinaire sur MS/2 de 0 à 1h30 post-gravistimulation (A) et de 2 à 3h post-gravistimulation (B), sur MS/10 de 0 à 1h30 post-gravistimulation (C) et au niveau de la zone d'élongation sur MS/2 de 0 à 1h30 post-gravistimulation (D). Ces images sont respectivement accompagnés de graphique représentant l'intensité de PIN2:GFP dans chaque condition.

(E) Image représentative de NRT1.1:GFP. Des plantules de 6 jours ont été transférés sur une lame horizontale avec un bloc de milieu MS/2 et imagés 1h après gravistimulation. barre d'échelle = 50 microns Graphique représentant l'intensité de NRT1.1:GFP dans la racine en réponse à 1h de gravitropisme chez Col-0 en réponse à différents milieux (MS/2, MS/10, MS/2-P, MS/2-N, MS/2-Fe).

Les p-values sont basées sur les tests t de Student et la comparaison est faite pour chaque génotype dans MS/2 par rapport aux différents milieux testés $p<0,0001$ (***), $p<0,001$ (**), et $p<0,05$ (*), n = 15, les barres d'erreur représentent l'écart type.

2.2.8- L'accumulation de protéines PIN2 et NRT1.1 en réponse aux milieux

Afin d'identifier un mécanisme moléculaire responsable des modifications de la réponse de l'auxine dans différentes conditions nutritives, nous avons suivi chez Col-0 l'accumulation des protéines PIN2 et NRT1.1, deux acteurs impliqués dans le transport d'auxine (Chen et al., 1998, Krouk et al., 2010). Le rapporteur PIN2:GFP a été utilisé pour observer PIN2, qui est localisée à la membrane plasmique basalement dans les cellules du cortex, mais apicalement dans les cellules épidermiques. Chez Col-0, l'observation de PIN2:GFP a été faite dans un premier temps avec une cinétique de T0 à T90 min après gravistimulation (Figure 1.9A). Toutefois aucune relocalisation de PIN2 n'a pu être observée avec une symétrie de PIN2 entre la face supérieur et inférieur au cours du temps. Nous avons donc observé PIN2:GFP de 2 à 3 h post-gravistimulation et de la même manière aucune relocalisation n'a été observée (Figure 1.9B). Nous avons donc voulu observer si le milieu pouvait avoir un effet sur la relocalisation de PIN2:GFP, pour ce faire nous avons fait la cinétique de T0 à T90 min sur MS/10 (Figure 1.9C). Encore une fois cela n'a pas permis d'observer d'asymétrie entre la face supérieure et inférieure. Ces observations étant réalisées à l'apex racinaire nous avons voulu regarder un peu au-dessus au niveau de la zone d'élongation en faisant de la même manière une cinétique de T0 à T90min (Figure 1.9D). De la même manière aucune relocalisation de PIN2 n'as pu être observée en réponse à la gravistimulation. Nous avons ensuite utilisé le rapporteur NRT1.1:GFP pour surveiller l'accumulation de NRT1.1, outre son activité de transport des nitrates et son rôle dans la régulation de la croissance des racines latérale, a une activité de transport de l'auxine (Krouk et al., 2010). L'observation de NRT1.1 dans Col-0 après 1h de gravistimulation (Figure 1.9E) n'a montré aucun changement dans son profil de localisation néanmoins on peut observer une augmentation de sa présence en condition de carence. Ces résultats montrent que les profils d'accumulation de protéines PIN2 et NRT1.1 ne sont pas affectés par la gravistimulation, ne présentant pas de distribution asymétrique. Toutefois, NRT1.1 est affecté par les modifications de la composition du milieu, mais sans différence entre condition permissive et MS/2-Fe. Ces réalisations ont toutefois été faites sur Col-0 et il serait intéressant de pouvoir observer NRT1.1:GFP chez *pin2-2*.

3 - Discussion

3.1 - L'originalité du phénotype racinaire agravitropique de pin2

Dans ce premier chapitre, le but a été de faire une caractérisation de l'expressivité du phénotype agravitropique de *pin2* et d'apporter des éléments de réponses expliquant sa conditionnalité. En effet, les transporteurs PINs bien qu'étant une famille bien caractérisée, gardent encore des zones d'ombres concernant leurs modes d'action. Récemment la structure et le mécanisme de PIN1, PIN3 et PIN8 ont été rapportés (Su et al., 2022; Ung et al., 2022; Yang et al., 2022) mais leur activité biochimique et leur intégration à l'échelle de l'organisme ainsi que leurs interactions avec l'environnement restent encore mal comprises. L'identification de mutants pin a mené à des découvertes majeures du développement des plantes, mais *pin2* a souffert d'un manque de description détaillé. Différentes études, depuis sa découverte en 1998, ont montré son phénotype agravitropique. Toutefois en faisant un comparatif de ces études on peut observer que la sévérité du phénotype varie, mais jusqu'à présent personne ne s'était intéressé à ce phénomène. Il existe une grande hétérogénéité des conditions de croissance utilisées dans les nombreux laboratoires impliqués avec des milieux et conditions de culture pouvant varier. En ce qui concerne les milieux nutritifs, il en existe plusieurs fréquemment utilisés : différentes concentrations de milieux Murashige et Skoog (MS) (Murashige et Skoog, 1962), de la gélose nutritive végétale non supplémentée (PNA) (Haughn et Somerville, 1986) ou modifiée (PNS) (Retzer et al., 2017) ou du milieu Hoagland (Hoagland et Arnon, 1938). Ceux-ci peuvent être considérés riches en nutriments (MS), comme des milieux minimaux (PNA/PNS) ou être limités en nutriments (Hoagland). Ce qui ressort après avoir comparé dans la littérature le phénotype racinaire de *pin2* qui a été cultivé sur ces différents milieux de culture, c'est que bien que *pin2* soit toujours décrit comme mutant agravitropique, son phénotype racinaire varie et les conditions de cultures semblent être essentiel à cela. Ce phénomène a été confirmé au cours de notre étude où les différentes expérimentations effectuées ont permis de révéler une conditionnalité du phénotype racinaire agravitropique de *pin2* qui est dépendante des nutriments. Une carence en trois nutriments majeurs (azote, phosphore et fer) ainsi que deux concentrations de milieu de Murashige et Skoog (MS/2 considéré comme riche et MS/10 considéré comme limité en nutriments) ont permis de catégoriser ces conditions selon le phénotype agravitropique de la racine de *pin2*. Les conditions restrictives (MS/2 et MS/2-Fe) permettent l'observation d'un phénotype agravitropique avec un enroulement de la racine de *pin2*, tandis que les conditions permissives (MS/2-P, MS/2-N, MS10) ont permis de révéler une réponse partielle à la gravité des racines de *pin2*. Des conditions de faibles concentrations en N et P et une

carence en saccharose ont également été testées et font partie des conditions permissives permettant de révéler le phénotype gravitropique de *pin2*. De plus, tous les mutants alléliques de *pin2* testés ont montré cette conditionnalité, ce n'est donc pas spécifique au mutant *pin2-2*. Cela démontre que le phénotype racinaire agravitropique de *pin2* dépend de conditions nutritives spécifiques. Une réversion du phénotype agravitropique peut être observée en conditions limitées en nutriments ou plus spécifiquement carencés en azote ou phosphore. Toutefois, toutes les carences nutritives ne semblent pas avoir le même effet, la carence en fer faisant partie des conditions restrictives avec un phénotype agravitropique. Bien que le phénotype conditionnel de *pin2* n'ait jamais été abordé à proprement parlé dans la littérature, il est possible de trouver des études dans lesquelles des liens entre le phénotype agravitropique de *pin2* et les nutriments ont déjà été notés (Niu et al., 2015 ; Ashraf et al., 2020). Niu et al., ont montrés que sur milieu Hoagland en présence d'un excès en phosphore *pin2* (*eir1-1*) a la racine courbée avec un angle de déviation tandis que le mutant répond à la gravité dans des conditions faibles en phosphore (Niu et al., 2015). Quant à Ashraf et al., ils ont montré que sur milieu Hoagland en présence d'un excès d'arsénite *pin2* (*eir1-4*) a un phénotype agravitropique, tandis que le mutant répond à la gravité en absence d'arsénite (Ashraf et al., 2020). Cela pourrait provenir du fait qu'au niveau cellulaire l'arsénite cible spécifiquement le tri intracellulaire de PIN2 et modifie ainsi l'homéostasie cellulaire de l'auxine (Ashraf et al., 2020). Cependant, aucun de ces auteurs n'a tiré de conclusion claire sur ce phénotype agravitropique, pouvant varier en fonction des conditions de cultures, ni approfondi les mécanismes potentiels pouvant expliquer ce phénomène. Il est néanmoins intéressant d'observer que de tels résultats ont été obtenus et ont mis en évidence cet effet environnemental, et surtout spécifique à des carences nutritives, ce qui correspond à la conditionnalité de *pin2* que nous avons mis en évidence dans notre étude.

Au cours de la caractérisation phénotypique racinaire de *pin2-2* nous nous sommes aussi intéressés aux racines latérales. Le stimulus gravitropique pouvant induire la formation de racines latérales sur le côté externe des racines en flexion, avec un maximum d'auxine se trouvant du côté interne de celle-ci, nous avons voulu observer et caractériser l'organisation qu'elles pouvaient avoir chez *pin2-2* et observer l'effet que les conditions permissives auraient sur celle-ci (Ditengou et al., 2008 ; Lucas et al., 2008). En effet, en condition restrictives *pin2-2* ne possède pas de 'waving' mais présente une flexion seulement vers la droite et donc un enroulement de sa racine, en conséquence on observe une augmentation de la densité de racines latérales majoritairement distribuées du côté externe de la flexion. Cela correspond à ce que l'on trouve chez un autre mutant agravitropique, les racines latérales de *aux1* sont aussi décrites comme apparaissant principalement sur le côté externe

de la racine enroulée (De Smet et al., 2007). Toutefois, malgré les conditions permissives qui permettent une réponse partielle à la gravité, nous ne retrouvons pas une distribution des racines latérales avec une alternance gauche/droite. Il semblerait donc que la conditionnalité de *pin2* grâce aux nutriments ne soit pas suffisante pour rétablir l'alternance gauche droite des racines latérales potentiellement car le phénomène d'oscillation causant l'organisation des RL sur la droite peut être dissociée du phénotype agravitropique.

3.2 - Les nutriments moteur de la réponse à l'auxine chez pin2-2

Afin d'apporter des éléments de réponses expliquant la conditionnalité du mutant *pin2* par les nutriments, nous avons voulu tester quels mécanismes pouvaient être impliqués. Dans un premier temps, le NaCl et le sorbitol ayant permis de découvrir la conditionnalité de *pin2*, c'est l'effet osmotique qui a été testé pour voir s'il pouvait être impliqué dans la réversion du phénotype. Nous n'avons toutefois pas vu d'effet du PEG sur la conditionnalité de *pin2*, il semble donc que cet effet ne soit pas lié à des différences de pression osmotique. Nous avons également testé si la vitesse de croissance avec ses deux composantes, l'élongation et la division, pouvait être impliqué. Toutefois bien que la vitesse de croissance soit différente chez *pin2-2* et varie en fonction des nutriments, il n'y a pas de corrélation entre les conditions permissives et restrictives et ces variations. Il n'y a donc pas de lien direct avec la conditionnalité de *pin2*. Nous nous sommes ensuite intéressés aux étapes du gravitropisme en nous concentrant dans un premier temps sur les phases précoces. Nous avons observé les grains d'amidon qui agissent comme percepteur de la gravité dans la columelle, ils sont bien présents chez *pin2* et sédimentent en réponse à la stimulation gravitropique. De plus, lorsque l'on s'intéresse aux 9 premières heures de réponses à la gravité on observe que la réponse à la gravité de *pin2* est intacte. Il semble donc que ce soient des phases plus tardives du gravitropisme qui soient à l'origine du phénotype agravitropique de *pin2*. Il est intéressant de noter que le terme mutant agravitropique est alors peut être un abus de langage parce que *pin2* peut répondre à la gravité tout du moins lors des premières heures. Afin de déterminer si ce phénomène de conditionnalité était local où causé par une signalisation systémique des expérimentations de gravisplitroot ont été mises en place combinant splitroot et gravistimulation. Elles ont permis de mettre en évidence que cette réversion du phénotype de *pin2* est un événement local. Nous nous sommes également intéressés à l'auxine qui est le candidat potentiel le plus évident. En effet, le mutant *pin2* est connu pour sur-accumuler l'auxine à l'apex de la racine dans la columelle et la coiffe racinaire latérale (Ottenschläger et al., 2003) en raison du manque de transport vers l'épiderme, où PIN2 est normalement exprimée. Cette suraccumulation a également été

observée au cours de cette étude chez le mutant *pin2-2* mais avec un effet dépendant des nutriments et des conditions. Dans un premier temps le marqueur DR5:GFP a montré une réduction de l'auxine dans la coiffe racinaire latérale de *pin2-2* dans les conditions permissives. Toutefois ces observations ne reflètent pas directement le niveau endogène d'auxine, mais plutôt sa réponse intégrative dans une voie de signalisation complexe et la résolution temporelle de ce rapporteur est limitée. Afin de mieux détecter la distribution et la concentration d'auxine dans les cellules, des rapporteurs basés sur le domaine II ou degron, qui est dégradé en présence d'auxine (DII), ont été conçus. Nous avons dans un premier temps travaillé avec DII-venus, dont les résultats ne sont pas présentés dans ce manuscrit, toutefois en présence d'une absence de signal aux noyaux il était difficile de déterminer si cela était dû à la présence d'auxine ou un problème d'intégrité de la cellule. Pour une observation plus précise nous avons donc décidé de travailler avec le rapporteur ratiométrique R2D2. Dans un premier temps nous avons réalisé une cinétique de R2D2 en réponse à une gravistimulation dans le cortex et l'épiderme sur une vingtaine de cellules afin de déterminer la meilleure zone où réaliser notre étude. Nous avons décidé de nous concentrer sur le point de cinétique à 1h30 post gravistimulation et sur les 9 première cellules de l'épiderme, en effet le cortex ne permettait pas d'observer de variations et le choix des 9 premières cellules de l'épiderme nous permettait d'observer des variations qui ne changeaient pas en prenant plus de cellules. Chez Col-0, un effet des nutriments (MS/2-Fe, MS/2-N et MS dilué) a été observé avec une diminution de l'auxine dans la partie inférieure de la racine, il est intéressant d'observer cet effet même en l'absence de phénotype visible ce qui pourrait venir d'une redondance fonctionnelle. Chez *pin2-2*, les conditions permissives (MS/2-P, MS/2-N, MS/10) ont entraîné une réponse auxinique asymétrique et une réduction de l'auxine dans l'épiderme par rapport aux conditions restrictives (MS/2 et MS/2-Fe). De plus, cette réduction en conditions permissives ramène l'auxine à un seuil similaire à ce que l'on observe chez Col-0 pouvant potentiellement expliquer la réponse partielle à la gravité dans ces conditions. Enfin, nous n'avons pas observé de modification de vitesse dans la cinétique de mise en place de cette asymétrie d'auxine avec les conditions permissives chez *pin2-2* donc la conditionnalité n'est pas liée à la vitesse de réponse. Il est intéressant de noter que dans d'autres études, des liens entre les nutriments et la modulation de l'auxine à l'extrémité de la racine ont déjà été rapportés (Chai et al., 2020 ; Ötvös et al., 2021). Des plantules ont été étudiées en évaluant l'enroulement des racines sur des boîtes horizontales avec une carence en nitrate, une forte croissance asymétrique des racines a été trouvée pour les racines Col-0 de type sauvage alors que ce phénotype était absent chez les mutants *pin2* (*eir1-1*). La réponse auxinique a été observée avec DR5:GFP et a montré un effet des milieux avec ou sans NO_3^-, suggérant qu'une réponse

asymétrique auxine a été induite par une carence en nitrate dans cette condition (Chai et al., 2020). La présence de nitrate a supprimé la croissance asymétrique des racines et est médiée par le transporteur NRT1.1 (Chai et al., 2020). De plus, le transport de l'auxine médié par PIN2 est épistatique à NRT1.1 lors d'une carence en nitrate (Chai et al., 2020). Une autre étude a également suggéré que l'activité de l'auxine au niveau des méristèmes racinaires s'adapte à des conditions N spécifiques avec une augmentation des niveaux d'activité de l'auxine dans les cellules épidermiques par rapport aux cellules du cortex dans les racines alimentées en $NH4^+$, alors qu'aucune différence entre ces deux fichiers cellulaires n'a été détectée dans les racines sur NO_3^- (Ötvös et al., 2021). Ces résultats confirment davantage le fait que les nutriments peuvent moduler la réponse à l'auxine dans la racine, ce qui peut alors avoir un impact sur le gravitropisme, comme observé chez le mutant *pin2* dans notre étude.

3.3 - L'expression ectopique asymétrique de PIN1, une clé pour comprendre la conditionnalité de pin2

L'auxine étant impliquée dans la conditionnalité du phénotype racinaire agravitropique de *pin2*, l'effet causal potentiel des transporteurs d'auxine a été évalué. Tout d'abord, PIN2 et NRT1.1 ont été observés chez Col-0. En effet, bien qu'il n'y ai pas de phénotype visible chez Col-0 il y a un effet des nutriments, nous avons donc voulu observer si PIN2 et NRT1.1 pouvaient être impliqués, sachant que PIN3, AUX1 et PIN1 seront par la suite observés en faisant un comparatif avec *pin2*. En ce qui concerne PIN2, il est connu comme ayant une régulation différentielle de son trafic entre les surfaces supérieures et inférieures d'une racine gravistimulée, du côté de la racine inférieure l'endocytose de PIN2 est inhibée, ce qui entraîne le maintien à la membrane plasmique de PIN2 dans les cellules épidermiques en expansion, tandis que du côté de la racine supérieure, PIN2 est rapidement intériorisé et dégradé (Abas et al., 2006). Nous avons néanmoins observé des difficultés pour faire ces observations. En effet, une cinétique a été réalisée de 0 à 3h à l'apex racinaire et aussi dans la zone d'élongation et aucune asymétrie n'est détectable dans nos conditions. Nous ne mettons néanmoins pas en doute l'importance de PIN2 et son asymétrie pour répondre à la gravité. Nous avons également voulu observer l'effet de MS/10 pour vérifier si celui-ci permettait l'observation de l'asymétrie ce qui n'a pas été le cas. En ce qui concerne le transcepteur NRT1.1 il a été démontré qu'il transporte l'auxine dans des systèmes hétérologues (Krouk et al., 2010) et que le transport de l'auxine médié par PIN2 est épistatique à NRT1.1 lors d'une carence en nitrate (Chai et al., 2020). Nous avons donc voulu observer l'effet de nutriments sur NRT1.1 chez Col-0. Et nous avons pu observer un effet de tous les nutriments testés sur NRT1.1 ce qui pourrait en faire un

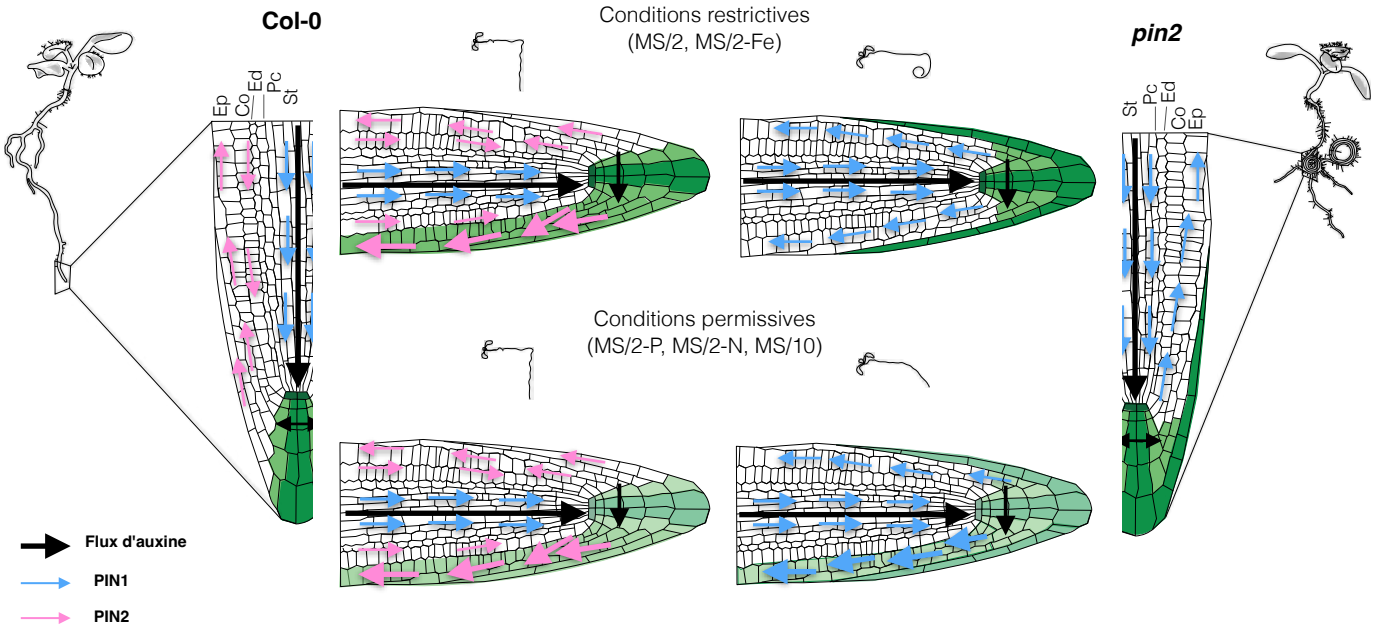


Figure 1.10. Modèle du phénotype racinaire agravitropique conditionnel de *pin2*
Modèle proposé expliquant comment l'expression ectopique épidermique de PIN1 chez le mutant *pin2* dans des conditions permissives rétablit les flux d'auxine asymétriques.

potentiel candidat. En ce qui concerne PIN3 et AUX1, ils ne sont pas impliqués dans la régulation des réponses gravitropiques, car leur localisation et leur présence n'ont pas changé dans des conditions permissives. PIN1, d'autre part, s'est avéré être exprimé de manière ectopique dans l'épiderme de *pin2* et les conditions nutritionnelles ont eu un effet sur sa localisation. Chez *pin2* l'accumulation de PIN1 dans la membrane apicale des cellules épidermiques est toujours au moins légèrement asymétrique, nous suggérons l'existence d'une valeur seuil en dessous de laquelle aucune restauration phénotypique se produit (dans des conditions restrictives) et au-dessus de laquelle la restauration gravitropique se produit (dans des conditions permissives). Ce seuil se situe avec un rapport des faces inférieures/supérieures entre 2 et 3. Cela permet potentiellement une redistribution de l'auxine dans la racine puis une croissance asymétrique en réponse à la gravité. Conformément à notre étude, une localisation ectopique de PIN1 chez des mutants *pin2* a précédemment été publiée (Omelyanchuk et al., 2016). De plus il a été observé que la localisation ectopique de PIN1 peut être affectée par les flavonols entraînant une restauration partielle du gravitropisme chez le mutant *pin2* ce qui se rapproche même si ce n'est pas ici dû à des nutriments à ce que l'on peut observer dans notre cas (Santelia et al., 2008). Enfin, l'aluminium pourrait également avoir un effet sur la régulation ectopique de PIN1 dans l'épiderme, même chez Col-0 (Li et al., 2021a). Ces résultats sont similaires à notre hypothèse dans laquelle l'expression ectopique asymétrique de PIN1 permet les différentes réponses dans des conditions permissives et restrictives.

3.4 - Modèle expliquant la conditionnalité de pin2-2 et perspectives

Ce chapitre a permis de mettre en évidence le phénotype conditionnel du mutant *pin2* et d'un lien entre les nutriments et le transport/réponse de l'auxine. Nous avons pu mettre en évidence que cette conditionnalité n'était pas dû à la pression osmotique, à la vitesse de croissance, à un signal systémique mais également que les premières étapes de la réponse à la gravité chez *pin2* étaient intactes. Nous avons pu observer que les conditions permissives permettaient la réorientation des flux d'auxine et donc une réponse à la gravité. Bien qu'AUX1 et PIN3 ne soient pas impliqués, nous avons mis en évidence le rôle de PIN1 exprimé différentiellement et ectopiquement dans l'épiderme de *pin2*. De plus, la croissance des racines latérales n'est pas impactée chez *pin2* mais la densité racinaire est plus importante et leur distribution est majoritairement sur le côté externe de la courbure et ceux même indépendamment de la réversion du phénotype.

Les résultats présents dans ce chapitre nous ont permis d'établir un modèle (Figure 1.10). Dans le fond sauvage Col-0, la localisation de la protéine PIN2 dans l'épiderme entraîne les flux

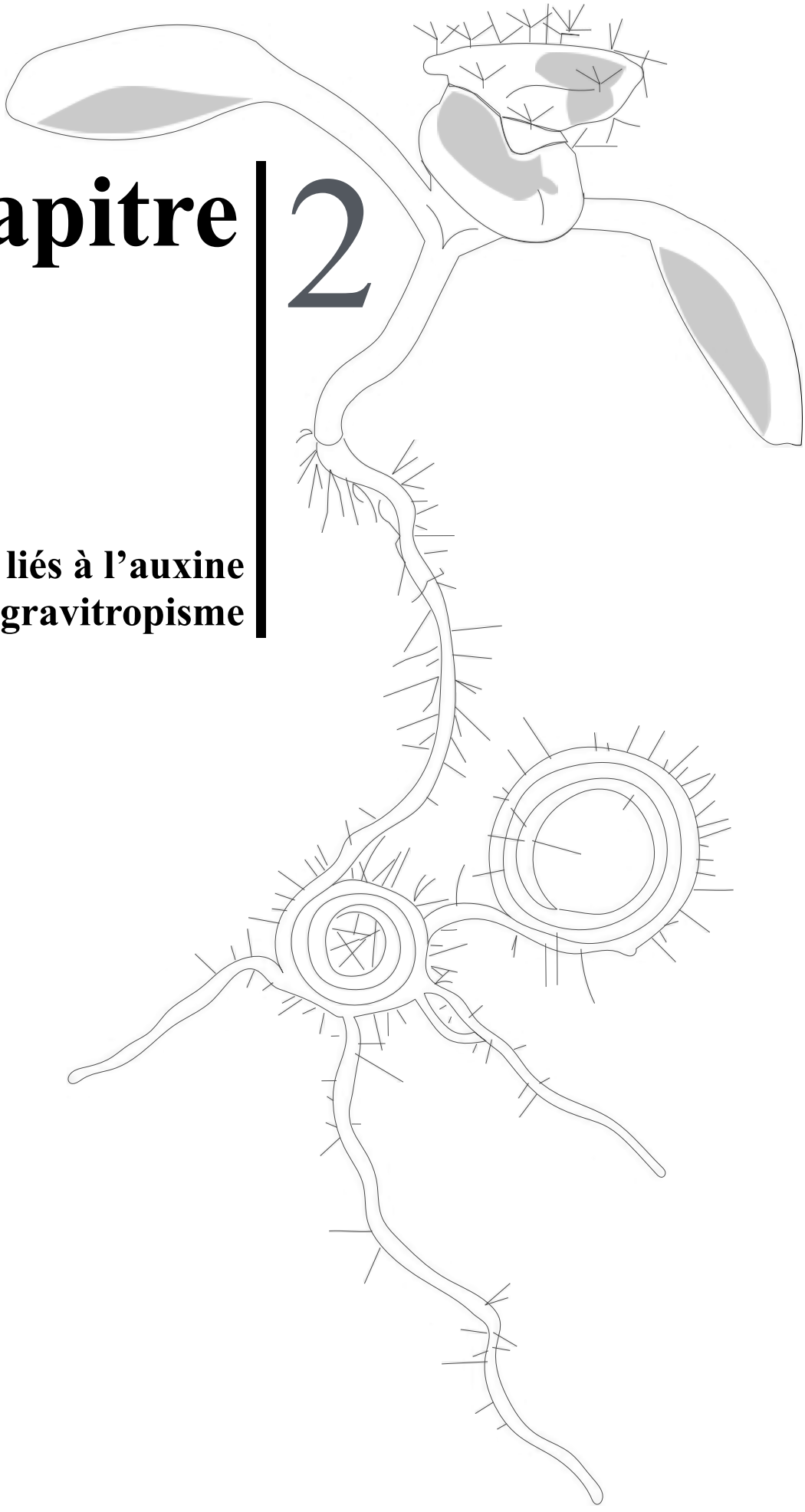
d'auxine et favorise la distribution asymétrique après un gravistimuli quelles que soient les conditions. Chez le mutant *pin2*, l'expression ectopique de PIN1 dans l'épiderme est observée dans toutes les conditions testées. Dans des conditions permissives, le rapport PIN1 haut/bas atteint une valeur seuil et restaure un flux d'auxine asymétrique responsable de la réponse gravitropique. Ce mécanisme est absent dans des conditions restrictives où la racine de *pin2* continue de croître de manière agravitropique et forme une forme de lasso. Donc la modulation du transport de l'auxine grâce à l'expression différentielle de PIN1 dans diverses conditions environnementales, modifie la réponse gravitropique racinaire et suggère que cette réponse tropique a été soumise à une forte pression sélective pour favoriser l'exploration des sols.

Des études ultérieures devraient mieux définir comment les changements dans la composition des nutriments peuvent moduler l'expression de PIN1 de manière directe ou indirecte. En effet, dans ce chapitre nous avons limité l'analyse aux principaux nutriments comme le nitrate, le phosphate et le fer car ce sont des éléments majeurs de régulation de la croissance et du développement racinaire (Xuan et al., 2017 ; Liu 2021 ; Liang 2022). Nous avons défini les conditions basées sur un milieu largement utilisé, qui est le Murashige et Skoog à moitié dilué mais des modulations pratiquement infinies de la composition du milieu pourraient être testées. Il serait également intéressant de comprendre pourquoi les milieux et plus particulièrement les carences nutritives ont des spécificités d'action en tant que condition permissive ou restrictive. Est-ce que cela vient de l'élément lui-même et sa carence, d'une cascade de signalisation ou des conséquences de cette carence. En effet, l'homéostasie des phytohormones dans les racines est obtenue par un équilibre délicat entre la biosynthèse de novo, le transport et la dégradation, qui sont toutes très sensibles aux signaux nutritifs externes et internes. Parmi ces signaux, il a été démontré que les carences en N et P ont un impact important sur les niveaux d'auxine dans les racines (Jia et al., 2022). La carence en N augmente la biosynthèse locale de novo de l'auxine dans la zone de maturation ainsi que dans le méristème apical de la racine. De la même manière, la carence en P peut également augmenter la biosynthèse de l'auxine dans les racines. En ce qui concerne la carence en Fe, elle augmente également les niveaux d'auxine dans les racines, toutefois cela cause l'induction subséquente de l'accumulation de NO (Chen et al., 2010). Le NO étant connu comme étant un signal transducteur dans le gravitropisme, est-ce la raison qui cause la condition -Fe à être restrictive. Étant donné que les privations de nitrate et de phosphate, ainsi qu'un dixième de MS, définissent les conditions permissives, nous n'avons pas étudié les voies en aval de certains éléments. De nombreux régulateurs ont été identifiés comme régulateurs de la réponse en carence

de nitrate (Kiba et al., 2018) et phosphate (Rouached et al., 2010) et même commune aux éléments connus (Ristova and Kopriva, 2022). Cependant, aucun lien moléculaire n'a été observé entre ces voies et l'expression de PIN1 dans l'épiderme racinaire. D'autres études devraient fournir plus d'informations à cet effet. Celles-ci aideraient à comprendre comment le gravitropisme est modulé par les nutriments dans le mutant *pin2*, la relocalisation des PINs avec notamment PIN1 étant la piste permettant d'expliquer la conditionnalité du phénotype racinaire agravitropique de ce mutant. Il serait donc également intéressant d'observer la réponse du double mutant *pin1 pin2-2* sur les différentes conditions permissives et restrictives. Le croisement a été initié mais nous n'avons pas réussi à obtenir ce double mutant, différents laboratoires ayant travaillé avec celui-ci ont été contactés pour récupérer des graines, toutefois la majorité ne les possédaient plus. Nous avons réussi à obtenir des graines mais celle-ci datait de 2008 et n'ont pas germé. Le double mutant *pin1 pin2* possèdent un phénotype embryonnaire majoritairement létal qui génère une difficulté à l'obtenir et pouvoir travailler avec celui-ci ce qui contraste avec les défauts beaucoup plus faibles et souvent pas entièrement pénétrants des mutants simples, suggèrent l'importance de la redondance fonctionnelle au sein de la famille des gènes PINs. Il serait également intéressant d'observer le double mutant *chl1.5 pin2*. En effet, NRT1.1 étant connu comme un transcepteur qui transporte également l'auxine, il serait intéressant de voir s'il participe également à ce phénomène. En effet on a pu voir chez Col-0 que NRT1.1:GFP était modulé par les différents nutriments donc il serait intéressant de l'observer chez *pin2-2*.

Chapitre 2

Les autres mutants liés à l'auxine et au gravitropisme



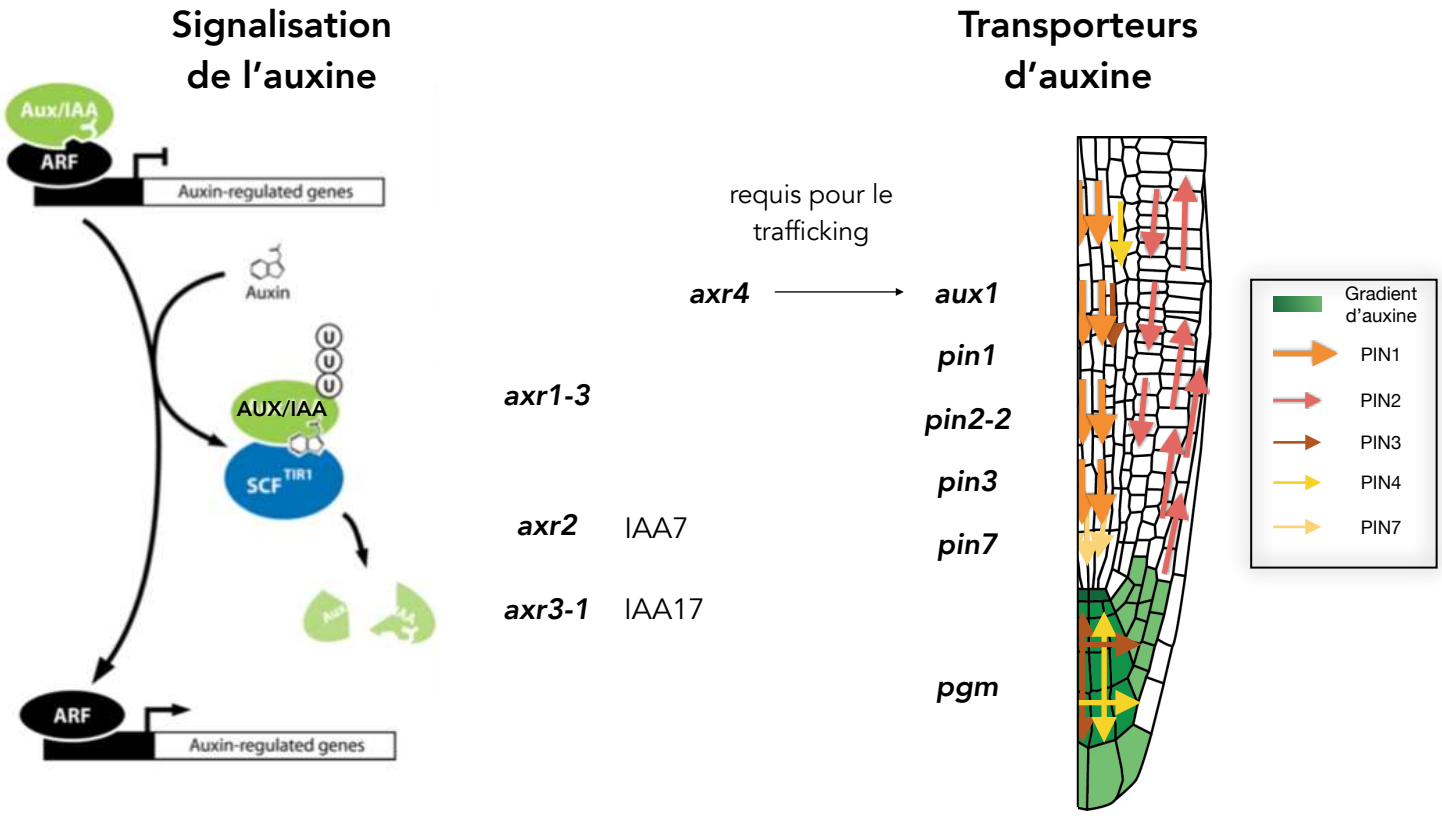


Figure 2.1. Schéma représentatif des différents mutants utilisés au cours de ce chapitre.
Schéma représentatif plaçant les différents mutants utilisés au cours de ce chapitre.

Chapitre 2 - Les autres mutants liés à l'auxine et au gravitropisme

1 - Introduction

Dans ce chapitre, afin d'élargir notre compréhension de l'implication des conditions de culture sur la réponse gravitropique, nous avons décidé d'étudier le phénotype de différents mutants pouvant être affectés dans l'homéostasie de l'auxine ou dans le gravitropisme. Différents mutants, étant pour certains considérés comme agravitropiques dans la littérature, ont été testés afin de voir si les conditions de culture, notamment avec des carences nutritives spécifiques, avait un effet sur leur phénotype de la même manière que pour *pin2-2*. Nous avons choisi des candidats impliqués dans la perception de la gravité, dans la voie de signalisation ou dans le transport de l'auxine (Figure 2.1). En ce qui concerne le candidat lié à la perception de la gravité, nous avons choisi le mutant pgm qui ne possède pas de grains d'amidon dans la columelle et qui est considéré comme agravitropique mais de façon indépendante à l'auxine. La phosphoglucomutase (PGM) catalyse la conversion de Glc-6-P en Glc-1-P qui a un rôle dans la biosynthèse de l'amidon (Yu et al., 2000; Brauner et al., 2014). Concernant les candidats impliqués dans la signalisation de l'auxine, ce sont des mutants résistants à l'auxine que nous avons choisi d'étudier, ceux-ci ayant des rôles différents au cours de la signalisation. Tout d'abord, nous avons choisi le mutant *axr1-3* qui est considéré comme ayant un phénotype qui inclut une résistance à l'auxine ainsi qu'un défaut de réponse gravitropique. En effet, RUB1 qui est composé d'un hérérodimère entre AXR1 et ECR1, régule l'activité du complexe Skp1-Cullin-Fbox (SCF) qui interagis avec Aux/IAA lorsque l'auxine se lie à TIR1, permettant la réponse à l'auxine (Lincoln et al., 1990; Dharmasiri et al., 2007). Nous avons également choisi les mutants *axr2-1* et *axr3-1* qui sont considérés comme ayant un défaut de réponse gravitropique dans la littérature. Les mutants *axr2-1* et *axr3-1* sont respectivement mutés au niveau des gènes IAA7 et IAA17, faisant partis de la famille des Aux/IAA qui sont rapidement et spécifiquement induits par l'auxine (Wilson et al., 1990; Muto et al., 2007; Sato et al., 2014; Leyser et al., 1996; Ouellet et al., 2001). Les protéines codées par les Aux/IAA sont nucléaires, capables de se dimériser, et composées de 4 domaines : les domaines I et II sont uniques aux protéines Aux/IAA, tandis que les domaines III et IV sont conservés et servent de domaines d'interaction protéine-protéine. Ces protéines interagissent avec les ARF, qui sont capables de se lier à l'élément de réponse à l'auxine présent dans le promoteur des gènes inductibles par l'auxine (Kim et al., 1997). Les mutations *axr2-1* et *axr3-1* modifient les acides aminés dans le motif conservé qvVGWPPvrsyRkN trouvé

dans le domaine II de toutes les protéines Aux/IAA ce qui confère une instabilité à la protéine (Ouellet et al., 2001). Enfin nous avons choisi le mutant *axr4* qui est considéré comme un mutant résistant à l'auxine tout comme les autres *axr* vu ci-dessus. Toutefois celui-ci bien qu'étant également considéré comme agravitropique, est lié au transport de l'auxine mais pas à sa signalisation. En effet, AXR4 est une protéine accessoire du réticulum endoplasmique (ER) qui est impliquée dans la régulation de la localisation de AUX1, mais pas des protéines PINs (Hobbie and Estelle, 1995; Yamamoto and Yamamoto, 1999; Dharmasiri et al., 2006; Hobbie, 2006). Sa perte entraîne une accumulation anormale d'AUX1 dans le ER des cellules épidermiques, indiquant que le phénotype agravitropique d'*axr4* est causé par un trafic défectueux d'AUX1 dans l'épiderme racinaire (Dharmasiri et al., 2006). Concernant les mutants impliqués dans le transport de l'auxine, nous nous sommes intéressés à différents transporteurs d'efflux de la famille des PINs. PIN1 et PIN2 ont été les premiers PINs à être identifiés (Chen et al., 1998; Galweiler et al., 1998), et bien que PIN1 ne joue pas un rôle direct dans l'accumulation différentielle d'auxine lors du gravitropisme, il est chargé de transporter l'auxine synthétisée dans les parties aériennes vers l'apex racinaire. Récemment la structure et le mécanisme de PIN1 a été identifié (Yang et al., 2022). Le mutant *pin1* est caractérisé par une tige d'inflorescences nue en forme d'épingle. Dans les racines, la protéine réside principalement dans la stèle à l'extrémité basale des cellules vasculaires. Nous nous sommes également intéressés à PIN3 qui est exprimé du côté basal des cellules vasculaires et du côté latéral des cellules du péricycle de la zone d'élongation redirigeant l'auxine dans la stèle par translocation latérale. Dans les cellules de la columelle, PIN3 présente une localisation apolaire, permettant l'allocation de l'auxine à l'épiderme. Lors du gravitropisme la transduction du signal se fait en partie grâce à la relocalisation de PIN3 dans les cellules de la columelle (Friml et al ., 2002 ; Kleine-Vehn et al., 2010; Rahman et al., 2010). La phosphorylation de PIN3 joue un rôle dans la régulation de son trafic vers la membrane plasmique (Ganguly et al., 2012). Récemment la structure et le mécanisme de PIN3 ont été identifiés (Su et al., 2022). De plus, le mutant *pin3* est considéré dans la littérature comme agravitropique (Friml et al., 2002). Nous nous sommes intéressés au mutant du gène PIN7 qui est un transporteur d'efflux d'auxine. Dans les racines, il est exprimé au niveau des membranes latérales et basales des cellules provasculaires et dans le méristème et la zone d'élongation (Friml et al., 2003). Enfin, nous nous sommes également intéressés au transporteur d'influx d'auxine AUX1, qui est présent dans le protophloème, la columelle et les cellules latérales de la coiffe (Swarup et al., 2001). AUX1 participe au gravitropisme en agissant à l'unisson avec les transporteurs d'efflux d'auxine pour coordonner la redistribution localisée de l'auxine dans l'apex de la racine (Marchant et al., 1999). Le mutant *aux1* est considéré comme

agravitropique et possède un phénotype semblable à celui de *pin2* avec un enroulement de la racine primaire (Bennett et al., 1996; Swarup et al., 2004).

Dans ce chapitre, j'ai donc cherché à déterminer si la sensibilité à l'environnement, et en particulier aux nutriments, qui rend conditionnel le phénotype agravitropique racinaire de *pin2* est unique, ou s'il est possible de retrouver ce phénomène chez d'autres mutants, et provient donc d'un mécanisme plus général qui n'est pas révélé que chez *pin2*. Plusieurs approches ont été mises en place. Tout d'abord, nous avons étudié les mutants qui ont été présentés ci-dessus, les mutants résistants à l'auxine : *axr1-3, axr2-1, axr3-1* et *axr4*, un mutant dans la perception de la gravité : pgm et des mutants de transporteurs d'efflux d'auxine : *pin1, pin3, pin7* ou d'influx d'auxine : *aux1* en réponse aux différentes conditions de culture (Tasaka et al., 2001). Ensuite, nous avons étudié les doubles mutants *pin2-2 aux1*, ainsi que *pin2-2 pin3*, afin de déterminer la part respective de ces différents régulateurs du gravitropisme racinaire dans le contrôle du phénotype par l'environnement ainsi que leurs interactions pour l'établissement des flux d'auxine au sein des tissus de l'apex racinaire et déterminer s'ils partageaient les mêmes voies de réponse. Finalement, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'effet des conditions permissives et restrictives sur le mutant *aux1*. En effet, celui-ci est l'un des mutants dans nos conditions de culture dont la racine primaire s'enroule avec un phénotype de lasso/spirale similaire au phénotype de *pin2*. Nous nous sommes donc plus intéressés à l'effet des nutriments sur la réponse à l'auxine chez ce mutant.

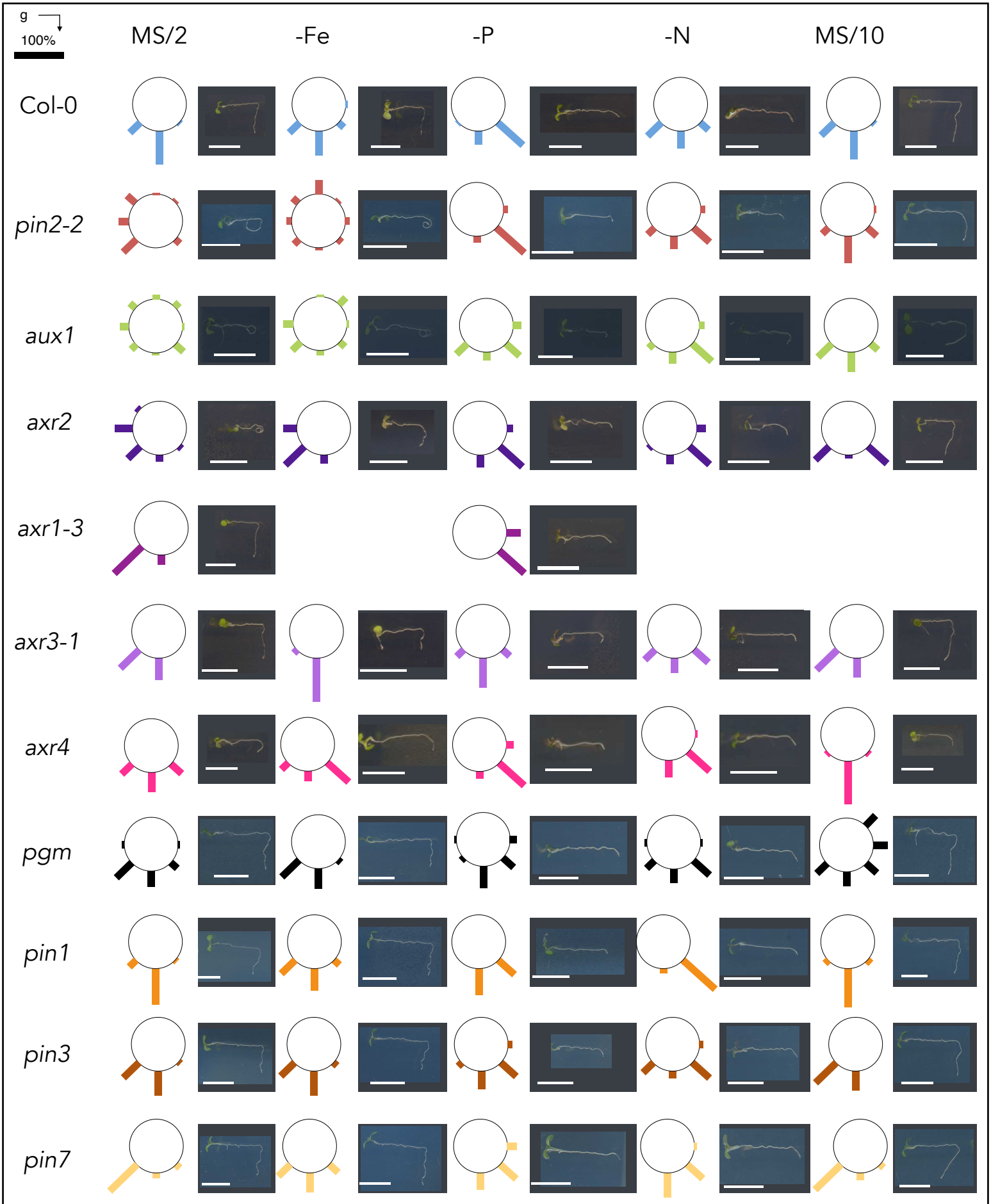


Figure 2.2. Le phénotype de réponse racinaire à la gravité chez des mutants *axrs*, *pgm*, *pins* et *aux1*
Réponse gravitropique de Col-0 et de différents mutants, considérés comme résistant à l'auxine (*axr1-3*, *axr2*, *axr3-1*, *axr4)*, ne produisant pas de grains d'amidon (*pgm*), mutants de transporteur d'efflux (*pin2-2*, *pin1*, *pin3*, *pin7)* et d'influx (*aux1*) d'auxine. Ces plantules ont été cultivés sur différents milieux nutritifs (MS/2, -Fe, -P, -N et MS/10) et imagés après 48 heures de gravistimulation. Les diagrammes circulaires affichent l'orientation de l'apex de la racine primaire sous forme de barres colorées représentant le pourcentage de plantes. 40<n<15, barre d'échelle = 1 cm.

2 - Résultats

2.1 - Le phénotype d'autres mutants liés à l'auxine et au gravitropisme

Les conditions restrictives (MS/2 et MS/2-Fe) et permissives (MS/2-P, -N et MS/10) déterminées avec *pin2-2* ont été testées sur tous les différents mutants présentés en introduction (Figure 2.2). En ce qui concerne les mutants *axr2* et *aux1*, ils ont un phénotype agravitropique en conditions restrictives et ils sont sensibles aux nutriments, notamment en conditions permissives où le phénotype est gravitropique. Pour *axr2* on observe une nuance concernant MS/2-Fe où il y a une réponse partielle à la gravité. Ces résultats confirment l'importance de l'auxine dans ce processus avec un phénotype agravitropique conditionnel similaire à *pin2-2* pour *axr2* et *aux1*. Néanmoins tous les mutants n'ont pas eu des résultats similaires à ceux de *pin2-2*. En effet les mutants *pin1*, *pin3*, *pin7*, *axr1-3*, *axr3-1* et *pgm* répondent à la gravité dans toutes les conditions, avec l'apex dirigé vers le vecteur de gravité comme Col-0. Bien que certains soient très largement considérés comme agravitropiques dans la littérature, en particulier *pin3* et *pgm*, cela n'a pas pu être observé dans nos conditions.

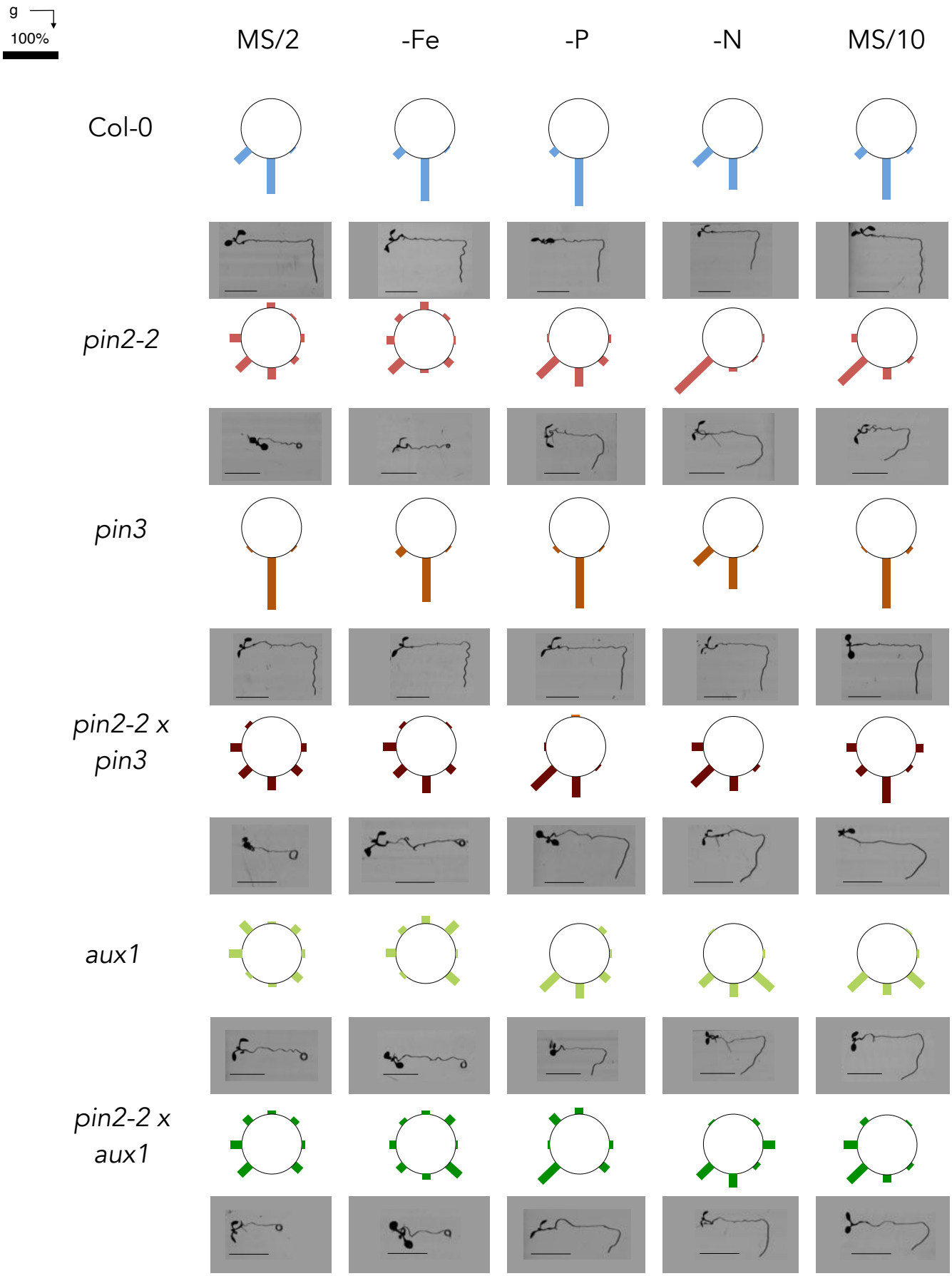


Figure 2.3. Le phénotype de croissance racinaire agravitropique de *pin2-2 pin3* et *pin2-2 aux1*
Réponse gravitropique de Col-0, *pin2-2*, *pin3*, le double mutant *pin2-2* x *pin3*, *aux1*, et le double mutant *pin2-2* x *aux1*. Images après 48 heures de gravistimulation dans le robot de phénotypage HIRROS. Les diagrammes circulaires affichent l'orientation de l'apex de la racine primaire sous forme de barres colorées représentant le pourcentage de plantes. n=30 , barre d'échelle = 1 cm.

2.2- Les doubles mutants pin2-2 aux1 et pin2-2 pin3

Les mutants *pin2* et *aux1* sont des mutants fortement agravitropique avec un phénotype de racine primaire en spirale qui est sensible aux nutriments, *pin3* dans nos conditions n'est pas considéré comme agravitropique malgré sa relocalisation en réponse à la gravité. Nous avons décidé de choisir ces deux candidats, *aux1* pour ses similitudes avec *pin2*, et *pin3* pour son rôle dans le gravitropisme, afin de déterminer s'il pouvait y avoir une complémentation entre ces différents mutants ou s'ils sont dans la même voie de réponse. Des croisements ont été réalisés pour obtenir les doubles mutants *pin2-2 aux1* et *pin2-2 pin3*. L'impact des conditions restrictives et permissives a été observé sur ces doubles mutants (Figure 2.3). Que ce soit pour le double mutant *pin2-2 aux1* ou *pin2-2 pin3* un phénotype agravitropique est observé en conditions restrictives similaire à ce qui est observé pour *pin2-2* ou *aux1*. De la même manière dans les conditions permissives pour le double mutant *pin2-2 aux1* ou *pin2-2 pin3* une réponse à la gravité est observée. Les doubles mutants *pin2-2 aux1* et *pin2-2 pin3* sont donc agravitropiques avec un phénotype conditionnel sensible aux nutriments. Il semble donc que le statut nutritionnel ait un effet sur le gravitropisme de ces doubles mutants en gardant une spécificité de nutriments. De plus, le phénotype de *pin2-2* et *aux1*, déjà fortement agravitropique mais conditionnel aux nutriments dans les simples mutants, est additionnel dans le double mutant, indiquant les actions conjointes de AUX1 et PIN2 tous les deux localisé dans les tissus épidermiques permettant le transport efficace de l'auxine et donc son action au cours du gravitropisme. Pour le phénotype de *pin2-2 pin3*, c'est le phénotype agravitropique de *pin2-2* qui prévaut sur le phénotype gravitropique des *pin3* chez le double mutant, indiquant que PIN3 n'est pas impliqué dans la réversion du phénotype par les nutriments. Il semblerait donc que ce soit un autre potentiel partenaire que ceux présenté ici qui soit responsable de la réversion du phénotype en fonction de l'environnement nutritif.

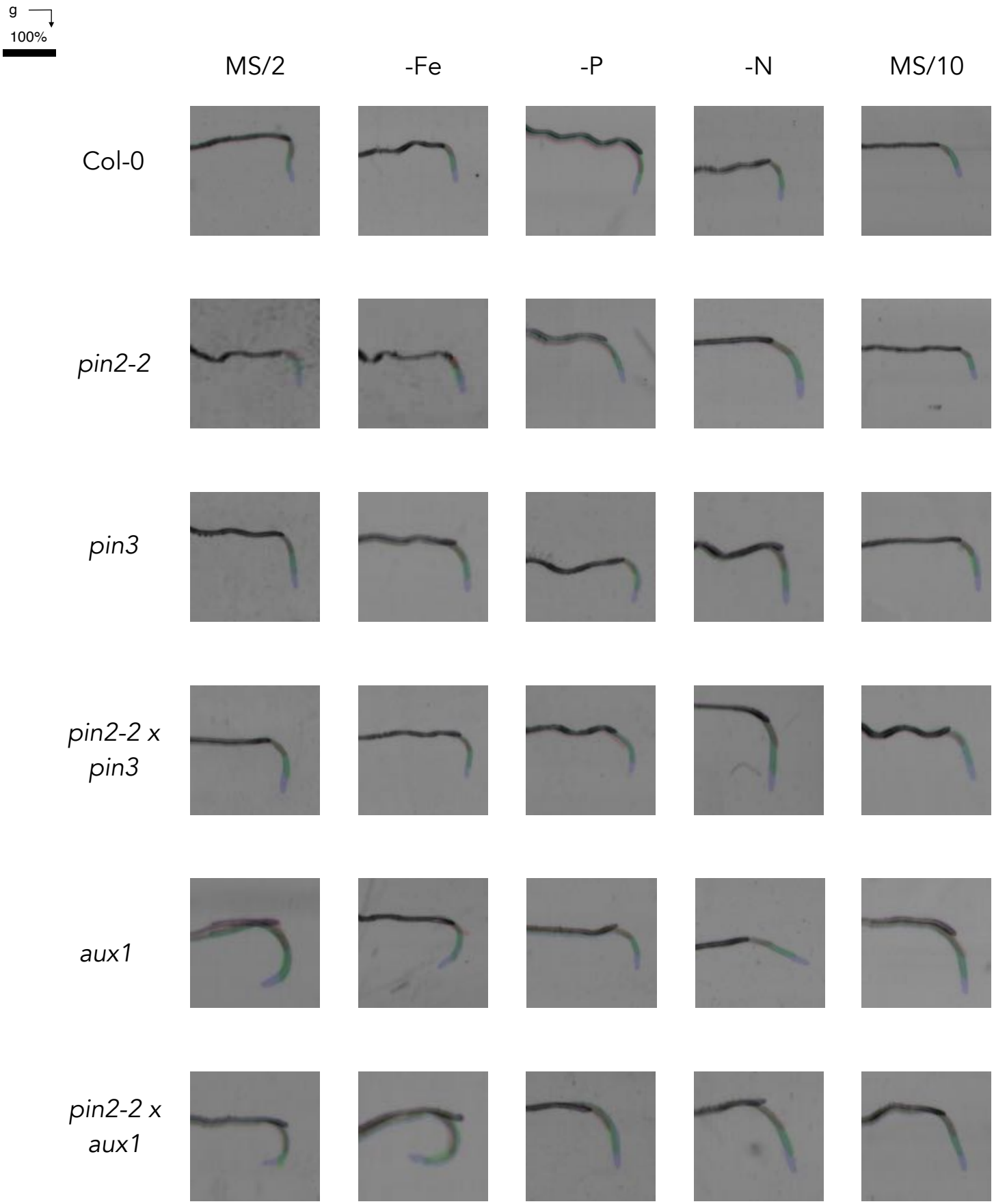


Figure 2.4. Le phénotype de gravitropisme précoce de *pin2-2*, *pin3* et *aux1* et des doubles mutants *pin2-2 x pin3* et *pin2-2 x aux1* dans des conditions permissives et restrictives

Image représentative d'apex racinaire de plantules de 6 jours de Col-0, *pin2-2*, *aux1*, *pin2-2* x *aux1* , *pin3* et *pin2-2* x *pin3* soumis à un stimulus gravitropique de 90° et imagés à 0, 3, 6 et 9 heures (respectivement noir, rouge, vert et violet) en réponse à différents milieux carencé en nutriments (MS/2, MS/2-Fe, MS/2-P, MS/2-N, MS/10).

2.3- Le gravitropisme précoce des aux1, pin3 et leurs doubles mutants avec pin2-2

Pour mieux comprendre l'effet des nutriments sur le gravitropisme au cours du temps, la cinétique du gravitropisme racinaire précoce (jusqu'à 9 heures) a été observé chez Col-0, *pin2-2*, *pin3*, *pin2-2 pin3*, *aux1* et *pin2-2 aux1*. La courbure de la racine est suivie à 0, 3, 6 et 9 h après gravistimulation (Figure 2.4). La racine des mutants *pin2-2*, *pin3* et le double mutant *pin2-2 pin3* présentent une réponse gravitropique racinaire précoce similaire à celle de Col-0. Ces résultats indiquent que les premières étapes de la réponse à la gravité sont perçues par ces différents mutants et que leur phénotype agravitropique est plus tardif à se mettre en place. Toutefois, en ce qui concerne le mutant *aux1* et le double mutant *pin2-2 aux1* un phénotype agravitropique est présent très précocement en conditions restrictives et une réponse à la gravité est observée en conditions permissives. Cela indique que c'est le phénotype de *aux1* qui prévaut sur celui *pin2* au cours du gravitropisme précoce, et que AUX1 aurait donc un rôle en amont de PIN2 sur le trajet des flux d'auxine permettant la réponse à la gravité. Il est également intéressant de noter que l'effet de l'environnement nutritif est relativement rapide, déjà observable dès 6h, et que cette observation nous donne des indications supplémentaires vis-à-vis de l'observation tardive.

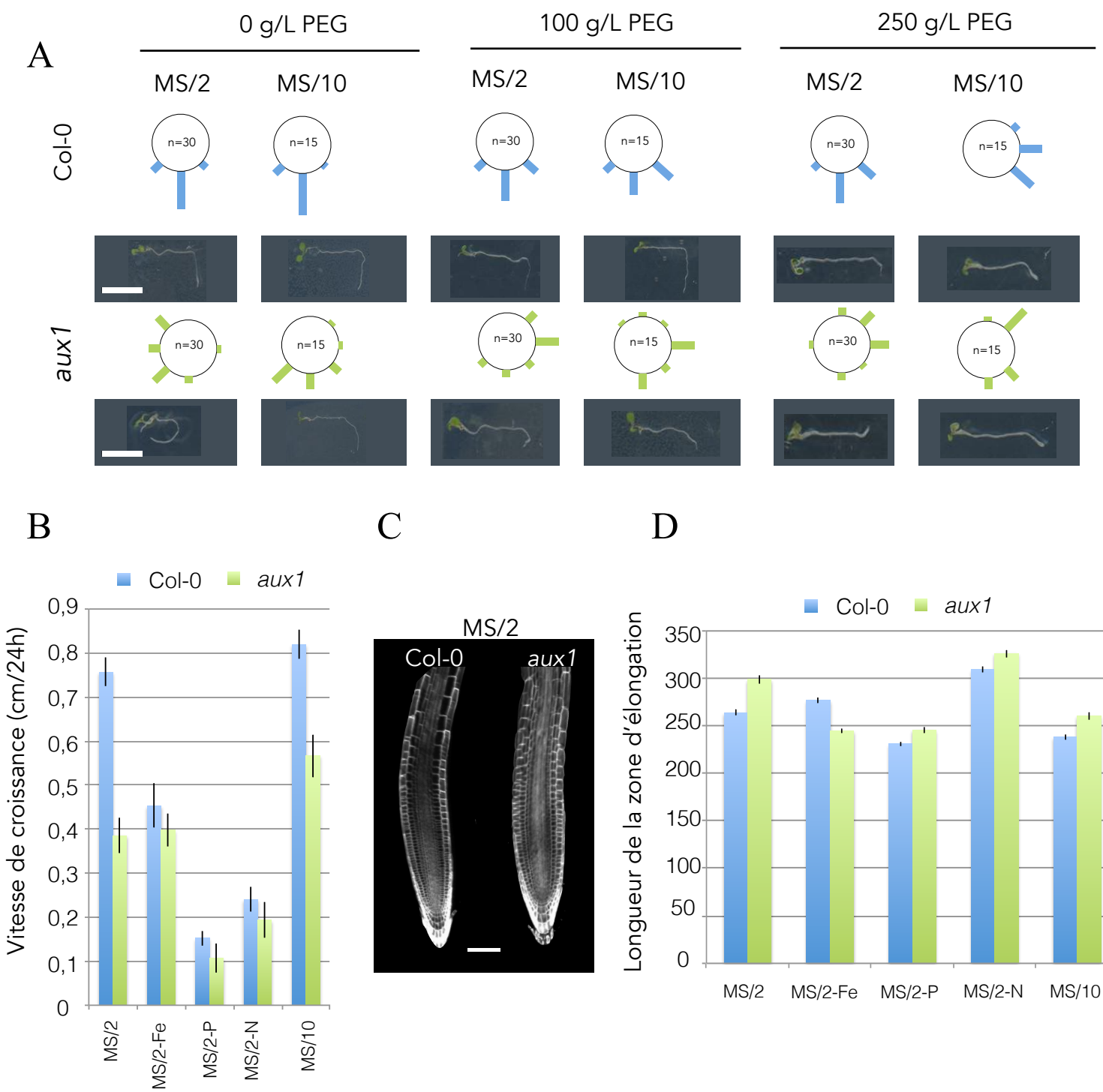


Figure 2.5. L'effet du stress osmotique et l'étude de la croissance racinaire de *aux1*

(**A**) Stress osmotique imité avec la présence d'une gamme de PEG sur milieux nutritif MS/2 et MS/10 pour Col-0 et *aux1*. Des plantules de 6 jours ont été transférés sur les différents milieux et soumis à un stimulus gravitropique à 90° et imagés après 48h de gravistimulation. Les diagrammes circulaires affichent l'orientation de l'apex de la racine primaire sous forme de barres colorées représentant le pourcentage de plantes. n=15, barre d'échelle = 1cm

(**B**) Graphique représentant la croissance des racines primaires de plantules de 6 jours de mutants Col-0 et *aux1* suivis pendant 24 heures (15<n<30) en réponse à différents milieux (MS/2, MS/10 , MS/2-P, MS/2-N, MS/2-Fe) . Les p-values sont basées sur les tests t de Student et la comparaison est faite pour chaque génotype dans MS/2 par rapport aux différents milieux testés P <0,0001 (***), P <0,001 (**), et P <0,05 (*), les barres d'erreur représentent l'écart type

(**C**)Image représentative du marqueur SPR1pro:tdTomato:Lti6b qui permet le marquage de la membrane plasmique pour observer la zone d'élongation dans des plantules de Col-0 et *aux1* de 7 jours.

(**C**) Graphique représentant la longueur de la zone d'élongation de Col-0 et *aux1* en réponse à différents milieux (MS/2, MS/10, MS/2-P, MS/2-N, MS/2-Fe). n=10

2.4- Les conditions osmotiques et la vitesse de croissance, le cas de aux1

Afin de mieux appréhender le phénomène qui pourrait permettre à aux1 d'avoir un phénotype conditionnel sensible aux nutriments, nous avons observé l'effet de l'osmolarité ainsi que l'effet de la vitesse de croissance ainsi que sa composante d'élongation. Des expériences de gravistimulation ont été réalisées sur MS/2 et MS/10 combiné à une modification de l'osmolarité avec du PEG afin de mieux comprendre la sensibilité du phénotype agravitropique (Figure 2.5A). La position de l'apex racinaire est suivie 48h après une réorientation à 90° des boîtes verticales. Col-0 a une réponse normale à la gravité dans toutes les concentrations de PEG testées que ce soit en MS/2 ou MS/10 avec l'apex suivant le vecteur de gravité tandis que le mutant aux1 a un phénotype agravitropique sur MS/2 dans toutes les concentrations de PEG testées et un phénotype racinaire qui répond à la gravité en MS/10 dans toutes les concentrations de PEG testées. L'augmentation de la pression osmotique à l'aide d'un polymère non métabolisé (PEG) n'a pas inversé le phénotype agravitropique du mutant *aux1* que ce soit en MS/2 ou MS/10, ce qui suggère qu'une augmentation de la concentration osmotique seule ne représente pas une condition permissive et que sa présence combinée à une condition permissive n'impacte pas le phénotype.

La vitesse de croissance a été évaluée pour tous les milieux sur 24 heures après l'induction gravitropique et a montré une réduction globale de la croissance des racines pour le mutant *aux1* (Figure 2.5B). Cependant, aucune corrélation avec les conditions permissives et restrictives n'a été observée, suggérant que l'altération de la croissance des racines n'est pas responsable de l'expression phénotypique et de la réversion de *aux1*. En complément nous avons également observé l'une des composantes de la vitesse de croissance : l'élongation. Elle a été observée à l'aide du marqueur SPR1pro:tdTomato:Lti6b, qui permet de visualiser la membrane plasmique à l'aide d'une fluorescence rouge et qui a été introgressé par croisement dans le mutant *aux1* (Figure 2.5C). De la même manière, aucune corrélation avec les conditions permissives et restrictives n'a été observée, la variation d'élongation liée aux différents milieux n'est donc pas responsable de l'expression phénotypique et de la réversion de *aux1* (Figure 2.5D).

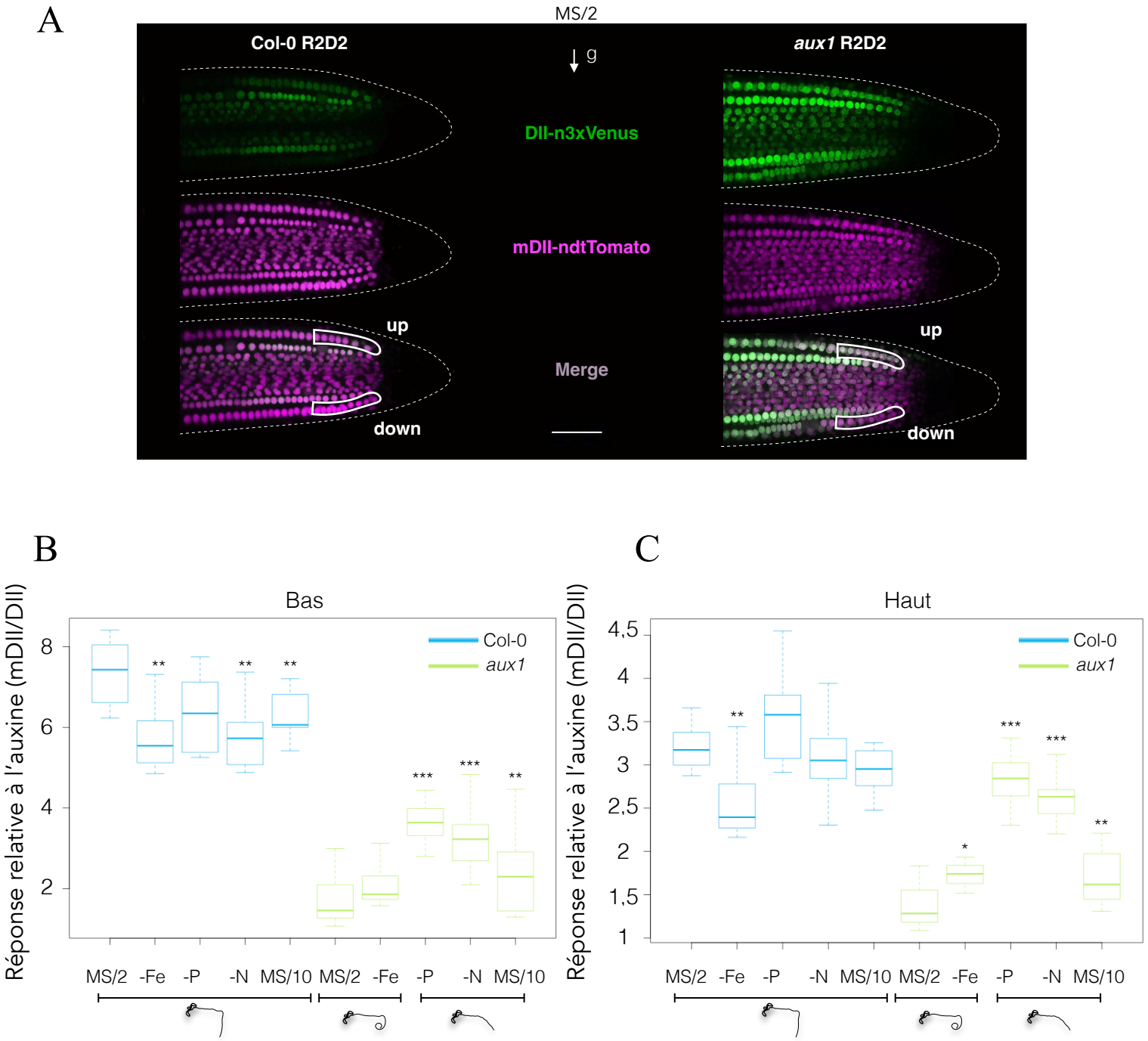


Figure 2.6. L'accumulation d'auxine en réponse à la disponibilité en nutriments chez le mutant *aux1*

(**A**) Image confocale représentative du marqueur ratiométrique R2D2 montrant les signaux DII-n3xVenus (vert) et mDII-ndtTomato (violet). Les zones blanches représentent les 9 premières cellules épidermiques choisies pour la quantification. Des plantules de 6 jours ont été imagées sur lame de microscopie avec un bloc de milieu MS/2 1h30 après gravistimulation. g = vecteur gravité, barre d'échelle = 50 microns

(**B,C**) Quantification du rapport mDII/DII dans les 9 premières cellules épidermiques de la partie basse ou haute de l'apex racinaire 1h30 après gravistimulation chez Col-0 et *aux1* dans divers médias (MS/2, MS/10, MS/2-P, MS/2-N, MS/2-Fe). Les p-values sont basées sur les tests t de Student pour une comparaison par paires par rapport au milieu de référence (MS/2) p<0,0001 (***), p<0,001 (**) et p<0,05 (*) , 10<n<15, les barres d'erreur représentent l'écart type.

2.5- L'accumulation d'auxine dans l'épiderme et la disponibilité des nutriments, le cas de aux1

Le marqueur ratiométrique R2D2 a été introgressé dans le mutant *aux1* afin d'observer les changements dynamiques de la réponse à l'auxine celui-ci permettant de visualiser lorsque le motif degron (DII) de Aux/IAA est dégradé (Liao et al., 2015). Les changements de la réponse à l'auxine ont été observés 90 minutes après gravistimulation (Figure 2.6A). Les données sont présentées sous la forme du rapport mDII/DII montrant donc une augmentation du rapport lorsqu'il y a plus d'auxine et que DII est dégradé. Les plantes Col-0 ont un signal plus intense sur la couche épidermique inférieure (neuf premières cellules épidermiques) par rapport à la face supérieure ce qui indique une augmentation de la présence d'auxine (Figure 2.6B et C). Certaines compositions de milieu ont légèrement modifié l'accumulation d'auxine en réponse au gravitropisme chez les plantes Col-0. En effet, les conditions MS/2-Fe réduisent globalement l'accumulation d'auxine sur les faces supérieures et inférieures alors que les conditions MS/2-N et MS/10 réduisaient uniquement l'accumulation d'auxine sur la face inférieure. Ces réductions ne sont associées à aucun défaut gravitropique racinaire. Dans le fond mutant *aux1*, la présence d'auxine est diminuée comparé à Col-0. Les conditions permissives sont associées à une augmentation de l'accumulation d'auxine à la fois dans les cellules épidermiques supérieures et inférieures (neuf premières cellules épidermiques). Dans ce cas, l'augmentation du rapport mDII/DII tendant vers des valeurs similaires à ce que l'on observe chez Col-0 est associée à la réversion phénotypique de la réponse gravitropique racinaire chez *aux1*. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent qu'une accumulation d'auxine dans le fond mutant *aux1* en condition permissive serait responsable de la réversion phénotypique. Il est intéressant de noter que *pin2-2* et *aux1*, bien qu'ayant un phénotype agravitropique racinaire similaire, ont un mécanisme permettant d'atteindre la conditionnalité de leurs phénotypes qui varie.

3 - Discussion

Dans ce deuxième chapitre, j'ai voulu savoir si les autres acteurs de la réponse des plantes au gravitropisme avaient une sensibilité de réponse modulée en fonction de leur environnement nutritif comme le mutant *pin2-2*. Cette recherche avait comme but d'identifier de potentiels partenaires entrant dans le mécanisme de réponse de *pin2* au gravitropisme et révéler ainsi le rôle complexe de l'environnement sur l'orientation de croissance des racines en lien avec l'auxine.

3.1 - L'effet des nutriments n'est pas spécifique à pin2-2

Les données présentées dans ce dernier chapitre démontrent que *aux1* et *axr2* ont un phénotype agravitropique racinaire conditionnel. Ce résultat est innovant et donne encore plus d'importance au rôle des nutriments déjà observé chez *pin2*. Il est intéressant de noter que la nature de ces 3 mutants met en lumière que les nutriments ont un impact sur les transports d'efflux, d'influx et la signalisation de l'auxine.

En ce qui concerne *aux1*, peu d'informations concernant son mode d'action au cours du gravitropisme sont connues mais sa caractérisation de mutant agravitropique est claire. Toutefois comme pour *pin2* l'impact du milieu nutritionnel sur cette caractérisation n'a jamais été abordé. Seul Chai et al., (2020) ont étudié l'effet d'une carence en nitrate inhibant l'enroulement de la racine de *aux1* sur boîtes horizontales par rapport à Col-0. Ce qui est assez différent de ce que l'on observe dans notre étude en boîte verticale mais c'est intéressant d'observer un effet des nutriments et une réaction différentielle entre Col-0 et *aux1*. Ils montrent, en outre, que cet effet du nitrate est médié par le transporteur/senseur de nitrate NRT1.1 et que le transport d'auxine via AUX1 et PIN2 est épistatique à NRT1.1. Une caractérisation de *aux1* en réponse aux conditions permissives et restrictives a donc été réalisé et sera abordé plus en détail dans la suite de cette discussion (cf. 3.3).

En ce qui concerne *axr2*, nous avons pu observer que son phénotype agravitropique pouvait être réverté par les nutriments. À la différence des mutants *pin2* et *aux1*, le milieu carencé en fer permet à la racine de répondre normalement à la gravité. Ceci peut s'expliquer par le rôle différent de AXR2 dans la réponse auxinique. En effet, le mutant *axr2* est impliqué dans la signalisation et non pas dans le transport de l'auxine, cela suggère que l'effet de la carence en fer cible spécifiquement la signalisation de l'auxine et non pas son transport.

Toutefois le mutant *axr3-1* qui comme *axr2* code un Aux/IAA n'est pas considéré comme agravitropique dans nos conditions, il semble donc qu'il y ait une spécificité des Aux/IAA visés. De plus, *axr1-3* qui ne code pas un Aux/IAA mais qui est également dans la voie de signalisation de l'auxine via son effet sur le complexe SCF, n'est pas agravitropique dans nos conditions. Cela

suggère que bien qu'il y ait une spécificité de *axr2* dans la voie de signalisation, tous les acteurs de celle-ci ne sont pas touchés pour autant.

Enfin, *axr4* qui permet normalement une bonne localisation de AUX1 n'est pas agravitropique dans nos conditions, ce qui nous a surpris mais qui pourrait indiquer que ce n'est pas tant la position et le trafic de AUX1 qui est importante dans son rôle durant le gravitropisme.

En ce qui concerne *pgm*, nous l'avions choisi car c'est un mutant décrit dans la littérature comme ayant un « effet dramatique » sur le gravitropisme sans être lié à un mécanisme auxinique (Bai and Wolverton, 2011). Nous voulions voir si, quand l'auxine n'est pas impliquée dans la condition de l'agravitropisme, cela pouvait quand même permettre une conditionnalité du phénotype en réponse aux milieux. Toutefois même s'il est souvent considéré comme agravitropique il ne présente qu'un défaut de réponse gravitropique, étant seulement 30% aussi gravitropique que des racines de WT en raison de l'absence de production d'amidon (Wolverton et al., 2011). Nous n'avons pas observé de phénotype agravitropique dans nos conditions et par conséquent nous n'avons pas mis en évidence un effet des milieux flagrants. Toutefois la représentation de nos résultats en diagramme circulaire divisé en seulement 8 catégories ne permet pas une visualisation assez fine pour des variations mineures et bien qu'elle soit adaptée aux changements drastiques que nous voulions observer étant concentré sur des phénotypes agravitropiques fort, cela nous fait peut-être passer à côté d'un effet qui serait potentiellement présent sur des mutants comme pgm qui ont un défaut de gravitropisme faible.

Concernant les mutants testés pour le transport d'efflux d'auxine avec les PINs : *pin1*, *pin3* et *pin7* répondent à la gravité dans toutes les conditions à l'inverse de *pin2*. Bien que PIN1 soit d'une importance capitale pour le transport d'auxine des parties aériennes vers l'apex racinaire, que PIN3 avec sa relocalisation soit important lors du gravitropisme pour la transduction du signal et que PIN7 soit important dans la réponse gravitropique des racines latérales (Rosquete et al., 2018) les mutants de ces trois gènes répondent à la gravité. Ceci met en évidence la redondance fonctionnelle qui existe entre ces différents transporteurs.

Il serait intéressant de tester une plus grande gamme de mutants pouvant être impliqués. Effectivement nous voulions notamment rajouter le triple mutant *lzy2 lzy3 lzy4* à l'étude, celui-ci ayant été caractérisé comme étant agravitropique avec un apex racinaire orienté vers le haut, mais nous n'avons jamais reçu de réponse positive des différents laboratoires contactés pour les recevoir. Les découvertes récentes liées aux gènes de la famille *LAZY1* ont été essentielles pour faire progresser la compréhension du processus de transduction du signal du gravitropisme. *LAZY1* a été identifié à l'origine dans le riz (Li et al., 2007) et plus tard, sur la base de la similarité des séquences,

six gènes de la famille *LAZY1* chez *Arabidopsis* ont été rapportés (Yoshihara et al., 2013). Deux noms ont été donnés aux gènes de la famille *LAZY1* par plusieurs groupes de recherche en raison de leurs phénotypes mutants (*ngr* ou *lzy*) (Ge and Chen, 2016; Ge and Chen, 2019; Nakamura et al., 2019).Ces gènes codent pour des protéines composées de 5 domaines, une séquence hautement conservée de 14 acides aminés, connue sous le nom de CCL (conserved C terminus in LAZY1 family proteins), s'est avérée être située dans la région conservée V. LZY2, LZY3 et LZY4 fonctionnent dans le gravitropisme racinaire (Ge & Chen, 2016 ; Taniguchi et al., 2017 ; Yoshihara & Spalding, 2017). Dans les racines du triple mutant *lzy2 lzy3 lzy4*, l'accumulation d'auxine dans le flanc supérieur des racines a été augmentée selon une analyse impliquant DR5rev:Venus et DII:Venus (Yoshihara & Spalding, 2017 ; Ge & Chen, 2019). Dans les racines du triple mutant *lzy2 lzy3 lzy4*, la localisation polaire du transporteur d'efflux d'auxine PIN3 dans les cellules de la columelle ainsi que le flux d'auxine latéral asymétrique dans l'extrémité de la racine en réponse à la gravistimulation est inversée, avec une accumulation sur la face supérieur (Ge & Chen, 2019). Il aurait donc été intéressant de pouvoir observer l'effet des nutriments sur ce mutant également agravitropique mais qui n'implique pas PIN2 et AUX1.

Enfin d'autres mutants tel que *pid16*, le triple mutant *wag1 wag2 pid16*, le double mutant *d6pk d6pkl1* et le triple mutant *d6pk d6pkl1 d6pkl2* allaient être ajoutés à l'étude, les graines ont été reçues mais pas en quantité suffisante pour être testées, elles ont donc été amplifiées. En effet, de nombreuses études ont montré que la localisation polaire et l'activité de transport de l'auxine des PINs est régulée par la phosphorylation, qui est directement régulée par des membres de la famille des protéines kinases Ser/Thr d'*Arabidopsis* AGCVIII, tel que D6 PROTEIN KINASE (D6PK), PINOID (PID), WAVING AGRAVITROPIC ROOTs (WAG). La plupart de ces protéines sont connues pour être localisées dans la membrane plasmique (Barbosa and Schwechheimer, 2014 ; Barbosa et al., 2018). La phosphorylation des PINs au niveau des résidus Ser conservés dépend des PID/WAG et a un impact à la fois sur la localisation polaire ainsi que sur l'activité de transport de l'auxine (Friml et al., 2004; Michniewicz et al., 2007; Zourelidou et al., 2014). La perte de la fonction de PID/WAG améliore la relocalisation de PIN3 dans les cellules de la columelle induite par la gravité (Grones et al., 2018). Ces découvertes suggèrent que la phosphorylation de PIN3 dépendant de PID/WAG joue un rôle inhibiteur dans la relocalisation de PIN3 induite par la gravité. Enfin il a également été démontré que les D6PK phosphorylent les PINs au niveau des résidus Ser conservés (Zourelidou et al., 2014; Barbosa et al., 2018). Bien que ces sites de phosphorylation chevauchent les sites phosphorylés par PID/WAG, les D6PK ne sont pas nécessaires pour la localisation polaire des PINs, mais régulent l'activité de transport de l'auxine des PINs. De plus, la

composition phospholipidique de la membrane plasmique contribue à la localisation des D6PK grâce à leur motif polybasique conservé, qui est nécessaire pour une bonne phosphorylation de PIN3 (Barbosa et al., 2016). C'est pourquoi il aurait été intéressant d'étudier l'impact des milieux de culture sur ces mutants.

3.2 - Relation entre AUX1, PIN2 et PIN3

L'utilisation des doubles mutants de *pin3* et *aux1* avec *pin2-2* nous ont permis de mettre en évidence les interactions existant entre eux pour l'établissement des flux d'auxine au sein des tissus de l'apex racinaire. En effet, *pin2-2 pin3* a un phénotype conditionnel réagissant à l'environnement nutritif de la même manière que *pin2-2*, que ce soit dans la phase précoce de réponse à la gravité ainsi que tardivement. Cela nous indique que PIN3 n'est pas impliqué dans la réversion du phénotype par les nutriments et que le rôle de PIN2 prévaut dans l'établissement tissulaire des flux d'auxine au cours du gravitropisme sur le rôle de PIN3. Il existe peu d'études présentant le double mutant *pin2 pin3*, toutefois on peut observer un article présentant la réponse de DR5:GFP chez *pin2*, *pin3* et le double mutant *pin2 pin3* (Jing et al., 2019). En effet, ils ont observé qu'à la suite d'une gravistimulation la relocalisation de l'auxine chez le double mutant était similaire à celle de *pin2* mais pas de *pin3* allant donc dans le sens de nos observations. Pour *pin2-2 aux1* un phénotype conditionnel réagissant à l'environnement nutritif est présent en condition de réponse à la gravité après 48h comme pour *aux1* et *pin2-2*. Le double mutant *pin2-2 aux1* ayant un phénotype additionnel dans ces conditions, c'est l'observation de la phase précoce de réponse à la gravité qui nous a permis de les discriminer. Lors de la phase précoce de réponse à la gravité on peut voir que le double mutant *pin2-2 aux1* a une réponse similaire à celle de *aux1* mais pas de *pin2*. AUX1 et PIN2 jouent donc un rôle dans la même voie durant la réponse à la gravité et AUX1 aurait un rôle en amont de PIN2 sur le trajet des flux d'auxine permettant la réponse à la gravité. Cela va dans le sens de ce que Liu et al., (2018) ont mis en évidence en observant la réponse de DR5:GFP chez *pin2*, *aux1* et le double mutant *pin2 aux1*. En effet, ils ont observé qu'à la suite d'une gravistimulation la relocalisation de l'auxine chez le double mutant était similaire à celle de *aux1* mais pas de *pin2* (Liu et al., 2018). Ceci les a fait atteindre une conclusion similaire à celle de notre étude, étant que AUX1 agit en amont de PIN2. Nos résultats permettent donc d'apporter plus de connaissances concernant les interactions existant entre AUX1, PIN2 et PIN3 permettant l'établissement des flux d'auxine dans l'apex racinaire. En effet nous avons démontré que AUX1 intervient en amont de PIN2 dont l'action prévaut sur celle de PIN3. Toutefois l'observation de ces doubles mutants ne nous a pas permis d'observer une perte de la conditionnalité du phénotype

agravitropique en réponse aux carences nutritives. Il semblerait donc que ce soit un autre potentiel partenaire que ceux présentés ici qui soit responsable de la réversion du phénotype en fonction de l'environnement nutritif. Au vu des résultats présentés dans le chapitre 1 cela semble évident que les prochains doubles mutants à étudier sont le double mutant *pin2-2 pin1* ainsi que *pin2-2 chl1-5*. Il serait intéressant pour continuer cette partie de pouvoir observer l'auxine et sa réponse chez tous ces différents doubles mutants en réponse aux différents milieux pour vérifier que le mode d'action présenté dans le chapitre 1 est similaire. De plus, suite à l'avancée des outils permettant la visualisation de l'auxine il serait intéressant d'introgresser des outils plus avancés que R2D2 pour avoir des analyses plus fines et précises.

3.3 - aux1 et pin2 des voies différentes menant à la conditionnalité du phénotype

Dans cette partie, le but a été de faire une caractérisation de l'expressivité du phénotype agravitropique de *aux1* de manière similaire à ce que nous avions fait pour *pin2* et d'apporter des éléments de réponses expliquant sa conditionnalité. En effet, AUX1 bien qu'étant connu pour son rôle de transporteur d'influx d'auxine, garde encore des mystères concernant son mode d'action dans le gravitropisme. Nous avons mis en évidence pour la première fois la conditionnalité de son phénotype à l'aide de conditions restrictives (MS/2 et MS/2-Fe) permettent l'observation d'un phénotype agravitropique et de conditions permissives (MS/2-P, MS/2-N, MS10) permettant de révéler une réponse partielle à la gravité. Afin d'apporter des éléments de réponses expliquant la conditionnalité du mutant *aux1* par les nutriments, nous avons voulu tester quels mécanismes pouvaient être impliqués. Le PolyEthylèneGlycol (PEG) est un polymère dont l'impact sur le stress osmotique est couramment utilisé en biologie végétale, il présente la particularité de ne pas passer la membrane plasmique et donc de dissocier l'effet osmotique de l'effet métabolique. Nous n'avons toutefois pas vu d'effet du PEG sur la conditionnalité de *aux1,* il semble donc que cet effet ne soit pas lié à des différences de pression osmotique. Nous avons également testé l'effet de la vitesse de croissance avec l'une de ses composantes : l'élongation. Toutefois bien que la vitesse de croissance soit différente chez *aux1* et varient en fonction des nutriments, il n'y a pas de corrélation entre les conditions permissives et restrictives et ces variations. Il n'y a donc pas de lien direct avec la conditionnalité de *aux1* tout comme ce que nous avions observé avec *pin2*. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'auxine qui est le candidat évident notamment au vu des découvertes déjà faites chez *pin2* dans le chapitre 1. Toutefois à l'inverse de *pin2* ce n'est pas une suraccumulation qui a été observée chez *aux1* mais une diminution de l'auxine à l'apex racinaire. Chez *aux1*, les conditions permissives (MS/2-P, MS/2-N, MS/10) ont entraîné une réponse auxinique asymétrique et une

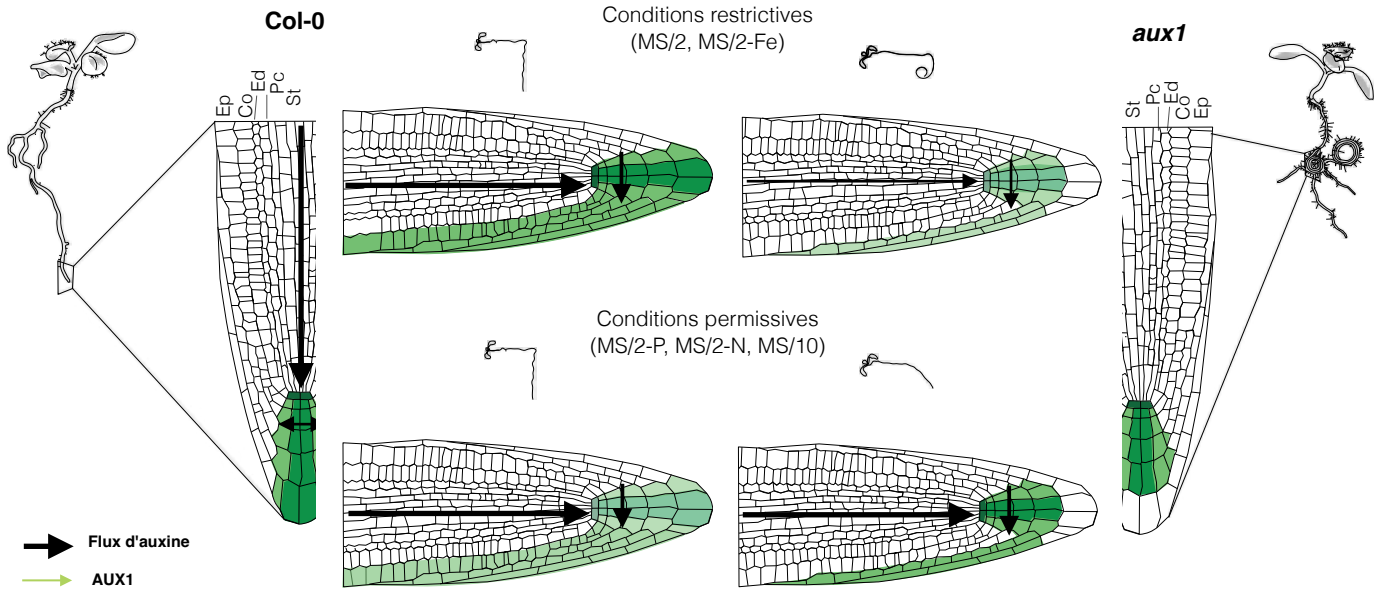


Figure 2.7. Modèle du phénotype racinaire agravitropique conditionnel de *aux1*
Modèle proposé expliquant comment la modulation de l'auxine par l'effet de l'environnement chez le mutant *aux1* dans des conditions permissives rétablit le niveau des flux d'auxine et la répartition asymétriques.

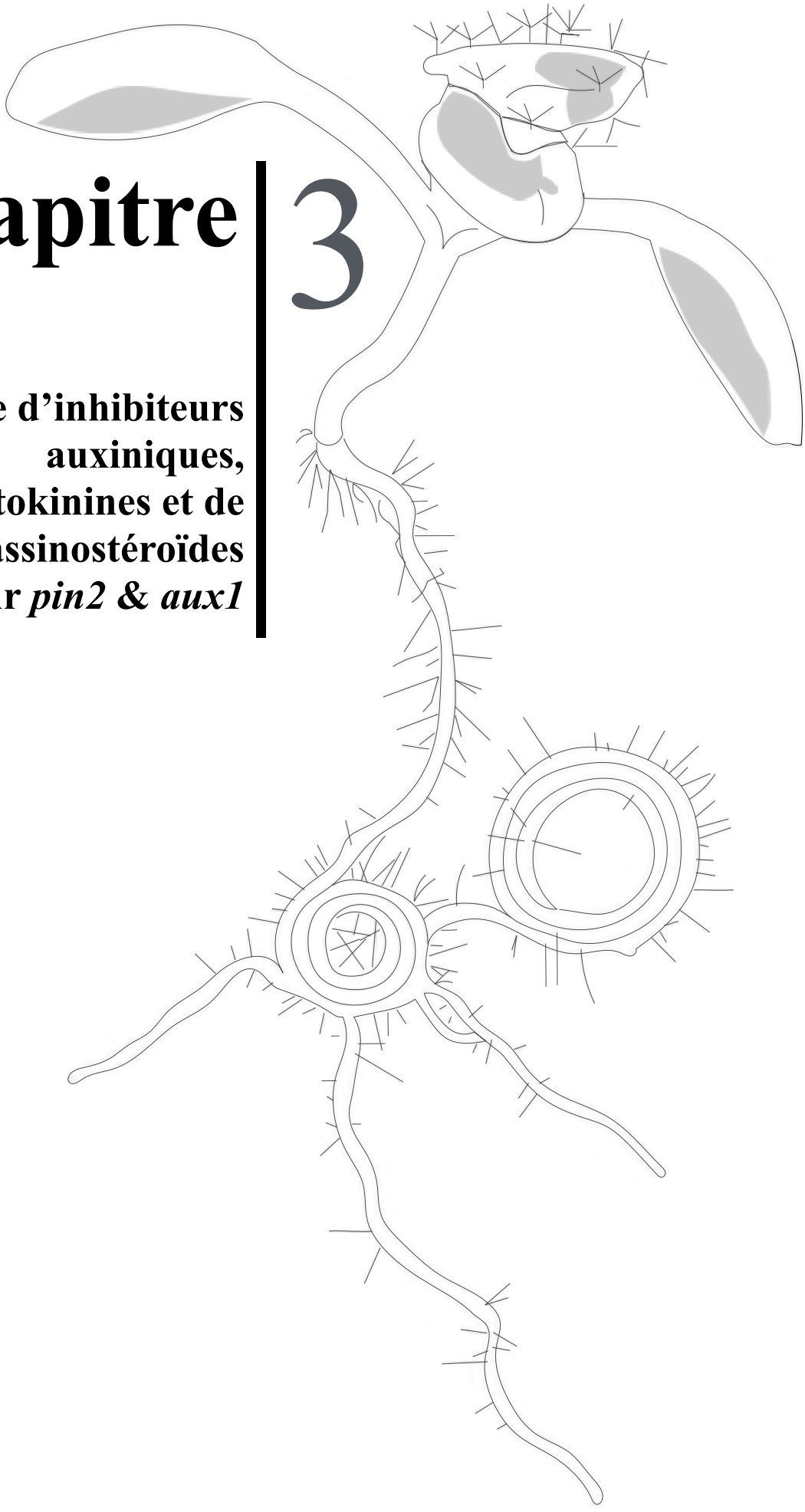
augmentation de l'auxine dans l'épiderme par rapport aux conditions restrictives (MS/2 et MS/2-Fe). De plus, cette augmentation en conditions permissives ramène l'auxine à un seuil similaire à ce que l'on observe chez Col-0 pouvant potentiellement expliquer la réponse partielle à la gravité dans ces conditions. Il est intéressant de noter que *pin2-2* et *aux1*, bien qu'ayant un phénotype agravitropique racinaire similaire, ont un mécanisme permettant d'atteindre la conditionnalité de leurs phénotypes qui varie. Néanmoins contrairement à ce que nous avons fait pour *pin2* nous n'avons pas encore pu observer les différents transporteurs d'auxine chez *aux1*. Il serait bien évidemment intéressant d'observer PIN1, qui est notre candidat premier chez *pin2,* pour voir si celui-ci peut également expliquer l'ajustement d'auxine en condition permissive chez *aux1*. Toutefois il serait également intéressant d'observer NRT1.1 ainsi que d'autres membres de la famille des AUX/LAX qui pourraient potentiellement être redondants avec AUX1.

3.4 - Modèle expliquant la conditionnalité de aux1

Ce chapitre a permis de mettre en évidence le phénotype conditionnel du mutant *aux1* ainsi que *axr2,* bien que celui-ci a été moins étudié par la suite. En ce qui concerne *aux1*, nous avons pu mettre en évidence que cette conditionnalité, tout comme pour *pin2*, n'était pas dû à la pression osmotique ni à la vitesse de croissance mais bien à une sensibilité liée à des carences nutritives spécifiques. Nous nous sommes intéressés aux doubles mutants de *pin2-2* avec *aux1* et *pin3* et ceux-ci conservait cette même sensibilité aux nutriments, semblant indiquer que c'est un autre acteur moléculaire que AUX1 ou PIN3 qui pourrait permettre cette conditionnalité. Enfin chez *aux1* nous avons étudié la distribution de l'auxine en réponse aux différentes conditions et les résultats acquis nous ont permis d'établir un modèle (Figure 2.7). Dans le fond sauvage Col-0, la localisation de la protéine AUX1 dans l'épiderme entraîne les flux d'auxine et favorise la distribution asymétrique après un gravistimuli quelles que soient les conditions. Chez le mutant *aux1*, dans des conditions restrictives, à l'inverse de *pin2,* il y a une diminution de l'auxine à l'apex racinaire. Cependant en conditions permissives il y a une augmentation de l'auxine dans l'épiderme permettant de passer la valeur seuil et restaurant un flux d'auxine asymétrique responsable de la réponse gravitropique. Ce mécanisme est absent dans des conditions restrictives où la racine de *aux1* continue de croître de manière agravitropique et forme une forme de spirale. Donc la modulation du transport de l'auxine dans diverses conditions environnementales, bien que similaire à ce que l'on observe chez *pin2* semble être différente car issue d'une augmentation et non d'une diminution mais permet dans tous les cas de modifier la réponse gravitropique racinaire et suggère que cette réponse tropique est soumise à une forte pression sélective pour favoriser l'exploration des sols.

Chapitre 3

L'étude d'inhibiteurs auxiniques, de cytokinines et de brassinostéroïdes sur *pin2* & *aux1*



Chapitre 3 - L'étude d'inhibiteurs auxiniques, de cytokinines et de brassinostéroïdes sur *pin2* & *aux1*

1 - Introduction

Les phytohormones ont des effets majeurs sur le développement des plantes à des concentrations extrêmement faibles. La coopération et l'interaction entre ces hormones est essentielle pour la régulation d'événements physiologiques clés notamment avec leurs effets synergiques ou antagonistes. Il en est de même sur la régulation du gravitropisme, nous avons déjà dans ce manuscrit abordé le rôle de l'auxine. Dans ce chapitre l'objectif était d'observer les effets d'inhibiteurs auxiniques ainsi que le rôle d'autres hormones notamment les cytokinines et les brassinostéroïdes sur le phénotype agravitropique de *pin2* et *aux1* en conditions permissives et restrictives. En effet, nous voulions tester quels aspects de l'homéostasie de l'auxine étaient impliqués, mais également si un crosstalk avec d'autres hormones avait lieu pour permettre cet effet nutriments spécifiques sur leur phénotype agravitropique. Concernant les inhibiteurs d'auxines, nous nous sommes intéressés à 5 inhibiteurs. L'application de L-Kynurenine (L-Kyn) qui diminue la biosynthèse de l'auxine dans les racines. Il semblerait que ses cibles moléculaires soient TAA1/ TARs, les enzymes clés de la voie de l'acide indole-3-pyruvique de la biosynthèse de l'auxine (He et al., 2011). Nous nous sommes également intéressés à l'auxinole qui se lie à TIR1 pour bloquer la formation du complexe TIR1-IAA-Aux/IAA et inhibe ainsi l'expression des gènes sensibles à l'auxine. Son analyse moléculaire indique que le cycle phényle de l'auxinole interagit fortement avec Phe82 de TIR1, un résidu crucial pour la reconnaissance d'Aux/IAA. Conformément à ce mode d'action prédit, l'auxinole inhibe de manière compétitive diverses réponses à l'auxine *in planta* (Hayashi et al., 2012). Enfin nous nous sommes intéressés à l'effet d'inhibiteurs du transport de l'auxine, 1-NOA qui bloque totalement le transport d'influx et d'efflux d'auxine (Laňková et al., 2010), ainsi que le NPA ou l'acide triiodobenzoïque (TIBA) qui sont des inhibiteurs uniquement du transport polarisé de l'auxine et cible donc les transporteurs d'efflux PINs (Geldner et al., 2001; Petrášek et al., 2002). Le NPA et le TIBA sont utilisés pour étudier le transport de l'auxine, en outre il a été découvert qu'ils perturberaient le transport d'efflux d'auxine en inhibant la délocalisation/ relocalisation des protéines membranaires PINs. Enfin en ce qui concerne les autres phytohormones, les cytokinines, les brassinostéroïdes et l'éthylène sont les plus explorées comme ayant une relation avec le gravitropisme. En ce qui concerne les cytokinines, elles régulent la division cellulaire et présentent un large éventail de fonctions physiologiques dans divers aspects de

la croissance (Mok and Mok, 2001; Chernyadev 2009; Ruffel et al., 2011; Spíchal, 2012). Elles sont produites dans les cellules de la coiffe racinaire, qui sont un siège majeur de régulation de la croissance et du gravitropisme (Aloni et al., 2004). Il a été suspecté qu'elles pourraient fonctionner en tant qu'inhibiteur de l'élongation tropique lors de la réponse à la gravité dû à leur rôle de régulateur négatif de croissance racinaire. Aloni et al., (2014) ont montré qu'à la suite d'une gravistimulation, la cytokinine observée via l'expression de ARR5::GUS est transportée et redistribuée de manière asymétrique sur la face inférieure de la coiffe racinaire après 30 minutes. Les gènes ARR de type A sont des gènes répondant directement et en seulement quelques minutes à la cytokinine, ils n'ont pas besoin de synthèse protéique préliminaire. ARR5::GUS est une construction génétique comprenant le marqueur GUS sous le contrôle du promoteur du gène ARR5, l'un des gènes ARR de type A qui permet l'analyse de son activité promotrice et est largement utilisé pour étudier la réponse à la cytokinine. La redistribution de la cytokinine en réponse à la gravité est similaire à ce que l'on observe avec l'auxine, toutefois un effet inhibiteur des cytokinines sur l'allongement des racines lors de la flexion gravitropique a été observée. Les cytokinines peuvent également interagir avec l'auxine pour réguler la réponse gravitropique (Schaller et al., 2015). En effet Pernisova et al., (2016) ont montré à l'aide du mutant du récepteur de la cytokinine *ahk3* ainsi que de la lignées transgéniques surexprimant des gènes de CYTOKININE OXIDASE DÉSHYDROGENASE (CKX), *Pro35S:AtCKX* appauvries en cytokinines endogènes, une aberration dans la distribution de la réponse auxinique dans les cellules de la columelle. Ils ont mis en évidence que la relocalisation de PIN3 et PIN7 est indépendante de la signalisation et concentration des cytokinines mais que le transport d'auxine médié par AUX1 est altéré de la columelle vers la zone de transition. L'altération de la distribution cellulaire du transporteur d'influx d'auxine AUX1 suggère que la cytokinine cible largement le transport d'auxine médié par AUX1 plutôt que le transport d'auxine médié par les PINs pour affecter le gravitropisme racinaire (Pernisova et al., 2016). En ce qui concerne les brassinostéroïdes, ce sont des hormones stéroïdiennes essentielles à la croissance et au développement des plantes. L'implication des brassinostéroïdes dans la réponse gravitropique a été suggérée en association avec l'auxine, car les deux phytohormones interagissent dans certains aspects de croissance et de développement. Il a été constaté pour la première fois chez le maïs que les brassinostéroïdes augmentent la réponse gravitropique des racines en augmentant leur sensibilité à l'IAA (Kim et al., 2000). C'est Li et al., (2005) qui ont montré l'effet des brassinostéroïdes chez *Arabidopsis*, où ils stimulent les capacités de transport polarisé de l'auxine et modifie sa distribution. En effet, la transcription des gènes PINs, qui facilitent le transport fonctionnel de l'auxine dans les plantes, est régulée de manière

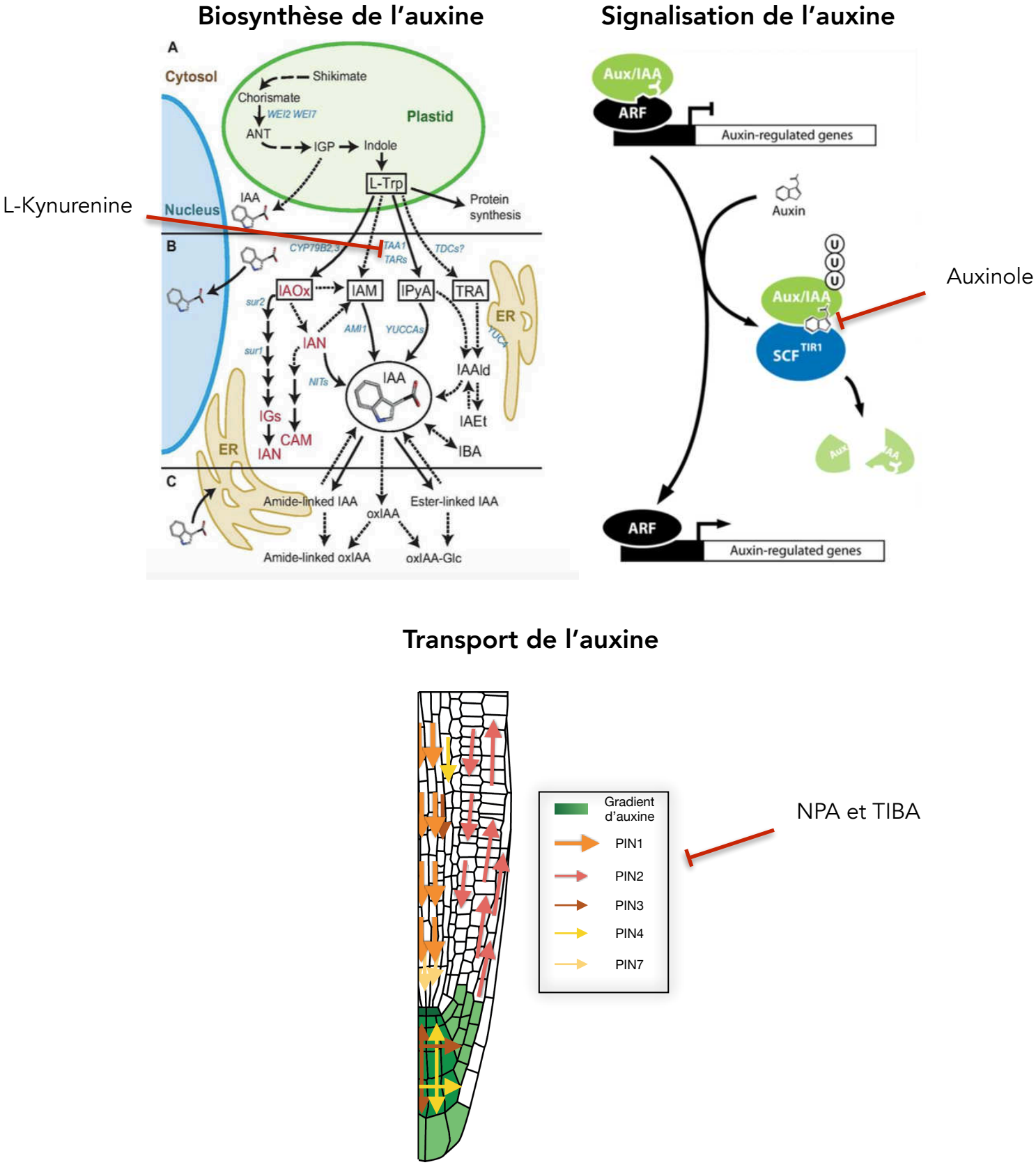


Figure 3.1. Schéma représentatif plaçant les différentes approches pharmacologiques utilisés au cours de ce chapitre.

Schéma représentatif plaçant les différents inhibiteurs ou différentes phytohormones utilisés au cours de ce chapitre.

différentielle en réponse à un traitement avec des brassinostéroïdes. De plus, ils auraient un effet positif sur le gravitropisme des plantes en favorisant l'accumulation de PIN2 de l'extrémité de la racine à la zone d'élongation et en stimulant l'expression et la localisation de ROP2. Li et al., (2005) soutiennent l'hypothèse selon laquelle ROP2 module la localisation fonctionnelle de PIN2 par la régulation de l'assemblage de l'actine, médiant ainsi les effets des brassinostéroïdes sur le transport polarisé de l'auxine polaire et les réponses tropiques (Li et al., 2005 ; Lanza et al., 2012). Plus récemment, il a été mis en évidence que les brassinostéroïdes peuvent moduler à la fois le cycling et l'endocytose de PIN2, affectant alors le transport polarisé de l'auxine (Retzer et al., 2019). Ces résultats montrent que les cytokinines et les brassinostéroïdes jouent un rôle prépondérant dans le contrôle des réponses gravitropiques des racines en interagissant avec l'auxine. En ce qui concerne l'effet des autres phytohormones, cela ne sera pas abordé au cours de ce chapitre (pour en savoir plus voir la revue de Singh et al., 2017).

Le chapitre 3 de cette thèse portera ainsi sur l'analyse de l'effet d'inhibiteurs, ainsi que l'effet de cytokinine et brassinostéroïde, combinées aux différentes carences en nutriments (P,N,Fe, MS/10) sur les mutants *pin2-2* et *aux1* (Figure 3.1). Pour ce faire nous avons testé l'effet de l'application exogène de L-Kynurenine (L-Kyn) inhibiteur de la biosynthèse de l'auxine, d'une gamme d'auxinole inhibiteur de la réponse à l'auxine, d'une gamme de TIBA, NPA et 1-NOA inhibiteur du transport de l'auxine, d'une gamme de concentration de trans-Zeatin (tZ) faisant partie de la famille des cytokinines (CK) et d'épibrassinolide (eBR) faisant partie de la famille des brassinostéroides. Cette étude sur le comportement particulier du phénotype conditionnel de *pin2* et *aux1* permettra d'élargir le champ des hypothèses pour comprendre les mécanismes liant réponse à la gravité et environnement nutritif.

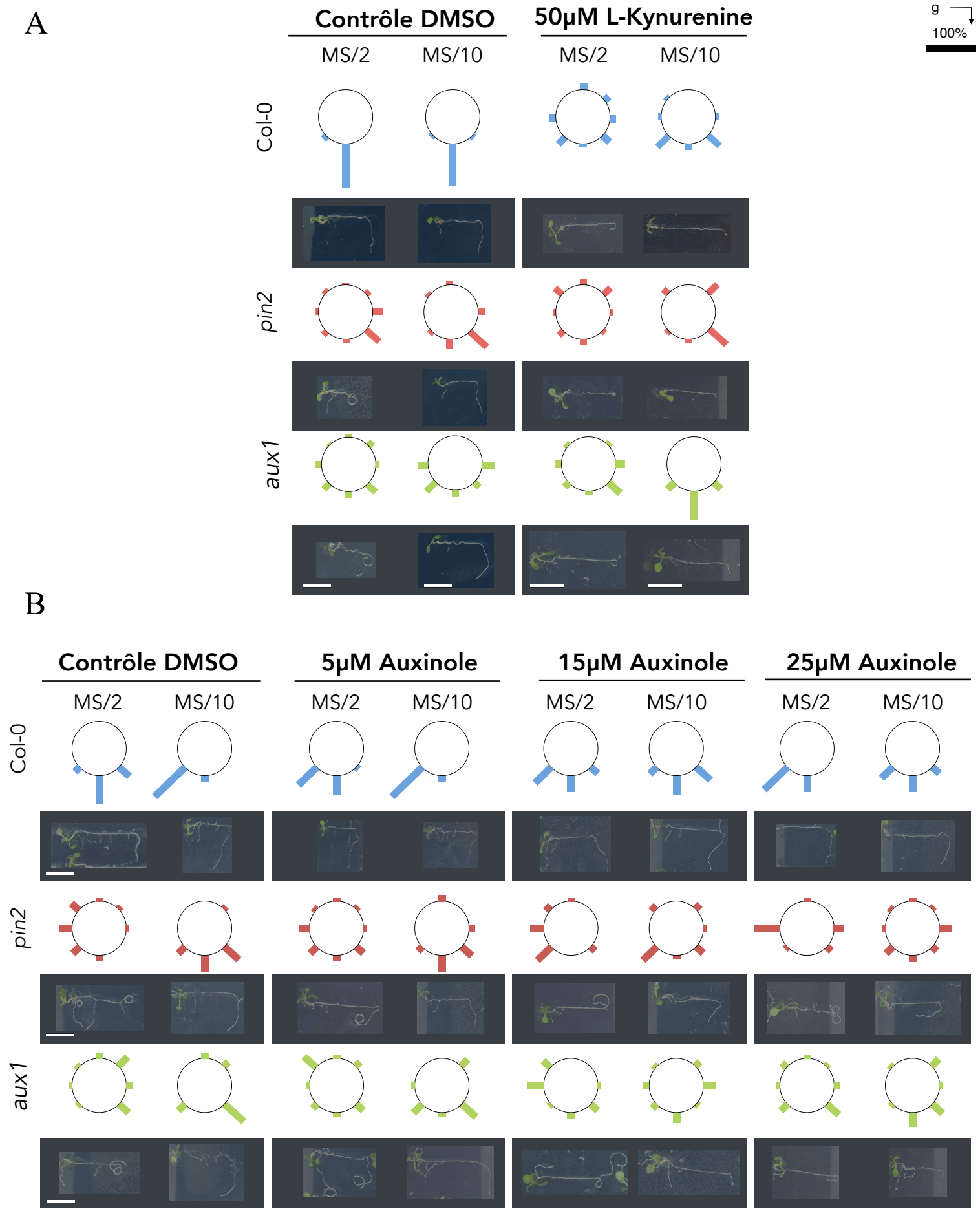


Figure 3.2. L'effet de L-Kynurenine et de l'auxinole sur le phénotype agravitropique conditionnel de *pin2* et *aux1*

Réponse gravitropique de Col-0, *pin2* et *aux1* en réponse à MS/2 et MS/10 combiné au DMSO ou a des inhibiteurs auxiniques. Images après 48 heures de gravistimulation. Les diagrammes circulaires affichent l'orientation de l'apex de la racine primaire sous forme de barres colorées représentant le pourcentage de plantes. n=15, barre d'échelle = 1 cm.

(A) L-Kynurenine inhibiteur de la biosynthèse de l'auxine

(B) Gamme d'auxinole un inhibiteur de la signalisation de l'auxine.

2 - Résultats

2.1- L'importance de l'auxine dans la relation entre gravitropisme et environnement nutritif chez pin2-2 et aux1

Différents inhibiteurs auxiniques ont été utilisés afin de déterminer leurs effets sur la sensibilité du phénotype agravitropique conditionnel de *pin2-2* et *aux1*. Ils ont été combinés aux milieux MS/2 et MS/10, respectivement représentatif des conditions restrictives et permissives. Ces différents inhibiteurs étant dissous dans du DMSO, celui-ci sert de contrôle non traité. Il n'y a pas d'effet du DMSO sur les différents génotypes, Col-0 répond à la gravité en MS/2 et MS/10 et pour *pin2* et *aux1* un phénotype agravitropique est présent en MS/2 puis gravitropique en MS/10. L'application exogène de L-Kynurenine (L-Kyn), inhibiteur de la biosynthèse de l'auxine, cause une réduction de croissance sur les deux milieux chez Col-0, *pin2-2* et *aux1* (Figure 3.2A). Une perturbation de la réponse gravitropique chez Col-0 est observée en MS/2 en présence de L-Kyn. Le phénotype n'est pas aussi fort que celui de *pin2* et *aux1,* néanmoins bien qu'il n'y ait pas d'enroulement de la racine primaire, l'apex racinaire se retrouve orienté dans toutes les directions sans suivre le vecteur de gravité. Pour *pin2* et *aux1* en MS/2 il n'y a pas d'effet visualisable de L-Kyn sur la réponse gravitropique, le phénotype agravitropique avec curling de la racine primaire est toujours présent. En présence de la condition permissive MS/10 pour *aux1* il n'y a pas d'effet de L-Kyn, on observe toujours une réversion du phénotype avec une réponse à la gravité. Pour *pin2* et Col-0 le résultat est plus nuancé, bien qu'une majorité des apex soient orientés vers le bas et que l'enroulement de la racine ne soit plus marqué le résultat n'est pas aussi clair que pour *aux1* avec des apex suivant le vecteur de gravité. Toutefois, bien que ces résultats doivent être reproduits et effectués sur tous les différents milieux, la première indication qui en ressort et que l'inhibition de la biosynthèse d'auxine avec L-Kyn affecte le gravitropisme sur MS/2 chez Col-0 mais n'affecte pas *pin2* et *aux1*. L-Kyn permettant d'inhiber la biosynthèse de l'auxine cela pourrait indiquer que les différentes étapes du gravitropisme sont sous-optimales dues à l'importance de l'auxine dans le processus. En MS/10 la permissivité est conservée pour *aux1* mais celui-ci est plus nuancé chez Col-0 et *pin2* indiquant potentiellement une sensibilité plus accrue pour ces génotypes à une présence optimale d'auxine. Ces résultats ne permettent pas de donner beaucoup d'indications sur les conditions restrictives et permissives mais mettent toujours en évidence cet effet prépondérant de l'auxine pour la réponse à la gravité. Nous nous sommes intéressés à l'application exogène d'une gamme d'auxinole (5, 15 et 25 µM), qui est un inhibiteur des gènes de réponse à l'auxine (Figure 3.2B). En

présence de 5 µM d'auxinole il n'y a pas d'effet sur la réponse gravitropique de Col-0, *pin2-2* ou *aux1,* que ce soit en MS/2 ou MS/10. Mais à partir de 15 µM et d'autant plus à 25 µM d'auxinole on observe un effet chez *pin2* et *aux1* mais pas d'effet particulier chez Col-0 qui continue de répondre à la gravité sur MS/2 et MS/10. L'effet de l'auxinole semble donc être uniquement visualisable chez *pin2* et *aux1*. Sur MS/2 les mutants sont toujours agravitropiques mais avec un enroulement moins fort et plus désorganisé. Sur MS/10 une perturbation est également présente bien qu'une majorité des plantules ne soient plus agravitropique avec un enroulement de la racine primaire, leur réponse à la gravité n'est pas similaire à ce que l'on observe avec un traitement simple au DMSO, l'apex pouvant aller dans toutes les directions. Cela semble indiquer que chez ces mutants la réponse à l'auxine est importante tant en MS/2 qu'en MS/10, cela ne nous permet toutefois pas d'expliquer la différence régnant entre conditions permissives et restrictives.

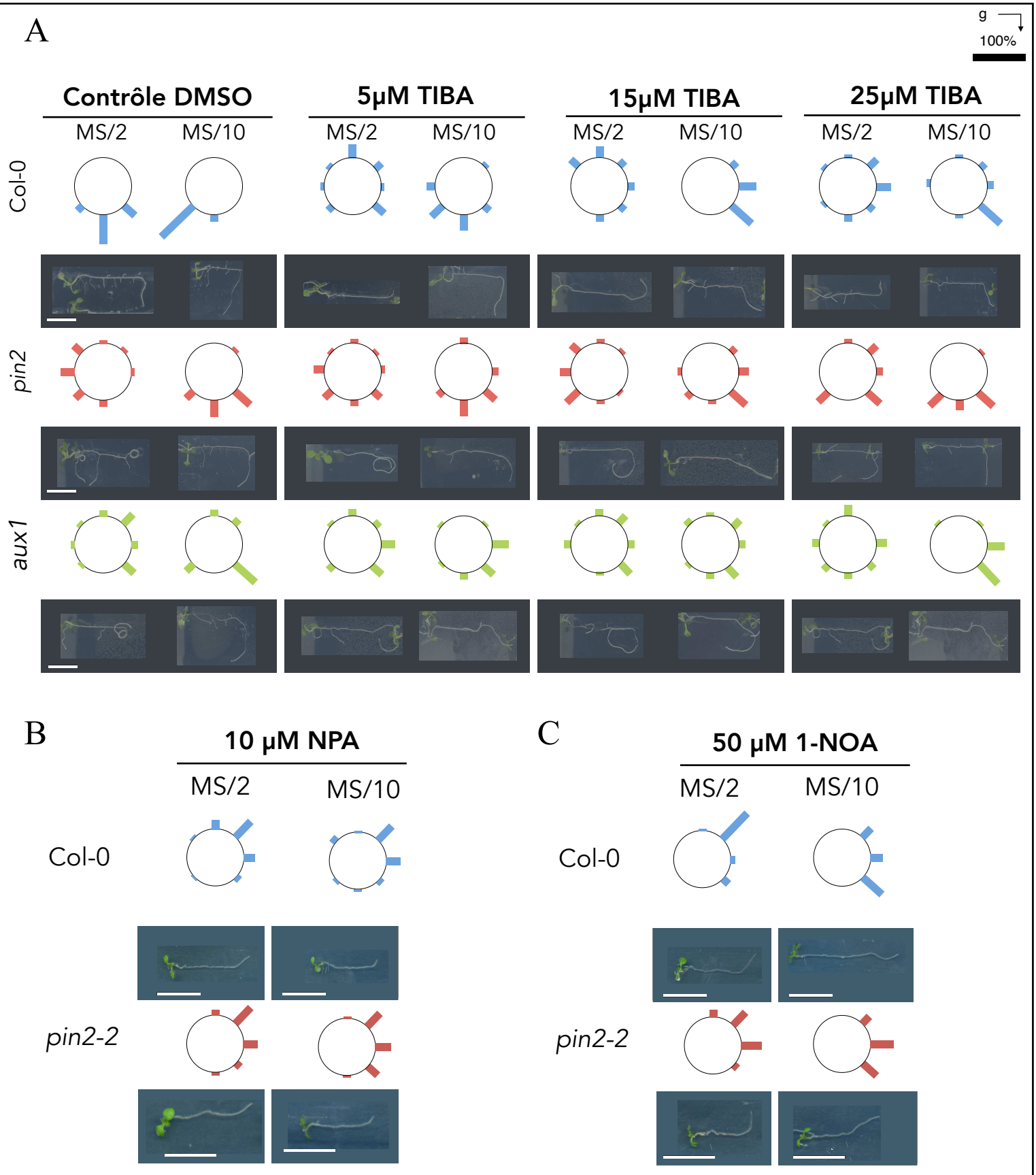


Figure 3.3. L'effet de TIBA, NPA et 1-NOA sur le phénotype agravitropique conditionnel de *pin2* et *aux1*
Réponse gravitropique de Col-0 et *pin2* en réponse à MS/2, -N et MS/10 en présence d'une gamme de TIBA qui est un inhibiteur du transport de l'auxine de 1-NOA et NPA qui est un inhibiteur du transport de l'auxine. Des plantules de 6 jours ont été cultivés sur des boites verticales puis transférée à 90° sur différents milieux nutritifs (MS/2, -Fe, -P, -N et MS/10) et imagés après 48 heures de gravistimulation. Les diagrammes circulaires affichent l'orientation de l'apex de la racine primaire sous forme de barres colorées représentant le pourcentage de plantes. n=15, barre d'échelle = 1 cm.

Après avoir analysé l'effet de ces inhibiteurs impliqués dans la signalisation et la réponse à l'auxine, l'intérêt s'est porté sur des inhibiteurs du transport de l'auxine. L'application exogène d'une gamme de TIBA (5, 15 et 25 µM), qui est un inhibiteur du transport polarisé de l'auxine, a été observée (Figure 3.3A). Lors de cette expérimentation sur toute la gamme de TIBA, Col-0 en MS/2 perd sa capacité à répondre à la gravité et son apex est majoritairement dirigé vers le haut à l'encontre du vecteur de gravité. Ce résultat va dans le sens de l'importance et du rôle majeur du transport polarisé de l'auxine dans l'établissement de la réponse à la gravité. En revanche, de façon plus surprenante, en MS/10 Col-0 répond à la gravité. Les effets des conditions permissives et restrictives habituellement uniquement visualisable sur les mutants *pin2* et *aux1* sont donc révélés chez Col-0 en présence de TIBA. Par conséquent cet effet de l'environnement et des nutriments sur le gravitropisme bien que révélé chez les mutants agravitropiques *pin2* et *aux1* est aussi présent chez Col-0 et dénote de l'importance du transport de l'auxine dans ce processus. En ce qui concerne *pin2* et *aux1* l'application exogène de TIBA sur MS/2 a un léger effet sur l'enroulement de la racine primaire plus la concentration augmente, celle-ci ayant tendance à être moins forte. Il n'en reste pas moins que ces mutants restent agravitropiques en MS/2, le transport étant déjà perturbé dû à leur mutation, l'effet du TIBA n'est pas vraiment conséquent. De même, en MS/10 ces mutants gardent leur capacité à répondre à la gravité, cela pouvant potentiellement indiquer que le TIBA et son inhibition du transport polarisé de l'auxine n'est pas suffisante pour abolir l'effet des conditions permissives. L'application exogène de NPA, qui est tout comme le TIBA un inhibiteur du transport polarisé de l'auxine, a été observée (Figure 3.3B). Toutefois les résultats diffèrent de ce que l'on observe avec le TIBA. En présence de NPA, Col-0 en MS/2 et MS/10 perd sa capacité à répondre à la gravité et son apex est majoritairement dirigé vers le haut à l'encontre du vecteur de gravité. L'application exogène de NPA empêche donc la réponse gravitropique et la croissance sur MS/10 ne permet pas de réverter cet agravitropisme. Pour les mutants *pin2-2* et *aux1,* la présence de NPA fait perdre l'effet de MS/10 comme condition permissive mais même en MS/2 le phénotype varie, en effet il reste agravitropique mais n'est plus un enroulement de la racine primaire, l'apex est majoritairement dirigé vers le haut à l'encontre du vecteur de gravité tout comme pour Col-0. Par ailleurs, des résultats similaires sont observés pour tous les génotypes en MS/2 et MS/10 en réponse à l'application exogène de 1-NOA qui est un inhibiteur du transport d'auxine tant pour l'influx que pour l'efflux (Figure 3.3C). Toutes ces expériences font ressortir l'importance capitale de l'auxine et de son homéostasie pour la réponse à la gravité avec des résultats particulièrement intéressants pour le TIBA et le NPA qui seront discutés par la suite.

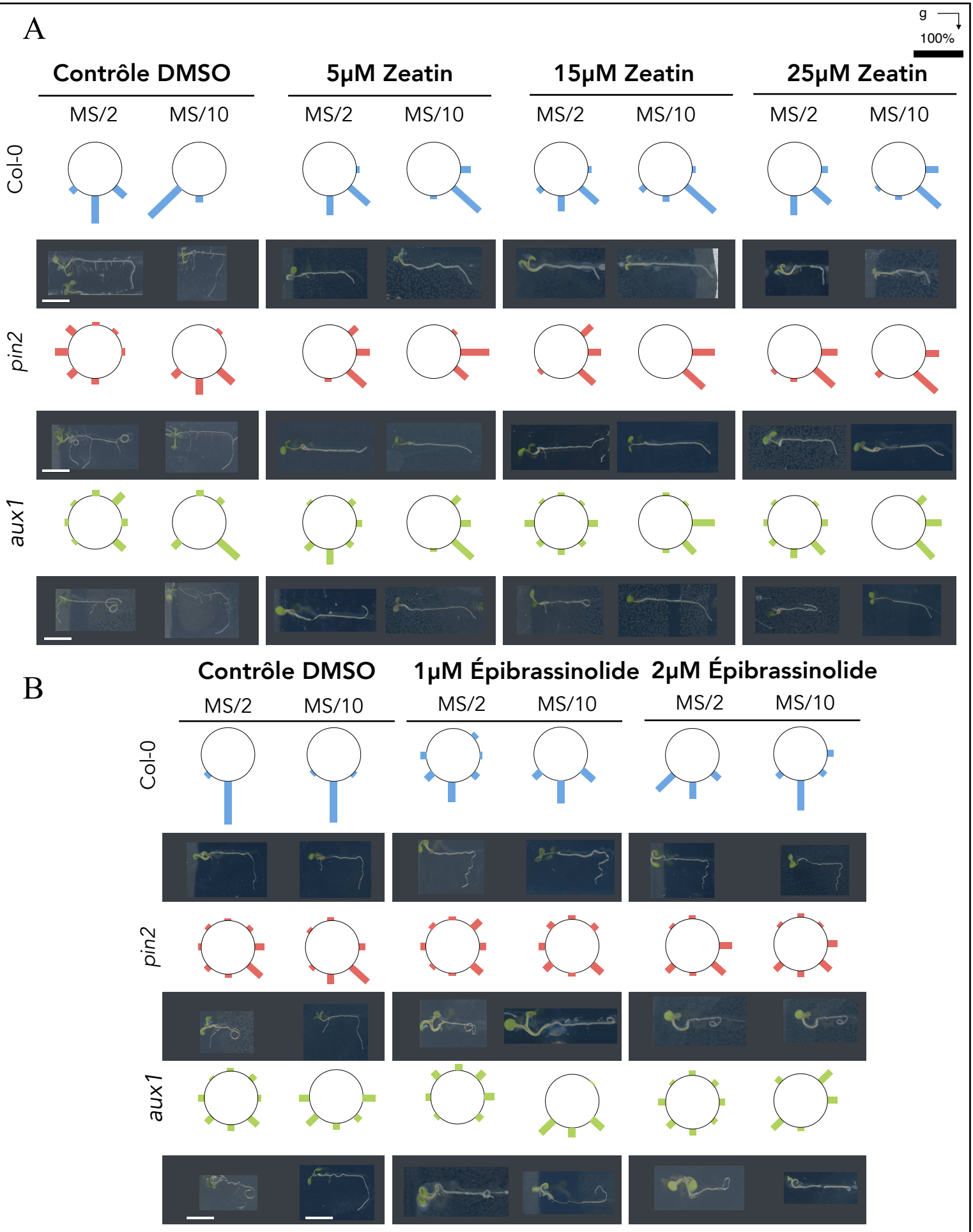


Figure 3.4. L'effet de la zéatin et de l'épibrassinolide sur le phénotype agravitropique conditionnel de *pin2* et *aux1*

Réponse gravitropique de Col-0, *pin2* et *aux1* en réponse aux différents milieux combiné au DMSO ou a une gamme de zéatin qui fait partie des cytokinines (**A**) ou une gamme d'épibrassinolide qui fait partie des brassinostéroïdes (**B**). Images après 48 heures de gravistimulation. Les diagrammes circulaires affichent l'orientation de l'apex de la racine primaire sous forme de barres colorées représentant le pourcentage de plantes. n=15, barre d'échelle = 1 cm.

2.2- Crosstalks hormonaux impliqués dans la conditionnalité du phénotype racinaire agravitropique de pin2-2 et aux1

Deux hormones ont été utilisées afin de déterminer si un crosstalk hormonal pouvait jouer sur la sensibilité du phénotype agravitropique conditionnel de *pin2-2* et *aux1*. Ces hormones ont été combinées aux milieux MS/2 et MS/10, respectivement représentatif des conditions restrictives et permissives, celle-ci étant dissoute dans du DMSO celui-ci sert de contrôle non traité. Il n'y a pas d'effet du DMSO sur les différents génotypes, comme présenté précédemment. Nous avons testé l'application exogène d'une gamme de concentration de trans-Zeatin (5, 15 et 25 µM) faisant partie de la famille des cytokinines (CK) et une gamme d'épibrassinolide (1 et 2 µM) faisant partie de la famille des brassinostéroides. Dans un premier temps, l'application exogène de cytokinine avec la trans-Zeatin, cause une réduction de croissance chez Col-0, *pin2-2* et *aux1* (Figure 3.4A). Lors de cette expérimentation sur toute la gamme de trans-Zeatin, Col-0 a une réponse à la gravité en MS/2 et MS/10. Pour *aux1*, il y a un phénotype agravitropique en MS/2 et une réponse partielle à la gravité en MS/10 donc pas vraiment d'effet de la trans-Zeatin observable. Toutefois de façon surprenante ces résultats sont différents pour *pin2-2,* en MS/2 et MS/10 une réponse partielle à la gravité est observée. La trans-Zeatin permettant donc à *pin2* de retrouver un phénotype partiellement gravitropique et ceux même en présence d'une condition restrictive, cela met en évidence la potentielle interaction de la cytokinine avec l'auxine dans la réponse à la gravité. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'application exogène de brassinostéroides avec l'épibrassinolide (eBR), qui ne cause pas de réduction de croissance quel que soit le génotype (Figure 3.4B). Pour Col-0 une réponse à la gravité sur MS/2 et MS/10 avec toutes les concentrations d'eBR a été observée, il est intéressant de noter un waving plus prononcé qu'en absence de l'eBR. Pour *pin2-2* et *aux1*, sur MS/2 et MS/10 avec toutes les concentrations d'eBR un phénotype agravitropique est présent, MS/10 perd donc son effet de condition permissive permettant la conditionnalité du phénotype de *pin2-2* et *aux1* qui est nutriments dépendantes. L'épibrassinolide révèle un effet des brassinostéroïdes sur la capacité à avoir une réponse à la gravité de *pin2-2* et *aux1* en condition permissives, cela met en évidence la potentiellement interaction des brassinostéroïdes avec l'auxine dans la réponse à la gravité.

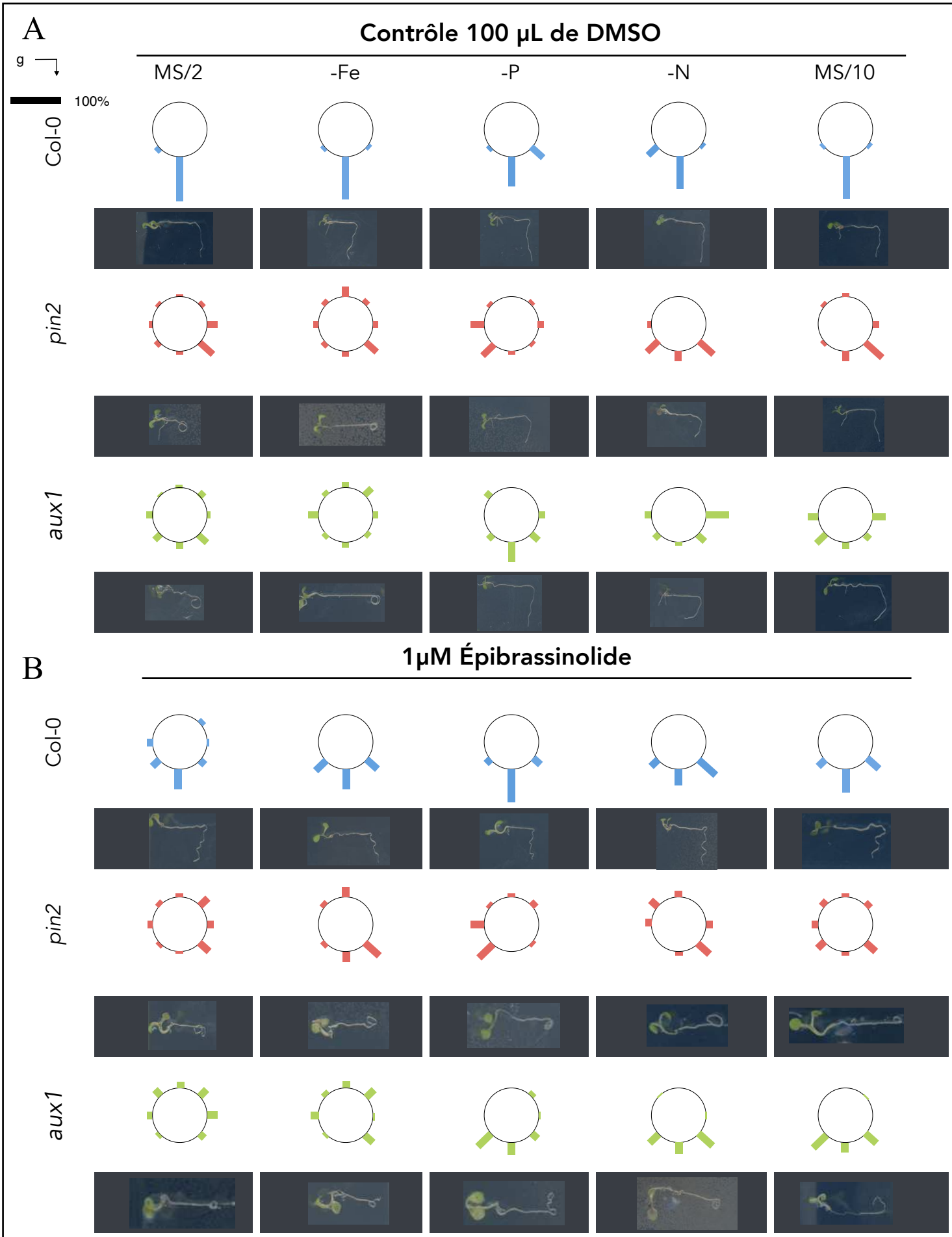


Figure 3.5. L'effet de l'épibrassinolide sur le phénotype agravitropique conditionnel de *pin2* et *aux1*
Réponse gravitropique de Col-0, *pin2* et *aux1* en réponse aux différents milieux combiné au DMSO (**A**) ou a 1µL d'épibrassinolide (**B**) qui fait partie des brassinostéroïdes. Images après 48 heures de gravistimulation. Les diagrammes circulaires affichent l'orientation de l'apex de la racine primaire sous forme de barres colorées représentant le pourcentage de plantes. n=15, barre d'échelle = 1 cm.

Ce résultat étant particulièrement intéressant, la concentration à 1 µM a été choisie pour tester tous les différents milieux et voir si des carences nutritives spécifiques pourraient avoir un effet différent de ce qui a été observé en condition MS/10 (Figure 3.5). Pour Col-0 une réponse à la gravité sur tous les milieux a été observé et pour *pin2-2* et *aux1*, sur tous les milieux un phénotype agravitropique est présent, même sur les conditions considérées comme permissives et révélant une réponse à la gravité. Ce n'est donc pas simplement le milieu MS/10 qui perd sa capacité à révéler le phénotype conditionnel de *pin2* et *aux1*. Les carences nutritives spécifiques ne permettent donc pas de conserver leurs rôles de conditions permissives en présence d'eBR.

3 - Discussion

Dans ce dernier chapitre, le but a été de déterminer quels aspects de l'homéostasie de l'auxine étaient importants dans l'effet de l'environnement sur le gravitropisme ainsi que de comprendre si d'autres hormones interviennent dans ce mécanisme. Cette partie des résultats a été acquise tardivement, il est donc important d'en tirer des enseignements qui resteront à confirmer par la suite. Néanmoins, les données acquises permettent de tirer quelques conclusions sur l'effet de l'auxine et de potentiels crosstalks hormonaux.

3.1 - L'auxine au coeur de la réponse à la gravité et de la conditionnalité de pin2 et aux1

Les résultats acquis grâce aux différents inhibiteurs utilisés ont confirmé la prépondérance de l'auxine et l'importance de son homéostasie au cours du gravitropisme.

En effet, l'inhibition de la biosynthèse d'auxine via L-Kyn affecte le gravitropisme de Col-0 sur MS/2, cela signifiant l'importance d'une quantité optimale d'auxine pour le gravitropisme. Ces résultats ne permettent toutefois pas de donner des indications quant à une potentielle explication des effets différentiels entre les milieux. Ceci indiquerait que la biosynthèse de l'auxine par la voie dépendante du tryptophane est essentielle pour la réponse à la gravité en MS/2 mais ne serait toutefois pas impliquée dans le mécanisme permettant un effet des conditions permissives pouvant indiquer potentiellement un rôle de l'auxine synthétisé spécifiquement dans la coiffe racinaire, dérivée du précurseur IBA dans ces conditions.

L'inhibition de l'expression des gènes de réponse à l'auxine via l'auxinole n'affecte pas Col-0 dans sa réponse à la gravité, toutefois *pin2* et *aux1* sont affectés tant en MS/2 qu'en MS/10. *pin2* présente un enroulement désorganisé et *aux1* un apex ne suivant plus uniquement le vecteur de gravité. Pour ces mutants l'expression des gènes de réponse à l'auxine est donc importante et participe à leur phénotype que ce soit en conditions permissives ou restrictives.

Finalement l'inhibition du transport d'auxine via trois inhibiteurs a été intéressante et nous a permis d'en apprendre davantage sur le rôle capital du transport de l'auxine. Le 1-NOA est un inhibiteur tant des transporteurs d'influx que d'efflux d'auxine, là où TIBA et NPA sont des inhibiteurs uniquement de l'efflux d'auxine. Nous nous attendions donc à des résultats similaires entre TIBA et NPA et une potentielle différence avec le 1-NOA. Étonnamment ce n'est pas ce que nous avons pu observer, en effet les résultats entre TIBA et NPA sont différents mais ceux du NPA et du 1-NOA sont similaires. Le transport polarisé de l'auxine à travers les cellules et les tissus résulte de la distribution polarisée des transporteurs d'efflux d'auxine dans la membrane plasmique. Et ce sont des protéines régulatrices des transporteurs d'efflux d'auxine notamment dans leur

localisation qui seraient des cibles spécifiques pour les phytotropines TIBA et NPA (Petrášek et al., 2002). Bien que leur mode d'action précis demeure encore mystérieux, il semblerait que TIBA inhibe le transport polarisé d'auxine de façon beaucoup moins efficace que le NPA (Sussman et al., 1981). Ceci pourrait potentiellement expliquer la différence que nous observons avec le TIBA qui permet de révéler des comportements en lien avec le gravitropisme là où le NPA est un inhibiteur trop fort pour cela. En effet, le TIBA a permis de révéler chez Col-0 l'effet des conditions permissives et restrictives sur le gravitropisme. Ces résultats appuient l'importance du rôle majeur du transport polarisé de l'auxine dans l'établissement de la réponse à la gravité. Ils sont capitaux car l'effet des nutriments au cours du gravitropisme n'est finalement pas dépendant ou exclusif aux mutants, cela correspond en fait à un mécanisme plus général qui est révélé chez *pin2* et *aux1* dû à leurs sensibilités mais qui est un mécanisme existant également chez Col-0 mais n'étant pas révélé grâce à la redondance des transporteurs de l'auxine. Enfin, l'effet du 1-NOA et du NPA perturbe le gravitropisme de façon similaire, quel que soit le milieu et le génotype, l'apex se retrouvant orienté vers le haut. Ce résultat finit de confirmer le rôle capital du transport de l'auxine au cours du gravitropisme tant via son influx que son efflux. Tous ces résultats participent à mettre en évidence la prépondérance de l'auxine et de son homéostasie générale tant via sa biosynthèse, l'expression de ses gènes de réponse et de son transport, pour la bonne mise en œuvre de la réponse à la gravité. De plus, le transport de l'auxine reste le levier principal permettant d'expliquer l'importance des nutriments qui peuvent moduler le gravitropisme. Il reste néanmoins des zones d'ombres dans les mécanismes potentiels pouvant expliquer ce phénomène. En effet, le TIBA ne fait pas perdre la capacité de *pin2* et *aux1* à répondre à la gravité en MS/10. Cela pourrait potentiellement indiquer que le rôle de PIN1 ayant été mis en évidence dans le chapitre 1 comme participant à ce mécanisme n'est pas l'unique raison permettant d'expliquer ce phénomène et qu'il reste encore d'autres pistes à explorer.

3.2 - Cytokinines et brassinostéroïdes entre synergie et effet antagoniste

Les résultats acquis grâce à l'application exogène de cytokinine et de brassinostéroïde ont permis de dévoiler les différents effets antagonistes ou additifs de ces phytohormones au cours du gravitropisme en fonction de l'environnement nutritifs des plantes. L'absence d'effet particulier de ces hormones sur la réponse gravitropique de Col-0, s'explique par la redondance des transporteurs de l'auxine Nous pouvons donc émettre l'idée selon laquelle ce qui est observé en réponse à ces hormones chez *pin2* et *aux1* agit sur des mécanismes également affectés chez Col-0 mais masqué par la présence de PIN2 et AUX1.

L'application exogène de trans-Zeatin, une cytokinine, permet de visualiser chez *pin2* un phénotype partiellement gravitropique et ceux même en MS/2. Ce résultat semble indiquer que la cytokinine joue un rôle dans le gravitropisme. Pourtant *aux1* ne réagit pas de façon similaire et ne semble pas impacté par la trans-Zeatin. Pernisova et al., (2016) ont mis en évidence que les cytokinines ciblent largement le transport d'auxine médié par AUX1 plutôt que le transport d'auxine médié par les PINs pour affecter le gravitropisme racinaire. Ce qui pourrait potentiellement participer à expliquer les différents résultats obtenus avec *pin2* et *aux1* suite à l'ajout de trans-Zeatin dans les différents milieux. En effet, chez *pin2* les cytokinines ont potentiellement un effet sur AUX1 qui permettrait de moduler le seuil d'auxine à la suite de la gravistimulation permettant donc une réponse à la gravité même sur MS/2 ce qui n'est pas observé chez *aux1*, les transporteurs PINs ne semblant pas impacté par la cytokinine. De plus, il est intéressant de constater que les cytokinines n'ont pas un effet analogue sur les racines latérales et la racine primaire. En effet, pour les racines latérales les cytokinines jouent un rôle antigravitropique, permettant aux racines latérales de garder un angle permettant l'exploration des sols et allant donc à l'encontre du vecteur de gravité (Waidmann et al., 2019). À l'inverse, pour la racine primaire les cytokinines joueraient plutôt un rôle additif à celui de l'auxine dans la réponse gravitropique permettant de suivre le vecteur de gravité notamment en modulant le transport d'auxine médié par AUX1. Une même hormone peut donc avoir des actions différentes selon la zone de réponse étudiée.

Enfin pour les brassinostéroïdes, bien qu'il n'y ait pas d'effet particulier sur la réponse gravitropique de Col-0, il est intéressant de noter un waving plus prononcé en présence de l'eBR. En ce qui concerne *pin2* et *aux1*, l'application exogène d'eBR a permis de révéler une perte de l'effet permissif du milieu MS/10 ainsi que des carences spécifiques en N et P sur le phénotype agravitropique de ces mutants. La présence de l'eBR cause donc un phénotype fortement agravitropique dans toutes les conditions pour *pin2* et *aux1* ce qui tend à mettre en évidence l'interaction potentielle des brassinostéroïdes avec l'auxine dans la réponse à la gravité. En effet, si pour les mutants *aux1* et *pin2* l'application d'eBR cause une réponse agravitropique sur tous les milieux, cela pourrait indiquer que le mécanisme permettant de répondre à la gravité en conditions permissives, selon nous, causé par une relocalisation asymétrique et ectopique de PIN1 tout du moins chez *pin2*, serait affecté par les brassinostéroïdes. Comme pour PIN2, d'autant plus sachant que PIN1 est localisé au même endroit chez *pin2*, on peut émettre l'hypothèse que les brassinostéroïdes auraient un effet soit sur le cycling et l'endocytose de PIN1 directement soit en impactant un autre candidat qui jouerait un rôle similaire à celui de ROP2. En effet, ROP2 module la localisation fonctionnelle de PIN2 par la régulation de l'assemblage de l'actine, médiant ainsi les

effets des brassinostéroïdes sur le transport polarisé de l'auxine polaire et les réponses tropiques (Li et al., 2005 ; Lanza et al., 2012). En effet, les brassinostéroïdes ont également un effet sur les filaments d'actine (De Bang et al., 2020). Ceci permettrait potentiellement d'accentuer le transport de l'auxine avec de nouveau une accumulation d'auxine pour *pin2* qui ne permettrait plus de passer sous le seuil et de permettre une réponse à la gravité et potentiellement un mécanisme différent chez *aux1*.

Pour finir, que ce soit les cytokinines ou les brassinostéroïdes il semblerait que ce ne soit pas tant un effet direct sur le gravitropisme mais une action en synergie avec l'auxine et la modulation de son transport qui aurait des conséquences sur le gravitropisme via l'effet des nutriments dans ce processus. Il serait donc intéressant pour valider cette hypothèse de regarder comment réagit PIN1:GFP chez *pin2* sur les différents milieux en présence d'épibrassinolide et comment la réorientation des flux d'auxines, via l'observation de R2D2, est impactée. De plus comme il a été testé des inhibiteurs d'auxine il serait intéressant de pouvoir tester des inhibiteurs de cytokinines ou brassinostéroïdes combiné aux différents milieux pour voir leurs effets sur le phénotype agravitropique conditionnel de *pin2* et *aux1*. De plus R2D2 a été utilisé pour visualiser l'auxine, plus récemment, un rapporteur nouveau type de rapporteur a été conçu combinant une dégradation basée sur le degron et une édition médiée par CRISPR/Cas9 dans les plantes (Figure S1A) (Khakhar et al., 2018). Ce répresseur à base de Cas9 activé par une hormone (HACR) peut non seulement surveiller la distribution de l'auxine dans les plantes, mais est aussi intéressant de par son caractère modulaire via HACR. En bref, l'endonucléase Cas9 est dirigée par un ARN à guide unique (sgRNA) vers une région du génome et coupe l'ADN au niveau de la séquence cible, créant ainsi une cassure double brin. Des mécanismes cellulaires réparent ensuite la cassure et introduisent des mutations dans la séquence cible dans le processus (Doudna et Charpentier, 2014). Ce système a par la suite été modifié pour lier des séquences cibles sans induire de clivage de l'ADN (Qi et al., 2013) en utilisant une version de Cas9 sans activité endonucléase. Ce dead Cas9 (ou dCas9), peut être utilisé pour moduler l'expression du gène en fusionnant dCas9 à un domaine transcriptionnel répresseur (Gilbert et al., 2013). Sur la base de ce système, Khakhar et al., (2018) ont développé des HACR qui surveillent la distribution endogène des phytohormones. Le HACR typique comprend un domaine dCas9 fusionné à un signal de localisation nucléaire, le domaine transcriptionnel répresseur TPL (TOPLESS) (Pierre-Jerome et al., 2014), et un domaine degron d'auxine dérivé de IAA17 (Moss et al., 2015). En présence d'auxine la protéine de fusion est dégradée. Étant donné que la position de chaque module semblait modifier la sensibilité à l'auxine (Khakhar et al., 2016), le degron a été placé entre dCas9 et le domaine TPL, assurant la plus haute sensibilité à la

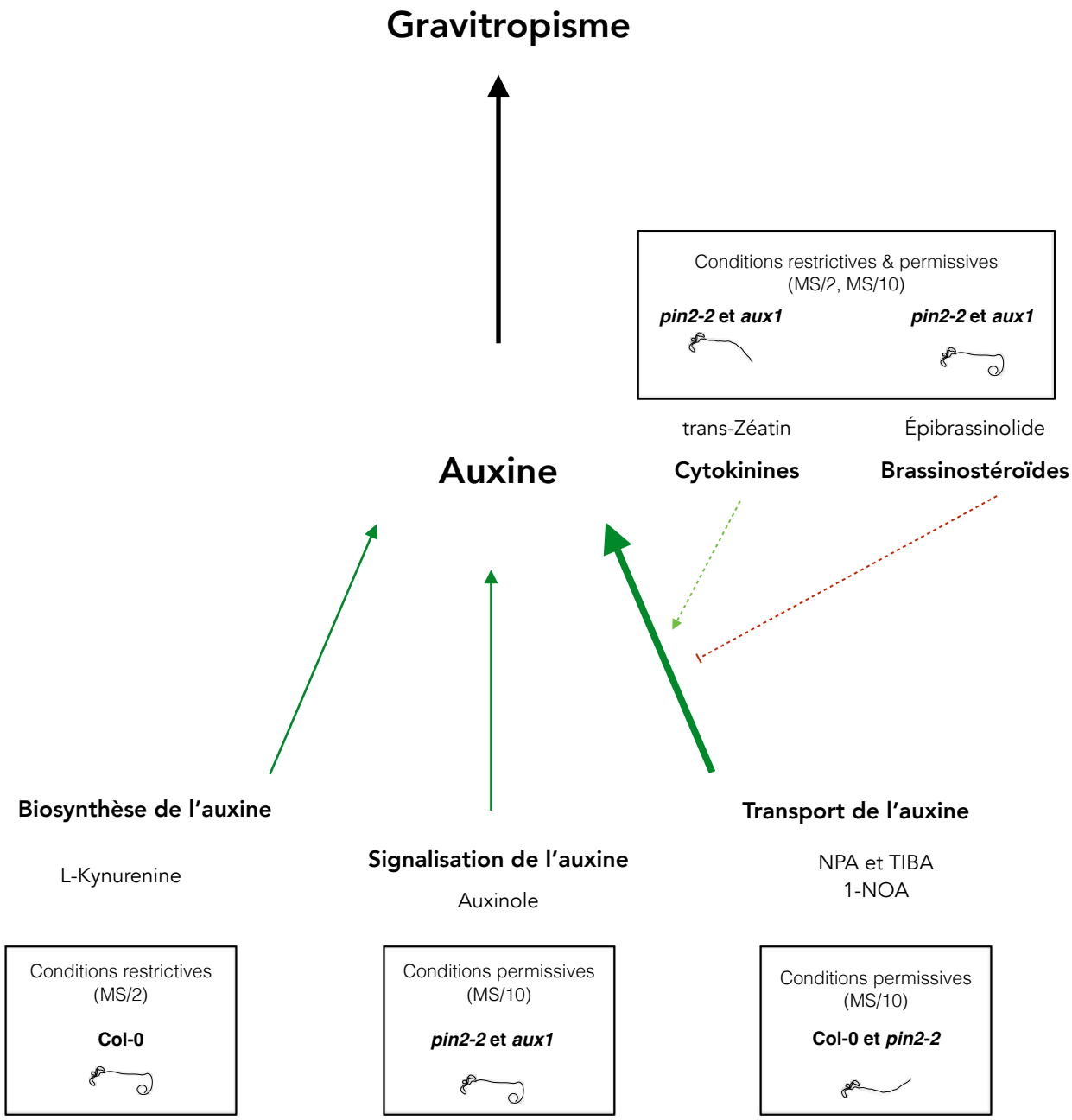


Figure 3.6. Modèle de l'effet des cytokinines, brassinostéroïdes et inhibiteurs de l'auxine sur le phénotype racinaire agravitropique conditionnel

Modèle proposé montrant la relation et les effets des cytokinines, brassinostéroïdes et inhibiteurs de l'auxine sur le gravitropisme en particulier dans des conditions restrictives et permissives.

phytohormone. Pour utiliser HACR pour la recherche sur l'auxine, des plantes d'*Arabidopsis* transgénique contiennent une construction codant pour un HACR d'auxine et exprimant un sgRNA ciblant le promoteur constitutif UBQ contrôlant l'expression du rapporteur VENUS-LUC. Lorsque ces plantes sont traitées avec une application exogène d'auxine, le domaine degron cible le HACR pour sa dégradation, atténuant ainsi la répression du gène rapporteur du domaine TPL. Le traitement à l'auxine s'accompagne donc d'une fluorescence et d'une luminescence plus élevées. La version ratiométrique des lignées HACR d'auxine ont été créées avec un deuxième rapporteur fluorescent (tdTomato) piloté par le promoteur UBQ avec un site cible sgRNA muté. Le signal fluorescent tdTomato est ensuite utilisé pour normaliser le signal fluorescent VENUS dans chaque cellule. Mais ce qui représente un grand intérêt de ce système et qu'il permet de remplacer le degron d'auxine par des degrons sensibles aux autres hormones végétales (jasmonates et gibbérellines ont été testées). Un système appelé ViparіNama (ViN) associant un HACR de gibbérelline et des vecteurs viraux à ARN (ViN 1.0) a été utilisé pour surveiller les effets de la reprogrammation de gènes impliqués dans la biosynthèse de la gibbérelline (Khakhar et al., 2021). Il serait donc intéressant d'utiliser ce type de système pour pouvoir observer l'effet des nutriments au cours du gravitropisme sur les autres hormones, en particulier les cytokinines et les brassinostéroïdes, pour mieux comprendre les crosstalks à l'action durant cet évènement.

3.3 - Modèle de l'homéostasie de l'auxine, le rôle des cytokinines et des brassinostéroïdes

Ce chapitre a permis de mettre en évidence l'importance de l'homéostasie de l'auxine, que ce soit sa biosynthèse, sa signalisation et son transport, au cours du gravitropisme (Figure 3.6). La biosynthèse de l'auxine semble essentielle pour répondre à la gravité mais ne serait toutefois pas impliquée dans le mécanisme permettant un effet des conditions permissives. La signalisation de l'auxine semble importante chez les mutants *pin2-2* et *aux1* et participe à leur phénotype que ce soit en conditions permissives ou restrictives. Mais le transport de l'auxine reste le levier principal permettant d'expliquer l'importance des nutriments qui peuvent moduler le gravitropisme. De plus, les cytokinines et les brassinostéroïdes, pas tant via un effet direct mais plutôt via une action en synergie avec l'auxine et la modulation de son transport, ont un effet qui permettrait de moduler le seuil d'auxine à la suite de la gravistimulation.

Discussion générale, perspectives & Conclusions



Discussion générale, perspectives & Conclusions

Ce projet de thèse est né de la découverte du mutant agravitropique *lasso* par nos collaborateurs (Estelle Hrabak et Megan Thompson, Université du New Hampshire, USA). À la recherche de gènes contrôlant à la fois la réponse gravitropique et la réponse au stress salin, ils ont identifié ce mutant qui présentait un phénotype agravitropique. Son séquençage effectué au sein de l'équipe plasticité, a permis d'identifier le gène *AtPIN2* comme responsable du phénotype du mutant *lasso*. Très rapidement nous avons identifié que le phénotype agravitropique de *pin2* pouvait être réverté par des changements nutritionnels. PIN2 étant un transporteur d'efflux d'auxine impliqué dans l'établissement du gradient d'auxine dans l'apex racinaire, ceci en fait un excellent outil de départ pour étudier l'impact de l'environnement, en particulier des nutriments, sur le lien existant entre gradient d'auxine et gravitropisme. L'objectif de mes travaux de thèse était donc de comprendre comment le gravitropisme pouvait être modulé par les nutriments, si d'autres mutants impliqués dans le gravitropisme ou le transport de l'auxine pouvaient être conditionnels de la même manière que *pin2*, et quel était le rôle de l'auxine et potentiellement d'autres hormones dans ce processus. Mes travaux ont ainsi contribué à améliorer les connaissances sur l'effet des nutriments sur le gravitropisme. En effet, certaines carences nutritives spécifiques permettent de moduler les niveaux de relocalisation asymétrique de l'auxine lors de la deuxième phase du gravitropisme qui correspond à la transduction du signal. PIN1 chez le mutant *pin2* est un acteur permettant ce processus, il reste malgré tout des zones d'ombres dans le mécanisme lié à ce phénomène. En effet, *aux1* et *axr2* sont deux mutants dont le gravitropisme est également conditionnel à l'environnement. La mécanistique causant ce processus chez ces mutants reste à être étudiée. Enfin, il semble que d'autres hormones, à cause de leurs interactions avec l'auxine, peuvent également avoir un impact sur l'effet des nutriments sur le gravitropisme, notamment les cytokinines et les brassinostéroïdes.

Ce modèle, selon lequel le statut nutritif de la plante permet de moduler le gravitropisme en modulant le rôle de l'auxine durant sa mise en place, ouvre de nombreuses perspectives et permet de disposer de pistes de recherche concernant l'étude de la réponse gravitropique. Cette dernière partie de ma thèse vise à replacer mon étude dans un contexte plus général en discutant des points pouvant être transverses à tous les chapitres et présenter les nouvelles questions que mes travaux ont soulevé.

1 - Agravitropisme et défaut de gravitropisme

Les mutants *pin2* et *aux1* découverts dans la fin des années 90 ont été largement décrits pour leurs phénotypes agravitropiques et leurs défauts de transport de l'auxine, pourtant leur phénotype agravitropique et sa pénétrance n'a jamais été remis en cause ou discuté. La nomenclature du phénotype comme étant agravitropique reflète déjà en elle-même la problématique du manque de connaissance à ce propos. Le terme agravitropique se définit comme ne présentant pas de gravitropisme, donc de réponse à la gravité. Toutefois ce mot générique est utilisé pour définir des phénotypes qui sont totalement différents, il est employé pour décrire le phénotype d'enroulement de la racine primaire pour *pin2* et *aux1*, le phénotype de racine orienté à l'inverse du vecteur de gravité pour le triple mutant *lzy2 lzy3 lzy4* et enfin pour des défauts gravitropiques plus mineurs tels que la variation de l'angle de réponse à la gravité pour *pgm* et *pin3*. Pour les mutants *lzy* il est possible de trouver les termes de réponse gravitropique négative ou gravitropisme inverse qui sont plus précis que la nomenclature agravitropique (Yoshihara and Spalding, 2017). Pour *pin2* et *aux1* il conviendrait donc peut être de parler de curling ou spirale gravitropique décrivant l'enroulement de la racine primaire d'autant plus que nous avons mis en évidence que *pin2* répond à la gravité au cours des premières heures de la réponse gravitropique.

2 - L'importance des nutriments sur la relocalisation asymétrique de l'auxine au cours du gravitropisme

L'importance de l'environnement nutritif au cours du gravitropisme, que nous avons mis en évidence dans nos travaux, représente une innovation majeure dans le domaine. L'auxine joue un rôle central dans la formation des traits morphologiques des racines, elle est modulée au niveau de sa biosynthèse, de son transport, de sa perception et de sa réponse pour déterminer les processus de développement racinaire adaptés définissant alors l'architecture du système racinaire et l'étendue de ses réponses, en particulier concernant la recherche de nutriments qui est essentielle pour la plante. Yamazaki et al., (2019) ont proposé pour la première fois le terme de « nutritropisme » comme désignant une réponse tropique des racines vers les nutriments. Ils ont examiné la réponse racinaire du riz face à un gradient de nutriments, et les apex des racines latérales ont été dirigés vers les patchs de nutriments, changeant donc leur direction de croissance. Cependant dans nos travaux il n'y avait pas de patch de nutriments mais un milieu homogène et la réponse à la gravité était étudiée en conséquence, c'est donc bien le gravitropisme qui est modulé par les nutriments et pas un cas de nutritropisme. La modification du gravitropisme, résultant des carences nutritives que nous avons testées (MS/2-P, -N, MS/10), est une avancée dans le domaine. Cependant il reste encore un grand

nombre de conditions nutritives à explorer pour mieux comprendre l'effet des nutriments sur le gravitropisme. Nous nous sommes concentrés sur une carence totale en N, il serait intéressant de dissocier les effets du nitrate et de l'ammonium. Zou et al., (2013) se sont penchés sur l'effet de l'ammonium sur le gravitropisme en voulant déterminer quels gènes étaient essentiels au maintien du gravitropisme racinaire sous stress NH_4^+. Ils ont identifié le mutant *gsa-1* sensible à l'ammonium et ont déterminé que GSA-1 est requis pour l'expression normale d'AUX1 et donc pour le transport basipétal de l'auxine dans les apex racinaires. De plus, PIN2 est proposé comme cible dans la réduction du gravitropisme racinaire sous stress NH_4^+, une réponse qui peut être contrariée par la voie dépendante de GSA-1. Cela les amène à proposer que GSA-1 protège le gravitropisme racinaire chez *Arabidopsis thaliana* sous stress ammonium (Zou et al., 2013). Plus récemment, Chai et al., (2020) se sont quant à eux intéressé à l'effet des nutriments qui influence la croissance asymétrique des racines (ARG) qui est composé d'une combinaison de gravitropisme, de sensing mécanique et de circumnutation (mouvement hélicoïdal que tous les organes de la plante font autour de la direction de croissance). Ils ont montré dans leur étude qu'une carence en nitrate améliore l'ARG sur des boîtes horizontales. Leur approche est très différente de celle utilisée dans notre étude mais il est intéressant de noter que l'effet des nutriments sur le gravitropisme est questionné au sein de la communauté scientifique. Une autre piste consisterait à explorer, l'effet des autres nutriments tel que le potassium qui est l'un des trois nutriments majeurs avec le phosphore et l'azote. Templalexis et al., (2022) ont récemment mis en évidence le rôle de TRH1, un membre des transporteurs à haute affinité de potassium (K^+) dans le gravitropisme. Il a été observé que la perte de la fonction de TRH1 entraîne un gravitropisme racinaire défectueux, associé à un déséquilibre de l'auxine dans l'apex racinaire. Il a été postulé que TRH1 module conjointement les gradients ioniques intracellulaires et le transport de l'auxine polaire de cellule à cellule permettant de moduler la différenciation des cellules épidermiques racinaires et la réponse gravitropique (Templalexis et al., 2022).

Une des principales avancées concernant la façon dont les nutriments vont impacter le gravitropisme provient de la visualisation de leurs effets sur la relocalisation asymétrique de l'auxine. Nous avons analysé le profil d'expression des marqueurs DR5:GFP et R2D2 qui ont permis de déduire le profil d'accumulation de l'auxine en réponse aux différents nutriments pour Col-0 et *pin2* et seulement le marqueur R2D2 pour *aux1*. Nous avons été confrontés à un certain nombre de difficultés pour réaliser ces observations. En effet, le confocal est horizontal et le transfert de plantules d'une boîte verticale sur une lame de microscopie n'assure pas que l'orientation haut/bas de la racine soit conservée. Pour corriger cette limite expérimentale, il aurait

été optimal d'utiliser un microscope confocal permettant de visualiser les racines en position verticale. N'ayant pas eu accès à ce type de matériel et pour palier à ce problème nous avons réalisé différemment le montage entre lame et lamelle. Le transfert se fait sur la lame où une fine brique de milieu est disposée et les plantes sont transférées pour réaliser directement la gravistimulation entre lame et lamelle et s'affranchir de la perte d'orientation haut/bas de la racine lorsque le transfert à lieu après la gravistimulation. Ce type de montage nous a également permis de réaliser des cinétiques. Une autre difficulté repose sur les marqueurs utilisés. Les rapporteurs d'auxine basés sur la transcription (DR5) ou à base de degron (DII-venus et R2D2) nous ont permis de mettre en évidence un effet certain des différents milieux de culture et ils sont largement utilisés pour étudier la distribution de l'auxine. Toutefois, ils ne peuvent respectivement pas détecter les niveaux d'auxine fluctuants rapidement en raison du temps nécessaire à la transcription, la traduction et la maturation de la protéine rapportrice (pour DR5), ou en raison du temps nécessaire pour leur resynthèse après la dégradation induite par l'auxine (pour DII-venus et R2D2). Un biocapteur récemment publié, AuxSen, représente la dernière innovation dans le domaine de la visualisation de l'auxine (Herud-Sikimic et al., 2021). Il repose sur la liaison directe à l'auxine avec une sélectivité élevée et il permet de surveiller en temps réel sa distribution spatiale. Ce capteur d'auxine dynamique, dérivé du répresseur tryptophane dimérique d'*E. coli*, utilise la technique du transfert d'énergie par résonance (FRET) et n'interfère pas avec les voies de signalisation des plantes. Lors de la liaison de l'auxine, le capteur dimérique subit un changement conformationnel, rapprochant les deux protéines fluorescentes, générant un signal FRET (Figure S1B). L'accumulation d'auxine est donc mesurée par un rapport FRET. Ce signal se produit lorsqu'un fluorophore donneur (aigue-marine) dans l'état excité transfère l'énergie à un fluorophore accepteur (mNeonGreen). Le rapport FRET augmente avec la diminution de la distance intermoléculaire, ce qui est le résultat du changement conformationnel d'AuxSen lors de la liaison de l'auxine. Comme la liaison de la phytohormone est réversible et qu'aucune expression ou dégradation de protéine n'est nécessaire, la surveillance des niveaux d'auxine est rapide et dynamique et permet notamment d'observer la réponse à la gravité sur des temps courts. En effet, un modèle, paramétré pour la dégradation dépendante de l'auxine de DII-Venus, a proposé que la mise en place de l'asymétrie débute dans les 5 minutes suivant un stimulus de gravité (Band et al., 2012). Le rapporteur AuxSen a montré quant à lui une nette augmentation du rapport FRET sur le nouveau côté inférieur de la pointe de la racine après 1 min seulement, mettant en évidence la capacité que le marqueur AuxSen possède à permettre la visualisation rapide des fluctuations des niveaux d'auxine. Ce marqueur pourrait donc représenter une amélioration pour permettre une observation plus directe et rapide des effets des

nutriments sur les niveaux d'auxine au cours du gravitropisme. De plus, nous avons focalisé nos analyses au niveau de l'apex racinaire, dans la coiffe latérale et l'épiderme, car nous avons rencontré des difficultés à réaliser l'observation des marqueurs dans la zone de transition et d'élongation. Toutefois la coiffe latérale et l'épiderme de l'apex racinaire reste un lieu de passage mais l'intégration de la réponse gravitropique se fait dans la zone d'élongation. Le marqueur AuxSen pourrait donc être utilisé pour pousser les observations dans cette zone. De plus, nous avons observé avec R2D2 chez *pin2* et *aux1* deux niveaux d'auxines différents, étant respectivement sur-accumulé ou sous-accumulé. Les conditions permissives permettant alors la modulation de ces niveaux d'auxine pour atteindre un seuil permettant la réponse gravitropique. Il serait intéressant d'observer, via AuxSen, si ce type d'accumulation différentielle entre *pin2* et *aux1* est retrouvée dans la zone d'élongation où AUX1 et PIN2 sont tous deux localisés; PIN2 fournissant la directionnalité du mouvement de l'auxine et AUX1 étant essentiel pour l'absorption efficace de l'auxine dans les cellules épidermiques. En effet, des simulations informatiques des flux d'auxine à travers les tissus de la zone d'élongation suggèrent que l'expression de AUX1 et PIN2 dans l'épiderme minimise l'effet de diffusion radiale tout en facilitant le transport de l'auxine (Swarup et al., 2005). Enfin, les analyses concernant l'effet des nutriments sur l'auxine au cours du gravitropisme ont été faite via les profils d'expression des marqueurs DR5:GFP et R2D2, il serait intéressant d'avoir d'autres approches, notamment de biologie moléculaire qui manquent dans ce manuscrit, pour étayer ces observations.

3 - Le transport de l'auxine et son rôle crucial au cours du gravitropisme, le cas de PIN1

La localisation subcellulaire des transporteurs d'auxine, en particulier les PINs, est donc cruciale pour le transport polarisé de l'auxine au cours du gravitropisme, dont nous avons montré l'importance ci-dessus. Malgré son importance, il reste de nombreuses inconnues concernant la régulation des PINs tant au niveau de leur régulation post-traductionnel, de leur localisation subcellulaire et de l'effet que l'environnement peut jouer sur ces processus, mais de récentes avancées ont été réalisées.

En ce qui concerne leur régulation post-traductionnel et l'effet de l'environnement, Ötvös et al., (2021) ont mis en évidence que la polarisation de PIN2 à la membrane plasmique peut être modulé par la source de N, mais que la transcription de PIN2 reste inchangée pointant vers un mécanisme de régulation post-traductionnel tel que la phosphorylation. En effet, la sérine 439 de PIN2 subi une déphosphorylation rapide après remplacement de NH_4^+ par NO_3^- ce qui favorise

l'accumulation de PIN2 à la membrane plasmique du côté apical des cellules épidermiques. Le phosphosite PIN2S439 est positionné dans la boucle hydrophile de la protéine PIN2 et est un résidu évolutif conservé même à travers les espèces tels que les gymnospermes. La déphosphorylation dépendante du nitrate chez PIN2 conduit donc à une latéralisation qui régule le flux d'auxine, entraînant un ajustement ultérieur du schéma de croissance des racines en réponse à une source d'azote.

Concernant la localisation polaire de PIN2, Glanc et al., (2019) ont montré que la mise en place de la polarité de PIN2 ne nécessite pas de microfilaments ou de microtubules d'actine intacts, suggérant que le signal spatial primaire pour la distribution des PINs polaire est indépendant du trafic endomembranaire guidé par le cytosquelette. Toutefois Li et al., (2021b) ont montrés que le regroupement des PINs dans la membrane plasmique est important pour maintenir leur distribution polaire, et que la formation d'amas au sein de la membrane plasmique est régulée par les phosphoinositides, les microtubules et les interactions avec la paroi cellulaire. Les phosphoinositides régulent notamment le regroupement des protéines PIN2 par interaction directe avec leur boucle hydrophile, et les microtubules ainsi que les interactions avec la paroi cellulaire (cellulose et pectine) confinent la diffusion latérale des protéines PIN2. Ce confinement de PIN2 génère une localisation en clusters à la membrane plasmique (Li et al., 2021b).

Un lien récent a été fait par Ke et al., (2021) entre la localisation subcellulaire fine de PIN2 dans des nanodomaines et le gravitropisme. En effet, PIN2 se retrouve dans des nanodomaines sous forme de clusters. Les nanodomaines sont définis comme des sous-compartiments membranaires dynamiques enrichis en lipides et assemblages protéiques spécifiques et submicroniques (20 nm à 1 µm) qui servent de plateformes fonctionnelles pour gérer une abondance de processus cellulaires (Martinière et Zelazny, 2021). Ke et al., (2021) ont montré qu'outre l'auxine, l'acide salicylique (SA) est corrélé négativement au gravitropisme en limitant la diffusion latérale de PIN2. Dans des conditions de faible SA, les nanodomaines ainsi que PIN2 sont répartis de manière homogène sur la membrane plasmique. Les protéines PIN2 font l'objet d'un trafic entre les vésicules et la membrane plasmique via une endocytose dynamique. Dans des conditions de SA élevée la dynamique de différentes biomolécules associées aux membranes plasmiques est réduite ce qui provoque une compartimentation et un tassement des nanodomaines. Le mouvement de PIN2 au sein des nanodomaines est alors contraint et conduit à un regroupement en hyperclusters ce qui supprime significativement l'endocytose et le mouvement diffusif latéral de PIN2. Cela perturbe la distribution asymétrique de PIN2 par SA au cours d'un stimuli gravitropique ce qui provoque un

transport sub-optimale de l'auxine. Par conséquent, une réponse gravitropique est impossible et SA est un régulateur négatif du gravitropisme.

À l'inverse du rôle de SA, l'acide para-aminobenzoïque (PABA), un modulateur de l'interaction auxine-éthylène pendant le gravitropisme racinaire, est un régulateur positif du gravitropisme. Il est intéressant de noter que Nziengui et al., (2018) ont mis en évidence que l'application exogène de PABA inverse la croissance agravitropique des racines de *pin2* qui deviennent alors gravitropiques. De même, Santelia et al., (2008) ont montré que l'application exogène de flavonols entraîne une restauration du gravitropisme chez le mutant *pin2,* notamment en modulant la localisation ectopique de PIN1. Ces observations se rapprochent de ce que nous avons mis en évidence avec des carences nutritives qui permettent de retrouver une réponse à la gravité chez *pin2* et *aux1,* et qui pour *pin2* semble lié à la localisation ectopique de PIN1 dans l'épiderme. La présence ectopique de PIN1 dans l'épiderme, qui est normalement le domaine d'expression de PIN2, affecte la symétrie de la distribution de l'auxine en fonction des conditions et participe à la restauration de la réponse gravitropique racinaire du mutants *pin2*.

Un certain nombre de questions sont soulevées suite à ces récentes avancées sur la régulation des PINs, tant au niveau de leur régulation post-traductionnel et de leur localisation subcellulaire, et l'effet que l'environnement peut avoir sur ces processus. La localisation de PIN2 dépend notamment de son statut de phosphorylation, qui peut être modulé par le nitrate et qui est important pour la régulation des flux d'auxine, de sa clusterisation et sa présence dans des nanodomaines qui se trouve être importante au cours du gravitropisme. On peut alors légitimement se demander si PIN1, localisé ectopiquement dans l'épiderme chez *pin2,* va se retrouver dans des nanodomaines et si les mécanismes contrôlant sa relocalisation pour générer la présence ou non d'asymétrie dans des conditions restrictives ou permissives proviennent d'une régulation liée au clustering. Si comme pour PIN2 il y a des interactions avec les hormones tels que SA ou s'il s'agit de mécanisme de phosphorylation comme pour PIN2 et le nitrate.

Concernant les interactions avec les hormones, Retzer et al., 2017 ont mis en évidence que les brassinostéroïdes sont antagonistes de l'endocytose de PIN2. Les brassinostéroïdes contrôlent les ajustements dans le trafficking de PIN2 et sa distribution intracellulaire régis la formation d'un gradient latéral dans les racines gravistimulées, coïncidant avec des ajustements du gradient d'auxine causant la croissance directionnelle des racines. Le crosstalk entre la signalisation des brassinostéroïdes et le tri endocytaire de PIN2 semble donc essentiel pour la réponse à la gravité. Dans notre étude, nous avons mis en évidence que l'application exogène d'eBR chez *pin2* et *aux1*

cause une perte de l'effet des conditions permissives, et cause donc un phénotype fortement agravitropique dans toutes les conditions. Ce résultat souligne une interaction des brassinostéroïdes avec l'auxine dans la réponse à la gravité et pourrait donc indiquer que chez *aux1*, PIN2 est perturbé par l'application d'eBR et chez *pin2* en absence de PIN2 ce serait potentiellement PIN1 qui serait ciblé.

La localisation ectopique de PIN1 dans l'épiderme semble donc importante pour la restauration de la réponse gravitropique racinaire du mutants *pin2*. Toutefois d'autres potentiels acteurs moléculaires pourraient jouer un rôle dans cette restauration de réponse gravitropique. En effet, l'application exogène de TIBA, qui est un inhibiteur du transport d'efflux et qui affecte PIN1 (Geldner et al., 2001), ne permet pas de perdre l'effet des conditions permissives ce qui semble indiquer qu'au minimum un autre acteur moléculaire aurait un rôle dans ce processus. L'intégration des facteurs environnementaux, en particulier des nutriments, dans la réponse à la gravité est donc possible majoritairement grâce à l'auxine et en particulier son transport avec un rôle crucial de PIN1 mis en évidence chez *pin2*, bien qu'un crosstalk hormonal puisse intervenir avec des actions en synergie avec l'auxine.

4 - L'importance évolutive du gravitropisme, le cas du riz

Il existe au moins deux modes distincts de réponse gravitropique racinaire dans le règne végétal : une réponse lente et rudimentaire des premières lignées de plantes vasculaires (lycophytes et fougères) et une réponse bien plus efficace et plus rapide des plantes à graines (gymnospermes et plantes à fleurs) (Zhang et al., 2019). Cette différence de réponse gravitropique peut être liée à l'origine évolutive indépendante des racines dans ces groupes de plantes et est également en corrélation avec les innovations de l'anatomie de l'architecture racinaire, en particulier la présence de statolithes sensibles à la gravité dans l'apex racinaire chez les plantes à graines. En conséquence, le lieu de perception de la gravité dans l'apex a évolué pour être séparé du lieu de la réponse de croissance nécessitant un nouveau mécanisme de signalisation entre ces tissus. Cela est possible avec l'évolution d'un nouveau type de transporteur d'auxine, les PINs, entraîné par la sélection naturelle positive. Ces innovations fonctionnelles se sont produites en deux étapes d'abord à l'apparition des plantes terrestres via des innovations précoces dans les domaines transmembranaires puis après la divergence des plantes à graines via des innovations ultérieures dans le domaine central des boucles hydrophiles. Ces changements de séquence ont entraîné la

localisation subcellulaire de PIN2 qui permet d'établir le flux de transport d'auxine reliant le lieu de perception de la gravité et la régulation de la croissance causant la réponse à la gravité. Zhang et al., (2019) ont effectué des expériences de complémentation génétique interspécifique avec des gènes PINs de divers lignées végétales représentatives exprimées chez le mutant *pin2* d'*Arabidopsis* sous le contrôle du promoteur *PIN2* d'*Arabidopsis*. Ces expériences de complémentation ont permis de mettre en évidence qu'il existe deux gènes PINs équivalent à PIN2 chez les gymnospermes : PING et PINH (PING/H), qui ont développé une propriété biologique similaire dans le gravitropisme racinaire rapide. Ceci suggère qu'un événement de duplication s'est produit au cours de l'évolution des gymnospermes car il n'existe qu'un seul gène PIN2 chez les plantes à fleurs, telles qu'*Arabidopsis* et *O. Sativa.* Il n'est toujours pas résolu si cela résulte de l'évolution de convergence de PIN2 et PING/H ou s' ils sont issus d'une descendance commune. L'analyse phylogénétique au niveau des protéines a montré que PING/H et PIN2 sont regroupés dans le même clade, soutenant que PING/H des gymnospermes sont les co orthologues de PIN2 des plantes à fleurs avec un ancêtre commun. Cependant, l'analyse phylogénétique au niveau des nucléotides et de la structure des boucles hydrophiles ont suggéré que la fonction de PING/H et PIN2 dans le gravitropisme racinaire a évolué par convergence chez les gymnospermes et les plantes à fleurs (Zhang et al., 2019). Ces données évolutives démontrent comment l'innovation anatomique racinaire, combinée à l'évolution des transporteurs d'auxine PINs, a conduit à l'évolution de la racine des plantes à graines pour devenir un organe sensible et efficace pour médier le gravitropisme rapide, ce qui a pu faciliter leur adaptation aux nouveaux environnements.

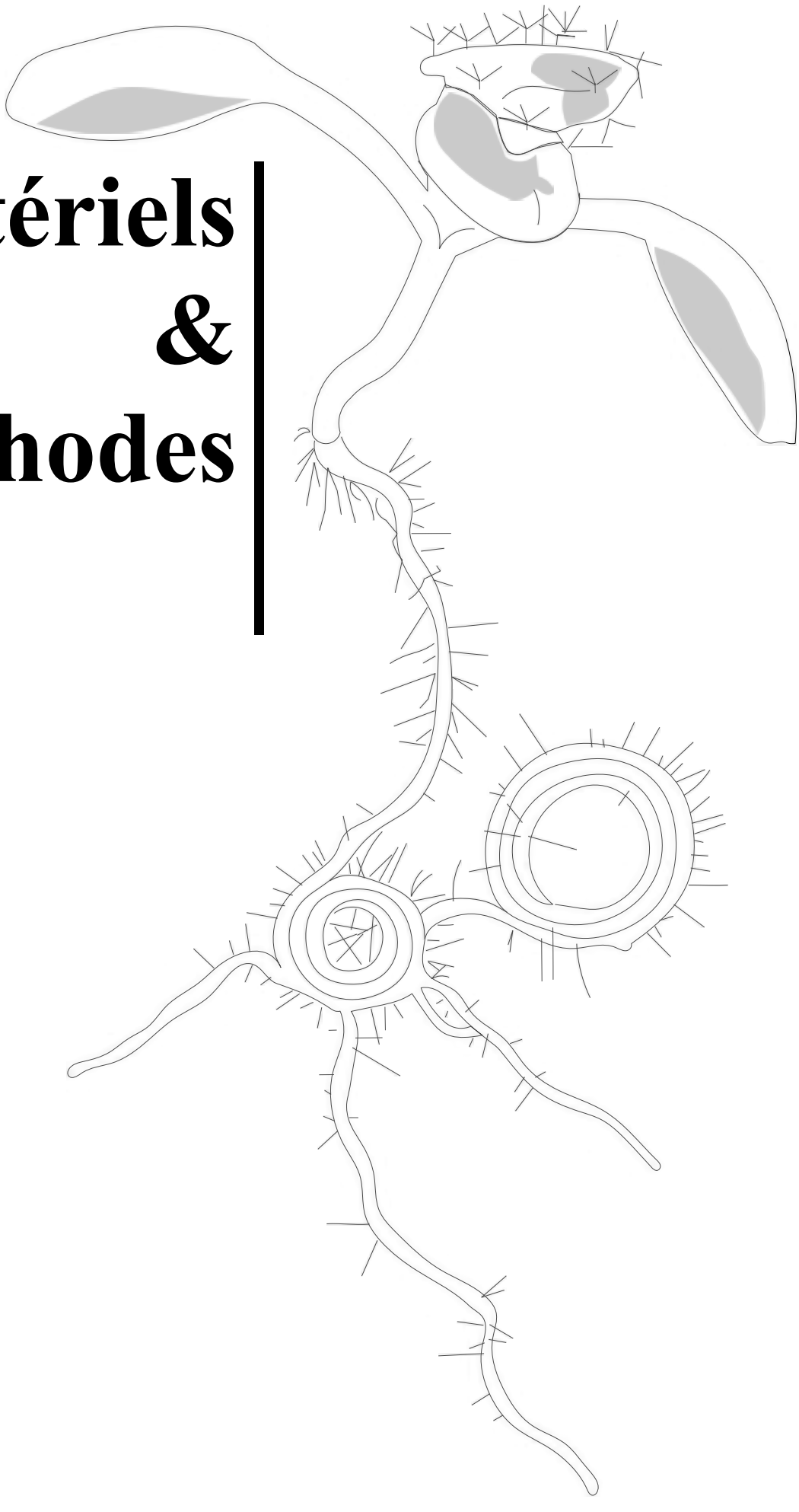
Notre étude met en évidence l'importance des conditions environnementales pour le phénotype racinaire *pin2* agravitropique chez *Arabidopsis*. Le gène PIN2 du riz (*OsPIN2*) peut sauver le phénotype mutant *pin2* d'*Arabidopsis* (Wang et al., 2018). De plus, le mutant du riz dans PIN2, *Ospin2*, ainsi que celui d'AUX1, *Osaux1* ne sont pas agravitropique, mais présente un défaut d'angle de croissance des racines (Inahashia et al., 2018 ; Giri et al., 2018). Il serait intéressant de pouvoir évaluer les réponses de ce mutant dans différentes conditions nutritives pour élargir nos connaissances sur le phénotype agravitropique conditionnel des racines aux espèces agronomiques pour lesquelles la croissance dans le sol et l'apport en nutriments sont essentiels. Cela pourrait suggérer que la définition de l'angle de croissance racinaire et la réponse gravitropique peuvent être contrôlés à la fois génétiquement et environnementalement. La modification conditionnelle du gravitropisme racinaire et des angles racinaires serait utile, car elle permettrait aux plantes

d'acquérir de manière optimale les nutriments dans leurs environnement hétérogène qu'est le sol avec des nutriments qui se retrouvent localisés en patch ou à différentes profondeurs. Ces observations ouvrent la voie à une meilleure exploration des racines et utilisation des ressources.

5 - Conclusions

L'objectif majeur de ce travail de thèse était d'étudier le rôle des nutriments sur le transport de l'auxine au cours du gravitropisme chez *Arabidopsis thaliana*. Mes travaux ont révélé la conditionnalité et la sensibilité aux nutriments des phénotypes agravitropiques des mutants *pin2* et *aux1*. Nous avons pu établir que la réversion du phénotype agravitropique chez *pin2* en conditions permissives passe par la localisation asymétrique et ectopique de PIN1 dans l'épiderme. Celle-ci est associée à une restauration de l'accumulation asymétrique d'auxine, que l'on retrouve également chez *aux1*, nécessaire à la réorientation de la racine en fonction de la gravité. Les résultats originaux présents dans cette étude démontrent donc l'importance et la nécessité d'un niveau seuil d'auxine, présent asymétriquement lors de la réponse gravitropique, qui est sensible aux nutriments. Ces observations, ainsi que l'utilisation d'inhibiteurs d'auxine, ont mis en évidence l'importance de l'homéostasie de l'auxine dans ce processus; le transport de l'auxine restant le principal levier permettant d'expliquer l'importance des nutriments au cours du gravitropisme. Nous avons également mis en évidence que les cytokinines et les brassinostéroïdes, via leur action en synergie avec l'auxine, ont un effet qui permettrait de moduler le seuil d'auxine pour répondre à la gravité. Ce travail de thèse ouvre la voie à de nombreuses perspectives concernant l'étude du mécanisme permettant aux nutriments de moduler le gravitropisme via le transport de l'auxine. En effet, la localisation asymétrique et ectopique de PIN1 dans l'épiderme est une première explication quant au mécanisme par lequel les nutriments permettent la restauration du phénotype gravitropique chez *pin2*. Il serait intéressant de comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents. Toutefois, cela n'est qu'un début d'explication concernant ce phénomène. Nos travaux indiquent que d'autres acteurs pourraient être impliqués dans le rôle des nutriments sur le transport de l'auxine au cours du gravitropisme et restent encore à être identifiés et caractérisés.

Matériels & Méthodes



Matériels & Méthodes

Matériel biologique végétal

Différentes lignées d'*Arabidopsis thaliana* ont été utilisées dans cette étude, l'écotype sauvage Columbia-0 (Col-0) et plusieurs mutants. Le mutant *pin2-2* issu d'un crible génétique mené par nos collaborateurs Estelle Hrabak et Megan Thompson (Université du New Hampshire, USA) utilisant une population de plantes mutagénisées par activation tagging (Weigel et al., 2000), et différents mutants alléliques de *pin2* : *SALK_122916.49.40.x*/*eir1-1*/*eir1-4*/*fsp2-1* (Chen et al., 1998 ; Luschnig et al., 1998), respectivement fournis par le Nottingham *Arabidopsis* Stock Center (NASC) ou généreusement fournis par Prof. Hidehiro Fukaki (Université de Kobe, Japon) et Tatsuaki Goh (Nara, Japon). Les mutants *aux1-22* (Bennet et al., 1996), *pin1-3* (Bennet et al., 1995), *pin3-5* (Blilou et al., 2005), *pin7-1* (Vieten et al., 2005), *axr1-3* (Lincoln et al., 1990), *axr2-1* (Timpte et al., 1994), *axr3-1* (Leyser et al., 1996), *axr4* (Hobbie et al., 1995), *pgm* (Periappuram et al., 2000). Les lignées transgéniques suivantes ont été utilisées dans cette étude : DR5:GFP (Benkova et al., 2003), R2D2 (Liao et al., 2015), pPIN1::PIN1-GFP (PIN1:GFP) (Omelyanchuk et al., 2016), pPIN2::PIN2-GFP (PIN2:GFP) (Li et al., 2015), pPIN3::PIN3-GFP (PIN3:GFP) (Žádníková et al., 2010), pAUX1::AUX1-YFP (AUX1:YFP) (Swarup et al., 2005), pNRT1.1::NRT1.1-GFP (NRT1.1:GFP) (Krouk et al., 2010), SPR1pro:tdTomato:Lti6b fournis par Tatsuaki Goh (Nara, Japon), cycB1:GUS (Himanen et al., 2003).

Conditions de cultures

Cultures en serre

L'amplification des graines d'*Arabidopsis thaliana* a été faite en serre en condition de jours longs (16h de jours à 20°C et 8h de nuit à 19°C). Pour acquérir les différents doubles mutants, et l'introgression dans le fond génétique *pin2-2* ou *aux1* des différentes constructions de marqueurs fluorescents, des croisements ont été réalisés pour générer des lignées homozygotes.

Culture in vitro

Pour la culture in vitro, les graines sont stérilisées dans 500 µL de solution composée de 12,5% de javel, 37,5% d'eau et de 50% d'éthanol à 96% pendant 3 à 5 min sous agitation, puis rincées 3 fois

avec de l'éthanol à 96%. Une fois les graines sèches, elles sont semées sur boite de Pétri carré de 12x12 cm contenant de 40 à 50 mL de milieu MS/2 en conditions stériles (Murashige et Skoog dilué au 1/2 additionné de vitamines de Gamborg (M0404 - Sigma Aldrich), 0,8% agar, 1% saccharose, 0,05% MES, pH ajusté à 5,7). Les plantes sont vernalisées pendant 2 jours à 4°C dans l'obscurité. Les plantes sont ensuite cultivées suivant un cycle de 16h jour pour 8 h de nuit (jours longs) avec une intensité lumineuse de 120 µmol/m2/s et une température de 21°C.

Les différents traitements des milieux

Traitement au NaCl, Sorbitol et PEG

Les plantes ont été traitées avec une supplémentation dans le milieu de 150 mM de sorbitol ou 75 mM de NaCl. Une gamme de PEG-8000 (P-2139 - Sigma Aldrich) (0 g/L, 100 g/L, 250 g/L) a également été réalisée en suivant la méthode adaptée de Verslues et al., (2006).

Traitement de carences nutritives

La composition des différents médiums a été réalisé de cette façon :

- MS/2-P (Murashige and Skoog Basal Salt Micronutrient Solution M0529 Sigma Aldrich + Gamborg′s Vitamin Solution G1019 Sigma Aldrich) additionné de nitrate d'ammonium (NH_4NO_3), nitrate de potassium (KNO_3), sulfate de potassium (K_2SO_4), sulfate de magnésium ($MgSO_4$), chlorure de calcium ($CaCl^2$) pour avoir la même composition de Murashige et Skoog sans aucun phosphate de potassium (KH_2PO_4) , agar 0,8 %, saccharose 1 %, MES 0,05 %, pH ajusté à 5,7 avec de l'hydroxyde de potassium (KOH)
- MS/2-N (Murashige and Skoog Basal Salt Micronutrient Solution M0529 Sigma Aldrich + Gamborg′s Vitamin Solution G1019 Sigma Aldrich) additionné de sulfate de magnésium ($MgSO_4$), de phosphate de potassium (KH_2PO_4), de sulfate de potassium (K_2SO_4), de chlorure de calcium ($CaCl^2$) pour avoir la même composition de Murashige et Skoog sans nitrate d'ammonium (NH_4NO_3) ni nitrate de potassium (KNO_3), agar 0,8%, saccharose 1%, MES 0,05%, pH ajusté à 5,7 avec de la potasse (KOH)
- MS/2-Fe (Murashige and Skoog Basal Salt Macronutrient Solution M0654 Sigma Aldrich + Gamborg′s Vitamin Solution G1019 Sigma Aldrich) additionné d'acide borique (H_3BO_3), de chlorure de cobalt ($CoCl^2$), de sulfate de cuivre ($CuSO_4$), de sulfate de manganèse ($MnSO_4$),

M0404		MS/2
Component		**mg/L**
Ammonium nitrate	NH_4NO_3	825
Boric acid	H_3BO_3	3,1
Calcium chloride anhydrous	$CaCl_2$	166,1
Cobalt chloride • $6H_2O$	$CoCl_2$	0,0125
Cupric sulfate • $5H_2O$	$CuSO_4$	0,0125
EDTA disodium salt	Na2-EDTA	18,63
Ferrous sulfate • $7H_2O$	$FeSO_4$	13,9
Magnesium sulfate	$MgSO_4$	90,35
Manganese sulfate • H_2O	$MnSO_4$	8,45
Molybdic acid (sodium salt) • $2H_2O$	Na_2MoO_4	0,125
Potassium iodide	KI	0,415
Potassium nitrate	KNO_3	950
Potassium phosphate monobasic	KH_2PO_4	85
Potassium sulfate	K_2SO_4	
Zinc sulfate • $7H_2O$	$ZnSO_4$	4,3
Organics (mg/L)		
myo-Inositol		50
Nictotinic acid (free acid)		0,5
Pyridoxine • HCl		0,5
Thiamine • HCl		5

M0404		MS/10
Component		**mg/L**
Ammonium nitrate	NH_4NO_3	165
Boric acid	H_3BO_3	0,62
Calcium chloride anhydrous	$CaCl_2$	33,22
Cobalt chloride • $6H_2O$	$CoCl_2$	0,0025
Cupric sulfate • $5H_2O$	$CuSO_4$	0,0025
EDTA disodium salt	Na2-EDTA	3,726
Ferrous sulfate • $7H_2O$	$FeSO_4$	2,78
Magnesium sulfate	$MgSO_4$	18,07
Manganese sulfate • H_2O	$MnSO_4$	1,69
Molybdic acid (sodium salt) • $2H_2O$	Na_2MoO_4	0,025
Potassium iodide	KI	0,083
Potassium nitrate	KNO_3	190
Potassium phosphate monobasic	KH_2PO_4	17
Potassium sulfate	K_2SO_4	
Zinc sulfate • $7H_2O$	$ZnSO_4$	0,86
Organics (mg/L)		
myo-Inositol		10
Nictotinic acid (free acid)		0,1
Pyridoxine • HCl		0,1
Thiamine • HCl		1

M0529 - Sigma Aldrich		MS/2-P
Component		**mg/L**
Ammonium nitrate	NH_4NO_3	825
Boric acid	H_3BO_3	3,1
Calcium chloride anhydrous	$CaCl_2$	166,1
Cobalt chloride • $6H_2O$	$CoCl_2$	0,0125
Cupric sulfate • $5H_2O$	$CuSO_4$	0,0125
EDTA disodium salt	Na2-EDTA	18,63
Ferrous sulfate • $7H_2O$	$FeSO_4$	13,9
Magnesium sulfate	$MgSO_4$	90,35
Manganese sulfate • H_2O	$MnSO_4$	8,45
Molybdic acid (sodium salt) • $2H_2O$	Na_2MoO_4	0,125
Potassium iodide	KI	0,415
Potassium nitrate	KNO_3	950
Potassium phosphate monobasic	KH_2PO_4	
Potassium sulfate	K_2SO_4	42,5
Zinc sulfate • $7H_2O$	$ZnSO_4$	4,3
Organics (mg/L)		
myo-Inositol		50
Nictotinic acid (free acid)		0,5
Pyridoxine • HCl		0,5
Thiamine • HCl		5

M0529 - Sigma Aldrich		MS/2-N
Component		**mg/L**
Ammonium nitrate	NH_4NO_3	
Boric acid	H_3BO_3	3,1
Calcium chloride anhydrous	$CaCl_2$	166,1
Cobalt chloride • $6H_2O$	$CoCl_2$	0,0125
Cupric sulfate • $5H_2O$	$CuSO_4$	0,0125
EDTA disodium salt	Na2-EDTA	18,63
Ferrous sulfate • $7H_2O$	$FeSO_4$	13,9
Magnesium sulfate	$MgSO_4$	90,35
Manganese sulfate • H_2O	$MnSO_4$	8,45
Molybdic acid (sodium salt) • $2H_2O$	Na_2MoO_4	0,125
Potassium iodide	KI	0,415
Potassium nitrate	KNO_3	
Potassium phosphate monobasic	KH_2PO_4	85
Potassium sulfate	K_2SO_4	475
Zinc sulfate • $7H_2O$	$ZnSO_4$	4,3
Organics (mg/L)		
myo-Inositol		50
Nictotinic acid (free acid)		0,5
Pyridoxine • HCl		0,5
Thiamine • HCl		5

M0654 - Sigma Aldrich		MS/2-Fe
Component		**mg/L**
Ammonium nitrate	NH_4NO_3	825
Boric acid	H_3BO_3	3,1
Calcium chloride anhydrous	$CaCl_2$	166,1
Cobalt chloride • $6H_2O$	$CoCl_2$	0,0125
Cupric sulfate • $5H_2O$	$CuSO_4$	0,0125
EDTA disodium salt	Na2-EDTA	
Ferrous sulfate • $7H_2O$	$FeSO_4$	
Magnesium sulfate	$MgSO_4$	90,35
Manganese sulfate • H_2O	$MnSO_4$	8,45
Molybdic acid (sodium salt) • $2H_2O$	Na_2MoO_4	0,125
Potassium iodide	KI	0,415
Potassium nitrate	KNO_3	950
Potassium phosphate monobasic	KH_2PO_4	85
Potassium sulfate	K_2SO_4	
Zinc sulfate • $7H_2O$	$ZnSO_4$	4,3
Organics (mg/L)		
myo-Inositol		50
Nictotinic acid (free acid)		0,5
Pyridoxine • HCl		0,5
Thiamine • HCl		5

Supplemented

Missing

Figure M.1. Composition des milieux

molybdate de sodium (Na_2MoO_4), iodure de potassium (KI), sulfate de zinc ($ZnSO_4$) pour avoir la même composition de Murashige et Skoog sans aucun sulfate de fer ($FeSO_4$), agar 0,8 %, 1 % saccharose, 0,05 % MES, pH ajusté à 5,7 avec de l'hydroxyde de potassium (KOH)
- MS/10 (Murashige and Skoog Basal Medium M0404 - Sigma Aldrich), agar 0,8 %, saccharose 1 %, MES 0,05 %, pH ajusté à 5,7 avec de l'hydroxyde de potassium (KOH)
Les compositions exactes des milieux sont en Figure M.1.

Traitement avec l'application d'inhibiteurs auxiniques

Les plantes ont été traitées avec l'application exogène dans le milieu de 50 µM de L-Kynurenine (K8625 - Sigma Aldrich), une gamme (0-5-15-25 µM) d'auxinole (SML3231 - Sigma Aldrich), une gamme (0-5-15-25 µM) de TIBA (T5910 - Sigma Aldrich), 10 µM de NPA (PS343 - Sigma Aldrich), 50 µM de 1-NOA (255416 - Sigma Aldrich). Ces inhibiteurs auxiniques ont été testés sur MS/2 et MS/10 sur des plantules de 6 jours, cultivées sur des boîtes verticales, puis transférées à 90° pour une gravistimulation de 48h sur n= 15 plantes. Ces différents inhibiteurs étant dissous dans du DMSO, il sert de contrôle non traité.

Traitement avec l'application d'hormones exogènes

Les plantes ont été traitées avec l'application exogène dans le milieu de 50 µM d'une gamme (0-5-15-25 µM) de zéatin (Z0876 - Sigma Aldrich) et d'une gamme (0-1-2 µM) d'épibrassinolide (E1641- Sigma Aldrich). Ces hormones ont été testées sur MS/2 et MS/10 sur des plantules de 6 jours, cultivées sur des boîtes verticales, puis transférées à 90° pour une gravistimulation de 48h sur n= 15 plantes. Ces différentes hormones étant dissoutes dans du DMSO, il sert de contrôle non traité. L'épibrassinolide a également été testé à 1µM sur tous les milieux (MS/2, MS/2-Fe, MS/2-P, MS/2-N et MS/10).

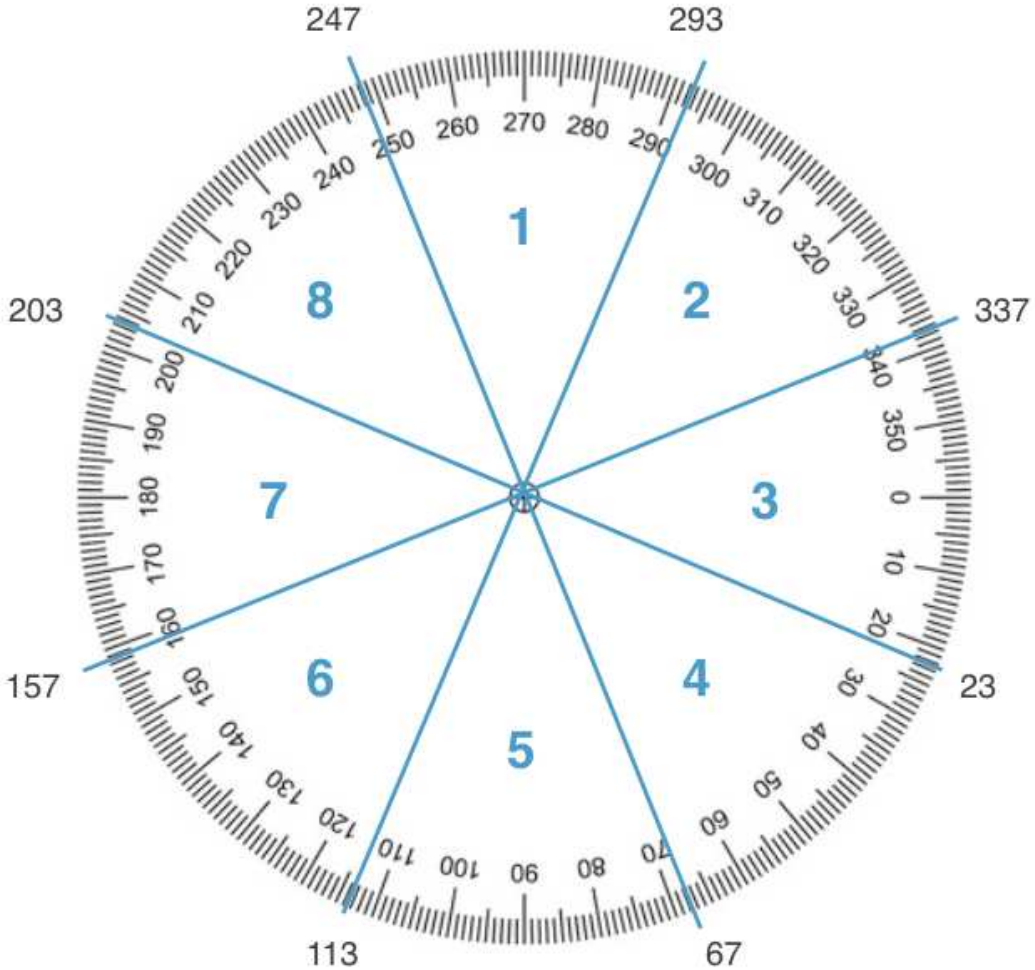


Figure M.2. Diagramme circulaire utilisé pour le phénotypage gravitropique de l'apex racinaire lors de la gravistimulation.

Phénotypage

Quantification de la longueur PR et vitesse de croissance

La longueur de la racine primaire (PR) a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ et présentée sous forme de graphiques avec n = 30 semis. La vitesse de croissance a été calculée en utilisant la croissance des semis pendant 24h.

Quantification des racines latérales

Les plantules de 4 jours ayant poussées en MS/2 sont transférées dans de nouvelles boîtes contenant les conditions de culture à tester (MS/2, MS/2-P, -N, MS/10) et la position et le stade de développement des racines latérales est analysé sur les plantules Col-0 et *pin2-2* 5 jours après transfert. Pour faciliter l'observation des racines latérales non émergées l'utilisation du marqueurs DR5:GFP a été utilisé pour visualiser les primodia et l'observation s'est faite à l'Apotome Zeiss.

Gravistimulation

Les plantules de 6 jours sont transférées dans une nouvelle boîte contenant les conditions de culture à tester puis la boîte est mise en rotation à 90° par rapport au vecteur gravitationnel. Une quantification de la position de l'apex est effectuée que ce soit en cinétique au cours de 9 premières heures correspondant au gravitropisme précoce, ou à 48h pour la réponse tardive du gravitropisme et classés en 8 orientations différentes sur un graphique circulaire (Swarup et al., 2004 ; Petrášek et al., 2006), le détail des catégories se trouve dans la Figure M.2. Adobe Photoshop CS6 a été utilisé pour superposer les images de gravistimulation.

Gravisplitroot

Les plantules de 7 jours ont la racine primaire coupée transversalement puis transférées sur une nouvelle boîte de MS/2 pour les laissées croître. À 14 jours les plantules ayant deux sections racinaires séparées sont transférées sur des boîtes contenant deux milieux distincts. Les deux sections racinaires distinctes sont gravistimulées comme schématisé dans la Figure M.3 et les prises

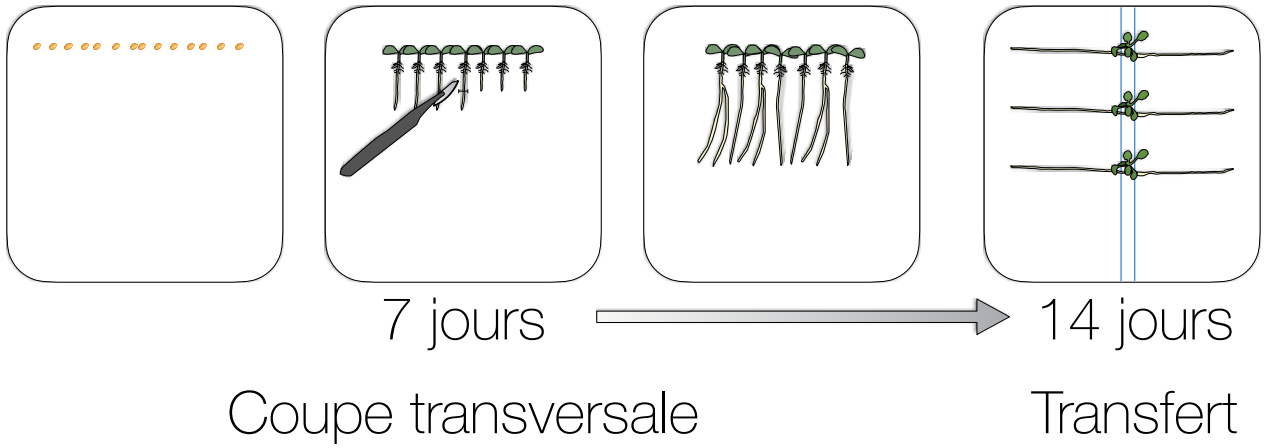


Figure M.3. Schéma de la réalisation de gravisplitroot

de vue sont réalisées 48h après cette gravistimulation des deux sections racinaires sur les deux milieux distincts.

Imagerie

Coloration à l'iode pour visualiser les grains d'amidon

Les plantules de 6 jours sont montées sur une lame avec de l'eau et la lamelle est placée au-dessus. La solution de Lugol est placée par capillarité entre lame et lamelle permettant la coloration des plantules en 30s. L'échantillon est ensuite nettoyé, toujours par capillarité, avec une solution de clarification (hydrate de chloral : glycérol : eau dans un rapport 8:3:1). Les apex racinaires sont ensuite observés au microscope optique Olympus BX61. Les grains d'amidon dans les amyloplastes apparaissent bleu foncé sur un fond brun clair.

Gène rapporteur GUS

L'activité GUS est révélée en immergeant les plantules exprimant la construction CycB1:GUS dans une solution de coloration (tampon phosphate 0,1 M pH 7, Triton 0,5%, X-gluc 2 mM). Les échantillons sont ensuite placés dans l'incubateur à l'obscurité à 37°C pour une durée de 2 heures. Après coloration, les échantillons sont immergés dans de l'éthanol 70% jusqu'à décoloration totale des tissus. Les apex racinaires sont ensuite observés au macroscope Axiozoom Zeiss.

Observation des phénotypes

Pour les expérimentations réalisées à la plateforme de Phénotypage du développement Racinaire les plantules ont été cultivées avec 1% d'agar, sous photopériodes jours longs avec éclairage LED (entre 40 et 350 µmol m−2 s−1) et une température de 23°C et la prise de vue c'est faite avec le robot HIRROS (HIgh Resolution ROot Scanner) (Fernandez et al., 2022). Pour les expérimentations de gravistimulation les images ont été acquises avec un scanner Epson Perfection V850 Pro à une résolution de 600 à 1000 ppp.

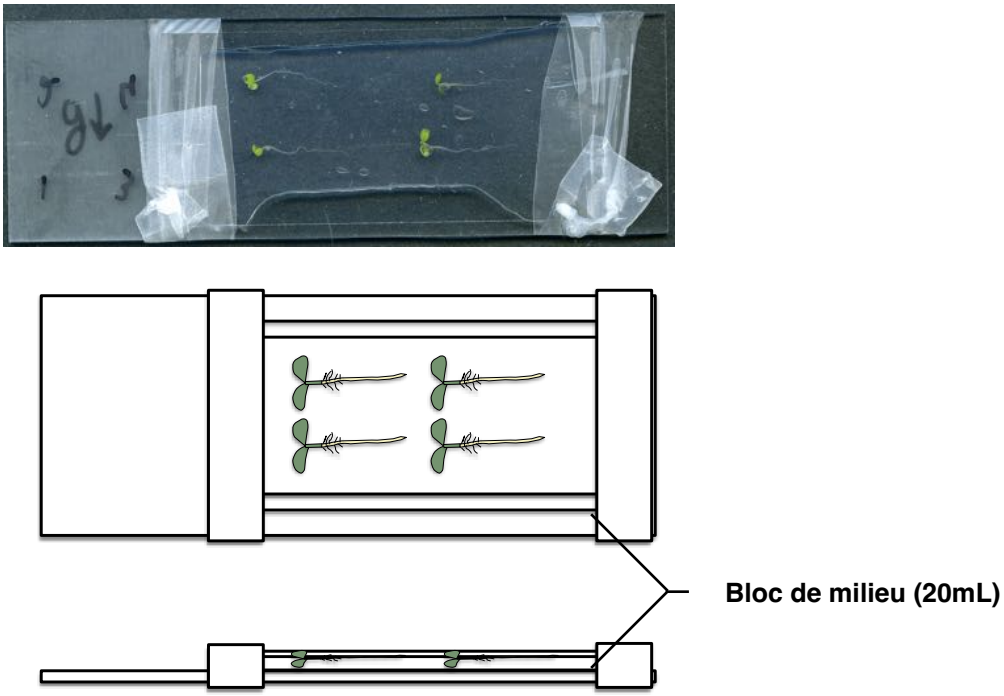


Figure M.4. Schéma du montage entre lame et lamelle avec un bloc de milieu

Microscopie confocal

Les lignées transgéniques suivantes ont été observées : DR5:GFP, R2D2, PIN3:GFP, AUX1:YFP, PIN1:GFP, ainsi que leur croisement avec *pin2-2* ou *aux1* pour R2D2. Pour la visualisation des ces différentes lignées et de l'iodure de propidium (PI), le Leica SP8 (Leica microsystems, Wetzlar, Allemagne) couplé au logiciel LASX a été utilisé. Chaque image a été prise avec les mêmes réglages de laser (i.e. 25% de laser argon), ce qui permet une meilleure comparaison des images lors de l'analyse, et ce sont les objectifs à eau HC PL APO CS2 40x/1.10 ou à huile HC PL APO CS2 63x/1.40 qui ont été utilisés. Les signaux de fluorescence pour la GFP (excitation 488 nm, émission 500 à 540 nm), la YFP (excitation 514 nm, 520 à 540 nm), le PI (propidium iodide, excitation 561 nm, émission 580 à 630 nm) ont été détectés. Les apex racinaires ont été observés respectivement 30 min, 1h ou 1h30 ou 4h après gravistimulation pour PIN3:GFP, PIN1:GFP, AUX1:YFP, R2D2 et DR5:GFP. Pour conserver l'orientation de la racine et pouvoir réaliser des cinétiques la gravistimulation a été réalisée directement entre lame et lamelle sur de fins bloc de milieux (Figure M.4). Un minimum de 10 à 16 répétitions biologiques indépendantes a été réalisé .

Quantification du signal de fluorescence

Les analyses d'images et la quantification ont été effectuées à l'aide de Fiji-ImageJ. Pour la quantification d'images (R2D2, PIN3:GFP, AUX1:YFP, PIN1:GFP), des projections d'intensité maximale d'images confocales ont été utilisées. La quantification de l'intensité de la GFP pour DR5::GFP a été réalisée avec le profil de tracé. L'intensité du signal a été normalisée avec la zone lorsqu'elle était différente et représentée comme l'intensité moyenne du signal en unités arbitraires (a.u). Pour R2D2, le signal nucléaire a été quantifié dans les 9 premières cellules de la couche épidermique comme décrit précédemment (Liao et al., 2015). Pour PIN3:GFP, la quantification a été effectuée comme décrit précédemment (Grones et al., 2018). Pour AUX1:YFP, la quantification a été faite sur une ligne passant par la face inférieure et supérieure de la racine en réponse à 1h30 de gravitropisme. Pour PIN1:GFP dans un premier temps la quantification s'est faite en carré dans la stèle après 1h de gravitropisme puis dans l'épiderme total ou directement au niveau de la membrane plasmique.

Observation de NRT1.1:GFP

L'Apotome Zeiss a été utilisé pour réaliser les observations de NRT1.1:GFP. Chaque image a été prise avec les mêmes réglages, ce qui permet une meilleure comparaison des images lors de l'analyse, et c'est l'objectif x20 à eau qui a été utilisé. Des plantules de 6 jours ont été transférées sur une lame avec un bloc de milieu et imagées 1h après gravistimulation en réponse à différents milieux (MS/2, MS/10, MS/2-P, MS/2-N, MS/2-Fe). Un minimum de 15 à 20 répétitions biologiques indépendantes a été réalisé.

Analyses statistiques

Le nombre de répétitions indépendantes d'expériences, ainsi que la taille exacte des échantillons, est décrit dans les légendes des figures. L'analyse statistique (test t de Student) a été effectuée en utilisant le logiciel R.

Annexes
Figures



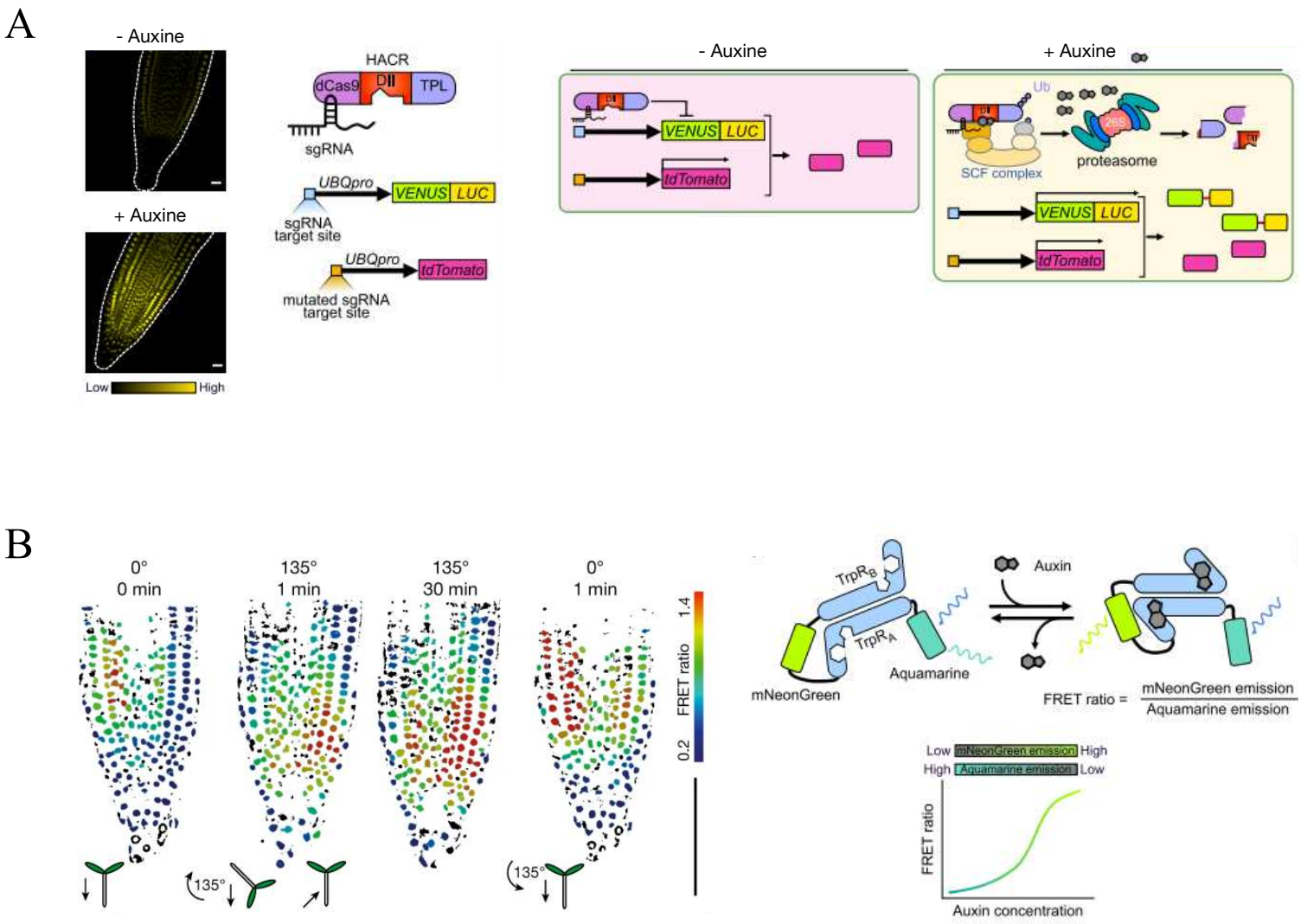


Figure Supplémentaire 1. Les nouveaux rapporteurs pour étudier l'auxine

(**A**) Photographie représentative du rapporteur HACR à l'apex racinaire d'*Arabidopsis*. Les plantules ont été traités sans (en haut) ou avec de l'auxine pendant 24 h (en bas). En présence d'auxine, le complexe répresseur HACR est dégradé dans toutes les cellules racinaires, la protéine VENUS s'accumule. En absence d'auxine le complexe répresseur HACR non ratiométrique ne représente pas la distribution du niveau d'auxine. Barres d'échelle = 20 mm. HACR, grâce à sa partie dCas9, s'associe à un sgRNA ciblant le complexe vers le promoteur UBQ, qui pilote l'expression des gènes rapporteurs. La variante ratiométrique sert de facteur de normalisation et comprend un deuxième rapporteur (tdTomato) ainsi q'un site cible sgRNA muté. En l'absence d'auxine, HACR ratiométrique réprime le rapporteur VENUS mais le rapporteur tdTomato est exprimé, le signal fluorescent est rouge dans ces cellules. En présence d'auxine VENUS est exprimé, et les niveaux d'auxine sont calculés en normalisant le signal du rapporteur VENUS à celui de tdTomato. Adapté de Jedlickova et al., 2022

(**B**) Photographie représentative de la réponse d'AuxSen au gravitropisme racinaire à l'apex racinaire d'*Arabidopsis*. Le rapport de FRET nucléaire est observé avant (0min 0°) et après retournement (1min 135°), et avant (30min 135°) et après retour (1min 0°) à la position presque verticale. Le biocapteur AuxSen est un capteur d'auxine basé sur le FRET, composé de protéines dimériques qui reconnaissent l'auxine avec une sélectivité élevée. Le fluorophore donneur (aigue-marine) à l'état excité transfère de l'énergie à un fluorophore accepteur (mNeonGreen). En présence d'auxine, le capteur subit un changement conformationnel, rapprochant les deux protéines fluorescentes, générant un signal FRET. Le rapport FRET augmente avec la diminution de la distance intermoléculaire lors de la liaison de l'auxine. Adapté de Jedlickova et al., 2022 et Herud-Sikimić et al., 2021

Annexes : Publication, Communications & Formations

LISTE DE PUBLICATION

Thomas M, Soriano A, O'Connor C, Crabos A, Nacry P, Thompson M, Hrabak E, Divol F, Péret B (2022) *pin2* mutant agravitropic root phenotype is conditional and nutrient-sensitive. Plant Science

COMMUNICATIONS ORALES

The agravitropic phenotype of *pin2* mutants is conditional and demonstrates an effect of nutrients on auxin transport. M. Thomas, F. Divol, B. Péret.
ICAR International Conference on *Arabidopsis* Research, Belfast , Irlande, 2022 (10 min talk)

The agravitropic root phenotype of *pin2* mutants is conditional and demonstrates an effect of nutrients on auxin transport. M. Thomas, F. Divol, B. Péret.
13th International Conference of the French Society of Plant Biology, Montpellier , France, 2022 (15 min talk)

FORMATIONS

Catégorie : Accompagnement du Doctorat

- MOOC Rédiger et publier un article scientifique (07 septembre 2021 - 27 juin 2022) EN LIGNE - EN DISTANCIEL
  20 heures

Catégorie : Connaissance de l'Entreprise

- Etude de marché et business model (05 avril 2022 - 5 avril 2022)
  6 heures

Catégorie : Communication

- Cérémonie solennelle 2020 de rentrée des doctorants du Collège Doctoral de l'Université de Montpellier (16 janvier 2020 - 16 janvier 2020) Université de Montpellier Site Nord Triolet Amphi Dumontet
  3 heures

- Fête de la science (10 octobre 2019)
  7 heures enregistrées par : GAIA - Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau.

- Journée de rentrée des doctorants de l'ED Gaia (16 janvier 2020) Amphi DUMONTET, Bâtiment 7, Université de Montpellier
  2 heures enregistrées par : GAIA - Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau.

Catégorie : Développement personnel

- Bilan personnalisé Mieux se connaitre pour mieux s'affirmer Université de Montpellier
  4 heures

Total du nombre d'heures pour la catégorie Développement personnel : *4 h*

Catégorie : Enseignement à distance

- MOOC Introduction à la statistique avec R (14 février 2022 - 28 mars 2022) ParisSaclay
  25 heures enregistrées par : GAIA - Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau.

Total du nombre d'heures pour la catégorie Enseignement à distance : *25 h*

Catégorie : Gestion de Projet

- Le financement de la Recherche par appels à projets (16 mai 2022 - 30 mai 2022)
  12 heures

- Management de projet : enjeux, méthodes et outils (14 avril 2022)
  6 heures

La formation participe à l'objectif suivant : préparer le devenir professionnel des doctorants dans le secteur public comme dans le secteur privé

Catégorie : Management d'équipes

- Le management d'une équipe en entreprise (19 mai 2022 - 19 mai 2022)
  7 heures

Catégorie : Méthodologie de la recherche

- Dépôt électronique des thèses - Session 2 (24 mars 2022 - 24 mars 2022) Université Montpellier 3 - Site Saint-Charles 1, salle des Colloques 1 - 71 rue Henri Serres (station de tramway Albert 1er - Ligne 1 ou 4)
  3 heures

Catégorie : Recherche responsable

- MOOC Intégrité scientifique dans les métiers de la recherche (01 septembre 2020 - 16 aout 2021) En ligne
  15 heures

Total participation : 110 heures / 12 modules

Bibliographie

Abas L, Benjamins R, Malenica N, Paciorek T, Wi J, Anzola JCM, Sieberer T, Luschnig C (2006) Intracellular trafficking and proteolysis of the Arabidopsis auxin-e fflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. Nat Cell Biol 8:

Abas L, Kolb M, Stadlmann J, Janacek DP, Lukic K, Schwechheimer C, Sazanov LA, Mach L, Friml J, Hammes UZ (2020) Naphthylphthalamic acid associates with and inhibits PIN auxin transporters. Proc Natl Acad Sci U S A. doi: 10.1073/pnas.2020857118

Aloni R, Langhans M, Aloni E, Ullrich CI (2004) Role of cytokinin in the regulation of root gravitropism. Planta **220**: 177–182

Ambrose C, Ruan Y, Gardiner J, Tamblyn LM, Catching A, Kirik V, Marc J, Overall R, Wasteneys GO (2013) CLASP Interacts with Sorting Nexin 1 to Link Microtubules and Auxin Transport via PIN2 Recycling in Arabidopsis thaliana. Dev Cell **24**: 649–659

Ashraf MA, Umetsu K, Ponomarenko O, Saito M, Aslam M, Antipova O, Dolgova N, Kiani CD, Nehzati S, Tanoi K, et al (2020) PIN FORMED 2 Modulates the Transport of Arsenite in Arabidopsis thaliana. Plant Commun **1**: 100009

Atkinson JA, Rasmussen A, Traini R, Voß U, Sturrock C, Mooney SJ, Wells DM, Bennett MJ (2014) Branching out in roots: Uncovering form, function, and regulation. Plant Physiol **166**: 538–550

Bai H, Wolverton C (2011) Gravitropism in lateral roots of Arabidopsis pgm-1 mutants is indistinguishable from that of wild-type. Plant Signal Behav **6**: 1423–1424

Bainbridge K, Guyomarc'h S, Bayer E, Swarup R, Bennett M, Mandel T, Kuhlemeier C (2008) Auxin influx carriers stabilize phyllotactic patterning. Genes Dev **22**: 810–823

Baldwin KL, Strohm AK, Masson PH (2013) Gravity sensing and signal transduction in vascular plant primary roots. Am J Bot **100**: 126–142

Band LR, Wells DM, Larrieu A, Sun J, Middleton AM, French AP, Brunoud G, Sato EM, Wilson MH, Peŕet B, et al (2012) Root gravitropism is regulated by a transient lateral auxin gradient controlled by a tipping-point mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A **109**: 4668–4673

de Bang L, Paez-Garcia A, Cannon AE, Chin S, Kolape J, Liao F, Sparks JA, Jiang Q, Blancaflor EB (2020) Brassinosteroids Inhibit Autotropic Root Straightening by Modifying Filamentous-Actin Organization and Dynamics. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2020.00005

Barbez E, Kleine-Vehn J (2013) Divide Et Impera-cellular auxin compartmentalization. Curr Opin Plant Biol **16**: 78–84

Barbez E, Kubeš M, Rolčík J, Béziat C, Pěnčík A, Wang B, Rosquete MR, Zhu J, Dobrev PI, Lee Y, et al (2012) A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants. Nature **485**: 119–122

Barbosa ICR, Hammes UZ, Schwechheimer C (2018) Activation and Polarity Control of PIN-FORMED Auxin Transporters by Phosphorylation. Trends Plant Sci **23**: 523–538

Barbosa ICR, Schwechheimer C (2014) Dynamic control of auxin transport-dependent growth by AGCVIII protein kinases. Curr Opin Plant Biol **22**: 108

Barbosa ICR, Shikata H, Zourelidou M, Heilmann M, Heilmann I, Schwechheimer C (2016) Phospholipid composition and a polybasic motif determine D6 PROTEIN KINASE polar association with the plasma membrane and tropic responses. Development (Cambridge) **143**: 4687–4700

Barlow PW, Zieschang HE (1994) Root movements: Towards an understanding through attempts to model the processes involved. Kluwer Academic Publishers

Baum SF, Rost TL (1996) Om0t M Root apical organization in Arabidopsis thaliana 1. Root cap and protoderm.

Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jürgens G, Friml J (2003) Local, efflux-dependent a module for plant organ formation. Cell **115**: 591–602

Bennett MJ, Marchant A, Green HG, May ST, Ward SP, Millner PA, Walker AR, Schulz B, Feldmann KA (1996) Arabidopsis AUXl Gene: A Permease-Like Regulator of Root Gravitropism. Science (1979) **273**: 948–950

Bennett SRM, Alvarez J, Bossinger G, Smyth DR (1995) Morphogenesis in pinoid mutants of Arabidopsis thaliana. The Plant Journal **8**: 505–520

Bennett T, Brockington SF, Rothfels C, Graham SW, Stevenson D, Kutchan T, Rolf M, Thomas P, Wong GKS, Leyser O, et al (2014) Paralogous radiations of PIN proteins with multiple origins of noncanonical PIN structure. Mol Biol Evol **31**: 2042–2060

Bennett T, Scheres B (2010) Root development-two meristems for the price of one? Curr Top Dev Biol **91**: 67–102

Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Ok RL, Mravec J, Titapiwatanakun B, Sauer M, Makam SN, Cheng Y, Bouchard R, Adamec J, et al (2007) Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in Arabidopsis. Plant Cell **19**: 131–147

Blancaflor EB, Masson PH (2003) Plant Gravitropism. Unraveling the Ups and Downs of a Complex Process. Plant Physiol **133**: 1677–1690

Blancaflor EB, Wang YS, Motes CM (2006) Organization and Function of the Actin Cytoskeleton in Developing Root Cells. Int Rev Cytol **252**: 219–264

Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K, Scheres B (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. Nature **433**: 39–44

Boer DR, Freire-Rios A, van den Berg WAM, Saaki T, Manfield IW, Kepinski S, López-Vidrieo I, Franco-Zorrilla JM, de Vries SC, Solano R, et al (2014) Structural basis for DNA binding specificity by the auxin-dependent ARF transcription factors. Cell **156**: 577–589

Boutté Y, Jonsson K, McFarlane HE, Johnson E, Gendre D, Swarup R, Friml J, Samuels L, Robert S, Bhalerao RP (2013) ECHIDNA-mediated post-Golgi trafficking of auxin carriers for differential cell elongation. Proc Natl Acad Sci U S A **110**: 16259–16264

Brauner K, Hormiller I, Nagele T, Heyer A (2014) Exaggerated root respiration accounts for growth retardation in a starchless mutant of Arabidopsis thaliana . The plant journal 79: 82-91

Brumos J, Robles LM, Yun J, Vu TC, Jackson S, Alonso JM, Stepanova AN (2018) Local Auxin Biosynthesis Is a Key Regulator of Plant Development. Dev Cell **47**: 306-318.e5

Brunoud G, Wells DM, Oliva M, Larrieu A, Mirabet V, Burrow AH, Beeckman T, Kepinski S, Traas J, Bennett MJ, et al (2012) A novel sensor to map auxin response and distribution at high spatio-temporal resolution. Nature **482**: 103–106

Buer CS, Sukumar P, Muday GK (2006) Ethylene modulates flavonoid accumulation and gravitropic responses in roots of Arabidopsis. Plant Physiol **140**: 1384–1396

Burney JA, Davis SJ, Lobell DB (2010) Greenhouse gas mitigation by agricultural intensification. Proc Natl Acad Sci U S A **107**: 12052–12057

Caroline Scott A, Strö mgren Allen N (1999) Changes in Cytosolic pH within Arabidopsis Root Columella Cells Play a Key Role in the Early Signaling Pathway for Root Gravitropism 1.

Chai S, Li E, Zhang Y, Li S (2020) NRT1.1-Mediated Nitrate Suppression of Root Coiling Relies on PIN2- and AUX1-Mediated Auxin Transport. Front Plant Sci **11**: 1–12

Chandler JW (2016) Auxin response factors. Plant Cell Environ **39**: 1014–1028

Chapman EJ, Estelle M (2009) Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. Annu Rev Genet **43**: 265–285

Chen RJ, Hilson P, Masson PH, Sedbrook J, Rosen E, Caspar T (1998) The Arabidopsis thaliana AGRAVITROPIC 1 gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. Proc Natl Acad Sci U S A **95**: 15112–15117

Chen WW, Yang JL, Qin C, Jin CW, Mo JH, Ye T, Zheng SJ (2010) Nitric oxide acts downstream of auxin to trigger root ferric-chelate reductase activity in response to iron deficiency in arabidopsis. Plant Physiol **154**: 810–819

Cheng Y, Dai X, Zhao Y (2006) Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in Arabidopsis. Genes Dev **20**: 1790–1799
Chernyad'ev II (2009) The protective action of cytokinins on the photosynthetic machinery and productivity of plants under stress (review). Appl Biochem Microbiol **45**: 351–362
Cook SD (2019) An Historical Review of Phenylacetic Acid. Plant Cell Physiol **60**: 243–254
Correa-Aragunde N, Foresi N, Delledonne M, Lamattina L (2013) Auxin induces redox regulation of ascorbate peroxidase 1 activity by S-nitrosylation/denitrosylation balance resulting in changes of root growth pattern in Arabidopsis. J Exp Bot **64**: 3339–3349
Coudert Y, Périn C, Courtois B, Khong NG, Gantet P (2010) Genetic control of root development in rice, the model cereal. Trends Plant Sci **15**: 219–226
Cucinotta M, Cavalleri A, Chandler JW, Colombo L (2021) Auxin and flower development: A blossoming field. Cold Spring Harb Perspect Biol **13**: 1–20
Cui Y, Li X, Chen Q, He X, Yang Q, Zhang A, Yu X, Chen H, Liu N, Xie Q, et al (2010) BLOS1, a putative BLOC-1 subunit, interacts with SNX1 and modulates root growth in Arabidopsis. J Cell Sci **123**: 3727–3733
Dai A (2013) Increasing drought under global warming in observations and models. Nat Clim Chang **3**: 52–58
Darwin C, Darwin F. (1880) The Power of Movement in Plants. John Murray, London
Depuydt S, Hardtke CS (2011) Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. Current Biology. doi: 10.1016/j.cub.2011.03.013
Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. Nature **435**: 441–445
Dharmasiri N, Dharmasiri S, Weijers D, Karunarathna N, Jurgens G, Estelle M (2007) AXL and AXR1 have redundant functions in RUB conjugation and growth and development in Arabidopsis. Plant Journal **52**: 114–123
Dharmasiri S, Swarup R, Mockaitis K, Dharmasiri N, Singh SK, Kowalchyk M, Marchant A, Mills S, Sandberg G, Bennett MJ, et al (2006) AXR4 is required for localization of the auxin influx facilitator AUX1. Science (1979) **312**: 1218–1220
DiDonato RJ, Arbuckle E, Buker S, Sheets J, Tobar J, Totong R, Grisafi P, Fink GR, Celenza JL (2004) Arabidopsis ALF4 encodes a nuclear-localized protein required for lateral root formation. Plant Journal **37**: 340–353
Ditengou FA, Teale WD, Kochersperger P, Flittner KA, Kneuper I, van der Graaff E, Nziengui H, Pinosa F, Li X, Nitschke R, et al (2008) Mechanical induction of lateral root initiation in Arabidopsis thaliana. Proc Natl Acad Sci U S A **105**: 18818–18823
Dixon SJ, Stockwell BR (2014) The role of iron and reactive oxygen species in cell death. Nat Chem Biol **10**: 9–17
Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B (1993) Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. Development **119**: 71–84
Dong QK, Zhang ZW, Liu YT, Tao LZ, Liu HL (2019) FERONIA regulates auxin-mediated lateral root development and primary root gravitropism. FEBS Lett **593**: 97–106
Doudna JA, Charpentier E (2014) The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science (1979). doi: 10.1126/science.1258096
Du Y, Scheres B (2017) Lateral root formation and the multiple roles of auxin. J Exp Bot **69**: 155–167
Dubrovsky JG, Soukup A, Napsucialy-Mendivil S, Jeknić Z, Ivanchenko MG (2009) The lateral root initiation index: An integrative measure of primordium formation. Ann Bot **103**: 807–817
Fàbregas N, Formosa-Jordan P, Confraria A, Siligato R, Alonso JM, Swarup R, Bennett MJ, Mähönen AP, Caño-Delgado AI, Ibañes M (2015) Auxin Influx Carriers Control Vascular Patterning and Xylem Differentiation in Arabidopsis thaliana. PLoS Genet. doi: 10.1371/journal.pgen.1005183
Fasano JM, Swanson SJ, Blancaflor EB, Dowd PE, Kao T-H, Gilroy S (2001) Changes in Root Cap pH Are Required for the Gravity Response of the Arabidopsis Root.

Fernandez A, Drozdzecki A, Hoogewijs K, Vassileva V, Madder A, Beeckman T, Hilson P (2015) The GLV6/RGF8/CLEL2 peptide regulates early pericycle divisions during lateral root initiation. J Exp Bot **66**: 5245–5256

Fernandez R, Crabos A, Maillard M, Nacry P, Pradal C (2022) High-throughput and automatic structural and developmental root phenotyping on Arabidopsis seedlings. Plant Methods **18**: 127

Friml J, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwarz H, Hamann T, Offringa R, Jü rgens G (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis.

Friml J, Wisniewska J, Benkova E, Mendgen K, Palme K (2002) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in ArabidopsisFriml, Jiří; Wiśniewska, Justyna; Benková, Eva; Mendgen, Kur Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. Letters to Nature **415**: 1–4

Friml J, Yang X, Michniewicz M, Weijers D, Quint A, Tietz O, Benjamins R, F Ouwerkerk PB, Ljung K, Sandberg G, et al (2004) A PINOID-Dependent Binary Switch in Apical-Basal PIN Polar Targeting Directs Auxin Efflux.

Fukaki H, Nakao Y, Okushima Y, Theologis A, Tasaka M (2005) Tissue-specific expression of stabilized SOLITARY-ROOT/IAA14 alters lateral root development in Arabidopsis. Plant Journal **44**: 382–395

Fukaki H, Tameda S, Masuda H, Tasaka M (2002) Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the solitary-root/IAA14 gene of Arabidopsis. Plant Journal **29**: 153–168

Furutani M, Hirano Y, Nishimura T, Nakamura M, Taniguchi M, Suzuki K, Oshida R, Kondo C, Sun S, Kato K, et al (2020) Polar recruitment of RLD by LAZY1-like protein during gravity signaling in root branch angle control. Nat Commun. doi: 10.1038/s41467-019-13729-7

Gallardo C, Hufnagel B, Casset C, Alcon C, Garcia F, Divol F, Marquès L, Doumas P, Péret B (2019) Anatomical and hormonal description of rootlet primordium development along white lupin cluster root. Physiol Plant **165**: 4–16

Galvan-Ampudia CS, Julkowska MM, Darwish E, Gandullo J, Korver RA, Brunoud G, Haring MA, Munnik T, Vernoux T, Testerink C (2013) Halotropism is a response of plant roots to avoid a saline environment. Current Biology **23**: 2044–2050

Galweiler L, Guan C, Muller A, Wisman E, Mendgen K, Yephremov A, Palme K (1998) Regulation of Polar Auxin Transport by AtPlNl in Arabidopsis Vascular Tissue.

Ganguly A, Sasayama D, Cho HT (2012) Regulation of the polarity of protein trafficking by phosphorylation. Mol Cells **33**: 423–430

Ge L, Chen R (2016) Negative gravitropism in plant roots. Nat Plants. doi: 10.1038/nplants.2016.155

Ge L, Chen R (2019) Negative gravitropic response of roots directs auxin flow to control root gravitropism. Plant Cell Environ **42**: 2372–2383

Geldner N, Anders N, Wolters H, Keicher J, Kornberger W, Muller P, Delbarre A, Ueda T, Nakano A, Jü Rgens G (2003) The Arabidopsis GNOM ARF-GEF Mediates Endosomal Recycling, Auxin Transport, and Auxin-Dependent Plant Growth.

Geldner N, Friml J, Stierhof Y-D, Jürgens G, Palme K (2001) Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. Nature **413**: 425–428

Gilbert GA, Knight JD, Vance CP, Allan DL (2000) Proteoid root development of phosphorus deficient lupin is mimicked by auxin and phosphonate. Ann Bot. Academic Press, pp 921–928

Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, Stern-Ginossar N, Brandman O, Whitehead EH, Doudna JA, et al (2013) XCRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. Cell **154**: 442

Gilroy S, Masson PH (2008) Plant Tropisms. Plant Tropisms 1–207

Giri J, Bhosale R, Huang G, Pandey BK, Parker H, Zappala S, Yang J, Dievart A, Bureau C, Ljung K, et al (2018) Rice auxin influx carrier OsAUX1 facilitates root hair elongation in response to low external phosphate. Nat Commun **9**: 1–7

Glanc M, Fendrych M, Friml J (2019) PIN2 polarity establishment in Arabidopsis in the absence of an intact cytoskeleton. Biomolecules. doi: 10.3390/biom9060222

Goh T, Kasahara H, Mimura T, Kamiya Y, Fukaki H (2012) Multiple AUX/IAA-ARF modules regulate lateral root formation: The role of Arabidopsis SHY2/IAA3-mediated auxin signalling. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **367**: 1461–1468

Gonin M, Bergougnoux V, Nguyen TD, Gantet P, Champion A (2019) What makes adventitious roots? Plants. doi: 10.3390/plants8070240

Goyal A, Szarzynska B, Fankhauser C (2013) Phototropism: At the crossroads of light-signaling pathways. Trends Plant Sci **18**: 393–401

Gray WM, Carlos Del Pozo J, Walker L, Hobbie L, Risseeuw E, Banks T, Crosby WL, Yang M, Ma H, Estelle M (1999) Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in Arabidopsis thaliana.

Gray WM, Hellmann H, Dharmasiri S, Estelle M (2002) Role of the Arabidopsis RING-H2 protein RBX1 in RUB modification and SCF function. Plant Cell **14**: 2137–2144

Grebe M, Friml J, Swarup R, Ljung K, Ran Sandberg G, Terlou M, Palme K, Bennett MJ, Scheres B (2002) Cell Polarity Signaling in Arabidopsis Involves a BFA-Sensitive Auxin Influx Pathway AUX1 as one component of a novel BFA-sensitive auxin transport pathway polarizing cells toward a hor-mone maximum.

Grones P, Abas M, Hajný J, Jones A, Waidmann S, Kleine-Vehn J, Friml J (2018) PID/WAG-mediated phosphorylation of the Arabidopsis PIN3 auxin transporter mediates polarity switches during gravitropism. Sci Rep **8**: 1–11

Gruber BD, Giehl RFH, Friedel S, von Wirén N (2013) Plasticity of the Arabidopsis root system under nutrient deficiencies. Plant Physiol **163**: 161–179

Guilfoyle TJ, Hagen G (2007) Auxin response factors. Curr Opin Plant Biol **10**: 453–460

Hammes UZ, Murphy AS, Schwechheimer C (2022) Auxin Transporters—A Biochemical View. Cold Spring Harb Perspect Biol. doi: 10.1101/cshperspect.a039875

Harrison BR, Masson PH (2008) ARL2, ARG1 and PIN3 define a gravity signal transduction pathway in root statocytes. Plant Journal **53**: 380–392

Haughn GW, Somerville C (1986) Sulfonylurea-resistant mutants of Arabidopsis thaliana. MGG Molecular & General Genetics **204**: 430–434

Hayashi K-I, Neve J, Hirose M, Kuboki A, Shimada Y, Kepinski S, Nozaki H (2012) Rational design of an auxin antagonist of the SCF TIR1 auxin receptor complex. ACS Chem Biol **7**: 590–598

He W, Brumos J, Li H, Ji Y, Ke M, Gong X, Zeng Q, Li W, Zhang X, An F, et al (2011) A small-molecule screen identifies L-Kynurenine as a competitive inhibitor of TAA1/TAR activity in Ethylene-Directed Auxin Biosynthesis and root growth in Arabidopsis. Plant Cell **23**: 3944–3960

Herder G den, van Isterdael G, Beeckman T, de Smet I (2010) The roots of a new green revolution. Trends Plant Sci **15**: 600–607

Herud-Sikimić O, Stiel AC, Kolb M, Shanmugaratnam S, Berendzen KW, Feldhaus C, Höcker B, Jürgens G (2021) A biosensor for the direct visualization of auxin. Nature **592**: 768–772

Himanen K, Boucheron E, Vanneste S, de Almeida Engler J, Inzé D, Beeckman T (2002) Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. Plant Cell **14**: 2339–2351

Hoagland DR, Arnon DI (1938) Preparing the nutrient solution. The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil **347**: 29–31

Hobbie L, Estelle M (1995) The axr4 auxin-resistant mutants of Arabidopsis thaliana define a gene important for root gravitropism and lateral root initiation. The Plant Journal **7**: 211–220

Hobbie LJ (2006) Auxin and cell polarity: the emergence of AXR4. Trends Plant Sci **11**: 517–518

Hou G, Kramer VL, Wang YS, Chen R, Perbal G, Gilroy S, Blancaflor EB (2004) The promotion of gravitropism in Arabidopsis roots upon actin disruption is coupled with the extended alkalinization of the columella cytoplasm and a persistent lateral auxin gradient. Plant Journal **39**: 113–125

Hufnagel B, Marques A, Soriano A, Marquès L, Divol F, Doumas P, Sallet E, Mancinotti D, Carrere S, Marande W, et al (2020) High-quality genome sequence of white lupin provides insight into soil exploration and seed quality. Nat Commun. doi: 10.1038/s41467-019-14197-9

Inahashi H, Shelley IJ, Yamauchi T, Nishiuchi S, Takahashi-Nosaka M, Matsunami M, Ogawa A, Noda Y, Inukai Y (2018) OsPIN2, which encodes a member of the auxin efflux carrier proteins, is involved in root elongation growth and lateral root formation patterns via the regulation of auxin distribution in rice. Physiol Plant **164**: 216–225

Jaffe M, Takahashi H, Biro R (1985) A Pea Mutant for the Study of Hydrotropism in Roots. Science (1979) **230**: 445–447

Jedličková V, Ebrahimi Naghani S, Robert HS (2022) On the trail of auxin: Reporters and sensors. Plant Cell **34**: 3200–3213

Jia Z, Giehl RFH, von Wirén N (2022) Nutrient–hormone relations: Driving root plasticity in plants. Mol Plant **15**: 86–103

Jing Y, Zheng X, Zhang D, Shen N, Wang Y, Yang L, Fu A, Shi J, Zhao F, Lan W, et al (2019) Danger-associated peptides interact with PIN-dependent local auxin distribution to inhibit root growth in arabidopsis. Plant Cell **31**: 1767–1787

Jonsson K, Boutté Y, Singh RK, Gendre D, Bhalerao RP (2017) Ethylene regulates differential growth via BIG ARF-GEF-dependent post-golgi secretory trafficking in arabidopsis. Plant Cell **29**: 1039–1052

Joop E. M. Vermeer, Daniel von Wangenheim, MMarie Barberon, Yuree Lee, Ernst H. K. Stelzer, Alexis Maizel, Niko Geldne (2014) A Spatial Accommodation byNeighboring Cells Is Required for Organ Initiation in Arabidopsis. Science (1979) **343**: 174–178

Kasahara H (2016) Current aspects of auxin biosynthesis in plants. Biosci Biotechnol Biochem **80**: 34–42

Kasprzewska A, Carter R, Swarup R, Bennett M, Monk N, Hobbs JK, Fleming A (2015) Auxin influx importers modulate serration along the leaf margin. Plant Journal **83**: 705–718

Kawara, S. I., El-Aishy, S. M., & Yamasaki KI, K. (1978). The Position of the Formation of" Stunted Roots" in Rice Plants Taken from the Actual Paddy Fields. *Japanese Journal of Crop Science*, *47*(4), 609-616.

Kawashima, C. (1988). Root System Formation in Rice Plant : II. Development of lateral roots on the primary roots of tillers. Japanese Journal of Crop Science, 57, 19-25.

Ke M, Ma Z, Wang D, Sun Y, Wen C, Huang D, Chen Z, Yang L, Tan S, Li R, et al (2021) Salicylic acid regulates PIN2 auxin transporter hyperclustering and root gravitropic growth via Remorin-dependent lipid nanodomain organisation in Arabidopsis thaliana. New Phytologist **229**: 963–978

Kebrom TH (2017) A growing stem inhibits bud outgrowth – The overlooked theory of apical dominance. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2017.01874

Kepinski S, Leyser O (2005) The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. Nature **435**: 446–451

Khakhar A, Bolten NJ, Nemhauser J, Klavins E (2016) Cell-Cell Communication in Yeast Using Auxin Biosynthesis and Auxin Responsive CRISPR Transcription Factors. ACS Synth Biol **5**: 279–286

Khakhar A, Leydon AR, Lemmex AC, Klavins E, Nemhauser JL (2018) Synthetic hormone-responsive transcription factors can monitor and re-program plant development. Elife. doi: 10.7554/eLife.34702.001

Khakhar A, Wang C, Swanson R, Stokke S, Rizvi F, Sarup S, Hobbs J, Voytas DF (2021) VipariNama: RNA viral vectors to rapidly elucidate the relationship between gene expression and phenotype. Plant Physiol **186**: 2222–2238

Kiba T, Inaba J, Kudo T, Ueda N, Konishi M, Mitsuda N, Takiguchi Y, Kondou Y, Yoshizumi T, Ohme-Takagi M, et al (2018) Repression of nitrogen starvation responses by members of the arabidopsis GARP-type transcription factor NIGT1/HRS1 subfamily. Plant Cell **30**: 925–945

Kim J, Harter K, Theologis A (1997) Protein-protein interactions among the AuxIAA proteins (auxin signalingyeast two-hybrid systemprotein cross-linking-sheet DNA binding motifcombinatorial interactions.

Kim S-K, Chang SC, Lee EJ, Chung W-S, Kim Y-S, Hwang S, Lee JS (2000) Involvement of Brassinosteroids in the Gravitropic Response of Primary Root of Maize. Plant Physiol **123**: 997–1004

Kleine-Vehn J, Dhonukshe P, Sauer M, Brewer PB, Wiśniewska J, Paciorek T, Benková E, Friml J (2008) ARF GEF-Dependent Transcytosis and Polar Delivery of PIN Auxin Carriers in Arabidopsis. Current Biology **18**: 526–531

Kleine-Vehn J, Dhonukshe P, Swarup R, Bennett M, Friml J (2006) Subcellular trafficking of the Arabidopsis auxin influx carrier AUX1 uses a novel pathway distinct from PIN1. Plant Cell **18**: 3171–3181

Kleine-Vehn J, Ding Z, Jones AR, Tasaka M, Morita MT, Friml J (2010) Gravity-induced PIN transcytosis for polarization of auxin fluxes in gravity-sensing root cells. Proc Natl Acad Sci U S A **107**: 22344–22349

Kleine-Vehn J, Huang F, Naramoto S, Zhang J, Michniewicz M, Offringa R, Friml J (2009) PIN auxin efflux carrier polarity is regulated by PINOID kinase-mediated recruitment into GNOM-independent trafficking in arabidopsis. Plant Cell **21**: 3839–3849

Kleine-Vehn J, Wabnik K, Martinière A, Łangowski Ł, Willig K, Naramoto S, Leitner J, Tanaka H, Jakobs S, Robert S, et al (2011) Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane. Mol Syst Biol. doi: 10.1038/msb.2011.72

Knight TA (1806) On the direction of the radicle and germen during the vegetation of seeds. Philos Trans R Soc Lond-Biol Sci 99:108-120

Konstantinova N, Korbei B, Luschnig C (2021) Auxin and root gravitropism: Addressing basic cellular processes by exploiting a defined growth response. Int J Mol Sci **22**: 1–20

Kramer EM, Bennett MJ (2006) Auxin transport: a field in flux. Trends Plant Sci **11**: 382–386

Krieger G, Shkolnik D, Miller G, Fromm H (2016) Reactive oxygen species tune root tropic responses. Plant Physiol **172**: 1209–1220

Krouk G, Kiba T (2020) Nitrogen and Phosphorus interactions in plants: from agronomic to physiological and molecular insights. Curr Opin Plant Biol **57**: 104–109

Krouk G, Lacombe B, Bielach A, Perrine-Walker F, Malinska K, Mounier E, Hoyerova K, Tillard P, Leon S, Ljung K, et al (2010) Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. Dev Cell **18**: 927–937

Krouk G, Ruffel S, Gutiérrez RA, Gojon A, Crawford NM, Coruzzi GM, Lacombe B (2011) A framework integrating plant growth with hormones and nutrients. Trends Plant Sci **16**: 178–182

Kruse CPS, Wyatt SE (2022) Nitric oxide, gravity response, and a unified schematic of plant signaling. Plant Science. doi: 10.1016/j.plantsci.2021.111105

Kumar S, Kumar S, Mohapatra T (2021) Interaction Between Macro- and Micro-Nutrients in Plants. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2021.665583

Kumpf RP, Shi CL, Larrieu A, Stø IM, Butenko MA, Péret B, Riiser ES, Bennett MJ, Aalen RB (2013) Floral organ abscission peptide IDA and its HAE/HSL2 receptors control cell separation during lateral root emergence. Proc Natl Acad Sci U S A **110**: 5235–5240

Laňková M, Smith RS, Pešek B, Kubeš M, Zažímalová E, Petrášek J, Hoyerová K (2010) Auxin influx inhibitors 1-NOA, 2-NOA, and CHPAA interfere with membrane dynamics in tobacco cells. J Exp Bot **61**: 3589–3598

Lanza M, Garcia-Ponce B, Castrillo G, Catarecha P, Sauer M, Rodriguez-Serrano M, Páez-García A, Sánchez-Bermejo E, Tc M, Leo del Puerto Y, et al (2012) Role of Actin Cytoskeleton in Brassinosteroid Signaling and in Its Integration with the Auxin Response in Plants. Dev Cell **22**: 1275–1285

Lee HW, Kim NY, Lee DJ, Kim J (2009) LBD18/ASL20 regulates lateral root formation in combination with LBD16/ASL18 downstream of ARF7 and ARF19 in Arabidopsis. Plant Physiol **151**: 1377–1389

Leitz G, Kang BH, Schoenwaelder MEA (2009) Statolith sedimentation kinetics and force transduction to the cortical endoplasmic reticulum in gravity-sensing Arabidopsis columella cells. Plant Cell **21**: 843–860

Leyser HMO, Pickett FB, Dharmasiri S, Estelle M (1996) Mutations in the AXR3 gene of Arabidopsis result in altered auxin response including ectopic expression from the SAUR-AC1 promoter. Plant Journal **10**: 403–413
Li C, Liu G, Geng X, He C, Quan T, Hayashi KI, de Smet I, Robert HS, Ding Z, Yang ZB (2021a) Local regulation of auxin transport in root-apex transition zone mediates aluminium-induced Arabidopsis root-growth inhibition. Plant Journal **108**: 55–66
Li H, von Wangenheim D, Zhang X, Tan S, Darwish-Miranda N, Naramoto S, Wabnik K, de Rycke R, Kaufmann WA, Gütl D, et al (2021b) Cellular requirements for PIN polar cargo clustering in Arabidopsis thaliana. New Phytologist **229**: 351–369
Li L, Xu J, Xu ZH, Xue HW (2005) Brassinosteroids stimulate plant tropisms through modulation of polar auxin transport in Brassica and Arabidopsis. Plant Cell **17**: 2738–2753
Li P, Wang Y, Qian Q, Fu Z, Wang M, Zeng D, Li B, Wang X, Li J (2007) LAZY1 controls rice shoot gravitropism through regulating polar auxin transport. Cell Res **17**: 402–410
Li SB, Xie ZZ, Hu CG, Zhang JZ (2016) A review of auxin response factors (ARFs) in plants. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2016.00047
Liang G (2022) Iron uptake, signaling, and sensing in plants. Plant Commun **3**: 100349
Liao CY, Smet W, Brunoud G, Yoshida S, Vernoux T, Weijers D (2015) Reporters for sensitive and quantitative measurement of auxin response. Nat Methods **12**: 207–210
Lima JE, Kojima S, Takahashi H, von Wirén N (2010) Ammonium triggers lateral root branching in Arabidopsis in an AMMONIUM TRANSPORTER1;3-dependent manner. Plant Cell **22**: 3621–3633
Lincoln C, Britton JH, Estelle M (1990) Growth and Development of the axr1 Mutants of Arabidopsis.
Liu D (2021) Root developmental responses to phosphorus nutrition. J Integr Plant Biol **63**: 1065–1090
Liu H, Liu B, Chen X, Zhu H, Zou C, Men S (2018) AUX1 acts upstream of PIN2 in regulating root gravitropism. Biochem Biophys Res Commun **507**: 433–436
Ljung K (2013) Auxin metabolism and homeostasis during plant development. Development (Cambridge) **140**: 943–950
Ljung K, Hull AK, Celenza J, Yamada M, Estelle M, Normanly J, Sandberg G (2005) Sites and Regulation of Auxin Biosynthesis in Arabidopsis Roots. Plant Cell **17**: 1090–1104
Löfke C, Luschnig C, Kleine-Vehn J (2013) Posttranslational modification and trafficking of PIN auxin efflux carriers. Mech Dev **130**: 82–94
López-Bucio J, Hernandez-Abreu E, Sa L, Nieto-jacobo F, Simpson J, Herrera-estrella L (2002) Phosphate Availability Alters.Pdf. **129**: 244–256
Lucas M, Godin C, Jay-Allemand C, Laplaze L (2008) Auxin fluxes in the root apex co-regulate gravitropism and lateral root initiation. J Exp Bot **59**: 55–66
Lucas M, Kenobi K, von Wangenheim D, Voß U, Swarup K, de Smet I, van Damme D, Lawrence T, Péret B, Moscardi E, et al (2013) Lateral root morphogenesis is dependent on the mechanical properties of the overlaying tissues. Proc Natl Acad Sci U S A **110**: 5229–5234
Luo J, Zhou JJ, Zhang JZ (2018) Aux/IAA gene family in plants: Molecular structure, regulation, and function. Int J Mol Sci. doi: 10.3390/ijms19010259
Luschnig C, Gaxiola RA, Grisafi P, Fink GR (1998) EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in Arabidopsis thaliana. Genes Dev **12**: 2175–2187
Ma Q, Grones P, Robert S (2018) Auxin signaling: A big question to be addressed by small molecules. J Exp Bot **69**: 313–328
Ma Z, Hasenstein KH (2006) The onset of gravisensitivity in the embryonic root of flax. Plant Physiol **140**: 159–166
Maathuis FJ (2009) Physiological functions of mineral macronutrients. Curr Opin Plant Biol **12**: 250–258
Malamy JE (2005) Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. Plant Cell Environ **28**: 67–77
Malamy JE, Benfey PN (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana. Development **124**: 33–44

di Mambro R, de Ruvo M, Pacifici E, Salvi E, Sozzani R, Benfey PN, Busch W, Novak O, Ljung K, di Paola L, et al (2017) Auxin minimum triggers the developmental switch from cell division to cell differentiation in the Arabidopsis root. Proc Natl Acad Sci U S A **114**: E7641–E7649

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

Marchant A, Kargul J, May ST, Muller P, Delbarre A, Perrot-Rechenmann C, Bennett MJ (1999) AUX1 regulates root gravitropism in Arabidopsis by facilitating auxin uptake within root apical tissues.

Marhavý P, Montesinos JC, Abuzeineh A, van Damme D, Vermeer JEM, Duclercq J, Rakusová H, Nováková P, Friml JI, Geldner N, et al (2016) Targeted cell elimination reveals an auxin-guided biphasic mode of lateral root initiation local communication between pericycle and adjacent endoder-mal cells emerges as an important control point in the re-cruitment of founder cells (FCs) for initiation of the lateral. doi: 10.1101/gad.276964

Marhavý P, Vanstraelen M, de Rybel B, Zhaojun D, Bennett MJ, Beeckman T, Benková E (2013) Auxin reflux between the endodermis and pericycle promotes lateral root initiation. EMBO Journal **32**: 149–158

Marschner, H. (1995) Functions of Mineral Nutrients: Micronutrients. In: Mineral Nutrition of Higher Plants, 2nd Edition, Academic Press, London, 313-404.

Martinière A, Zelazny E (2021) Membrane nanodomains and transport functions in plant. Plant Physiol. doi: 10.1093/plphys/kiab312ï

Masson PH, Tasaka M, Morita MT, Guan C, Chen R, Boonsirichai K (2002) Arabidopsis thaliana: A Model for the Study of Root and Shoot Gravitropism. Arabidopsis Book **1**: e0043

McLaughlin HM, Ang ACH, Østergaard L. (2021) Noncanonical Auxin Signaling. Cold Spring Harb Perspect Biol.

Meng L, Buchanan BB, Feldman LJ, Luan S (2012) CLE-like (CLEL) peptides control the pattern of root growth and lateral root development in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A **109**: 1760–1765

Michniewicz M, Zago MK, Abas L, Weijers D, Schweighofer A, Meskiene I, Heisler MG, Ohno C, Zhang J, Huang F, et al (2007) Antagonistic Regulation of PIN Phosphorylation by PP2A and PINOID Directs Auxin Flux. Cell **130**: 1044–1056

Migliaccio F, Piconese S (2001) Spiralizations and tropisms in Arabidopsis roots. Trends Plant Sci **6**: 561–565

Miyazawa Y, Takahashi H (2020) Molecular mechanisms mediating root hydrotropism: what we have observed since the rediscovery of hydrotropism. J Plant Res **133**: 3–14

Mo M, Yokawa K, Wan Y, Baluska F (2015) How and why do root apices sense light under the soil surface? Front Plant Sci **6**: 1–8

Mok DW, Mok MC (2001) CYTOKININ METABOLISM AND ACTION.

Monshausen GB, Miller ND, Murphy AS, Gilroy S (2011) Dynamics of auxin-dependent Ca 2+ and pH signaling in root growth revealed by integrating high-resolution imaging with automated computer vision-based analysis. Plant Journal **65**: 309–318

Monshausen GB, Sievers A (2002) Basipetal propagation of gravity-induced surface pH changes along primary roots of Lepidium sativum L. Planta **215**: 980–988

Moreno-Piovano GS, Moreno JE, Cabello J v., Arce AL, Otegui ME, Chan RL (2017) A role for LAX2 in regulating xylem development and lateral-vein symmetry in the leaf. Ann Bot **120**: 577–590

Mori S (1999) Iron acquisition Satoshi Mori. Curr Opin Plant Biol **2**: 250–253

Müller A, Guan C, Gälweiler L, Tänzler P, Huijser P, Marchant P, Parry G, Bennett Malcolm, Wisman E, Palme K (1998) AtPIN2 defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control. EMBO J **17**: 6903–6911

Murashige T, Skoog F (1962) Murashige1962Revised.Pdf. Physiol Plant **15**: 474–497

Muthert LWF, Izzo LG, van Zanten M, Aronne G (2020) Root Tropisms: Investigations on Earth and in Space to Unravel Plant Growth Direction. Front Plant Sci **10**: 1–22

Muto H, Watahiki MK, Nakamoto D, Kinjo M, Yamamoto KT (2007) Specificity and similarity of functions of the Aux/IAA genes in auxin signaling of arabidopsis revealed by promoter-exchange experiments among MSG2/IAA19, AXR2/IAA7, and SLR/IAA14. Plant Physiol **144**: 187–196

Nakamura M, Nishimura T, Morita MT (2019) Gravity sensing and signal conversion in plant gravitropism. J Exp Bot **70**: 3495–3506

Neumann, G. and Martinoia, E. (2002) Cluster Roots—An Underground Adaptation for Survival in Extreme Environments. Trends in Plant Science, 7, 162-167.

Niemeyer M, Moreno Castillo E, Ihling CH, Iacobucci C, Wilde V, Hellmuth A, Hoehenwarter W, Samodelov SL, Zurbriggen MD, Kastritis PL, et al (2020) Flexibility of intrinsically disordered degrons in AUX/IAA proteins reinforces auxin co-receptor assemblies. Nat Commun. doi: 10.1038/s41467-020-16147-2

Niu Y, Jin G, Li X, Tang C, Zhang Y, Liang Y, Yu J (2015) Phosphorus and magnesium interactively modulate the elongation and directional growth of primary roots in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. J Exp Bot **66**: 3841–3854

van Norman JM, Xuan W, Beeckman T, Benfey PN (2013) To branch or not to branch: The role of pre-patterning in lateral root formation. Development (Cambridge) **140**: 4301–4310

Nziengui H, Lasok H, Kochersperger P, Ruperti B, Rébeillé F, Palme K, Ditengou FA (2018) Root gravitropism is regulated by a crosstalk between para-aminobenzoic acid, ethylene, and auxin. Plant Physiol **178**: 1370–1389

Oh E, Zhu JY, Bai MY, Arenhart RA, Sun Y, Wang ZY (2014) Cell elongation is regulated through a central circuit of interacting transcription factors in the Arabidopsis hypocotyl. Elife. doi: 10.7554/eLife.03031

Okushima Y, Fukaki H, Onoda M, Theologis A, Tasaka M (2007) ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in Arabidopsis. Plant Cell **19**: 118–130

Okushima Y, Overvoorde PJ, Arima K, Alonso JM, Chan A, Chang C, Ecker JR, Hughes B, Lui A, Nguyen D, et al (2005) Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in Arabidopsis thaliana: Unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. Plant Cell **17**: 444–463

Omelyanchuk NA, Kovrizhnykh V v., Oshchepkova EA, Pasternak T, Palme K, Mironova V v. (2016) A detailed expression map of the PIN1 auxin transporter in Arabidopsis thaliana root. BMC Plant Biol **16**: 1–12

Osmont KS, Sibout R, Hardtke CS (2007) Hidden branches: Developments in root system architecture. Annu Rev Plant Biol **58**: 93–113

Ottenschläger I, Wolff P, Wolverton C, Bhalerao RP, Sandberg G, Ishikawa H, Evans M, Palme K (2003) Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. Proc Natl Acad Sci U S A **100**: 2987–2991

Ötvös K, Marconi M, Vega A, O'Brien J, Johnson A, Abualia R, Antonielli L, Montesinos JC, Zhang Y, Tan S, et al (2021) Modulation of plant root growth by nitrogen source-defined regulation of polar auxin transport. EMBO J **40**: 1–21

Ouellet F, Overvoorde PJ, Theologis A (2001) IAA17/AXR3: Biochemical Insight into an Auxin Mutant Phenotype.

Overvoorde PJ, Okushima Y, Alonso JM, Chan A, Chang C, Ecker JR, Hughes B, Liu A, Onodera C, Quach H, et al (2005) Functional genomic analysis of the AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID gene family members in Arabidopsis thaliana. Plant Cell **17**: 3282–3300

Pacheco-Villalobos D, Hardtke CS (2012) Natural genetic variation of root system architecture from Arabidopsis to Brachypodium: Towards adaptive value. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **367**: 1552–1558

Pagitz M, Lamacchia E, Hol M (2012) Pressure-actuated cellular structures. Bioinspir Biomim. doi: 10.1088/1748-3182/7/1/016007

Palmieri M, Kiss JZ (2005) Disruption of the F-actin cytoskeleton limits statolith movement in Arabidopsis hypocotyls. J Exp Bot **56**: 2539–2550
Panoli A, Martin MV, Alandete-Saez M, Simon M, Neff C, Swarup R, Bellido A, Yuan L, Pagnussat GC, Sundaresan V (2015) Auxin import and local auxin biosynthesis are required for mitotic divisions, cell expansion and cell specification during female gametophyte development in Arabidopsis thaliana. PLoS One. doi: 10.1371/journal.pone.0126164
París R, Vazquez MM, Graziano M, Terrile MC, Miller ND, Spalding EP, Otegui MS, Casalongué CA (2018) Distribution of endogenous NO regulates early gravitropic response and PIN2 localization in arabidopsis roots. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2018.00495
Parry G, Marchant A, May S, Swarup R, Swarup K, James N, Graham N, Allen T, Martucci T, Yemm A, et al (2001) Quick on the uptake: Characterization of a family of plant auxin influx carriers. J Plant Growth Regul **20**: 217–225
Perera IY, Hung CY, Brady S, Muday GK, Boss WF (2006) A universal role for inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated signaling in plant gravitropism. Plant Physiol **140**: 746–760
Péret B, Middleton AM, French AP, Larrieu A, Bishopp A, Njo M, Wells DM, Porco S, Mellor N, Band LR, et al (2013) Sequential induction of auxin efflux and influx carriers regulates lateral root emergence. Mol Syst Biol. doi: 10.1038/msb.2013.43
Péret B, de Rybel B, Casimiro I, Benková E, Swarup R, Laplaze L, Beeckman T, Bennett MJ (2009) Arabidopsis lateral root development: an emerging story. Trends Plant Sci **14**: 399–408
Peret B, Swarup K, Ferguson A, Seth M, Yang Y, Dhondt S, James N, Casimiro I, Perry P, Syed A, et al (2012) AUX/LAX Genes Encode a Family of Auxin Influx Transporters That Perform Distinct Functions during Arabidopsis Development. Plant Cell **24**: 2874–2885
Péret B, Swarup K, Ferguson A, Seth M, Yang Y, Dhondt S, James N, Casimiro I, Perry P, Syed A, et al (2012) AUX/LAX genes encode a family of auxin influx transporters that perform distinct functions during arabidopsis development. Plant Cell **24**: 2874–2885
Pérez-Torres CA, López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Ibarra-Laclette E, Dharmasiri S, Estelle M, Herrera-Estrella L (2008) Phosphate availability alters lateral root development in Arabidopsis by modulating auxin sensitivity via a mechanism involving the TIR1 auxin receptor. Plant Cell **20**: 3258–3272
Periappuram C, Steinhauer L, Barton DL, Taylor DC, Chatson B, Zou J (2000) The Plastidic Phosphoglucomutase from Arabidopsis. A Reversible Enzyme Reaction with an Important Role in Metabolic Control 1.
Pernisova M, Prat T, Grones P, Harustiakova D, Matonohova M, Spichal L, Nodzynski T, Friml J, Hejatko J (2016) Cytokinins influence root gravitropism via differential regulation of auxin transporter expression and localization in Arabidopsis. New Phytol **212**: 497–509
Petersson S v., Johansson AI, Kowalczyk M, Makoveychuk A, Wang JY, Moritz T, Grebe M, Benfey PN, Sandberg G, Ljung K (2009) An auxin gradient and maximum in the arabidopsis root apex shown by high-resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis. Plant Cell **21**: 1659–1668
Petrášek J, Elčkner M, Morris DA, Zažímalová E (2002) Auxin efflux carrier activity and auxin accumulation regulate cell division and polarity in tobacco cells. Planta **216**: 302–308
Pierre-Jerome E, Jang SS, Havens KA, Nemhauser JL, Klavins E (2014) Recapitulation of the forward nuclear auxin response pathway in yeast. Proc Natl Acad Sci U S A **111**: 9407–9412
Pigliucci M (1998) Developmental phenotypic plasticity: Where internal programming meets the external environment. Curr Opin Plant Biol **1**: 87–91
Pigliucci, Massimo (2001). Phenotypic Plasticity: Beyond Nature and Nurture. Johns Hopkins University Press.
Plieth C, Trewavas AJ (2002) Reorientation of seedlings in the earth's gravitational field induces cytosolic calcium transients. Plant Physiol **129**: 786–796
Porco S, Larrieu A, Du Y, Gaudinier A, Goh T, Swarup K, Swarup R, Kuempers B, Bishopp A, Lavenus J, et al (2016) Lateral root emergence in Arabidopsis is dependent on transcription factor LBD29 regulation of auxin influx carrier LAX3. Development (Cambridge) **143**: 3340–3349

Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA (2013) Repurposing CRISPR as an RNA-γuided platform for sequence-specific control of gene expression. Cell **152**: 1173–1183

Rahman A, Takahashi M, Shibasaki K, Wu S, Inaba T, Tsurumi S, Baskin TI (2010) Gravitropism of Arabidopsis thaliana Roots Requires the Polarization of PIN2 toward the Root Tip in Meristematic Cortical Cells . Plant Cell **22**: 1762–1776

Rampey RA, LeClere S, Kowalczyk M, Ljung K, Sandberg G, Bartel B (2004) A family of auxin-conjugate hydrolases that contributes to free indole-3-acetic acid levels during arabidopsis germination. Plant Physiol **135**: 978–988

Rath M, Dümmer M, Galland P, Forreiter C (2020) A gravitropic stimulus alters the distribution of EHB1, a negative effector of root gravitropism in Arabidopsis. Plant Direct. doi: 10.1002/pld3.215

Rebouillat J, Dievart A, Verdeil JL, Escoute J, Giese G, Breitler JC, Gantet P, Espeout S, Guiderdoni E, Périn C (2009) Molecular genetics of rice root development. Rice **2**: 15–34

Retzer K, Akhmanova M, Konstantinova N, Malínská K, Leitner J, Petrášek J, Luschnig C (2019) Brassinosteroid signaling delimits root gravitropism via sorting of the Arabidopsis PIN2 auxin transporter. Nat Commun. doi: 10.1038/s41467-019-13543-1

Retzer K, Lacek J, Skokan R, del Genio CI, Vosolsobě S, Laňková M, Malínská K, Konstantinova N, Zažímalová E, Napier RM, et al (2017) Evolutionary conserved cysteines function as cis-acting regulators of arabidopsis PIN-FORMED 2 distribution. Int J Mol Sci. doi: 10.3390/ijms18112274

Ristova D, Kopriva S (2022) Sulfur signaling and starvation response in Arabidopsis. iScience **25**: 104242

Rosales MA, Mauel C, Nacry P (2019) Abscisic Acid Coordinates Dose-dependent Developmental and Hydraulic Responses of Roots to Water Deficit. Plant Physiol. doi: 10.1104/pp.18.01546

Rosquete MR, Waidmann S, Kleine-Vehn J (2018) PIN7 auxin carrier has a preferential role in terminating radial root expansion in Arabidopsis thaliana. Int J Mol Sci. doi: 10.3390/ijms19041238

Rosquete MR, von Wangenheim D, Marhavý P, Barbez E, Stelzer EHK, Benková E, Maizel A, Kleine-Vehn J (2013) An auxin transport mechanism restricts positive orthogravitropism in lateral roots. Current Biology **23**: 817–822

Rouached H, Arpat AB, Poirier Y (2010) Regulation of phosphate starvation responses in plants: Signaling players and cross-talks. Mol Plant **3**: 288–299

Roy R, Bassham DC (2015) Gravitropism and lateral root emergence are dependent on the trans-Golgi network protein TNO1. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2015.00969

Roychoudhry S, del Bianco M, Kieffer M, Kepinski S (2013) Auxin controls gravitropic setpoint angle in higher plant lateral branches. Current Biology **23**: 1497–1504

Ruffel S, Krouk G, Ristova D, Shasha D, Birnbaum KD, Coruzzi GM (2011) Nitrogen economics of root foraging: Transitive closure of the nitrate-cytokinin relay and distinct systemic signaling for N supply vs. demand. Proc Natl Acad Sci U S A **108**: 18524–18529

de Rybel B, Vassileva V, Parizot B, Demeulenaere M, Grunewald W, Audenaert D, van Campenhout J, Overvoorde P, Jansen L, Vanneste S, et al (2010) A novel Aux/IAA28 signaling cascade activates GATA23-dependent specification of lateral root founder cell identity. Current Biology **20**: 1697–1706

Rychter AM, Rao IM. (2005). Role of phosphorus in photosynthetic carbon metabolism. Hand book of Photosynthesis 2:123–148

Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, Malamy J, Benfey P, Leyser O, Bechtold N, development Steeves ous, et al (1999) An Auxin-Dependent Distal Organizer of Pattern and Polarity in the Arabidopsis Root Plants contain many different cell types in ordered spatial patterns. Pattern formation initiates in the em-bryo and is elaborated in the meristems, foci of continu.

Saito C, Morita MT, Kato T, Tasaka M (2005) Amyloplasts and vacuolar membrane dynamics in the living graviperceptive cell of the arabidopsis inflorescence stem. Plant Cell **17**: 548–558

Santelia D, Henrichs S, Vincenzetti V, Sauer M, Bigler L, Klein M, Bailly A, Lee Y, Friml J, Geisler M, et al (2008) Flavonoids redirect PIN-mediated polar auxin fluxes during root gravitropic responses. Journal of Biological Chemistry **283**: 31218–31226

dos Santos Maraschin F, Memelink J, Offringa R (2009) Auxin-induced, SCFTIR1-mediated poly-ubiquitination marks AUX/IAA proteins for degradation. Plant Journal **59**: 100–109

Sasaki T, Burr B (2000) International Rice Genome Sequencing Project: the effort to completely sequence the rice genome. Curr Opin Plant Biol **3**: 138–141

Sato A, Sasaki S, Matsuzaki J, Yamamoto KT (2014) Light-dependent gravitropism and negative phototropism of inflorescence stems in a dominant Aux/IAA mutant of Arabidopsis thaliana, axr2. J Plant Res **127**: 627–639

Sato EM, Hijazi H, Bennett MJ, Vissenberg K, Swarup R (2015) New insights into root gravitropic signalling. J Exp Bot **66**: 2155–2165

Sauer M, Kleine-Vehn J (2019) PIN-FORMED and PIN-LIKES auxin transport facilitators. Development (Cambridge). doi: 10.1242/dev.168088

Schaller GE, Bishopp A, Kieber JJ (2015) The yin-yang of hormones: Cytokinin and auxin interactions in plant development. Plant Cell **27**: 44–63

Shimizu-Mitao Y, Kakimoto T (2014) Auxin sensitivities of all arabidopsis aux/IAAs for degradation in the presence of every TIR1/AFB. Plant Cell Physiol **55**: 1450–1459

Simon S, Petrášek J (2011) Why plants need more than one type of auxin. Plant Science **180**: 454–460

Singh M, Gupta A, Laxmi A (2017) Striking the Right Chord: Signaling Enigma during Root Gravitropism. Front Plant Sci **8**: 1–17

de Smet I, Tetsumura T, de Rybel B, dit Frey NF, Laplaze L, Casimiro I, Swarup R, Naudts M, Vanneste S, Audenaert D, et al (2007) Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of Arabidopsis. Development **134**: 681–690

de Smet I, Vassileva V, de Rybel B, Levesque MP, Grunewald W, van Damme D, van Noorden G, Naudts M, van Istredael G, de Clercq R, et al (2008) Receptor-Like Kinase ACR4Restricts Formative Cell Divisionsin theArabidopsisRoot. Science (1979) **322**: 590–594

Spíchal L (2012) Cytokinins - Recent news and views of evolutionally old molecules. Functional Plant Biology **39**: 267–284

Staves MP (1997) Cytoplasmic streaming and gravity sensing in Chara internodal cells. Planta **203**: 79–84

Stepanova AN, Robertson-Hoyt J, Yun J, Benavente LM, Xie DY, Doležal K, Schlereth A, Jürgens G, Alonso JM (2008) TAA1-Mediated Auxin Biosynthesis Is Essential for Hormone Crosstalk and Plant Development. Cell **133**: 177–191

Stepanova AN, Yun J, Robles LM, Novak O, He W, Guo H, Ljung K, Alonso JM (2011) The Arabidopsis YUCCA1 Flavin Monooxygenase functions in the Indole-3-Pyruvic acid branch of Auxin Biosynthesis. Plant Cell **23**: 3961–3973

Su N, Zhu A, Tao X, Ding ZJ, Chang S, Ye F, Zhang Y, Zhao C, Chen Q, Wang J, et al (2022) Structures and mechanisms of the Arabidopsis auxin transporter PIN3. Nature. doi: 10.1038/s41586-022-05142-w

Sussman MR, Helen M, Goldsmith M (1981) The action of specific inhibitors of auxin transport on uptake of auxin and binding of N-l-naphthylphthalamic acid to a membrane site in maize coleoptiles. Springer-Verlag

Swarup K, Benková E, Swarup R, Casimiro I, Péret B, Yang Y, Parry G, Nielsen E, de Smet I, Vanneste S, et al (2008) The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. Nat Cell Biol **10**: 946–954

Swarup R, Friml J, Marchant A, Ljung K, Sandberg G, Palme K, Bennett M (2001) Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex. Genes Dev **15**: 2648–2653

Swarup R, Kargul J, Marchant A, Zadik D, Rahman A, Mills R, Yemm A, May S, Williams L, Millner P, et al (2004) Structure-function analysis of the presumptive Arabidopsis auxin permease AUX1. Plant Cell **16**: 3069–3083

Swarup R, Kramer EM, Perry P, Knox K, Leyser HMO, Haseloff J, Beemster GTS, Bhalerao R, Bennett MJ (2005) Root gravitropism requires lateral root cap and epidermal cells for transport and response to a mobile auxin signal. Nat Cell Biol **7**: 1057–1065

Swarup R, Péret B (2012) AUX/LAX family of auxin influx carriers—an overview. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2012.00225

Tan X, Calderon-Villalobos LIA, Sharon M, Zheng C, Robinson C v., Estelle M, Zheng N (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. Nature **446**: 640–645

Tang LP, Zhou C, Wang SS, Yuan J, Zhang XS, Su YH (2017) FUSCA3 interacting with LEAFY COTYLEDON2 controls lateral root formation through regulating YUCCA4 gene expression in Arabidopsis thaliana. New Phytologist **213**: 1740–1754

Tang RH, Han S, Zheng H, Cook CW, Choi CS, Woerner TE, Jackson RB, Pei ZM (2007) Coupling diurnal cytosolic Ca2+ oscillations to the CAS-IP 3 pathway in Arabidopsis. Science (1979) **315**: 1423–1426

Taniguchi M, Furutani M, Nishimura T, Nakamura M, Fushita T, Iijima K, Baba K, Tanaka H, Toyota M, Tasaka M, et al (2017) The arabidopsis LAZY1 family plays a key role in gravity signaling within statocytes and in branch angle control of roots and shoots. Plant Cell **29**: 1984–1999

Tao Y, Ferrer J-L, Ljung K, Pojer F, Hong F, Long JA, Li L, Moreno JE, Bowman ME, Ivans LJ, et al (2008) Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants.

Tasaka M, Kato T, Fukaki H (2001) Genetic Regulation of Gravitropism in Higher Plants.

Teale WD, Paponov IA, Palme K (2006) Auxin in action: Signalling, transport and the control of plant growth and development. Nat Rev Mol Cell Biol **7**: 847–859

Templalexis D, Tsitsekian D, Liu C, Daras G, Simura J, Moschou P, Ljung K, Hatzopoulos P, Rigas S (2022) Potassium transporter TRH1/KUP4 contributes to distinct auxin-mediated root system architecture responses. Plant Physiol **188**: 1043–1060

le Thanh T, Hufnagel B, Soriano A, Divol F, Brottier L, Casset C, Péret B, Doumas P, Marquès L (2021) Dynamic Development of White Lupin Rootlets Along a Cluster Root. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2021.738172

Timpte C, Lincoln C, Pickett FB, Turner J, Estelle M (1995) The AXR1 and AUX1 genes of Arabidopsis function in separate auxin-response pathways. The Plant Journal **8**: 561–569

Tromas A, Perrot-Rechenmann C (2010) Recent progress in auxin biology. C R Biol **333**: 297–306

Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle T (1997) Creation of a Highly Active Synthetic AuxRE. Society **9**: 1963–1971

Ung KL, Winkler M, Schulz L, Kolb M, Janacek DP, Dedic E, Stokes DL, Hammes UZ, Pedersen BP (2022) Structures and mechanism of the plant PIN-FORMED auxin transporter. Nature. doi: 10.1038/s41586-022-04883-y

Utsuno K, Shikanai T, Yamada Y, Hashimoto T (1998) AGR, an Agravitropic locus of Arabidopsis thaliana, encodes a novel membrane-protein family member. Plant Cell Physiol **39**: 1111–1118

Vandenbussche F, Petrášek J, Žádníková P, Hoyerová K, Pešek B, Raz V, Swarup R, Bennett M, Zažímolavá E, Benkova E, et al (2010) The auxin influx carriers AUX1 and LAX3 are involved in auxin-ethylene interactions during apical hook development in Arabidopsis thaliana seedlings. Development **137**: 597–606

Vanneste S, Friml J (2009) Auxin: A Trigger for Change in Plant Development. Cell **136**: 1005–1016

Vanneste S, de Rybel B, Beemster GTS, Ljung K, de Smet I, van Isterdael G, Naudts M, Iida R, Gruissem W, Tasaka M, et al (2005) Cell cycle progression in the pericycle is not sufficient for SOLITARY ROOT/IAA14-mediated lateral root initiation in Arabidopsis thaliana. Plant Cell **17**: 3035–3050

Verbelen J-P, Cnodder T de, Le J, Vissenberg K, Baluška F (2006) The Root Apex of Arabidopsis thaliana Consists of Four Distinct Zones of Growth Activities. Plant Signal Behav **1**: 296–304

Verma S, Attuluri VPS, Robert HS. (2021) An Essential Function for Auxin in Embryo Development. Cold Spring Harb Perspect Biol.

Vermeer JEM, Geldner N (2015) Lateral root initiation in Arabidopsis thaliana: A force awakens. F1000Prime Rep. doi: 10.12703/P7-32

Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu JK (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. Plant Journal **45**: 523–539

Vieten A, Vanneste S, Wiśniewska J, Benková E, Benjamins R, Beeckman T, Luschnig C, Friml J (2005) Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. Development **132**: 4521–4531

Volkmann D, Baluška F, Lichtscheidl I, Driss-Ecole D, Perbal G (1999) Statoliths motions in gravity-perceiving plant cells: does actomyosin counteract gravity? The FASEB Journal **13**: 143–147

Waidmann S, Kleine-Vehn J (2020) Asymmetric cytokinin signaling opposes gravitropism in roots. J Integr Plant Biol **62**: 882–886

Waidmann S, Ruiz Rosquete M, Schöller M, Sarkel E, Lindner H, LaRue T, Petřík I, Dünser K, Martopawiro S, Sasidharan R, et al (2019) Cytokinin functions as an asymmetric and anti-gravitropic signal in lateral roots. Nat Commun. doi: 10.1038/s41467-019-11483-4

Wang HZ, Yang KZ, Zou JJ, Zhu LL, Xie ZD, Morita MT, Tasaka M, Friml J, Grotewold E, Beeckman T, et al (2015) Transcriptional regulation of PIN genes by FOUR LIPS and MYB88 during Arabidopsis root gravitropism. Nat Commun. doi: 10.1038/ncomms9822

Wang L, Guo M, Li Y, Ruan W, Mo X, Wu Z, Sturrock CJ, Yu H, Lu C, Peng J, et al (2018) LARGE ROOT ANGLE1, encoding OsPIN2, is involved in root system architecture in rice. J Exp Bot **69**: 385–397

von Wangenheim D, Fangerau J, Schmitz A, Smith RS, Leitte H, Stelzer EHK, Maizel A (2016) Rules and self-organizing properties of post-embryonic plant organ cell division patterns. Current Biology **26**: 439–449

Ware A, Walker CH, Šimura J, González-Suárez P, Ljung K, Bishopp A, Wilson ZA, Bennett T (2020) Auxin export from proximal fruits drives arrest in temporally competent inflorescences. Nat Plants **6**: 699–707

Weigel D, Weigel D, Ahn JH, Ahn JH, Blázquez MA, Blázquez MA, Borevitz JO, Borevitz JO, Christensen SK, Christensen SK, et al (2000) Activation tagging in Arabidopsis. Plant Physiol **122**: 1003–1013

Whitford R, Fernandez A, Tejos R, Pérez AC, Kleine-Vehn J, Vanneste S, Drozdzecki A, Leitner J, Abas L, Aerts M, et al (2012) GOLVEN Secretory Peptides Regulate Auxin Carrier Turnover during Plant Gravitropic Responses. Dev Cell **22**: 678–685

Williamson LC, Ribrioux SPCP, Fitter AH, Ottoline Leyser HM (2001) Phosphate availability regulates root system architecture in Arabidopsis. Plant Physiol **126**: 875–882

Wilmoth JC, Wang S, Tiwari SB, Joshi AD, Hagen G, Guilfoyle TJ, Alonso JM, Ecker JR, Reed JW (2005) NPH4/ARF7 and ARF19 promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation. Plant Journal **43**: 118–130

Wilson AK, Bryan Pickett F, Turner JC, Estelle M (1990) A dominant mutation in Arabidopsis confers resistance to auxin, ethylene and abscisic acid.

Wollenweber B, Porter JR, Lübberstedt T (2005) Need for multidisciplinary research towards a second green revolution. Curr Opin Plant Biol **8**: 337–341

Wolverton C, Mullen JL, Ishikawa H, Evans ML (2002) Root gravitropism in response to a signal originating outside of the cap. Planta **215**: 153–157

Wolverton C, Paya AM, Toska J (2011) Root cap angle and gravitropic response rate are uncoupled in the Arabidopsis pgm-1 mutant. Physiol Plant **141**: 373–382

Won C, Shen X, Mashiguchi K, Zheng Z, Dai X, Cheng Y, Kasahara H, Kamiya Y, Chory J, Zhao Y (2011) Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by tryptophan aminotransferases of Arabidopsis and YUCCAs in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A **108**: 18518–18523

Wu, Y., Chang, Y., Luo, L., Tian, W., Gong, Q. and Liu, X. (2022), Abscisic acid employs NRP-dependent PIN2 vacuolar degradation to suppress auxin-mediated primary root elongation in *Arabidopsis*. New Phytol, 233: 297-312

Xu G, Fan X, Miller AJ (2012) Plant nitrogen assimilation and use efficiency. Annu Rev Plant Biol **63**: 153–182

Xu S, Wang Q, Liu Y, Liu Z, Zhao R, Sheng X (2021) Latrunculin B facilitates gravitropic curvature of Arabidopsis root by inhibiting cell elongation, especially the cells in the lower flanks of the transition and elongation zones. Plant Signal Behav. doi: 10.1080/15592324.2021.1876348

Xuan W, Audenaert D, Parizot B, Möller BK, Njo MF, de Rybel B, de Rop G, van Isterdael G, Mähönen AP, Vanneste S, et al (2015) Root cap-derived auxin pre-patterns the longitudinal axis of the arabidopsis root. Current Biology **25**: 1381–1388

Xuan W, Band LR, Kumpf RP, van Damme D, Parizot B, de Rop G, Opdenacker D, Möller BK, Skorzinski N, Njo MF, et al (2016) Cyclic programmed cell death stimulates hormone signaling and root development in Arabidopsis. Science (1979) **351**: 384–387

Xuan W, Beeckman T, Xu G (2017) Plant nitrogen nutrition: sensing and signaling. Curr Opin Plant Biol **39**: 57–65

Yamamoto K, Pyke KA, Kiss JZ (2002) Reduced gravitropism in inflorescence stems and hypocotyls, but not roots, of Arabidopsis mutants with large plastids.

Yamamoto' M, Yamamoto' KT (1999) Effects of Natural and Synthetic Auxins on the Gravitropic Growth Habit of Roots in Two Auxin-Resistant Mutants of Arabidopsis, axrl and axr4: Evidence for Defects in the Auxin Influx Mechanism of axr4.

Yamazaki K, Ohmori Y, Fujiwara T (2019) A positive tropism of rice roots toward a nutrient source. Plant Cell Physiol **61**: 546–553

Yang Z, Xia J, Hong J, Zhang C, Wei H, Ying W, Sun C, Sun L, Mao Y, Gao Y, et al (2022) Structural insights into auxin recognition and efflux by Arabidopsis PIN1. Nature. doi: 10.1038/s41586-022-05143-9

Yoder TL, Zheng H-Q, Todd P, Staehelin LA (2001) Amyloplast Sedimentation Dynamics in Maize Columella Cells Support a New Model for the Gravity-Sensing Apparatus of Roots 1.

Yoshihara T, Spalding EP (2017) LAZY genes mediate the effects of gravity on auxin gradients and plant architecture. Plant Physiol **175**: 959–969

Yoshihara T, Spalding EP, Iino M (2013) AtLAZY1 is a signaling component required for gravitropism of the Arabidopsis thaliana inflorescence. Plant Journal **74**: 267–279

Yu T, Lue W-L, Wang S-M, Chen J (2000) Mutation of Arabidopsis Plastid Phosphoglucose Isomerase Affects Leaf Starch Synthesis and Floral Initiation. Plant Physiology 123: 319-325

Zhang H, Forde BG (1998) An Arabidopsis MADS Box Gene That Controls Nutrient-Induced Changes in Root Architecture. **279**: 407–409

Zhang J, Nodzynski T, Pencik A, Rolcik J, Friml J (2010a) PIN phosphorylation is sufficient to mediate PIN polarity and direct auxin transport. Proceedings of the National Academy of Sciences **107**: 918–922

Zhang J, Nodzyński T, Pěnčík A, Rolčík J, Friml J (2010b) PIN phosphorylation is sufficient to mediate PIN polarity and direct auxin transport. Proc Natl Acad Sci U S A **107**: 918–922

Zhang J, Vanneste S, Brewer PB, Michniewicz M, Grones P, Kleine-Vehn J, Löfke C, Teichmann T, Bielach A, Cannoot B, et al (2011) Inositol trisphosphate-induced ca2+ signaling modulates auxin transport and pin polarity. Dev Cell **20**: 855–866

Zhang Y, Immink R, Liu CM, Emons AM, Ketelaar T (2013) The Arabidopsis exocyst subunit SEC3A is essential for embryo development and accumulates in transient puncta at the plasma membrane. New Phytologist **199**: 74–88

Zhang Y, Xiao G, Wang X, Zhang X, Friml J (2019) Evolution of fast root gravitropism in seed plants. Nat Commun. doi: 10.1038/s41467-019-11471-8

Zhao R, Liu Z, Li Z, Xu S, Sheng X (2022) Gravity induces asymmetric Ca2+ spikes in the root cap in the early stage of gravitropism. Plant Signal Behav **17**: 1–5

Zhu J, Bailly A, Zwiewka M, Sovero V, di Donato M, Ge P, Oehri J, Aryal B, Hao P, Linnert M, et al (2016) TWISTED DWARF1 Mediates the Action of Auxin Transport Inhibitors on Actin Cytoskeleton Dynamics. Plant Cell **28**: 930–948

Zou N, Li B, Chen H, Su Y, Kronzucker HJ, Xiong L, Baluška F, Shi W (2013) GSA-1/ARG1 protects root gravitropism in Arabidopsis under ammonium stress. New Phytologist **200**: 97–111

Zourelidou M, Absmanner B, Weller B, Barbosa ICR, Willige BC, Fastner A, Streit V, Port SA, Colcombet J, van Bentem S de la F, et al (2014) Auxin efflux by PIN-FORMED proteins is activated by two different protein kinases, D6 PROTEIN KINASE and PINOID. Elife. doi: 10.7554/eLife.02860

Zwiewka M, Bielach A, Tamizhselvan P, Madhavan S, Ryad EE, Tan S, Hrtyan M, Dobrev P, Vanková R, Friml J, et al (2019) Root Adaptation to H 2 O 2 -Induced Oxidative Stress by ARF-GEF BEN1- and Cytoskeleton-Mediated PIN2 Trafficking. Plant Cell Physiol **60**: 255–273

Résumé : Les plantes ont la capacité de s'adapter aux facteurs environnementaux grâce à une phytohormone, l'auxine, régulateur majeur du développement et des tropismes. Parmi eux, le gravitropisme est essentiel pour que les racines poussent en suivant le vecteur de gravité à la recherche de nutriments et d'eau dans le sol. L'importance de l'auxine a été démontrée par le phénotype agravitropique racinaire du mutant de transport polarisé de cette phytohormone *pin2*. Un nouvel allèle mutant de PIN2 a permis de révéler que ce phénotype est lié aux nutriments disponibles dans le milieu de culture. Les travaux de cette thèse visent à comprendre quel est l'impact des nutriments sur le lien déjà existant entre gradient d'auxine et gravitropisme, pour moduler l'architecture racinaire. Pour ce faire différents milieux de cultures ont été utilisés pour suivre à l'aide des marqueurs d'auxine DR5 et R2D2 les gradients d'auxine au cours de la réponse à la gravistimulation dans différents mutants. Il est clair que les mutants *pin2* et *aux1*, respectivement transporteurs d'efflux et d'influx d'auxines, répondent à la gravité seulement sur milieux dépourvus de phosphore et d'azote indépendamment de l'osmolarité et de la vitesse de croissance des racines primaires. Dans le mutant *pin2* nous avons pu établir que cette réversion du phénotype agravitropique passe par l'expression asymétrique et ectopique de PIN1 dans l'épiderme. Celle-ci est associée à une restauration de l'accumulation asymétrique d'auxine nécessaire à la réorientation de la racine en fonction de la gravité. Ces observations ainsi que l'utilisation d'inhibiteurs d'auxine ont mis en évidence l'importance de l'homéostasie de l'auxine dans ce processus. Le transport de l'auxine représente le principal levier permettant d'expliquer l'importance des nutriments au cours du gravitropisme. Nous avons également mis en évidence que les cytokinines et les brassinostéroïdes, via leur action en synergie avec l'auxine, ont un effet qui permettrait de moduler le seuil d'auxine pour répondre à la gravité.

Ainsi, les travaux menés au cours de cette thèse ont permis d'apporter de nouvelles connaissances quant aux phénotypes agravitropiques de *pin2* et *aux1* et quant aux effets des nutriments sur le transport de l'auxine au cours du gravitropisme. La régulation de la distribution de l'auxine par la disponibilité des nutriments impacte directement la capacité des racines à piloter leur réponse gravitropique. Cela suggère que définir l'angle de croissance racinaire en modulant la réponse gravitropique peut être contrôlé à la fois génétiquement et environnementalement. Ces observations ouvrent la voie à l'amélioration de l'exploration du sol par les racines avec une meilleure utilisation des ressources.

Mots clés : Transport polarisé de l'auxine, Gravitropisme, Nutriments, Phénotype conditionnel, PIN2, AUX1

Abstract: Plants have the capacity to adapt to environmental factors using the phytohormone, auxin, as a major regulator of development and tropisms. Among these responses, gravitropism is essential for plants roots to grow downward in the search for nutrients and water. Importance of auxin was demonstrated by the root agravitropic phenotype of the polarized transport mutant of this phytohormone : *pin2*. A new mutant allele of PIN2 revealed that this agravitropic phenotype is caused by the nutrients available in the culture media. My thesis project aims to understand what is the impact of nutrients on the already existing link between auxin gradient and gravitropism, to modulate root architecture. To do this, different culture media were used to follow auxin gradient, using DR5 and R2D2 probes, during the response to gravistimulation in different mutants. It is clear that *pin2* and *aux1* mutants, transporters of auxin efflux and influx respectively, respond to gravity only on media lacking phosphorus and nitrogen, independently of the osmolarity and the primary roots growth rate. In *pin2* mutant, we were able to establish that this reversion of agravitropic phenotype occurs through the asymmetric and ectopic expression of PIN1 in the epidermis. This is associated with a restoration of the asymmetric accumulation of auxin necessary for the reorientation of the root according to gravity. These observations along with the use of auxin inhibitors have highlighted the importance of auxin homeostasis in this process. Auxin transport represents the main lever for explaining the importance of nutrients during gravitropism. We also demonstrated that cytokinins and brassinosteroïds, through their action in synergy with auxin, have an effect that could modulate the auxin threshold to respond to gravity.

Thus, the work carried out during this thesis has provided new knowledge about the agravitropic phenotype of *pin2* and *aux1* and about the effects of nutrients on auxin transport during gravitropism. The regulation of auxin distribution by nutrient availability directly impacts the ability of roots to drive their gravitropic response. This suggests that setting the root growth angle by modulating the gravitropic response can be both genetically and environmentally controlled. These observations open the way to the improvement of soil exploration by roots with a better use of resources.

Keywords: Polarized auxin transport, Gravitropism, Nutrients, Conditional phenotype, PIN2, AUX1