



HAL
open science

Recherche d'acteurs moléculaires impliqués dans l'arrêt de croissance des rootlettes de racines protéoïdes de lupin blanc

Tamara Le Thanh

► **To cite this version:**

Tamara Le Thanh. Recherche d'acteurs moléculaires impliqués dans l'arrêt de croissance des rootlettes de racines protéoïdes de lupin blanc. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2021. Français. NNT : 2021MONTG043 . tel-03553991

HAL Id: tel-03553991

<https://theses.hal.science/tel-03553991>

Submitted on 3 Feb 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

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

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

Unité de recherche Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes (BPMP)

Recherche d'acteurs moléculaires impliqués dans l'arrêt de croissance des rootlettes de racines protéoïdes de lupin blanc

Présentée par Tamara LE THANH

Le 16 décembre 2021

Sous la direction de Patrick DOUMAS et Laurence MARQUÈS

Devant le jury composé de

M. Thierry DESNOS, Chargé de recherche, CEA, Cadarache

M. Florian FRUGIER, Directeur de recherche CNRS, IPS2, Paris Saclay

Mme Anne REPELLIN, Professeure des Universités, IEES, Paris

Mme Claude PLASSARD, Directeur de recherche, INRAE, Eco&Sols Montpellier

M. Laurent LAPLAZE, Directeur de recherche, IRD, Montpellier

M. Patrick DOUMAS, Chargé de recherche, INRAE, BPMP, Montpellier

Mme Laurence MARQUÈS, Co-directrice de thèse, FDS-UM, BPMP, Montpellier

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Co-directeur de thèse

Invitée



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

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

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

Unité de recherche Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes (BPMP)

Recherche d'acteurs moléculaires impliqués dans l'arrêt de croissance des rootlettes de racines protéoïdes de lupin blanc

Présentée par Tamara LE THANH

Le 16 décembre 2021

Sous la direction de Patrick DOUMAS et Laurence MARQUÈS

Devant le jury composé de

M. Thierry DESNOS, Chargé de recherche, CEA, Cadarache

M. Florian FRUGIER, Directeur de recherche CNRS, IPS2, Paris Saclay

Mme Anne REPELLIN, Professeure des Universités, IEES, Paris

Mme Claude PLASSARD, Directeur de recherche, INRAE, Eco&Sols Montpellier

M. Laurent LAPLAZE, Directeur de recherche, IRD, Montpellier

M. Patrick DOUMAS, Chargé de recherche, INRAE, BPMP, Montpellier

Mme Laurence MARQUÈS, Co-directrice de thèse, FDS-UM, BPMP, Montpellier

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Co-directeur de thèse

Invitée



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Remerciements

OUF, ENFIN ! Si j'écris ces remerciements, c'est que j'ai survécu à ces 8 années d'études, que j'ai atteint mes objectifs, et acquis les compétences nécessaires pour me consacrer pleinement à ma passion. Ces 3 dernières années ont été aussi dures qu'enrichissantes, et je n'aurai jamais pu traverser cette épreuve sans les personnes qui m'ont accompagné pas à pas à travers ce tumultueux parcours qu'est la thèse. C'est avec beaucoup d'émotions que je quitte BPMP, et probablement même Montpellier.

Dans un premier temps, je tiens à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail : Thierry DESNOS et Florian FRUGIER en tant que rapporteurs ; Anne REPELLIN, Claude PLASSARD et Laurent LAPLAZE en tant qu'examinateurs. Merci pour les discussions à venir, et l'intérêt que vous portez à mes travaux.

Merci également aux membres de mon comité de thèse pour leurs précieux conseils et leur bienveillance : Valérie HOCHER, Phillippe NACRY, Nicolas ARNAUD et Thierry DESNOS.

J'aimerais remercier chaleureusement mes encadrants Laurence et Patrick, pour avoir fait preuve de patience et de courage pour m'emmener jusqu'au bout de mon stage de master 2, du concours de l'école doctorale et enfin de ma thèse.

Laurence, je te remercie pour ta bienveillance et ta pédagogie, ainsi que pour le temps que tu m'as accordé malgré ton emploi du temps de ministre. Merci pour toutes les corrections pointilleuses me permettant de mieux comprendre mes erreurs, et pour m'avoir (ou avoir essayé de, le chemin est peut-être encore un peu long... :p) appris à user de rigueur et de précision quant au vocabulaire scientifique que j'utilise. Je suis impatiente que tu puisses avoir un peu plus de temps pour la recherche et pour toi, que tu puisses souffler et réaligner tes chakras scientifiques ! L'année prochaine : Yoga, expériences, et surtout, PAS DE COURS !

Patrick, merci pour avoir accepté de repousser un peu la date de ton départ pour que j'ai l'honneur d'être ta dernière doctorante. J'espère que je ne t'ai pas donné trop de fil à retordre... :p. Merci pour ta franchise, souvent percutante mais nécessaire, et ton aide tout au long de ma thèse. Egalement, je te remercie pour m'avoir, avec Camille, donné goût à l'escalade. Je te souhaite le meilleur pour ta nouvelle vie qui commence, pleine d'aventures, d'escapades et de tranquillité ! Et n'oublies pas, si un jour tu veux vendre ta maison, je suis toujours intéressée !!! J'aimerais maintenant prendre le temps de remercier les membres de l'équipe Plasticité qui m'ont accompagné tout au long de cette thèse, pour ces plasti-pauses tant enviées à BPMP et tous ces moments de bonheurs.

Benjamin, aka chef, merci pour maintenir l'équipe soudée, autant sur le plan professionnel que sur les relations amicales. Je pense que la force de cette équipe réside réellement dans cette bonne entente commune et cette bonne humeur que tu réussis à maintenir grâce aux diverses activités que nous faisons tous ensemble, et grâce à tes chocolats exquis !

Un grand merci à Fanchon, pour TOUT : ton aide précieuse et indispensable dans ma formation au laboratoire, dans les expériences que tu as mené pour que je puisse rendre à temps mon papier/ma thèse, pour tous ces moments de rigolade, ton aide psychologique dans les moments de down et également ta franchise dans mes moments de doutes, etc... Je pense sincèrement que tu es quelqu'un de formidable, un élément central et moteur dans la réussite de ma thèse, mais également dans l'équipe Plasticité. Je t'attends de pied ferme à La Réunion, mais aussi sur les poteaux de Koh Lanta 2022 ou 2023 !!!

Esther, je te remercie pour avoir pu répondre à toutes mes questions, aussi bêtes étaient-elles, pour m'avoir écouté me plaindre ou me réjouir, et pour m'avoir supporté dans mes ascenseurs émotionnels ces derniers mois. Merci pour m'avoir aidé dans cette dernière ligne droite, et ces dernières heures très compliquées avant la soumission de ma thèse, surtout quand le PDF a totalement planté ! Je te remercie également pour les quelques mots espagnols que j'ai pu apprendre, et pour ces moments de rigolade dans le bureau. J'espère de tout cœur que ton projet sera accepté, et que le nouveau Kevin décrochera la bourse doctorale, mais avec toi comme encadrante, je n'en doute pas une seule seconde !

Maintenant, place aux non-permanents. Dans un premier temps, j'aimerais dire un grand merci à Marion (AQUI), pour tous ces moments que l'on a partagés. Pour les phrases du type « je pensais que les gens comme toi, ça existait que dans les films ». Merci pour la petite escapade à Port-cros avec les autres, ce premier baptême de plongé qui m'a lancé sur mon niveau 1, on a vraiment bien rigolé et j'en garde un super souvenir. Je te souhaite beaucoup de force, et de courage pour l'année qui va arriver. Fais preuve de persévérance, accroches-toi, et si je suis dans le coin, je viendrai bien évidemment assister à ta soutenance pour te soutenir ! N'oublie pas, when life gives you lemon, make lemonade !!!

Cléa, merci pour avoir pris de ton temps pour m'aider dans différentes expériences, pour m'avoir aidé à paginer ma thèse et pour avoir pris le temps de vérifier chaque page lorsqu'il fallait que je la rende. J'espère que ta (potentielle) nouvelle vie à Lyon se passera au top et que tu deviendras une future star de la danse.

Laurent, merci pour ton aide sur le clonage, pour ta bonne humeur et tous ces moments qu'on a passé pour des jeux / des escapes games / des apéros. Je vous souhaite tout le meilleur du monde avec Elena, et DECROCHES NOUS CE CONCOURS !!

J'aimerai également remercier Alexandre pour son aide précieuse avec l'analyse des données transcriptomiques, Barbara et Cécilia pour leur conseils et cette petite virée à Dijon, et Célia, Cécilia et Fanny pour mon intégration dans l'équipe lorsque je suis arrivée en M2. Merci à François pour ces moments au labo et à l'escalade, j'espère que les bonbons te plaisent ;). Merci à Virginia pour m'avoir donné envie de visiter l'Argentine. Merci à Inge, pour ces éclairs au chocolat, stracciatella, mangue-passion etc...

Un grand merci à Malika, ma première stagiaire, pour sa bonne humeur, son implication et pour prendre de mes nouvelles de temps en temps. Bientôt, pékin espress c'est pour toi !!!

Merci aussi aux autres stagiaires qui sont passés dans l'équipe et qui ont su se plier à la célèbre coutume de l'équipe : gâteaux, gâteaux et gâteaux.

J'aimerais remercier les personnes du laboratoire BPMP qui m'ont apporté leur aide au cours de ma thèse. Notamment un grand merci à Carine pour ton aide précieuse en microscopie ainsi que tes nombreux conseils. J'ai vraiment apprécié les formations avec toi, ta disponibilité et surtout ta sympathie. Merci pour ces « magnifiques images » de microscopie dans mon papier, qui le sont en majeure partie grâce à toi!

Merci aussi à Lydia, pour ton aide avec l'aniline blue mais aussi lors de l'enseignement des travaux pratiques à la fac, auxquelles j'ai pu rapidement prendre goût.

J'aimerai remercier Kev, pour ta bonne humeur et tes conseils lors de la dernière ligne droite ! Pour ces moments mémorables à Amsterdam, à Port-cros, au labo et dans les soirées qu'on a pu faire. Pleins de bonheur pour Pops et toi, j'ai hâte que tu sois un GRAND chercheur/dealer de gecko aux cuisses raffermies par les 20 km de vélo par jour hihi.

Merci à Virginia, pour ton soutien moral, pour ces petits moments chez toi, au bar ou au tropisme, ta bonne humeur constante et communicative, et ton grand cœur. Je te souhaite pleins de bonheur, d'amour et d'eau fraîche ! Ciao bonazza, torticolli !!

Paloma, gracias por tu buen humor y tu sonrisa. Estoy siempre feliz cuando te veo. Te deseo muchas buenas cosas !!

Merci à tous les non-permanents avec qui on a pu passer de super moments lors des apéros, malgré cette période compliquée du covid. Quand vous voulez pour prendre votre raclée au moly ! Enfin, merci également à toutes les autres personnes de BPMP.

Du plus profond du cœur, j'aimerai remercier Halima, ma sœur, Yung Halouf, pour ton soutien, ta relecture de certains de mes chapitres et surtout ta bonne humeur constante. Tu as été indispensable à mon bien être ces dernières années. Malgré que, parfois, ta motivation te fait défaut (oui Halima, je suis actuellement en train de t'attendre, mais tu fais une sieste de 3h), je sais que tu franchiras avec brio tous les obstacles que cette vie mettra sur ton chemin.

Merci à Thib, pour ton amitié sans faille depuis tant d'années. Merci d'avoir pris le temps de faire le gendarme des fautes d'orthographe dans ma thèse ! Les années passent et on est toujours là à se suivre, pour longtemps encore je l'espère.

Merci à Tanya, loin des yeux mais si près de mon cœur. J'espère que le fait d'en finir avec mes études, et toi avec ton travail, nous permettra de passer plus de temps ensemble, à l'ancienne. Muchos besos hermana !!!

谢谢你 à Chan (Louise) pour ton soutien et tes conseils au cours de ma thèse, mais surtout pour me laisser t'appeler Chan depuis tant d'années alors que, j'admets, tu n'as (presque) rien d'asiatique... Qui aurait cru que j'allais enseigner les TP que je te laissais rédiger en L2 hahaha. Malgré tout l'amour que je te porte, on n'a pas fini d'en découdre et je compte bien vous mettre la raclée au catane jusqu'en maison de retraite à toi et Halima ;).

Merci à tout le SQUAD : Max, Suba, Gomar, Lulu, Vinyl, Guigui, Katosh, Eddie, Paul, Genmi et Nini pour votre soutien, tous ces moments à déconner, ces repas, apéros, sorties etc...

Ιωάννα, σ' ευχαριστώ για την στήριξη σου τα τελευταία αυτά πέντε χρόνια. Σ' ευχαριστώ για τα ταξίδια μας, την τρέλα μας για το σουσί, για την προσοχή και την αγάπη σου. Ξέρεις όπως εγώ, ότι όλες οι ιστορίες έχουν κι ένα τέλος όμως και το ότι οι κανόνες έχουν βγει για να τους καταπατάμε. Τα λέμε σύντομα, σε αγαπάω.

Il y a de nombreuses personnes que j'aimerai également remercier mais je commence à manquer de place... Un grand merci pour leur présence également à Rod, Eleni Fiona, Typhaine, Camille, Dim, Charlie, Leila, Anne-lou, Charlotte, et ainsi que toutes les personnes que j'aurai pu oublier...

Et le meilleur pour la fin, merci à ma famille pour leur présence. Particulièrement, j'aimerai remercier mes parents pour toujours avoir su me conseiller tout en respectant mes choix et mes convictions, pour m'avoir inculqué de nombreuses valeurs qui font la personne que je suis aujourd'hui, et pour tout l'amour qu'ils m'ont toujours offert.

Résumé : Le phosphate (Pi) est un nutriment indispensable au développement des végétaux, connu pour faire partie d'une signalisation nutritionnelle responsable de modifications importantes du système racinaire. Chez le lupin blanc (*Lupinus albus*), la carence en Pi induit la formation de structures racinaires spécialisées appelées racines protéoïdes, sur lesquelles se développent de denses amas de racines courtes à croissance déterminée que nous appellerons les rootlettes. De nombreuses études ont mis en évidence la capacité spectaculaire de ces rootlettes à améliorer l'acquisition du Pi, mais peu d'informations sont disponibles sur leur développement spécifique et en particulier le caractère déterminé de leur croissance. Les travaux de cette thèse visent à mettre en évidence les mécanismes moléculaires impliqués dans la croissance déterminée des rootlettes de racines protéoïde de lupin blanc. En ce sens, une caractérisation anatomique et physiologique des rootlettes, associée à une approche transcriptomique, a permis de définir 5 stades de développement, menant à l'identification d'une profonde transition à la fois structurale et fonctionnelle. Ainsi, les rootlettes évoluent d'une phase de croissance, impliquant la présence d'une activité méristématique, vers une phase entièrement dédiée à la nutrition associée à la différenciation complète de leur méristème. Dans le but de mettre en évidence les acteurs moléculaires de cette transition, les gènes *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like*, homologues de *AtWOX5* connu chez la plante modèle *Arabidopsis* pour son rôle central dans le maintien du méristème, ont été sur-exprimés dans des racines de lupin blanc par transformation génétique hairy-root. Cependant, les phénotypes racinaires obtenus n'ont pas permis de confirmer une implication de ces gènes dans la transition développementale des rootlettes. Il est acquis que les rootlettes émergent de manière successive et génèrent un gradient développemental le long de la racine protéoïde. Notre attention s'est focalisée sur des rootlettes particulières qui se distinguent par une longueur plus importante, interrompant donc ce gradient caractéristique. La caractérisation anatomique de ces rootlettes anormalement longues a démontré de fortes similitudes avec la structure d'un apex de racine protéoïde à croissance indéterminée. Un jeu de données transcriptomiques a été généré afin de comparer : rootlettes longues, apex de racines protéoïdes et rootlettes courtes (standard). L'analyse de ces données a permis de montrer qu'un réseau de gènes impliqués dans l'auto-maintien du méristème est fortement exprimé dans les rootlettes longues par rapport aux rootlettes courtes (standard) juxtaposées. L'analyse de ce transcriptome a également permis de mettre en évidence le gène *LaRGF2-like*, homologue du peptide *AtRGF2* connu pour être impliqué dans la régulation du méristème. La sur-expression de *LaRGF2-like* par transformation hairy-root dans des racines de lupin blanc semble permettre le maintien de la zone méristématique dans une majorité de rootlettes des racines transformées, suggérant un rôle important de ce gène dans la transition vers la croissance déterminée. Ainsi, les travaux menés au cours de cette thèse ont permis d'apporter de nouvelles connaissances quant aux acteurs impliqués dans le développement déterminé des rootlettes. La compréhension du développement de ces structures spécialisées pourra éventuellement permettre de transférer la capacité à produire des racines protéoïdes ou des racines courtes dédiées à la nutrition chez d'autres espèces d'intérêt agronomique.

Mots clés : Racines protéoïdes, lupin blanc, croissance déterminée, phosphate

Abstract : Phosphate (Pi) is an essential plant nutrient but by far the least mobile and least available for plants, therefore representing a limiting factor for their growth and development. It is well known that Pi deprivation triggers developmental adaptations in plants, including the modification of their root architecture. In white lupin (*Lupinus albus*), low Pi induces the formation of very specialized roots called cluster roots. These structures are made up of hundreds of short rootlets with a determinate growth, forming one or more very dense clusters. The spectacular ability of rootlets to improve Pi nutrition has been widely studied, though little information is known about the determinate development of these structures. My thesis project aims to unravel the molecular players involved in the determinate growth of white lupin rootlets. To this extent, an anatomical and physiological description of the rootlets, combined with transcriptomic approaches, allowed us to define 5 developmental stages, leading to the identification of a major transition change in rootlet development, both at the structural and functional level. Indeed, rootlets evolve from a growth phase, involving root meristem activity, to a functional phase fully dedicated to nutrition in which the meristem has disappeared. In order to unravel the molecular actors implied in rootlet determined growth, *LaWOX5.1-like* and *LaWOX5.2-like*, homologous genes of *AtWOX5* known in the model plant *Arabidopsis* for being involved in the maintenance of the root meristem, were overexpressed in white lupin roots with hairy-root transformation. However, the obtained phenotypes did not allow us to confirm the involvement of *LaWOX5.1-like* and *LaWOX5.2-like* in the developmental transition of rootlets. It is known that rootlets emerge in a successive manner along the cluster root leading to the formation of a continuous spatial gradient of rootlet development. Abnormally long rootlets, differing from standard short rootlets by their longer size, caught our attention. Anatomical studies showed that long rootlet apex structure is very similar to the cluster root indeterminate apex. A transcriptomic data set was generated, allowing to compare: long rootlets, cluster root apexes and normal rootlets. The study of the transcriptomic data set revealed the high expression of a network of genes involved in the meristem maintenance in long rootlets compared to normal rootlets. In addition, its analysis allowed the identification of *LaRGF2-like* gene, homologous to *AtRGF2* peptide, known to be involved in the meristem maintenance. Overexpression of *LaRGF2-like* in white lupin roots seems to maintain meristem activity in transformed rootlets, suggesting that this gene is a key gene in the molecular switch leading to rootlet determined growth. Finally, this thesis work has enabled the acquisition of knowledge and a better understanding of the molecular mechanisms involved in the determined growth of rootlets. In the long term, the understanding of the development of these special structures could make it possible to transfer the ability of producing cluster roots to other crop species, thereby improving their phosphate nutrition.

Key words : Cluster root, white lupin, determinate growth, phosphate

Table des matières

Introduction générale.....	1
1. Développement et plasticité du système racinaire.....	2
1.1 La zone méristématique.....	2
1.1.1 La coiffe.....	2
1.1.2 La structure du MAR.....	3
1.1.3 Le réseau de gènes impliqués dans l'auto-maintien du MAR.....	4
1.1.4 L'auxine et la cytokinine contrôlent les facteurs de transcriptions impliqués dans l'auto-maintien du MAR.....	5
1.1.5 L'implication des peptides dans les processus développementaux de la racine.....	5
1.1.5.1 L'implication des peptides CLE dans le maintien du MAR.....	6
1.1.5.2 L'implication des peptides CEP dans le maintien du MAR.....	6
1.1.5.3 Les multiples rôles des peptides RGFs/GLVs/CLELs.....	6
1.1.5.4 L'implication des peptides RGFs/GLVs/CLELs dans le maintien du MAR.....	7
1.2 La zone de transition.....	8
1.3 La zone d'élongation.....	9
1.4 La zone de différenciation.....	9
1.5 La formation des racines latérales.....	10
1.5.1 L'auxine au cœur du processus d'initiation des racines latérales.....	10
1.5.2 La mise en place d'un nouvel organe dont la structure est similaire à la racine primaire.....	11
1.5.3 Le mise en place d'un nouveau méristème lors de la formation des racines latérales.....	11
1.6 La plasticité du système racinaire face aux facteurs abiotiques : l'exemple de la croissance déterminée des Cactacées du désert de Sonora.....	13
2. Les mécanismes d'adaptation des plantes face à la carence en phosphate.....	14
2.1 Biodisponibilité du phosphate dans le sol.....	14
2.2 La carence en phosphate : des enjeux économiques et écologiques.....	15
2.2.1 Le cycle du phosphore.....	15
2.2.2 Le phosphore en tant que ressource non renouvelable.....	16
2.2.3 Le phosphore au cœur d'une polémique environnementale.....	16
2.3 Les mécanismes d'adaptation des plantes à la carence en Pi.....	17
2.3.1 La symbiose mycorhizienne améliore l'acquisition de Pi chez les plantes.....	17
2.3.2 La modification du système racinaire par le Pi chez la plante modèle <i>A. thaliana</i>	18
2.3.3 Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'arrêt de la racine primaire suite à une carence en phosphate chez <i>A. thaliana</i>	18

2.3.4 L'induction des gènes impliqués dans le transport de Pi.....	19
2.3.5 Améliorer l'acquisition de Pi via la sécrétion de molécules dans la rhizosphère.....	19
2.3.6 Les racines protéoïdes, une adaptation à la carence en Pi.....	20
3. Le lupin blanc et les racines protéoïdes en réponse à la carence en Pi.....	21
3.1 Le lupin blanc, un modèle pour l'étude des racines protéoïdes.....	21
3.1.1 Les racines protéoïdes du lupin blanc.....	21
3.1.2 L'initiation et le développement des rootlettes.....	21
3.1.3 Les rootlettes exsudent de grandes quantités de molécules afin de favoriser l'absorption de Pi.....	22
3.1.4 La croissance déterminée des rootlettes.....	23
3.2 Les outils pour l'étude des racines protéoïdes de lupin blanc.....	24
3.2.1 Le séquençage du génome du lupin.....	24
3.2.2 Les données transcriptomiques disponibles.....	24
3.2.3 La transformation hairy-root chez le lupin blanc.....	25
Objectifs de thèse.....	26

Chapitre 1 : Description du développement et de la fonction des rootlettes de racines protéoïdes de lupin blanc.....	27
1. Introduction.....	28
2. Résultats.....	29
2.1 Article publié dans « Frontiers In Plant Science ».....	29
2.2 Résultats complémentaires.....	30
2.2.1 Les amyloplastés disparaissent durant le développement des rootlettes.....	30
2.2.2 Le transport des nutriments : des racines jusqu'aux feuilles.....	31
2.2.2.1 Après 3 jours, les plantes ayant développé des racines protéoïdes présentent un statut phosphaté similaire aux plantes contrôles.....	31
2.2.2.2 En 1 heure, les plantes carencées en Pi retrouvent un statut phosphaté normal.....	32
2.2.2.3 Quand est-il des autres nutriments ?.....	32
3. Discussion.....	33
3.1 Les rootlettes, des structures parfaitement adaptées à l'absorption de Pi.....	33
3.2 De la carence à l'homéostasie du Pi.....	35
3.3 La relation Fer-Pi.....	37
3.4 Le manganèse, un indicateur de la présence d'acides organiques dans le sol.....	37
4. Matériel et méthodes des résultats complémentaires.....	38
4.1 Matériel végétal et conditions de culture.....	38

4.2 Analyses microscopiques et visualisation des statolithes.....	39
4.3 Analyses physiologiques de la sève brute.....	39
4.3.1 Récolte de la sève pour l'expérience 3 jours.....	40
4.3.2 Récolte de la sève pour l'expérience à cinétique courte.....	40
4.3.3 Analyse des échantillons de sève brute.....	40
Chapitre 2 : Recherche d'acteurs moléculaires impliqués dans le développement déterminé des rootlettes de racine protéoïde de lupin blanc – approche ciblée et crible génétique.....	41
1. Introduction.....	42
2. Matériel et méthodes.....	43
2.1 La transformation hairy-root.....	43
2.1.1 Le clonage moléculaire pour la sur-expression de <i>LaWOX5.1-like</i> et <i>LaWOX5.2-like</i>	43
2.1.2 La souche bactérienne utilisée.....	44
2.1.3 La transformation hairy-root des racines de lupin blanc.....	44
2.1.4 Méthode d'analyse des racines transformées.....	45
2.1.5 Vérification de la sur-expression de <i>LaWOX5.1-like</i> et <i>LaWOX5.2-like</i>	45
2.1.6 Analyses microscopiques des racines transformées avec pAtWOX5:GFP.....	46
2.2 Le crible génétique.....	46
2.2.1 Matériel végétal et conditions de culture du crible.....	46
2.2.2 Conditions de culture de l'amplification.....	47
3. Résultats.....	47
3.1 L'approche gène candidat.....	47
3.1.1 Profil d'expression du promoteur du gène AtWOX5 chez le lupin blanc...	47
3.1.2 <i>LaWOX5.1-like</i> et <i>LaWOX5.2-like</i> , deux homologues à AtWOX5.....	47
3.1.3 La sur-expression de <i>LaWOX5.1-like</i> et <i>LaWOX5.2-like</i>	48
3.1.4 L'impact de la sur-expression de <i>LaWOX5.1-like</i> et <i>LaWOX5.2-like</i>	50
3.2 L'approche sans a priori : le crible génétique.....	50
4. Discussion.....	52
4.1 La sur-expression de <i>LaWOX5-like</i> ne permet pas de maintenir une croissance indéterminée des rootlettes.....	52
4.2 35SWOX5.1 et 35SWOX5.2, des phénotypes pas si surprenants.....	53
4.3 Le lupin blanc, un modèle difficile pour la génétique.....	54

Chapitre 3 : Analyse anatomique et transcriptomique de rootettes longues échappant temporairement à la croissance déterminée.....	56
1. Introduction.....	57
2. Résultats.....	58
2.1 Caractérisation anatomique des LR.....	58
2.2 Analyse transcriptionnelle des « Longues Rootettes ».....	60
2.2.1 Identification des gènes différentiellement exprimés.....	61
2.2.2 Analyse de l'enrichissement des ontologies des gènes.....	62
2.2.3 Focus sur les facteurs de transcription.....	63
2.2.4 <i>LaRGF2-like</i> , un gène candidat à la croissance déterminée des rootettes ?.....	65
2.3 Approche gène-candidat avec <i>LaRGF2-like</i>	66
2.3.1 La surexpression de <i>LaRGF2-like</i>	66
2.3.2 Le phénotype racinaire induit par la sur-expression de <i>LaRGF2-like</i>	67
2.3.3 Analyse microscopique de l'apex des rootettes-like de 35S::RGF2.....	67
3. Discussion.....	68
3.1 Les rootettes longues ne sont pas dédiées à la nutrition, contrairement aux rootettes à croissance déterminée.....	68
3.2 Les rootettes longues possèdent toujours une activité méristématique....	70
3.3 <i>LaRGF2-like</i> est impliqué dans le maintien d'une activité méristématique.....	71
3.4 Comment <i>LaRGF2-like</i> maintient l'activité méristématique ?.....	72
3.5 La régulation de <i>LaRGF2-like</i>	73
4. Matériel et méthodes.....	73
4.1 L'analyse du transcriptome « Longues Rootettes ».....	74
4.1.1 Échantillonnage et la création de bibliothèques ARN.....	74
4.1.2 L'analyse du transcriptome.....	74
Discussion générale et perspectives.....	75
1. La transition développementale des rootettes.....	76
2. <i>LaRGF2-like</i> , acteur de la transition développementale des rootettes.....	78
3. Comment <i>LaRGF2-like</i> régule l'activité méristématique ?.....	79
4. Une potentielle implication de l'auxine dans l'arrêt de croissance des rootettes ?.....	81
5. Vers des plantes adaptées à l'appauvrissement croissant des sols, et une meilleure utilisation des ressources.....	82
Bibliographie.....	85

Liste des abréviations

ABC	ATP binding cassette
ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid
ACR4	ARABIDOPSIS CRINKLY4
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALMT1	1-ALUMINIUM ACTIVATED MALATE
ARF	AUXIN RESPONSIVE FACTOR
ARN	Acide ribonucléique
ASL18	ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE18
ATP	Adénosine-triphosphate
BBM	BABYBOOM
BRN1/2	BEARSKIN1/2
CDF4	CYCLING DOF FACTOR 4
CEP	C-TERMINALLY ENCODED PEPTIDE
CLEL	CLE-LIKE
CLV	CLAVATA
CLV1	CLAVATA1
CMA	Champignon Mycorhizien Arbusculaire
CRK	CYSTEIN-RICH RECEPTOR LIKE KINASE
CSLA2	CELLULOSE SYNTHASE2
CYCB1	CYCLINE B1
EXP7/8	EXPANSIVE7/8
FC	Fold Change
FIT1	FE-DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR
FRO1	FERRIC-CHELATE REDUCTASE1
GFP	Green Fluorescent Protein
GLV	GLOVEN
GUS	β-glucuronidase
H ₂ PO ₄ ⁻	Orthophosphate
HPIC	Chromatographie Ionique à Haute Pression
IAA	Acide Indole-3-Acétique
IRT1	IRON-REGULATED TRANSPORTER1
LBD16	LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN16
LPR1	LOW PHOSPHATE ROOT1
LR	Longue Rootlette
LSU2	RESPONSE TO LOW SULFUR2
MAR	Méristème Apical Racinaire
MATE	MULTI DRUG AND TOXIN EFFLUX
Mko1	Moors koom1
MP-AES	Spectroscopie d'émission atomique par plasma micro-ondes
ms	Matière sèche
MS	Murashige and Skoog
NAC	NO APICAL MERISTEM
NCR	No Cluster Root
NLA	NITROGEN LIMITATION ADAPTATION

NR	Normale Rootlette
OFP	OVATE PROTEIN FAMILY1
PAP	PURPLE ACID PHOSPHATASE
PDR2	PHOSPHATE DEFICIENCY RESPONSE 2
PEPCase	Phosphoenolpyruvate carboxylase
PHT1	PHOSPHATE TRANSPORTER1
Pi	Phosphate inorganique
PIN	PIN-FORMED
PLT	PLETHORA
PS2	PHOSPHATE STARVATION-INDUCED GENE2
RDH6	ROOT HAIR DEFECTIVE 6
RGF	ROOT MERISTEM GROWTH FACTOR
ROW1	REPRESSOR OF WUSCHEL1
RSL4	ROOT HAIR DEFECTIVE-LIKE 4
S-APase	Phosphatase acide
SCR	SCARECROW
SHI	SHORT INTERNODES
SHR	SHORTROOT
SHY2	SHORT HYPOCOTYL2
SLR	SOLITARY-ROOT
SMB	SOMBRERO
STOP1	SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY1
TPST	Tyrosylprotein sulfotransferase
Tyr	Tyrosine
WOX5	WUSCHEL-RELATED HOMEBOX5
XTH	Xycoglucan endotransglucosylase

Liste des figures et tables

Introduction générale

Figure i.1 : Organisation de la racine primaire et de son méristème chez *A. thaliana*

Table 1 : Récapitulatif de la nomenclature associée aux peptides GLVs/RGFs/CLEL

Figure i.2 : Rôles des peptides RGFs/GLVs/CLELs dans le développement racinaire

Figure i.3 : Initiation et formation des racines latérales

Figure i.4 : Schéma simplifié de la répartition totale du stock de phosphore (P) dans le sol

Figure i.5 : Le phosphate dans le sol

Figure i.6 : Impact de la carence en Pi sur le système racinaire d'*A. thaliana*

Figure i.7 : Le lupin blanc développe des racines protéoïdes en réponse à une carence en phosphate

Figure i.8 : Les rootlettes ont une croissance déterminée

Figure i.9 : Echantillonnage spatial d'une racine protéoïde pour la création d'un jeu de données transcriptomiques

Chapitre 1

Figure 1.1 : Accumulation des grains d'amidon dans la coiffe de l'apex de la racine protéoïde et des rootlettes à différents stades de développement

Figure 1.2 : Quantification des nutriments présents dans la sève brute de plantes de lupin blanc cultivées en conditions de Pi contrastées

Figure 1.3 : Quantification des nutriments présents dans la sève brute de plantes de lupin blanc cultivées en conditions de Pi contrastées (cinétique de 0h à 6h)

Figure 1.4 : Profils d'expression de 3 transporteurs le long de la racine protéoïde

Figure 1.5 : Vue d'ensemble des mécanismes mis en place en réponse à une carence en Pi

Chapitre 2

Figure 2.1 : Utilisation de la construction mCherry en tant que marqueur fluorescent de la transformation génétique

Figure 2.2 : Méthode d'analyse des phénotypes racinaires hairy root

Figure 2.3 : Etude de l'expression du promoteur du gène *AtWOX5* dans une racine « protéoïde-like hairy root »

Figure 2.4 : Etude de l'expression de *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like*, deux gènes de lupin blanc homologues de *AtWOX5*

Figure 2.5 : Production de racines de lupin sur-exprimant les gènes *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like* par transformation hairy root

Figure 2.6 : Phénotypes des racines « protéoïde-like hairy root » contrôles et sur-exprimant *LaWOX5.1-like* ou *LaWOX5.2-like*

Figure 2.7: Ratio aire/longueur des rootlettes de racines « protéoïde-like hairy root » contrôles et sur-exprimant *LaWOX5.1-like* ou *LaWOX5.2-like*

Figure 2.8: Etude par RT-qPCR de l'expression de deux gènes de lupin homologues de gènes d'*A. thaliana* impliqués dans le maintien du méristème

Figure 2.9 : Isolement d'un mutant EMS à rootlettes longues

Figure 2.10 : Phénotypes de différents mutants mis en évidence lors du crible génétique

Chapitre 3

Figure 3.1 : Image d'une racine protéoïde de lupin blanc présentant quelques « Longues Rootlettes »

Figure 3.2 : Comparaison anatomique entre une « Longue Rootlette » (LR) et une « Normale Rootlette » (NR)

Figure 3.3 : Etude anatomique des apex d'une racine protéoïde, d'une « Longue Rootlette » (LR) et d'une « Normale Rootlette » (NR)

Figure 3.4 : Etude tissulaire de l'apex de différentes « Longues Rootlettes »

Figure 3.5 : Analyse du jeu de données transcriptomiques nommé « Longues Rootlettes »

Figure 3.6 : Diagramme à points représentant les différents processus biologiques enrichis parmi les gènes différentiellement exprimés et négativement régulés dans la condition LR vs NR et la condition TIP vs NR

Figure 3.7 : Diagramme à points représentant les différents processus biologiques enrichis parmi les gènes différentiellement exprimés et positivement régulés dans la condition LR vs NR et la condition TIP vs NR

Figure 3.8 : Réseau de gènes d'*A. thaliana* homologues aux facteurs de transcription de lupin blanc positivement régulés dans la condition LR vs NR et la condition TIP vs NR

Figure 3.9 : Intégration des 3 gènes codant pour les peptides Root Meristem Growth Factor (RGFs) dans le réseau de gènes d'*A. thaliana* homologues aux facteurs de transcription de lupin blanc positivement régulés dans la condition LR vs NR et la condition TIP vs NR

Figure 3.10 : Profil d'expression de *LaRGF2-like*

Figure 3.11 : Impact de la sur-expression du gène *LaRGF2-like* sur l'expression de différents gènes impliqués dans le maintien du méristème

Figure 3.12 : Phénotypes racinaires résultant de la sur-expression du gène *LaRGF2-like* dans des racines « hairy-root »

Figure 3.13 : Etude tissulaire de l'apex de racines sur-exprimant le gène *LaRGF2-like* et de racines contrôles 35S::GUS

Discussion et perspectives

Figure d.1 : La transition développementale des rootlettes

Figure d.2 : Schéma hypothétique de la régulation de l'activité méristématique des rootlettes par le gène *LaRGF2-like*

Annexes

Table 1 : Qualité des ARNs et du séquençage des échantillons du jeu de données transcriptomiques « Longues rootlettes »

Table 2 : Les 50 gènes les plus sous-exprimés dans la condition LR comparé à la condition NR

Table 3 : Les 50 gènes les plus sous-exprimés dans la condition TIP comparé à la condition NR

Table 4 : Les 50 gènes les plus sur-exprimés dans la condition LR comparé à la condition NR

Table 5 : Les 50 gènes les plus sur-exprimés dans la condition LR comparé à la condition NR

Table 6 : Liste des facteurs de transcription sous-exprimés dans les conditions LR et TIP comparé à la condition NR avec un LogFC < -4

Table 7 : Liste des facteurs de transcription sur-exprimés dans les conditions LR et TIP comparées à la condition NR avec un LogFC > 4

Table 8 : Liste des amorces utilisées pour les expériences de qPCR

Introduction générale

Les plantes sont des organismes remarquables, capables de s'adapter aux contraintes imposées par leur environnement. Leur caractère autotrophe leur confère la capacité de synthétiser leur propre matière organique via les processus de photosynthèse et de nutrition minérale. Ancrées à leur substrat par leurs racines, la ramification de ces structures permet aux plantes d'explorer le sol afin de s'approvisionner en eau et en nutriments essentiels à leur développement. Les racines sont aussi nécessaires aux multiples interactions entre la plante et les micro-organismes présents dans la rhizosphère. Pour faire face aux nombreuses variations hydriques et nutritionnelles de leur milieu, les végétaux modifient l'architecture de leur système racinaire. Cet état de l'art décrit le lien étroit entre la fantastique plasticité du système racinaire et la nutrition de la plante.

1. Développement et plasticité du système racinaire

Le système racinaire est formé d'une racine primaire sur laquelle émergent les racines latérales ou racines secondaires. La racine primaire est mise en place durant l'embryogénèse via la formation d'un méristème apical racinaire (MAR) primaire, puis le système racinaire se développe tout au long du stade post-embryonnaire (Perilli et al., 2012). On retrouve un MAR à l'extrémité de chaque racine, ayant pour rôle d'assurer la croissance de celle-ci. Chez la plante modèle *A. thaliana*, la racine primaire est organisée en 4 zones distinctes ayant chacune une activité cellulaire particulière : (i) la zone méristématique, (ii) la zone de transition, (iii) la zone d'élongation et (iv) la zone de différenciation (Figure i.1A) (Verbelen et al., 2006).

1.1 La zone méristématique

La zone méristématique ou méristème apical racinaire (MAR), représente un réservoir de cellules non-différenciées en constant renouvellement, à l'origine du développement indéterminé de la racine.

1.1.1 La coiffe

Le MAR est physiquement protégé par la coiffe racinaire, permettant à la racine de pénétrer dans le sol sans endommager les précieuses cellules de son méristème. La coiffe est parallèlement impliquée dans la perception, la transduction et la transmission du stimulus gravitropique grâce aux statolithes présents dans les statocytes de la columelle (Blancaflor et

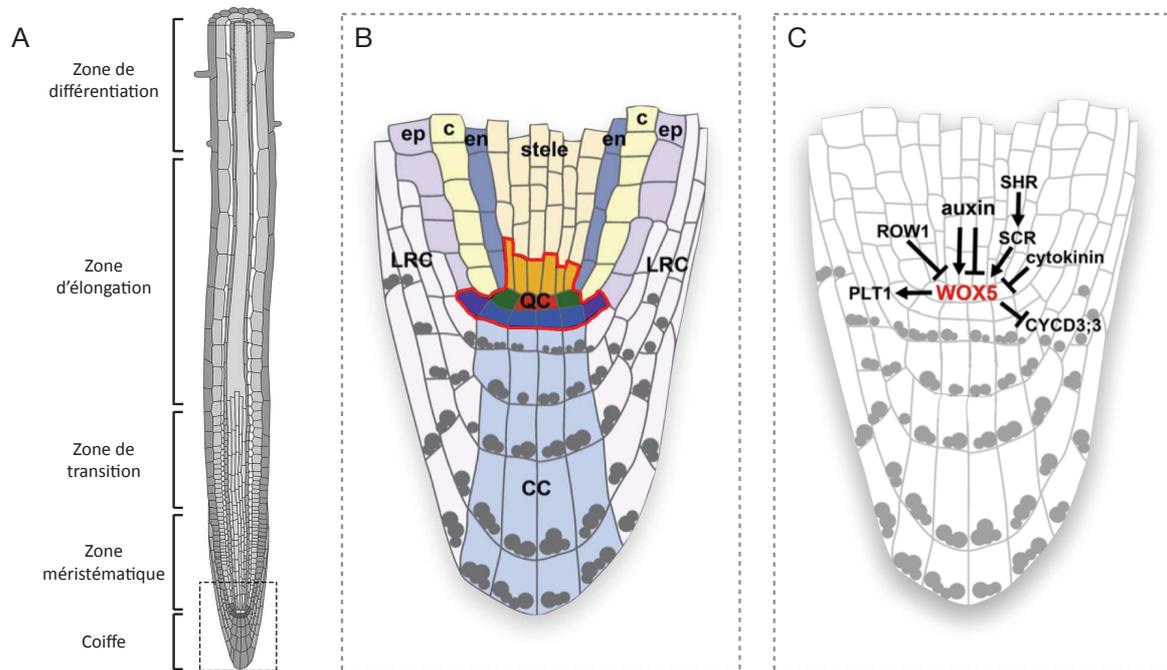


Figure i.1 : Organisation de la racine primaire et de son méristème chez *A. thaliana*. (A) La racine primaire d'*A. thaliana* est divisée en 4 zones développementales : (i) la zone méristématique contenant le MAR, protégée par la coiffe ; (ii) la zone de transition préparant les cellules à leur expansion ; (iii) la zone d'élongation où les cellules s'allongent rapidement et (iv) la zone de différenciation, caractéristique de l'apparition des poils absorbants (Schéma modifié d'après Rodríguez-Alonso et al., 2018). (B) Organisation et présentation des différents types cellulaires du MAR. Entourée en rouge, la niche de cellules souches contenant le centre quiescent (rouge) ainsi que les cellules initiales (i) du cortex et de l'endoderme (vert) ; (ii) de la stèle (orange) ; (iii) de la coiffe latérale et de l'épiderme (violet) et (iv) de la columelle. Ep : épiderme ; C : cortex ; LRC : coiffe latérale ; CC : cellules de la columelle. Les ronds gris correspondent aux grains d'amidon (Schéma modifié d'après Drisch and Stahl, 2015). (C) Schéma de la régulation moléculaire et hormonale du méristème, impliquant la régulation du gène central *WOX5*. Les flèches indiquent les régulations positives et les flèches barrées indiquent les régulations négatives (Schéma modifié d'après Drisch and Stahl, 2015).

al., 1998; Iijima et al., 2008). La taille exacte et la morphologie des coiffes racinaires varient selon les espèces mais une structure générale en deux parties est conservée : (i) la columelle, qui occupe la partie centrale, composée de cellules sans activité mitotique, et (ii) la coiffe latérale qui l'entoure (Dolan et al., 1993). Les cellules de la columelle et de la coiffe latérale sont constamment 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). L'équilibre entre la différenciation et la maintenance des cellules souches de la coiffe est médiée par plusieurs facteurs de transcriptions, notamment la famille des NO APICAL MERISTEM (NAC). Ainsi, *FEZ* et *SOMBRERO (SMB)* codent pour des protéines nucléaires NAC et jouent un rôle antagoniste dans le programme développemental de la coiffe. Le gène *FEZ* est exprimé dans les cellules souches et les cellules filles en découlant, où il stimule les divisions périclinales des cellules de la coiffe latérale ainsi que celles des cellules souches de la columelle. Quant à *SMB*, il est accumulé dans les cellules de la coiffe en maturation, où il favorise la détermination des cellules filles. Une boucle de rétrocontrôle mise en place par les deux acteurs permet de réguler la fréquence de division des cellules de la coiffe. En effet, *FEZ* active l'expression de *SMB* dans les cellules souches filles tandis que *SMB* régule négativement l'activité de *FEZ* (Willemsen et al., 2008). Deux autres facteurs de transcription de type NAC et homologues proches de *SMB*, *BEARSKIN1 (BRN1)* et *BRN2*, ont également été identifiés comme agissant de manière redondante avec *SMB* afin de réguler la différenciation des cellules et favoriser la maturation de la coiffe (Bennett et al., 2010).

1.1.2 La structure du MAR

Chez *A. thaliana*, les cellules initiales présentes dans le MAR fournissent les différentes assises cellulaires permettant la formation des multiples couches cellulaires de la racine. Les cellules initiales entourent un petit groupe de cellules organisatrices, le centre quiescent, dont l'activité mitotique est quasi-inexistante. Le centre quiescent et les cellules initiales forment ensemble la niche de cellules souches et ont pour rôle de maintenir un équilibre entre la prolifération de nouvelles cellules et la différenciation de celles-ci. Cet auto-maintien de la niche de cellules souches permet ainsi la constante croissance de la racine (Figure i.1B) (van den Berg et al., 1995; van den Berg et al., 1997).

1.1.3 Le réseau de gènes impliqués dans l'auto-maintien du MAR

L'équilibre entre prolifération et différenciation cellulaire est maintenu par un réseau de gènes impliquant plusieurs facteurs de transcription (Figure i.1C). Ce réseau s'articule autour d'un facteur de transcription en particulier : WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN BOX5 (*WOX5*), facteur de transcription de type homeobox, spécifiquement exprimé dans le centre quiescent (Sarkar et al., 2007). *WOX5* possède un rôle central dans le maintien du pool de cellules souches puisqu'il réprime localement la division cellulaire des cellules du centre quiescent via la régulation négative de la kinase cycline-dépendante *CYCD3;3* (Forzani et al., 2014). *WOX5* est confiné dans le centre quiescent par REPRESSOR OF WUSCHEL1 (*ROW1*), qui réprime sa transcription dans les cellules extérieures au centre quiescent ainsi que dans le méristème proximal via des mécanismes épigénétiques (Han and Zhu, 2009; Zhang et al., 2015). La protéine *WOX5* est également impliquée dans la maintenance de la columelle. En effet, *WOX5* a la capacité de se déplacer du centre quiescent vers les cellules souches de la columelle où il va directement réprimer l'expression du facteur de transcription CYCLING DOF FACTOR 4 (*CDF4*). *CDF4* promeut la différenciation des cellules, et sa répression va permettre de créer un gradient d'expression contraire à celui de *WOX5*, où *CDF4* n'est (i) pas exprimé dans le centre quiescent, (ii) peu exprimé dans les cellules souches de la columelle et (iii) fortement exprimé dans les cellules différenciées de la columelle. L'opposition de ces deux gradients permet ainsi le maintien de la columelle (Pi et al., 2015). D'autres acteurs comme les facteurs de transcription de la famille des GRAS : SHORTROOT (*SHR*) et SCARECROW (*SCR*) sont nécessaires au maintien du MAR et particulièrement à la formation des tissus du cortex et de l'endoderme (Sabatini et al., 2003). *SHR* est produite dans la stèle des racines chez *A. thaliana*, et va se déplacer vers le centre quiescent afin d'activer l'expression de *SCR*, induisant ainsi la régulation positive de *WOX5* (Sarkar et al., 2007). De même, les membres de la famille multigénique des *PLETHORA* (*PLT*) jouent un rôle essentiel dans le développement des MAR. En particulier, les facteurs de transcription *PLT1* et *PLT3* forment des complexes avec les facteurs de transcription *SCR* et TCP (Théosinte-branched cycloidea PCNA), et se fixent directement sur le promoteur de *WOX5* afin de permettre sa régulation positive (Shimotohno et al., 2018). Parallèlement, l'activité de *WOX5* régule elle aussi l'expression de *PLT1* de manière indirecte (Ding and Friml, 2010; Burkart et al., 2019; Pardal and Heidstra, 2021).

1.1.4 L'auxine et la cytokinine contrôlent les facteurs de transcriptions impliqués dans l'auto-maintien du MAR

L'auxine (indole-3-acetic acid, IAA) possède un rôle essentiel dans le maintien du pool de cellules souches. Souvent décrite comme l'hormone régulatrice de la croissance des plantes, elle est distribuée de manière non homogène dans l'apex racinaire, avec une accumulation dite « maximum d'auxine » dans la région du centre quiescent et des cellules initiales de la columelle de la racine primaire (Sabatini et al., 1999). Ce gradient d'auxine est mis en place dès l'embryogénèse pour permettre l'initiation du méristème racinaire primaire, médié par l'expression des gènes *AUX/LAXs* et *PIN-FORMED (PIN)*, respectivement transporteurs d'influx et d'efflux d'auxine (Jiang and Feldman, 2002; Friml et al., 2003). Lors de la croissance de la racine primaire, les PINs jouent un rôle essentiel dans la régulation de la division, de l'élongation et de la différenciation cellulaire en contrôlant les flux d'auxine qui eux même induisent l'expression des facteurs de transcriptions PLTs, créant un gradient d'expression suivant la répartition de l'auxine dans le MAR (Blilou et al., 2005). Ce gradient d'expression des PLTs permet le maintien de la niche de cellule souche dans le MAR, mais aussi la différenciation des cellules dans les zones proximales. (Galinha et al., 2007). La phytohormone cytokinine présente souvent un rôle antagoniste à l'auxine. Par exemple, dans le MAR, l'expression de *WOX5* est modulée par l'auxine et les cytokinines et participe ainsi à l'établissement d'un maximum d'auxine dans l'apex racinaire (Gonzali et al., 2005; Drisch and Stahl, 2015).

1.1.5 L'implication des peptides dans les processus développementaux de la racine

Les peptides régulateurs représentent une classe de petites molécules de signalisation permettant des régulations non cellule-autonome. Leur implication dans le développement des parties aériennes a été largement décrite (Fukuda and Higashiyama, 2011), ainsi que dans le contrôle de la nodulation (Laffont et al., 2020). Par homologie de domaines, plusieurs familles de peptides régulateurs ont été mis en évidence comme impliqués dans des processus développementaux de la racine : (i) La famille de peptides CLE, possédant un domaine

conservé en C-terminal de 12 à 14 acides aminés appelé CLE motif (Cock and McCormick, 2001), (ii) la famille des peptides C-terminally encoded peptide (CEP), possédant un domaine conservé de 15 acides aminés, avec 2 résidus prolines pouvant être hydroxylés (Ohyama et al., 2008), et (iii) la famille de peptides root meristem growth factor (RGF), aussi connus sous le nom de golven (GLV) ou encore CLE-like (CLEL), possédant un domaine conservé de 14 acides aminés avec un motif de sulfatation tyrosine Asp-Tyr (Matsuzaki et al., 2010; Meng et al., 2012; Whitford et al., 2012).

1.1.5.1 L'implication des peptides CLE dans le maintien du MAR

CLE40, le plus proche homologue de *CLAVATA3 (CLV3)*, régulateur de l'homéostasie du méristème caulinaire et du nombre d'organe floral (Hirakawa, 2021), a été décrit comme impliqué dans la maintenance du centre quiescent et de l'identité des cellules souches de la columelle (Stahl et al., 2009). Les mutants perte de fonction *cle40* possèdent des racines courtes, avec des apex irréguliers résultant d'un retard de différenciation des cellules de la columelle. Il a été décrit que l'interaction entre *CLE40* et les deux récepteurs kinases *ARABIDOPSIS CRINKLY4 (ACR4)* et *CLAVATA1 (CLV1)* régule l'expression de *WOX5* afin de maintenir l'identité des cellules souches de la columelle (Stahl et al., 2009).

1.1.5.2 L'implication des peptides CEP dans le maintien du MAR

Les peptides de la famille des CEP sont impliqués dans le développement du méristème racinaire. Notamment, la sur-expression de *CEP1* ou bien l'application exogène de ce peptide entraîne un arrêt de la croissance de la racine primaire, résultant d'une répression des divisions cellulaires de la zone méristématique sans que le centre quiescent ne soit affecté (Ohyama et al., 2008).

1.1.5.3 Les multiples rôles des peptides RGFs/GLVs/CLELs

Décrits par 3 groupes de scientifiques différents, ces peptides portent le nom de RGFs/GLVs/CLELs (Table 1) (Matsuzaki et al., 2010; Meng et al., 2012; Whitford et al., 2012). Dans le but de faciliter la compréhension et la rédaction, ces petits peptides seront appelés

AGI code	Whitford <i>et al.</i> (2012)	Matsuzaki <i>et al.</i> (2010)	Meng <i>et al.</i> (2012)
At4g16515	<i>GLV1</i>	<i>RGF6</i>	<i>CLEL6</i>
At5g64770	<i>GLV2</i>	<i>RGF9</i>	<i>CLEL9</i>
At3g30350	<i>GLV3</i>	<i>RGF4</i>	–
At3g02240	<i>GLV4</i>	<i>RGF7</i>	<i>CLEL4</i>
At1g13620	<i>GLV5</i>	<i>RFG2</i>	<i>CLEL1</i>
At2g03830	<i>GLV6</i>	<i>RGF8</i>	<i>CLEL2</i>
At2g04025	<i>GLV7</i>	<i>RGF3</i>	<i>CLEL3</i>
At3g02242	<i>GLV8</i>	–	<i>CLEL5</i>
At5g15725	<i>GLV9</i>	–	–
At5g51451	<i>GLV10</i>	<i>RGF5</i>	<i>CLEL7</i>
At5g60810	<i>GLV11</i>	<i>RGF1</i>	<i>CLEL8</i>
AT1G66145	–	–	<i>CLE18</i>

Table i.1 : Récapitulatif de la nomenclature associée aux peptides GLVs/RGFs/CLEL. Ce tableau récapitule les différentes nomenclatures associées aux gènes *RGFs* d'*A. thaliana* identifiés et décrits par 3 équipes de recherches différentes (Fernandez et al., 2013b). (-) indique que le gène n'a pas été pu être associé.

RGFs au cours de mes travaux de thèse.

Afin de permettre leur activité, les protéines précurseurs des RGFs sont modifiées post-traditionnellement par clivage protéolytique (Matsuzaki et al., 2010; Meng et al., 2012; Whitford et al., 2012). En effet, on distingue dans les protéines précurseurs RGFs 2 domaines conservés séparés par une région variable : un domaine N-terminal de 21 à 33 acides aminés contenant le peptide signal permettant donc à la protéine d'être adressée à la voie de sécrétion, et un domaine C-terminal de 13 à 16 acides aminés contenant un motif conservé chez tous les membres de la famille RGFs, et codant pour le peptide mature qui sera actif une fois clivé (Figure i.2A) (Matsuzaki et al., 2010; Meng et al., 2012; Whitford et al., 2012). Une sulfatation post-traductionnelle d'un résidu Tyrosine (Tyr) présent dans le domaine C-terminal et médiée par la tyrosylprotein sulfotransferase (TPST) est nécessaire à l'activité de plusieurs peptides matures (Matsuzaki et al., 2010; Whitford et al., 2012). Par ailleurs, des mutations de cette enzyme entraînent de forts phénotypes de perturbation de la croissance racinaire, notamment une forte réduction de la taille du méristème, ainsi qu'une perte de la coordination entre l'élongation et la différenciation des cellules (Matsuzaki et al., 2010).

Chez la plante modèle *A. thaliana*, la famille des peptides de signalisation RGFs code pour 11 gènes, dont 9 présentent une activité dans la racine primaire. Ces 9 RGFs ont été classifiés en 3 groupes différents, certains gènes pouvant être assignés à plusieurs groupes selon la localisation de leur expression tissulaire : (i) *RGF2/GLV5*, *RGF3/GLV7*, *RGF5/GLV10* et *RGF1/GLV11* sont exprimés dans le centre quiescent et/ou dans les cellules de la columelle ; (ii) *RGF4/GLV3*, et *GLV9* dans la zone située juste au-dessus du centre quiescent, *GLV6* est transcrit dans les deux domaines (i) et (ii), et (iii) *RGF7/GLV4* et *GLV8* sont exprimés seulement dans la zone au-dessus du méristème (Figure i.2B) (Fernandez et al., 2013b).

1.1.5.4 L'implication des peptides RGFs/GLVs/CLEs dans le maintien du MAR

L'expression *RGF2/GLV5* et *RGF3/GLV7* est localisée dans les cellules de la columelle (Figure i.2.C et 2.D), tandis que *RGF1/GLV11* est spécifiquement exprimé dans les cellules du centre quiescent ainsi que les cellules initiales de la columelle (Figure i.2E) (Fernandez et al., 2013a). Aucun phénotype particulier n'est observé par la simple mutation de l'un de ces trois

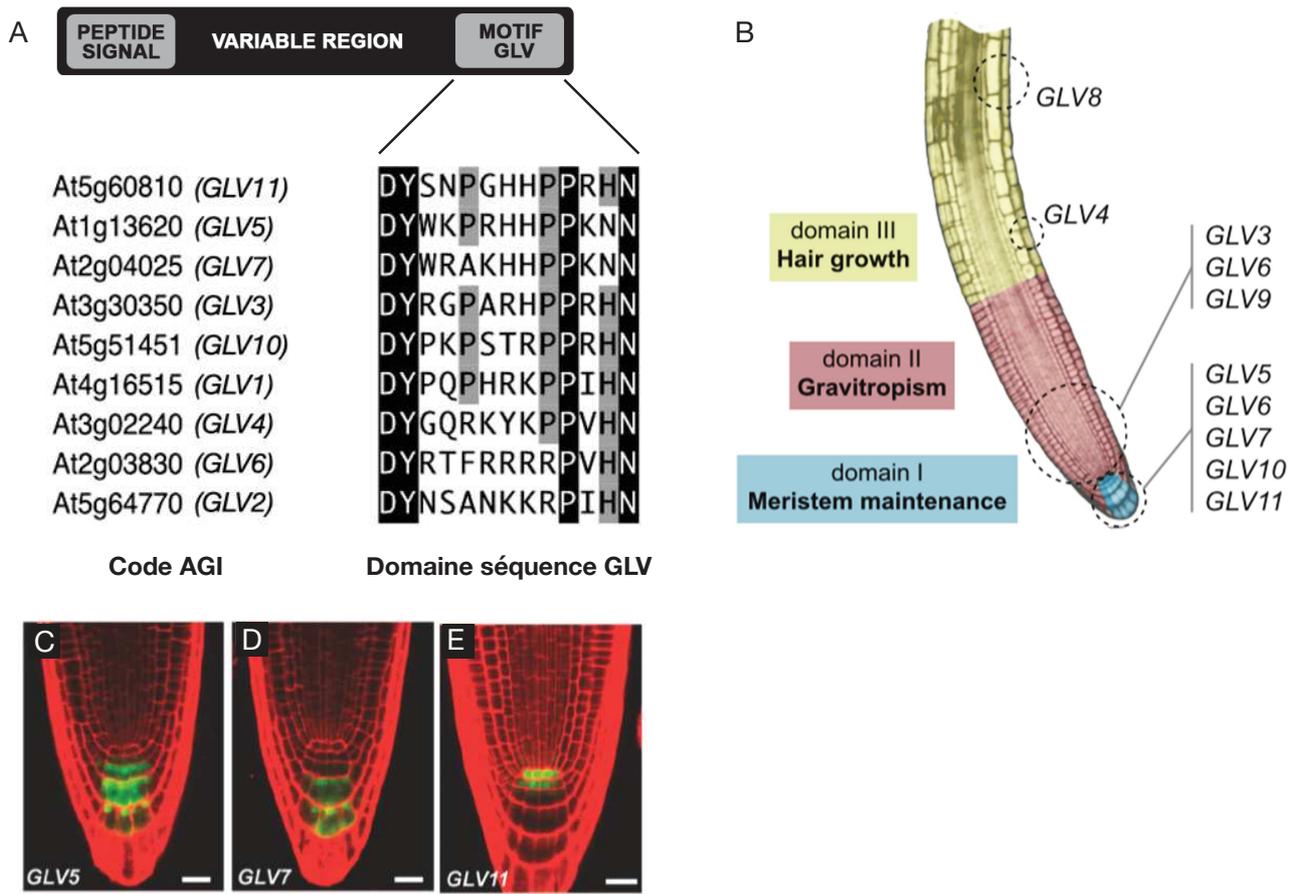


Figure i.2 : Rôles des peptides RGFs/GLVs/CLELs dans le développement racinaire. (A) Les RGFs/GLVs/CLELs possèdent 2 domaines conservés entourant une région variable. Le domaine N-terminal contient le peptide signal permettant d'adresser la protéine à la voie de sécrétion. Le domaine C-terminal contient un motif conservé, caractéristique des membres de la famille des RGFs/GLVs/CLELs. Ce domaine, une fois clivé, code pour le peptide mature (Schéma modifié d'après (Matsuzaki et al., 2010; Fernandez et al., 2013b)). (B) Les peptides RGFs/GLVs/CLELs sont exprimés dans des zones spécifiques de la racine primaire et sont impliqués dans 3 domaines d'activités différents : (i) la maintenance du méristème ; (ii) le gravitropisme et (iii) la croissance des poils absorbants (Fernandez et al., 2013b). (C) Localisation tissulaire de l'expression de 3 RGFs/GLVs/CLELs exprimés dans le MAR : RGF2/GLV5, RGF3/GLV7 et RGF1/GLV11 (Fernandez et al., 2013b). Echelle C-E : 20 μ m.

gènes. Cependant, la triple mutation *rgf1 rgf2 rgf3* entraîne une réduction de la longueur de la racine primaire, caractérisée par une diminution des cellules méristématiques (Matsuzaki et al., 2010). Une application externe de RGF1 permet de restaurer le phénotype sauvage et indique donc que ces gènes sont impliqués dans la régulation de l'activité méristématique de manière redondante. Ces gènes maintiennent le pool de cellules souches en régulant positivement transcriptionnellement et post-transcriptionnellement le niveau et le pattern d'expression de *PLT1* et *PLT2* (Matsuzaki et al., 2010). Il est intéressant de noter que l'auxine stimule l'expression du gène codant pour l'enzyme de sulfatation TPST, qui va ainsi induire l'activation des RGFs et donc la transcription des gènes *PLT1* et *PLT2*, elle-même dépendante de facteurs de transcriptions auxin-responsive-factors (ARF) (Aida et al., 2004; Zhou et al., 2010).

1.2 La zone de transition

Après avoir quitté la zone méristématique, les cellules traversent une zone de transition avant d'entreprendre leur élongation et leur différenciation. Dans cette zone de transition, les cellules ex-méristématiques initient lentement leur expansion en longueur et en largeur. Les cellules présentes au début de la zone de transition conservent leur capacité de division tandis que les cellules se trouvant à la fin de cette zone sont prêtes à entreprendre le début de leur rapide élongation (Verbelen et al., 2006). Les hormones végétales cytokinine et auxine jouent des rôles antagonistes pour permettre de maintenir l'équilibre entre division et différenciation cellulaire grâce à une boucle de rétrocontrôle moléculaire. En effet, chez *Arabidopsis*, les facteurs de transcription de type B Response regulators of *Arabidopsis*, ARR1 et ARR23 sont induit par les cytokinines, et entraînent (i) une inhibition des transporteurs d'auxine PINs en activant la transcription d'un répresseur du signal d'auxine SHORT HYPOCOTYL2 (SHY2) (Moubayidin et al., 2010) et (ii) la dégradation de l'auxine en régulant positivement l'expression du gène GH3.17 impliqué dans l'homéostasie de l'auxine (Di Mambro et al., 2017). Cette régulation de la distribution d'auxine mène à la différenciation des cellules et donc à une réduction de la taille du méristème. Parallèlement, l'auxine maintient la croissance du MAR en dégradant la protéine SHY2, permettant ainsi de réguler l'activité des gènes PINs et donc la division cellulaire (Ioio et al., 2008). Cette boucle de rétrocontrôle crée un minimum d'auxine au niveau de la zone de transition, permettant ainsi d'établir la position de ce gradient mais aussi de diriger les cellules méristématique vers la zone d'élongation (Di Mambro et al., 2017).

1.3 La zone d'élongation

En quittant la zone de transition, les cellules subissent une rapide élongation où, en moins de 3h, leur longueur va jusqu'à quadrupler (Verbelen et al., 2006). Les cellules présentes dans la zone d'élongation sont facilement reconnaissables par leur forme allongée et rectangulaire, et la formation rapide de la vacuole poussant ainsi le noyau sur le côté de la paroi. L'extension des parois cellulaires peut être inhibée par l'accumulation d'éthylène de manière concentration-dépendante (Smalle and Van Der Straeten, 1997). En effet, lorsque les plantes sont exposées à de grandes quantités d'éthylène ou du précurseur de la synthèse d'éthylène 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), on observe une réduction de la longueur des cellules, mais aussi l'induction de la formation des poils absorbants témoignant de la différenciation des cellules (Le et al., 2001). Par ailleurs, la formation d'un renflement indiquant l'initiation de la formation du poil absorbant marque la frontière entre la zone d'élongation et la zone de différenciation.

1.4 La zone de différenciation

Dans la zone de différenciation, les cellules ralentissent leur élongation jusqu'à atteindre leur taille finale. C'est également dans cette zone que les cellules adoptent leur rôles et fonctions, et qu'ainsi les assises cellulaires de la stèle, du cortex, de l'endoderme, du péricycle et de l'épiderme sont définies. Cette zone est caractérisée par le développement d'extensions cylindriques issues de cellules de l'épiderme spécialisées : les poils absorbants. Ils ont pour rôle d'augmenter la surface d'absorption de l'eau et des éléments minéraux présents dans la rhizosphère.

Chez la plante modèle *A. thaliana*, les poils absorbants se positionnent en suivant un pattern spécifique. Ils se développent à partir de cellules épidermiques se situant dans l'espace intercellulaire entre deux cellules corticales sous-jacentes (position H pour hair cells) tandis que les cellules épidermiques situées au-dessus d'une cellule corticale ne développent pas de poils absorbants (position N pour non-hair cells). En aval, dans les trichoblastes, l'inhibition de GL2 entraîne l'expression du facteur de transcription bHLH ROOT HAIR DEFECTIVE 6 (RHD6), permettant l'initiation des poils absorbants (Masucci and Schiefelbein,

1994; Menand et al., 2007; Lin et al., 2015). RDH6 régule positivement deux alpha-expansines, EXPANSINE 7 et 8 (EXP7 et EXP8), spécifiquement exprimées dans les poils absorbants et impliquées dans l'initiation des poils absorbants et leur croissance (Cho and Cosgrove, 2002). La croissance des poils absorbants est positivement régulée par l'une des cibles directes de RHD6, le gène *ROOT HAIR DEFECTIVE-LIKE 4 (RSL4)*, qui va permettre la transcription de gènes impliqués dans l'élongation cellulaire des poils absorbants (Yi et al., 2010; Vijayakumar et al., 2016). Les hormones végétales, en particulier l'éthylène et l'auxine, jouent un rôle essentiel dans le développement des poils absorbants (Vissenberg et al., 2020). L'éthylène et l'auxine agissent en tant que régulateurs positifs, mais seul l'éthylène possède un rôle dans la spécification des cellules épidermiques, en aval, voir parallèlement de la voie TTG/GL2 (Masucci and Schiefelbein, 1996; Dolan, 2001; Cho and Cosgrove, 2002). Ces deux hormones végétales stimulent l'expression de différents gènes impliqués dans l'initiation et l'élongation des poils absorbants comme RHD6 et RSL4 (Masucci and Schiefelbein, 1994; Yi et al., 2010; Zhang et al., 2016; Feng et al., 2017).

1.5 La formation des racines latérales

Chez les angiospermes, les racines secondaires se développent à partir des tissus différenciés de la racine primaire et implique l'organogénèse de nouveaux méristèmes. Chez *A. thaliana*, l'initiation des racines latérales provient exclusivement de divisions asymétriques des cellules du péricycle situées en face des pôles de xylème (Laskowski et al., 1995; Malamy and Benfey, 1997; Dubrovsky et al., 2000), mais chez certaines légumineuses, les cellules du cortex sont également impliquées (Gallardo et al., 2019).

1.5.1 L'auxine au cœur du processus d'initiation des racines latérales

On parle d'initiation des racines latérales lorsque les cellules fondatrices entreprennent leur première division asymétrique. Ce processus est principalement régulé par l'auxine (Fukaki et al., 2007; Lavenus et al., 2013). En effet, il a été démontré chez *A. thaliana* que l'auxine régule positivement la division des cellules du péricycle (Laskowski et al., 1995; Casimiro et al., 2001; Fukaki et al., 2007). On observe dans les cellules fondatrices une accumulation (maximum) d'auxine, permettant d'induire les mécanismes moléculaires de réponse à cette hormone

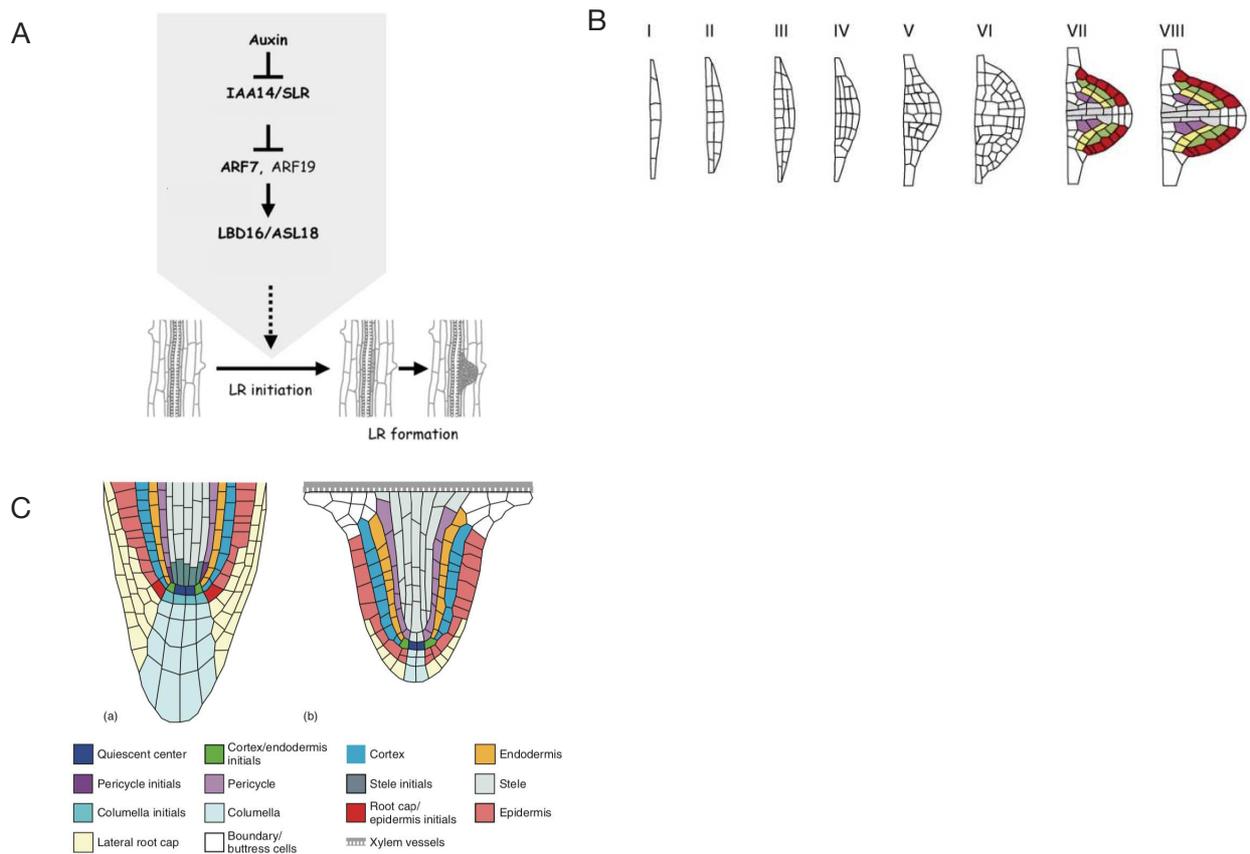


Figure i.3 : Initiation et formation des racines latérales. (A) Le module *SOLITARY-ROOT(SLR)/IAA14-ARF7/ARF19*, dépendant de l’auxine, permet l’initiation des racines latérales en activant les gènes *LBD16/ASL18* (Fukaki et al., 2002). (B) Stades développementaux de l’organogénèse du primordium de racine latérale. (I) Les cellules fondatrices du péricycle entreprennent une première division asymétrique. (II) Des divisions péricleines des cellules du péricycle forment une couche interne et une couche externe. (III-VI) La succession de divisions péricleines confère une forme de dôme au primordium Et, parallèlement, il traverse le cortex et l’endoderme. (VII-VIII) Le primordium de racine latérale est formé de lignées de cellules organisées de manière similaire à la racine primaire d’*A. thaliana* (Péret et al., 2009). (C) Schéma de l’organisation de la racine primaire d’*A. thaliana* (a) et d’un méristème de racine latérale (b). Les types cellulaires présents dans la racine primaire et dans la racine latérale sont indiqués par des couleurs associées à la légende. (Trinh et al., 2018).

végétale. Le module *SOLITARY-ROOT(SLR)/IAA14-ARF7/ARF19* induit lors de la signalisation auxinique est essentiel à l'initiation des racines secondaires (Fukaki et al., 2002). L'accumulation d'auxine déclenche la dégradation du répresseur SLR/IAA114, ce qui va entraîner la dé-répression des facteurs de transcriptions ARF7 et ARF19. Ceux-ci vont ainsi activer l'expression de leurs gènes cibles, et en particulier de LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN16 (LBD16) et ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE18 (ASL18), menant à l'initiation des racines latérales (Figure i.3A) (Fukaki et al., 2007; Okushima et al., 2007; Goh et al., 2012).

1.5.2 La mise en place d'un nouvel organe dont la structure est similaire à la racine primaire

Suite à l'initiation, le primordium de racine latérale s'organise et se développe morphologiquement avant d'émerger des tissus différenciés de la racine primaire. Basée sur des critères morphologiques, l'organogénèse du primordium a été divisée en 8 stades de développement par l'équipe de Malamy et Benfey (Figure i.3B) (Malamy and Benfey, 1997). Chez *A. thaliana* les racines latérales initient leur développement lorsqu'une, ou bien une paire, de cellules du péri-cycle dites « fondatrices » subissent plusieurs divisions asymétriques afin de mettre en place un primordium composé d'une simple couche de cellules de taille similaires (Stade I, Figure i.3B). Par la suite, les cellules entreprennent des divisions périclines, formant ainsi une couche interne et une couche externe (stade II, Figure i.3B). Après une succession de divisions périclines, le primordium adopte une forme de dôme tout en traversant les couches cellulaires de l'endoderme et du cortex (Stade III-VI Figure i.3B). Arrivé au stade VII, le primordium est organisé de manière similaire à l'apex de la racine primaire (Trinh et al., 2018), puis émerge au stade VII-VIII (Figure i.3B) (Péret et al., 2009).

1.5.3 Le mise en place d'un nouveau méristème lors de la formation des racines latérales

L'organogénèse du primordium implique la formation d'un méristème actif afin d'assurer l'élongation de la racine latérale. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la formation et du maintien du méristème sont similaires entre la racine primaire et la racine latérale (Tian et al., 2014). Il est intéressant de noter que le gène *RGF8/GLV8/CLEL2*

est exprimé dès le stade I du développement du primordium (Fernandez et al., 2013a). La sur-expression de ce gène entraîne une perturbation de la première division asymétrique, suggérant un rôle important de *RGF8/GLV8/CLEL2* dans le contrôle des premières divisions du péricycle (Fernandez et al., 2015). La fonction du gène *WOX5*, impliqué dans le maintien du pool de cellules souches dans le MAR de la racine primaire, est conservée chez la racine latérale (Hu and Xu, 2016). Dans le primordium de racine latérale, *WOX5* est exprimé à partir des stades IV/V dans 2 à 4 cellules qui composeront probablement les cellules du centre quiescent (Goh et al., 2016). Cependant, la mise en place du centre quiescent de la racine latérale n'aurait lieu qu'à partir du stade 5 malgré l'expression plus précoce de *WOX5* (Goh et al., 2016; Du and Scheres, 2017). Comme expliqué précédemment, l'expression de *WOX5* est dépendante du module *SHR-SCR* (Sarkar et al., 2007). Dans les primordia en développement, l'expression de *SCR* est nécessaire à l'activation de *SHR*, permettant ainsi la spécification du centre quiescent (Sabatini et al., 2003; Goh et al., 2016). D'autres acteurs comme les gènes de la famille des *PLTs* jouent un rôle essentiel dans la mise en place du méristème du primordium de racine latérale. *PLT3*, *PLT5* et *PLT7* sont exprimés dès le stade I du développement du primordium de la racine latérale où ils contrôlent la division asymétrique des cellules du péricycle afin de permettre la transition au stade II. Parallèlement, leur expression est indispensable à l'activation de l'expression *SHR* et *SCR* ainsi qu'à l'activation d'autres *PLTs* comme *PLT1*, *PL2* et *PLT4* (Du and Scheres, 2017). De manière comparable à la racine primaire, l'action des *PLTs* et des transporteurs d'auxine *PIN* permet la mise en place d'un gradient d'auxine (maxime d'auxine) dans l'apex de la racine latérale (Du and Scheres, 2017). A partir du stade VI, l'expression des deux gènes *FEZ* et *SMB* impliqués dans le maintien de la coiffe racinaire chez la racine primaire (Willemsen et al., 2008) peut être détectée, respectivement à la pointe du primordium ainsi que dans les cellules en contact avec le futur centre quiescent, et dans les couches externes de l'apex du primordium (Du and Scheres, 2017). Enfin, l'expression de *WER*, impliqué dans la spécification de l'épiderme (Lee and Schiefelbein, 1999), a pu être mise en évidence dans les couches qui correspondront à l'épiderme des primordia émergents de racines latérales (Du and Scheres, 2017). Ainsi, il semblerait que la niche de cellules souches soit mise en place progressivement durant la formation du primordium de racine latérale, notamment à partir de la transition entre le stade IV et le stade V. Plusieurs gènes marqueurs d'une activité méristématique sont exprimés durant la formation du primordium, suggérant la mise en place d'une organisation méristématique avant l'émergence

du primordium de racine latérale. Néanmoins, ce nouveau méristème serait actif seulement après émergence (Malamy and Benfey, 1997).

1.6 La plasticité du système racinaire face aux facteurs abiotiques : l'exemple de la croissance déterminée des Cactacées du désert de Sonora

Alors que les plantes sont soumises à une vie fixée, elles ont développé la capacité de s'adapter aux conditions fluctuantes et contrastées de leur environnement. La modification de leur système racinaire est une des nombreuses réponses adaptatives acquises par les plantes pour lutter contre les différents facteurs abiotiques tels que les sécheresses, inondations, augmentation de la température des sols ou encore salinité (Julkowska et al., 2014; Lin and Sauter, 2018; Calleja-Cabrera et al., 2020; Maurel and Nacry, 2020).

Chez certains Cactacées du désert de Sonora, une croissance déterminée de la racine primaire est observable (Dubrovsky, 1997a; Dubrovsky, 1997b). Celle-ci implique une faible croissance de la racine primaire, avant une différenciation totale de l'apex. Après 2-3 jours de croissance, la longueur du MAR de la racine primaire diminue, résultant d'un arrêt des divisions cellulaires des cellules de la zone méristématique et de leur rapide élongation et différenciation (Dubrovsky, 1997a; Dubrovsky, 1997b). En conséquence de la différenciation des cellules du MAR, on observe une différenciation du xylème jusqu'au bout de la racine ainsi que des poils absorbants recouvrant la totalité l'apex de la racine primaire (Rodríguez-Rodríguez et al., 2003). Il est intéressant de noter que cet arrêt de croissance est corrélé avec l'induction rapide du développement des racines latérales. Dans des environnements arides comme les déserts, ce type de développement est bénéfique pour les plantes afin de développer un système racinaire dans la partie haute du sol, permettant ainsi aux racines d'absorber l'eau accumulée lors des rares pluies. Bien que la croissance déterminée de la racine primaire soit constitutive, elle est stimulée par un déficit en eau et constitue une forme d'adaptation développementale et évolutive des Cactacées aux sols arides du désert (Dubrovsky, 1997b; Dubrovsky and Gómez-Lomelí, 2003; Shishkova et al., 2013). Chez certaines espèces de Cactacées, le MAR de la racine primaire est programmé pour entreprendre quelques divisions cellulaires avant de se différencier. En effet, on observe une faible activité proliférative des cellules initiales du MAR chez *Pachocereus pringlei*, et même l'absence de la mise en place d'un centre quiescent post-embryonnaire chez *Stenocereus*

gummosus, suggérant la nécessité du bon fonctionnement du centre quiescent afin de maintenir une croissance indéterminée (Rodríguez-Rodríguez et al., 2003). Une étude a notamment mis en évidence l'implication de plusieurs gènes connus pour être impliqués dans le maintien du méristème chez *A. thaliana* comme *SHR*, *SCR*, *PLT1*, et *WOX5* dans la croissance déterminée de la racine primaire de *P. pringlei* (Rodríguez-Alonso et al., 2018), ce qui souligne que les connaissances acquises chez la plante modèle *Arabidopsis* peuvent être mobilisées pour comprendre la plasticité racinaire de familles botaniques éloignées.

Dans un contexte d'appauvrissement et de dégradation anthropiques des sols, la plasticité du système racinaire des plantes permet de faire face aux variations de la disponibilité des nutriments essentiels au développement (López-Bucio et al., 2003; Lynch, 2005). La modification du système racinaire est la réponse adaptative des plantes à la carence en Pi la plus étudiée (Williamson et al., 2001; López-Bucio et al., 2002; Al-Ghazi et al., 2003; Nacry et al., 2005; Péret et al., 2014) et sera soigneusement décrite dans la deuxième partie de cette introduction.

2. Les mécanismes d'adaptation des plantes face à la carence en phosphate

Le phosphore est l'un des trois macroéléments essentiels permettant d'assurer le développement des plantes (Tiessen, 2008). Chez les plantes, il possède plusieurs rôles fondamentaux, notamment car il entre dans la composition structurale de molécules clés comme l'ADN, l'ARN, l'ATP ou encore les phospholipides. Le phosphore est également impliqué dans des processus de régulation essentiels comme les phosphorylations (Bieleski, 1973; Rychter and Rao, 2005).

2.1 Biodisponibilité du phosphate dans le sol

Malgré un rôle incontestable dans le développement des végétaux et une abondance notoire dans le sol, le phosphore représente l'élément le moins mobile et le moins biodisponible pour les plantes. On le retrouve dans le sol sous trois formes ioniques différentes : le phosphore organique, le phosphore minéral et le phosphate inorganique soluble (Pi) (Figure i4) (Plassard et al., 2015). Le Pi, correspond aux formes ioniques d'orthophosphate. L'ion $H_2PO_4^-$ est soluble dans la solution du sol et représente la seule forme

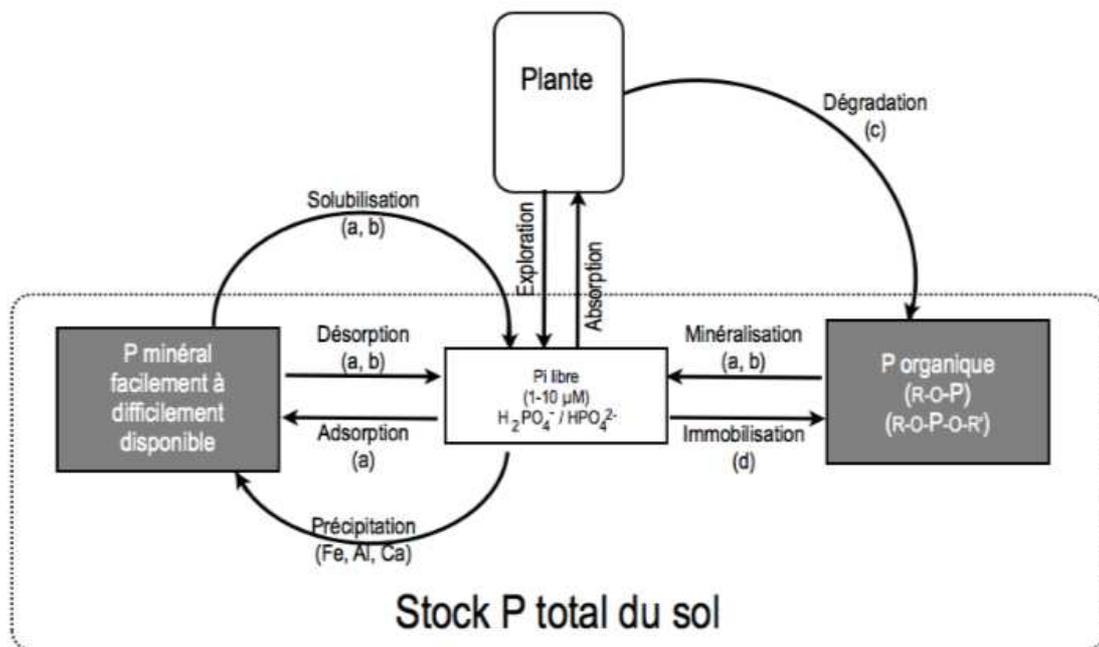


Figure i.4 : Schéma simplifié de la répartition totale du stock de phosphore (P) dans le sol. Le pool de phosphate inorganique (Pi) libre dans la solution du sol représente une fraction infime du P total dans le sol et est la seule forme assimilable par les plantes. Le stock de Pi libre peut être alimenté par (i) le pool de P minéral lors des phénomènes de désorption ou de solubilisation et/ou (ii) le pool de P organique du sol. Ces différents phénomènes sont influencés par a) les variations de pH ; b) la production d'anions organiques ; c) la production de phosphatases ou de phytases et d) l'immobilisation de P dans la fraction microbienne du sol. (Plassard et al., 2015).

assimilable par les plantes (Bielecki, 1973; Schachtman et al., 1998). Alors que le phosphate organique représente 20 à 80% du phosphate total dans le sol, la concentration d'ions orthophosphates libres dans la solution du sol est infime (de 0,1 à 10 μM) (Hinsinger, 2001). La faible biodisponibilité et mobilité du Pi sont liées à sa forte réactivité aux nombreux constituants du sol, notamment au calcium, fer ou encore aluminium (McLaughlin et al., 1981). La complexation du Pi aux différentes particules du sol entrave drastiquement sa solubilité et entraîne une forte rétention de celui-ci dans le sol, ce qui représente un facteur limitant majeur pour le développement des plantes.

2.2 La carence en phosphate : des enjeux économiques et écologiques

Afin de pallier aux carences induites par le manque de solubilité du Pi, l'application de fertilisants minéraux contenant du phosphate est devenue incontournable dans l'agriculture conventionnelle. Néanmoins, l'apport de fertilisants phosphatés peut, d'une part, contribuer à l'épuisement des ressources en phosphore qui sont des ressources non renouvelables et, d'autre part, conduire à une eutrophisation des milieux aquatiques.

2.2.1 Le cycle du phosphore

Le cycle biogéochimique du phosphore représente l'ensemble des échanges de phosphore sur la planète. Il se distingue des autres cycles par l'absence de composante gazeuse significative impliquant des processus atmosphériques. Le cycle du phosphore est dit sédimentaire, car la majorité du phosphore provient d'échanges entre les continents et les océans, principalement de l'érosion de roches sédimentaires. Il se déroule en 4 processus principaux : (i) le soulèvement tectonique de la roche mère permettant l'exposition de roches riches en phosphore, issues de la lithification de sédiments principalement marins ; (ii) l'érosion physique (action de la pluie et du vent) et chimique (décomposition chimique des roches) des roches exposées de la lithosphère, entraînant la dissolution de particules de phosphore dans les rivières tandis qu'une partie est absorbée par les végétaux sous forme de phosphate ; (iii) le transport fluvial du phosphore jusqu'aux lacs et océans et (iv) la sédimentation du phosphore au fond des plans d'eau, associés à des matières organiques et

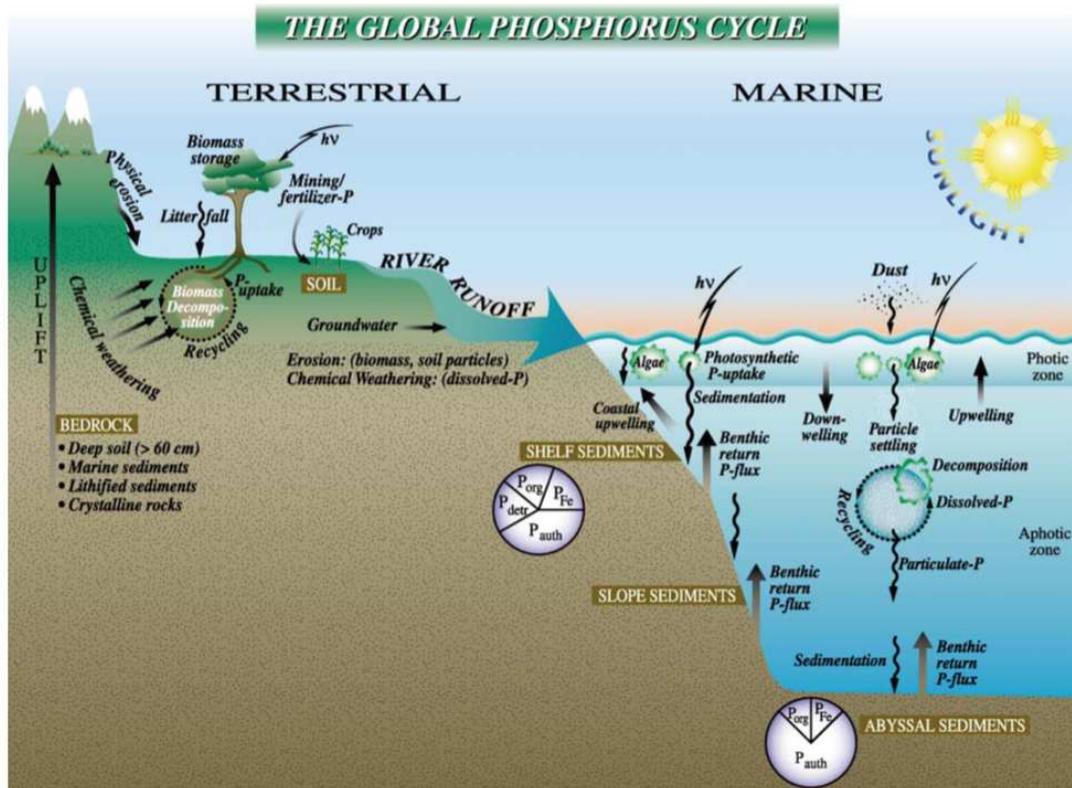


Figure i.5 : Le phosphate dans le sol. Schéma du cycle biogéochimique du phosphore représentant les échanges de phosphore sur terre. Il se déroule en 4 processus : (i) L'exposition de roches riches en phosphore provenant de sédiments principalement marins ; (ii) l'érosion de ces roches permettant la dissolution de particules de phosphore dans les rivières ; (iii) le transport dans les eaux du phosphore jusqu'aux lacs et océans et (iv) la sédimentation du phosphore au fond des plans d'eau (Ruttenberg, 2003).

minérales, entraînant l'enterrement de ces sédiments qui, après quelques millions d'années, formeront des roches riches en phosphore par lithification (Figure i.5) (Ruttenberg, 2003).

2.2.2 Le phosphore en tant que ressource non renouvelable

Dans un contexte d'augmentation constante de la population sur terre, les demandes en engrais phosphatés ont nettement augmenté au cours des 50 dernières années. Ces fertilisants sont composés de phosphate extrait de roches phosphatées, résultant de millions d'années de dépôts sédimentaires, souvent d'origine océanique, et fortement concentrés en phosphate (Filippelli, 2011). La roche phosphatée constitue donc une ressource non-renouvelable sur laquelle dépend la fertilité des sols exploités et a donc fait l'objet d'extractions massives, menant à un appauvrissement sans retour des réserves mondiales (Cordell et al., 2009). Ces réserves, faisant référence aux mines de phosphates, sont localisées et contrôlées par peu de pays (principalement le Maroc, la Chine et les Etats-Unis) et se retrouvent donc au cœur de conflits politiques et socio-économiques délicats (Rosmarin, 2004).

2.2.3 Le phosphore au cœur d'une polémique environnementale

La nécessité d'approvisionner les cultures en nutriments adéquates pour assurer une récolte fructueuse entraîne une utilisation excessive d'engrais commerciaux riches en phosphate, le plus souvent dépassant les besoins nécessaires des plantes en question (Carpenter et al., 1998). Les activités humaines, et notamment ces apports extensifs en fertilisants, entraînent une modification du cycle naturel du phosphore (Bennett et al., 2001). Lorsque les engrais phosphatés sont apportés aux sols, seule une petite fraction du Pi est disponible pour les plantes, car sa forte réactivité rend la majeure partie insoluble (Sample et al., 1980). La quantité de phosphore restante est appelée phosphore résiduel et contribue à un excès de cet élément dans la partie supérieure du sol. L'érosion des sols entraîne le lessivage du phosphore, qui est transporté jusqu'aux cours d'eau. Cet enrichissement démesuré de l'eau en phosphore provoque la prolifération d'algues et de phytoplanctons, entraînant l'épuisement de l'oxygène présent dans l'eau : c'est l'eutrophisation. L'eutrophisation des réservoirs d'eau peut entraîner des changements considérables, allant de la dégradation de la

qualité de l'eau jusqu'à la perte des espèces composant l'écosystème en question (Smith et al., 1999).

2.3 Les mécanismes d'adaptation des plantes à la carence en Pi

Nous avons précédemment pu voir que les fertilisants phosphatés ne constituent pas une solution durable pour les besoins croissants de l'agriculture (Tilman, 1999). Ces dernières années, l'attention s'est donc focalisée sur l'incroyable capacité des plantes à créer des associations symbiotiques, et à adapter structurellement et fonctionnellement leur système racinaire face à la carence en Pi. En effet, l'amélioration de celles-ci constituerait une solution pérenne, et moins polluante.

2.3.1 La symbiose mycorhizienne améliore l'acquisition de Pi chez les plantes

Le Pi étant un facteur limitant dans la croissance des plantes, celles-ci ont donc évolué de manière à développer des stratégies adaptatives leur permettant de lutter contre cette carence. L'une des stratégies concerne la formation de symbioses mutualistes en interaction avec les champignons mycorhiziens ectomycorhizien et endomycorhizien (Tatry et al., 2009). Plus de 80% des plantes à fleurs peuvent être colonisées par des champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA), et les étapes du processus de colonisation sont exhaustivement décrites (Harrison, 1997; Smith et al., 1998; Smith and Read, 2010). Le CMA se nourrit du carbone fournit par la plante, et en échange permet à la plante d'améliorer son acquisition de Pi. La contribution du CMA à l'acquisition du Pi par les plantes peut aller d'un faible pourcentage jusqu'à la quasi-totalité du Pi absorbé et implique 3 transporteurs de Pi à haute affinité, GvPT, GiPT et GmosPT, issus respectivement de 3 champignons différents *Glomus versiforme*, *G. intraradices* and *G. mosseae* (Harrison and van Buuren, 1995; Maldonado-Mendoza et al., 2001; Smith et al., 2003; Benedetto et al., 2005). Parallèlement, il est intéressant de noter que l'expression de transporteurs de type PHT1 est induite en réponse à la symbiose mycorhizienne dans plusieurs espèces de plantes différentes (Javot et al., 2007). Lors de la formation de la symbiose et de l'expression, induite par les mycorhizes, des membres de la famille des PHT1 dans les cellules contenant des arbuscules, on observe une régulation négative des autres transporteurs PHT1, en particuliers ceux localisés dans l'épiderme (Javot

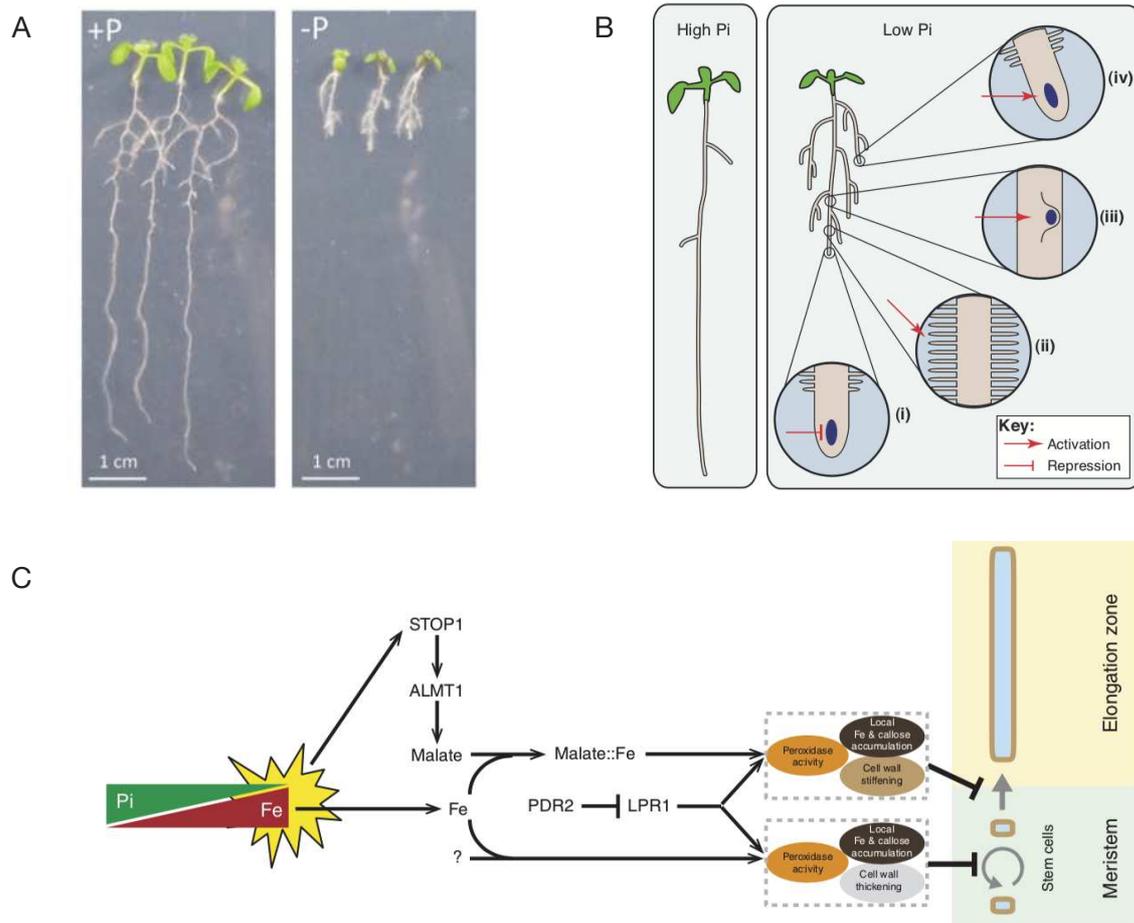


Figure i.6 : Impact de la carence en Pi sur le système racinaire d'*A. thaliana*. (A) Phénotype de la plante modèle *A. thaliana* à la suite d'une carence en Pi. On observe la formation de racines latérales, au détriment de l'élongation de la racine primaire (Péret et al., 2014). (B) Schéma de l'adaptation du système racinaire d'*A. thaliana* au manque de Pi. On observe (i) l'inhibition de la croissance de la racine primaire ; (ii) l'augmentation de la production et de la taille des poils absorbants ; (iii-iv) l'induction de la formation de nombreuses racines latérales. Ces changements morphologiques permettent d'améliorer la surface d'absorption de Pi (Péret et al., 2011). Schéma récapitulant les mécanismes moléculaires impliqués dans l'inhibition de la croissance de la racine primaire d'*A. thaliana*. Lors d'un stress induit par une carence en Pi, on observe une augmentation de la quantité de fer entraînant l'activation de *STOP1*, puis de *ALMT1*, permettant l'exsudation de malate dans l'apoplaste. Le chélate fer/malate va interagir avec l'activité ferroxidase de *LPR1* pour inhiber l'élongation cellulaire de la racine primaire. Parallèlement, le module *LPR1-PRD2* va permettre l'inhibition de la division cellulaire dans la niche de cellules souches par l'accumulation de fer et de callose, entraînant l'arrêt de la prolifération des cellules du méristème (Balzergue et al., 2017).

et al., 2007). Il existe ainsi un équilibre délicat entre les mécanismes d'acquisition du Pi par les racines et par la symbiose mycorhizienne.

2.3.2 La modification du système racinaire par le Pi chez la plante modèle *A. thaliana*

Chez *A. thaliana*, le Pi est connu pour faire partie d'une signalisation nutritionnelle responsable de modifications importantes du système racinaire (Figure i.6A) (Williamson et al., 2001; López-Bucio et al., 2002; Al-Ghazi et al., 2003; Péret et al., 2014). L'adaptation du système racinaire d'*A. thaliana* à la carence en Pi permet à la plante d'explorer la partie supérieure du sol, où le Pi a tendance à s'accumuler (Lynch and Brown, 2001). En effet, lors d'une carence externe en Pi, on observe l'induction de la formation de nombreuses racines latérales, au détriment de la racinaire primaire qui arrête sa croissance, ainsi qu'une augmentation de la densité et de la longueur des poils absorbants (Figure i.6B) (Sánchez-Calderón et al., 2005; Svistoonoff et al., 2007; Péret et al., 2011). L'inhibition de la croissance de la racine primaire résulte de la réduction rapide de l'élongation cellulaire dans la zone de transition, suivi d'un arrêt progressif de la prolifération des cellules souches du méristème ce qui entraîne un épuisement de la niche de cellules souches et cause la différenciation des cellules du méristème, voire même sa nécrose (Sánchez-Calderón et al., 2005).

2.3.3 Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'arrêt de la racine primaire suite à une carence en phosphate chez *A. thaliana*

L'inhibition de la croissance de la racine primaire lors du contact avec un milieu carencé en phosphate implique deux modules distincts : LOW PHOSPHATE ROOT1-PHOSPHATE DEFICIENCY RESPONSE 2 (LPR1-PDR2) et SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY 1-ALUMINIUM ACTIVATED MALATE 1 (STOP1-ALMT1) (Figure i.6C) (Balzergue et al., 2017; Mora-Macías et al., 2017; Gutiérrez-Alanís et al., 2018). PRD2 code pour une ATPase et a pour rôle de réprimer l'activité de LPR1, qui code pour une multicopper oxidase possédant une activité ferroxidase. Lors d'une carence en Pi, le module LPR1-PRD2 permet de moduler l'accumulation de fer dans le niche de cellules souches ainsi que dans la zone d'élongation, entraînant la production de formes réactives d'oxygène (ROS) et un dépôt de callose dans les

parois des cellules du MAR et de la zone d'élongation (Müller et al., 2015b). L'accumulation de callose obstrue les communications de cellules à cellules et empêche ainsi le mouvement de SHR, menant à une diminution de la maintenance du pool de cellules souches et donc de l'activité méristématique (Müller et al., 2015b). STOP1, qui code pour un facteur de transcription de la famille « zinc-finger », active l'expression inductible par aluminium de ALMT1, qui lui code pour un transporteur d'efflux de malate permettant l'exsudation de celui-ci dans l'apoplaste des cellules de l'apex et y facilite ainsi la chélation et donc l'accumulation du fer dans le MAR (Iuchi et al., 2007; Tokizawa et al., 2015). Le module STOP1-ALMT1 est nécessaire pour déclencher la rapide inhibition de l'élongation cellulaire en condition de carence en Pi et contribue parallèlement à l'épuisement du MAR avec le module LPR1-PRD2 (Balzergue et al., 2017; Mora-Macías et al., 2017; Godon et al., 2019).

2.3.4 L'induction des gènes impliqués dans le transport de Pi

Pour faire face aux carences en Pi, les plantes augmentent l'affinité et la capacité de leur système de transport afin d'améliorer l'acquisition du Pi. La plante modèle *A. thaliana* induit ainsi l'expression de la famille de transporteurs membranaires PHOSPHATE TRANSPORTER 1 (PHT1), co-transporteurs de Pi et H⁺ (Nussaume et al., 2011). Le Pi est ainsi absorbé de manière active dans un processus de co-transport, utilisant le gradient de protons créé par les ATPases membranaires. Il existe 9 membres de la famille des transporteurs de Pi à haute affinité, appelés PHT1;1 à PHT1;9, parmi lesquels PHT1;1 et PHT1;4 seraient les contributeurs majeurs, en transportant plus de 70% du Pi racinaire total (Shin et al., 2004). Ces transporteurs sont induits par la carence en Pi, mais cette rapide induction est réversible, suggérant une régulation transcriptionnelle (Karthikeyan et al., 2002).

2.3.5 Améliorer l'acquisition de Pi via la sécrétion de molécules dans la rhizosphère

La réponse à la carence en phosphate est aussi accompagnée d'une forte expression de phosphatases acides et de la sécrétion d'enzymes permettant l'hydrolyse du phosphate organique présent dans la rhizosphère, qui représente la forme de phosphate majoritaire dans les sols. Par ailleurs, la sur-expression chez *A. thaliana* d'une phosphatase acide de *Medicago*

Truncatula engendre une meilleure accumulation du Pi dans la plante (Xiao et al., 2006). Lors de faibles concentrations externes en Pi, certaines plantes ont aussi la capacité de sécréter des acides organiques, comme le malate et le citrate, permettant ainsi de faciliter la solubilisation du Pi (Vance et al., 2003; Shen et al., 2005).

2.3.6 Les racines protéoïdes, une adaptation à la carence en Pi

Observées chez les *Proteaceae* et décrites pour la première fois comme des racines « peu communes » par Adolf Engler, ce n'est qu'en 1960 qu'Helen Purnell adopte le terme de racines protéoïdes, les décrivant comme des racines possédant de denses amas de petites racines à la croissance déterminée (Purnell, 1960). A ce jour, les racines protéoïdes ont été décrites dans plusieurs espèces différentes issues des familles suivantes : *Betulaceae*, *Casuarinaceae*, *Cucurbitaceae*, *Eleagnaceae*, *Fabaceae*, *Mimosaceae*, *Moraceae*, *Myricaceae*, *Proteaceae* et *Restionaceae* (Dinkelaker et al., 1995; Skene, 1998). Les racines protéoïdes n'étant pas exclusives à la famille des *Proteaceae*, on retrouve dans la littérature le terme plus général de « cluster root », faisant référence à une racine parentale comportant plusieurs groupes compacts de petites racines courtes que nous appellerons « rootlettes » dans la suite de ce manuscrit, un néologisme permettant de nommer ces petites racines très spéciales. Les racines protéoïdes, à l'instar de la symbiose mycorhizienne, constitue une adaptation évolutive des plantes afin d'améliorer leur nutrition phosphatée (Dinkelaker et al., 1995). En effet, ces racines spécialisées ont la capacité d'exsuder de grandes quantités d'acides organiques, de phosphatases et de protons afin d'améliorer la biodisponibilité et l'absorption de Pi (Neumann and Martinoia, 2002).

Ainsi, face au facteur limitant qu'est le Pi, les plantes ont développé diverses stratégies afin de lutter contre la carence. Nous avons pu précédemment voir que l'apport d'engrais commerciaux possède un impact non-négligeable sur l'environnement, et participe à l'épuisement des réserves en phosphore de la planète. Ces dernières années, les recherches se sont donc concentrées sur la capacité des plantes à faire face à la carence en Pi.

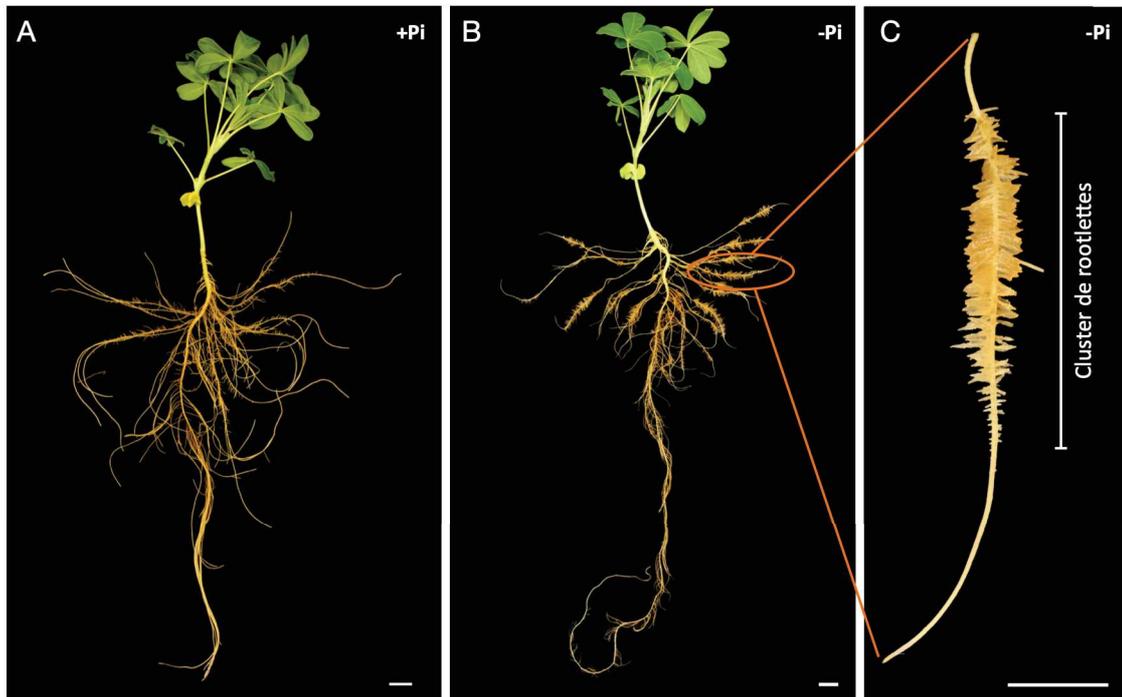


Figure i.7 : Le lupin blanc développe des racines protéoïdes en réponse à une carence en phosphate. (A) Système racinaire d'un lupin blanc cultivé en présence de Pi, 22 jours après germination. (B) Système racinaire d'un lupin blanc cultivé en absence de Pi, 22 jours après germination. On observe la présence de structures racinaires particulières : les racines protéoïdes. (C) Racine protéoïde de lupin blanc récoltée sur des plantes cultivées en absence de Pi, 16 jours après germination. La racine protéoïde est ici composée d'un cluster de rootlettes. Echelle A-C : 1 cm.

3. Le lupin blanc et les racines protéoïdes en réponse à la carence en Pi

Le lupin blanc (*Lupinus albus L.*) est une plante de la famille des *Fabaceae*, capable de former des nodules fixateurs d'azote, qui possède également la capacité de développer des racines protéoïdes. Il est intéressant de noter que le lupin blanc a perdu la capacité de former des associations de type symbioses mycorhiziennes, et que sa capacité à développer des racines protéoïdes est apparu il y a environ 2.5 millions d'années (Skene, 2000). Les gènes spécifiques de la symbiose mycorhizienne comme *PT4*, *RAM1*, *RAM2*, *FatM*, *HA1*, *STR1*, *STR2* ou encore *Exo70* ne sont pas présents dans le génome du lupin blanc (Hufnagel et al., 2020). La capacité du lupin blanc à absorber l'azote et le Pi fait de cette plante cultivée une plante adaptée aux sols pauvres, dont la culture ne nécessite pas d'engrais N et P. Ainsi, l'étude des racines protéoïdes de lupin blanc suscite un grand intérêt général.

3.1 Le lupin blanc, un modèle pour l'étude des racines protéoïdes

3.1.1 Les racines protéoïdes du lupin blanc

Chez le lupin blanc, la carence en Pi induit la formation de structures racinaires éphémères : les rootlettes, portées par les racines protéoïdes (Figure i.7A et 7B) (Johnson et al., 1996; Watt and Evans, 1999; Neumann and Martinoia, 2002). Les racines protéoïdes, et notamment les rootlettes, participent à l'augmentation de la surface d'échange dans la partie haute du système racinaire, permettant au lupin blanc d'acquérir le Pi accumulé dans la partie supérieure du sol (Watt and Evans, 1999).

3.1.2 L'initiation et le développement des rootlettes

Les rootlettes se développent de manière rapide et successive, créant un gradient développemental spatial et continue le long de la racine protéoïde (Figure i.7C) (Watt and Evans, 1999; Neumann and Martinoia, 2002). Dans la littérature, les racines protéoïdes ont été divisées en plusieurs stades de développement distincts, le plus souvent dénommées (i) émergente, (ii) juvénile, (iii) mature et (iv) sénescence (Neumann and Römheld, 1999; Weisskopf et al., 2006; Tomasi et al., 2008; Wang et al., 2010; Tiziani et al., 2020).

Chez le lupin blanc, l'initiation de la formation du primordium de rootlette débute par la division de cellules du péricycle situées en face des pôles de xylème et implique également les cellules du cortex (Dubrovsky et al., 2000; Gallardo et al., 2019). Huit stades de développement du primordium, ainsi que l'établissement d'un gradient d'auxine durant l'initiation jusqu'à l'émergence ont été mis en évidence, suggérant que l'initiation du développement des rootlettes se déroule de manière similaire à celle décrite chez *A. thaliana* (Gallardo et al., 2019).

3.1.3 Les rootlettes exsudent de grandes quantités de molécules afin de favoriser l'absorption de Pi

Non seulement les rootlettes augmentent la surface d'échange entre la plante et le sol, mais elles sont également physiologiquement très actives et ont la capacité de modifier la rhizosphère afin d'améliorer la nutrition phosphatée. Les rootlettes sécrètent de grandes quantités de d'acides organiques, de protons, et de phosphatases dans le but de mobiliser le Pi présent dans le sol (Neumann and Römheld, 1999; Massonneau et al., 2001). En effet, l'exsudation de ces molécules permet d'acidifier la rhizosphère, ce qui entraîne une meilleure biodisponibilité du Pi (Massonneau et al., 2001). Deux acides organiques sont majoritairement sécrétés par les rootlettes de lupin blanc : le malate et le citrate. L'accumulation d'acides organiques dans la rhizosphère, notamment le citrate, permet de chélater par échange cationique les éléments formant des complexes avec le Pi comme le Fe, Al et Ca (Jones, 1998). Alors que le malate est principalement exsudé dans les stades juvéniles, voire de manière constante le long de la racine protéoïde, plusieurs études attestent que l'exsudation de citrate se fait préférentiellement dans les stades matures des racines protéoïdes (Neumann et al., 2000; Neumann and Martinoia, 2002; Peñaloza et al., 2002; Lyu et al., 2016; Tiziani et al., 2020). Par ailleurs, le « burst » d'exsudation de citrate est associé à l'expression de deux H⁺-ATPase membranaire LHA1 et LHA2 chez le lupin blanc (Tomasi et al., 2009). Lors d'analyses transcriptomiques, l'expression de 6 autres H⁺-ATPase a été mise en évidence comme induite lors d'une carence en Pi dans les racines protéoïdes de lupin blanc (O'Rourke et al., 2013). En effet, les carboxylates ont un effet plus important sur la libération du Pi dans la rhizosphère lorsqu'ils sont accompagnés par une sécrétion de protons (Neumann and Römheld, 1999; Palomo et al., 2006). Parallèlement, l'exsudation de citrate est aussi associée à l'augmentation

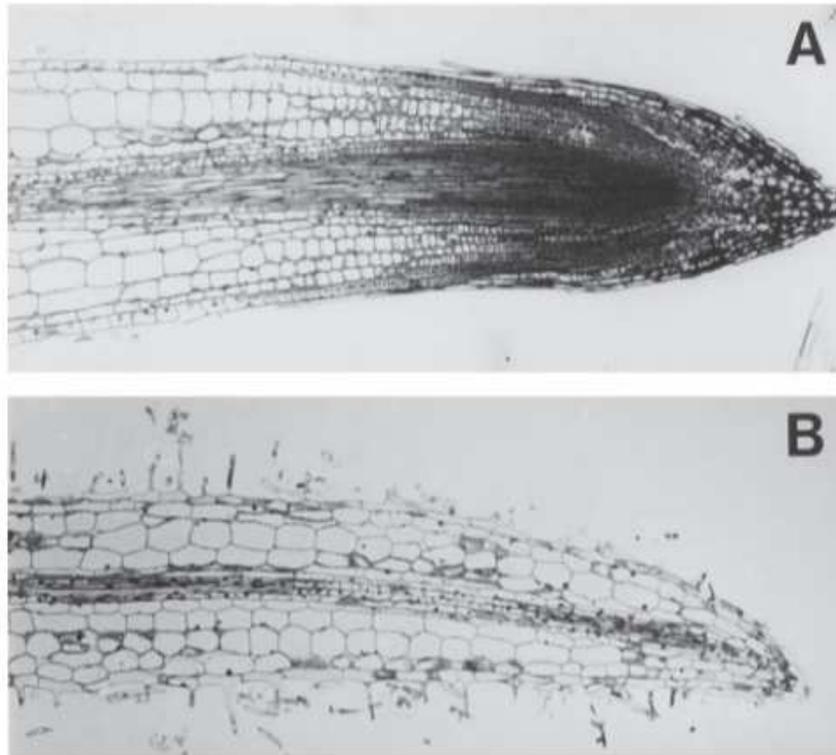


Figure i.8 : Les rootlettes ont une croissance déterminée. Coupe longitudinale (A) de l'apex d'une racine protéoïde et (B) d'une rootlette mature de lupin blanc. La structure cellulaire de l'apex de la racine protéoïde de lupin blanc présente une zone méristématique, indiquant sa capacité à croître de manière indéterminée. En contraste, la structure de la rootlette montre une absence de zone méristématique, la présence de la stèle jusqu'au bout de l'apex ainsi que des poils absorbants présents sur la totalité de la rootlette (Watt and Evans, 1999).

de l'expression et de l'activité d'une phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCase), permettant d'alimenter les voies de biosynthèse des acides organiques en carbone (Johnson et al., 1996; Neumann and Römheld, 1999). Enfin, les rootlettes de lupin blanc ont la capacité de sécréter de manière abondante des phosphatases acides (SAPase) comme *LaSAP1*, permettant d'hydrolyser le phosphate organique présent dans le sol et ainsi libérer de nouvelles réserves de Pi (Gilbert et al., 1999; Wasaki et al., 2003; Zinn et al., 2009; O'Rourke et al., 2013; Lyu et al., 2016). L'exsudation coordonnée de ces différentes molécules suggère que les rootlettes sont des structures spécialisées dans des mécanismes physiologiques permettant une amélioration de l'absorption du Pi.

Parallèlement à leur aptitude à améliorer la solubilisation et la mobilité du Pi dans le sol, plusieurs travaux indiquent que les rootlettes ont la capacité de l'absorber (Keerthisinghe et al., 1998; Neumann et al., 2000; Liu et al., 2001; Lyu et al., 2016). Chez le lupin blanc, l'expression de plusieurs transporteurs de Pi ont été mis en évidence comme régulés positivement dans les racines protéoïdes (O'Rourke et al., 2013; Secco et al., 2014; Hufnagel et al., 2020). Notamment, le transporteur de Pi à haute affinité *LaPT1*, qui présente une forte homologie au gène *AtPT2/AtPHT1 ;4*, est fortement et particulièrement exprimé dans les racines protéoïdes et uniquement lors de carence en Pi (Liu et al., 2001; O'Rourke et al., 2013).

3.1.4 La croissance déterminée des rootlettes

Contrairement aux racines latérales et aux racines protéoïdes qui les portent, les rootlettes se caractérisent par un développement déterminé (Skene, 1998; Neumann and Römheld, 1999; Watt and Evans, 1999). En effet, les rootlettes se développent en mettant en place une zone méristématique caractéristique, mais peu de temps après leur émergence, elles subissent un arrêt de croissance (Skene, 2000; Gallardo et al., 2019). La structure cellulaire d'une rootlette dont la croissance est arrêtée (Figure i.8B) est fortement différente de l'apex racinaire de la racine protéoïde (Figure i.8A). En effet, lorsque les rootlettes ont atteint leur taille finale, on peut observer que la totalité des cellules de la rootlette est complètement différenciée, la stèle atteint l'apex, et une multitude de poils absorbants recouvrent la totalité de la rootlette, y compris l'apex (Watt and Evans, 1999). Ces caractéristiques suggèrent la disparition de la zone méristématique, et la spécialisation de la rootlette dans des mécanismes d'exsudation et d'absorption. La taille finale similaire des



Figure i.9 : Echantillonnage spatial d'une racine protéoïde pour la création d'un jeu de données transcriptomiques. 10 racines protéoïdes issues de 4 plantes, cultivées 12 jours, en carence en phosphate ont été disséquées à partir de l'apex de la racine protéoïde en 8 morceaux dont 7 (S1-S7) de précisément 0.5 cm. 4 réplicats biologiques ont été effectués pour chaque section.

rootlettes suggère que cet arrêt de croissance est génétiquement programmé, mais les déterminants moléculaires impliqués restent encore méconnus.

3.2 Les outils pour l'étude des racines protéoïdes de lupin blanc

3.2.1 Le séquençage du génome du lupin

Le génome du lupin blanc (variété AMIGA) a été séquencé au sein de notre équipe de recherche Développement et Plasticité du Système Racinaire, et représente un outil de référence précieux pour améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires liés au développement et à la physiologie des racines protéoïdes (Hufnagel et al., 2020). 38 258 gènes ont ainsi pu être annotés sur le génome du lupin blanc, qui présente 55% d'éléments répétés. Le génome de référence ainsi que celui de 15 autres variétés de lupin blanc, re-séquencé par notre équipe, sont disponibles au public sur https://www.whitelupin.fr/genome_browser.html

3.2.2 Les données transcriptomiques disponibles

Chronologiquement, on observe dans la littérature le développement d'un premier jeu de données transcriptomiques mettant en évidence 2,128 gènes différentiellement exprimés (2-fold, $P < 0.05$) entre les racines protéoïdes, les racines latérales et les feuilles en réponse à une carence en Pi (O'Rourke et al., 2013). Par la suite, une analyse RNA-seq focalisée sur 3 stades de développement des racines protéoïdes (apex racinaire, stade immature et stade mature) ainsi que 2 stades de développement de racines ne développant pas de racines protéoïdes (apex racinaire et stade mature) a mis en évidence que plusieurs gènes impliqués dans le contrôle de l'activité méristématique et dans la réponse aux hormones étaient impliqués dans l'initiation et la formation des racines protéoïdes (Secco et al., 2014). Afin de mieux comprendre et décrire le développement des racines protéoïdes, notre équipe a généré un jeu de données transcriptomiques couvrant spatialement toutes les étapes du développement des rootlettes (Hufnagel et al., 2020). Une racine protéoïde a ainsi été fractionnée en 8 sections : une section S0 contenant l'apex et sept sections de 0.5 cm (S1 à S7) (Figure i.9). Ces données transcriptomiques ont notamment permis de mettre en évidence l'expression de plusieurs gènes *LaPUCHI-like* ainsi que d'autres gènes régulateurs, dans la mise en place précoce de l'initiation des rootlettes (Hufnagel et al., 2020).

3.2.3 La transformation hairy-root chez le lupin blanc

Chez le lupin blanc, la régénération de plantes transformées à partir de cals n'est pas réalisable et donc la transformation stable via *Agrobacterium tumefaciens* n'est pas possible. La technique de transformation hairy-root par *A. rhizogenes* a donc été développée et constitue un outil rapide d'introduction de gènes, permettant l'analyse de racines transformées (Uhde-Stone et al., 2005). Bien que la balance auxine/cytokinine soit modifiée, les racines transgéniques de lupin blanc sont morphologiquement similaires aux racines sauvages (Uhde-Stone et al., 2005) et en particulier développent des « rootlettes-like ». L'utilisation de cet outil chez le lupin blanc a plusieurs fois fait ses preuves, notamment dans la visualisation tissulaire de promoteurs de gènes d'intérêt couplés au gène rapporteur GUS (Uhde-Stone et al., 2005; Sbabou et al., 2010; Gallardo et al., 2019).

Objectifs de thèse

Les racines protéoïdes de lupin blanc sont une adaptation développementale à la carence en Pi, et se caractérisent par la mise en place de courtes rootlettes à croissance déterminée témoignant d'une grande plasticité du système racinaire. L'objectif principal de ma thèse est de mettre en lumière les acteurs moléculaires impliqués dans cette croissance déterminée des rootlettes. Le développement successif des rootlettes le long de la racine protéoïde crée un gradient développemental et fait du lupin blanc une plante idéale pour cette étude. Dans un premier temps, une description anatomique fine des rootlettes a été nécessaire afin de comprendre et maîtriser le modèle d'étude. Puis, dans le but de mettre en évidence des acteurs moléculaires de la croissance déterminée des rootlettes, des approches fonctionnelles de type gène candidat et crible génétique ont été conduites. Enfin, des approches transcriptomiques visant à comparer des racines à croissance indéterminée avec des racines à croissance déterminée ont permis l'identification d'un acteur moléculaire potentiellement impliqué dans le développement déterminé des rootlettes.

CHAPITRE 1



**Description du développement
et de la fonction des rootlettes
de racines protéoïdes de lupin blanc**

1. Introduction

Les rootlettes sont des racines d'ordre tertiaire qui se développent successivement et de manière très dense le long des racines protéoïdes de lupin blanc, en réponse à une carence en Pi (Johnson et al., 1996; Watt and Evans, 1999; Neumann and Martinoia, 2002). De nombreuses études se sont intéressées à la fantastique capacité des rootlettes à solubiliser puis absorber le Pi, cependant, peu d'analyses ont été dédiées à l'étude de leur développement (Neumann and Römheld, 1999; Massonneau et al., 2001). Outre leur activité physiologique spectaculaire, les rootlettes se caractérisent par une croissance déterminée impliquant la différenciation de leur méristème, et les déterminants moléculaires impliqués dans ce phénomène ne sont pas connus (Watt and Evans, 1999). Leur émergence rapide et successive entraîne la formation d'un gradient développemental spatial et temporel le long de la racine protéoïde, faisant ainsi des rootlettes un modèle particulièrement intéressant pour étudier la croissance déterminée des racines. En tirant profit de ce patron développemental très spécifique, ce premier chapitre propose (i) une description histologique fine des différents stades de développement des rootlettes, (ii) une étude de l'évolution de l'expression de marqueurs moléculaires de la zone méristématique lors du développement des rootlettes et (iii) la mise en évidence d'une transition développementale entre croissance et spécialisation fonctionnelle qui, à terme, fait de la rootlette une structure entièrement dédiée à la nutrition hydro-minérale. Alors que les études précédentes portaient sur des classes d'âge de rootlettes, ce travail a été mené sur un continuum d'évolution de rootlettes de très jeunes racines protéoïdes. Ces résultats sont appuyés par une analyse approfondie des données transcriptomiques générées par l'équipe (Hufnagel et al., 2020). Ce travail a été présenté sous la forme d'un article scientifique publié en 2021 dans la revue « Frontiers In Plant Science ». Il apporte de nouvelles connaissances anatomiques, moléculaires et fonctionnelles sur le développement séquentiel et déterminé des rootlettes et propose l'utilisation de ces structures racinaires comme un modèle pour l'étude du lien entre développement et spécialisation fonctionnelle des racines.

2. Résultats

2.1 Article publié dans « Frontiers In Plant Science »

La numérotation des figures et la pagination dans cet article est indépendante du reste du manuscrit.



Dynamic Development of White Lupin Rootlets Along a Cluster Root

Tamara Le Thanh, Bárbara Hufnagel, Alexandre Soriano, Fanchon Divol, Laurent Brottier, Célia Casset, Benjamin Péret, Patrick Dumas* and Laurence Marquès*

BPMP, Univ Montpellier, CNRS, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Stefano Cesco,
Free University of Bozen-Bolzano, Italy

Reviewed by:

Raphael Tiziani,
Free University of Bozen-Bolzano, Italy
Nicola Tomasi,
University of Udine, Italy
Fabio Valentinuzzi,
Free University of Bozen-Bolzano, Italy

*Correspondence:

Patrick Dumas
patrick.dumas@inrae.fr
Laurence Marquès
laurence.marques@umontpellier.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Nutrition,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 08 July 2021

Accepted: 19 August 2021

Published: 07 September 2021

Citation:

Le Thanh T, Hufnagel B,
Soriano A, Divol F, Brottier L,
Casset C, Péret B, Dumas P and
Marquès L (2021) Dynamic
Development of White Lupin Rootlets
Along a Cluster Root.
Front. Plant Sci. 12:738172.
doi: 10.3389/fpls.2021.738172

White lupin produces cluster roots in response to phosphorus deficiency. Along the cluster root, numerous short rootlets successively appear, creating a spatial and temporal gradient of developmental stages that constitutes a powerful biological model to study the dynamics of the structural and functional evolution of these organs. The present study proposes a fine histochemical, transcriptomic and functional analysis of the rootlet development from its emergence to its final length. Between these two stages, the tissue structures of the rootlets were observed, the course of transcript expressions for the genes differentially expressed was monitored and some physiological events linked to Pi nutrition were followed. A switch between (i) a growing phase, in which a normal apical meristem is present and (ii) a specialized phase for nutrition, in which the rootlet is completely differentiated, was highlighted. In the final stage of its determinate growth, the rootlet is an organ with a very active metabolism, especially for the solubilization and absorption of several nutrients. This work discusses how the transition between a growing to a determinate state in response to nutritional stresses is found in other species and underlines the fundamental dilemma of roots between soil exploration and soil exploitation.

Keywords: white lupin, rootlet, cluster root, determinate growth, mineral nutrition

INTRODUCTION

Plant roots are adaptive systems able to adjust their architecture and physiology to their fluctuating environment in order to achieve efficient uptake of water and mineral nutrients (Rogers and Benfey, 2015). Among the mineral nutrients, phosphorus holds a special place. Indeed, roots take up inorganic phosphate (Pi) from the soil solution, but Pi is poorly soluble and promptly forms complexes with abundant cations in the soil such as calcium or magnesium, and becomes unavailable for plant nutrition (Holford, 1997). As a result, plants often experience Pi deprivation and have developed strategies to structurally and functionally adapt their root system. The modification of the root architecture in response to Pi deficiency has been widely studied in the model plant *Arabidopsis thaliana* (Williamson et al., 2001; López-Bucio et al., 2002; Al-Ghazi et al., 2003; Nacry et al., 2005; Péret et al., 2014). One of the most important changes observed in the adaptation of the *A. thaliana* root system to Pi deficiency, is the arrest of primary root growth and the increase in the number and length of lateral roots (Bouain et al., 2016; Balzergue et al., 2017). This developmental plasticity is based on *de novo* organogenesis of root meristems from primary root differentiated tissues that initiate the new lateral root primordia

(Trinh et al., 2018). These primordia evolve into meristems expressing the same key regulators that the embryonic primary root meristem. Among these main root architecture regulators, the transcription factors WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 5 (WOX5), REPRESSOR OF WUSCHEL1 (ROW1), SCARECROW (SCR), SHORTROOT (SHR), PLETHORAs (PLTs), NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 9 (FEZ) and SOMBRERO (SBR) play a critical role to build a well-defined cellular organization with a central stem cell niche surrounding the organizing center, providing all the cell types of the root and the root cap (Malamy and Benfey, 1997; Willemsen et al., 2008; Zhang et al., 2015; Goh et al., 2016; Du and Scheres, 2017). *Arabidopsis thaliana* root physiology is also altered during Pi deprivation with an increase in the exudation of protons, organic acids and enzymes such as acid phosphatases (Pantigoso et al., 2020). All these changes are orchestrated by a complex molecular pathway, named PSR for “Pi Starvation Response” (Chiou and Lin, 2011; Puga et al., 2017). Homologous genes involved in the PSR pathway have been identified in many other species, including major crops, showing that this response to Pi deficiency is highly ubiquitous (Secco et al., 2013; Lyu et al., 2016). However, white lupin (*Lupinus albus* L.) is a pulse crop in which root response to Pi deficiency is spectacular. Indeed, it produces very specialized roots, called cluster roots or proteoid roots, in response to Pi limitation (Johnson et al., 1996; Watt and Evans, 1999; Neumann and Martinoia, 2002). A cluster root is a lateral root along which hundreds of very short rootlets develop, forming one to several very dense clusters. Not only do these numerous rootlets improve the exchange surface between plant and soil, but they also modify the rhizosphere zone to improve mineral nutrition. Indeed, they secrete large amounts of organic acids, phosphatases and protons, resulting in an “exudative burst” that improves overall Pi solubilization and acquisition (Neumann and Römheld, 1999; Massonneau et al., 2001). It should be noted that these responses to Pi deprivation are quite similar to those observed in *A. thaliana*, but with a much larger scale (López-Bucio et al., 2003). White lupin cluster roots are therefore structural and functional units combining developmental and physiological processes that are particularly effective in improving Pi nutrition (Watt and Evans, 1999; Lambers et al., 2006).

In this perspective, white lupin root constitutes a very interesting model to understand how a root system can be up-graded for nutrient-efficiency acquisition. We recently obtained a high-quality genome of white lupin and transcriptomic data that have contributed to the understanding of the molecular changes involved in structural and physiological responses leading to cluster root formation and function (Hufnagel et al., 2020). The numerous rootlets appearing along the cluster root seem to follow an initial developmental pattern similar to the lateral root one (Gallardo et al., 2019). In this study, we combine anatomical, transcriptomic and functional approaches to describe the evolution of white lupin rootlets from their emergence to their final growth arrest, in order to better understand the developmental steps of these specialized organs. The rapid and successive emergence of rootlets, along lateral roots, leads to the formation of a continuous spatial gradient

of rootlets bearing all developmental stages. We took advantage of this patterning to use one cluster of rootlets as a very fine developmental model for studying the evolution of rootlet structure and function dedicated to soil exploration (foraging) and Pi absorption (mining), which are the two enter points to improve water and nutrient acquisition efficiency in plants.

MATERIALS AND METHODS

Plant Materials and Growth Conditions

Seeds of white lupin (*L. albus* cultivar Amiga from Florimond Desprez, France), of 8 mm size, were used in all experiments. Seedlings were cultivated in growth chambers under controlled conditions (16 h light/8 h dark, 25°C day/20°C night, 65% relative humidity and PAR intensity 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Seeds were germinated on vermiculite substrate for 4 days then either transplanted in 1.6 L pots or 200 L tanks depending on the experiments. The hydroponic solution was modified from Abdolzadeh et al. (2010) without phosphate: MgSO_4 54 μM ; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 400 μM ; K_2SO_4 200 μM ; Na-Fe-EDTA 10 μM ; H_3BO_3 2.4 μM ; MnSO_4 0.24 μM ; ZnSO_4 0.1 μM ; CuSO_4 0.018 μM and Na_2MoO_4 0.03 μM . The solution was continuously aerated and was renewed every 7 days for pots.

Molecular Cloning

We focused on three genes known to be involved in the network controlling the meristem maintenance in the model plant *A. thaliana*: WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 5 (WOX5), SCARECROW (SCR) and REPRESSOR OF WUSCHEL 1 (ROW1) (Drisch and Stahl, 2015). Taking advantage of our previously acquired genomic and transcriptomic data (Hufnagel et al., 2020), we selected white lupin genes with both high sequence homologies with *A. thaliana* genes and a high expression level in the cluster root: Lalb_Ch04g0250731 and Lalb_Ch18g0052701 for *LaWOX5.1-like* and *LaWOX5.2-like*, respectively, Lalb_Ch01g0019561 for *LaROW1-like* and Lalb_Ch19g0123861 for *LaSCR-like* (¹Supplementary Figure 1). Promoter sequences of *pLaWOX5.1-like* (Lalb_Ch04g0250731), *pLaWOX5.2-like* (Lalb_Ch18g0052701), *pLaROW1-like* (Lalb_Ch01g0019561) and *pLaSCR-like* (Lalb_Ch19g0123861) were extracted from white lupin genome [(Hufnagel et al., 2020) (see text footnote 1)]. *pLaSCR-like* was cloned according to Sbabou et al. (2010). The primers for *pLaWOX5-like* (F-5'-GGACGCTATAAAAGAATCACA-3'; R-5'-GCTCAATGATTC TGTGCCTCT-3') and *pLaROW1-like* (F-5'-CGAGGAGCT TGAGTTGCTCC -3'; R-5'-ATCCATTGTCCATTTAGAAT TGC-3') were designed using Primer3Plus (Untergasser et al., 2012). They were used to amplify, respectively, a total of 2,032 bp and 1,181 bp upstream of the start codon of *LaWOX5-like* and *LaROW1-like* from white lupin genomic DNA with the addition of the attb1 (5'-GGGGCCAAGTTTGTACA AAAAAGCAGGCT-3') and attb2 (5'-CCCCCACTTTGT ACAAGAAAGCTGGGT-3') adapters. Amplified fragments were cloned into the pDONR221, then cloned into the binary

¹www.whitelupin.fr

plasmid pKGW-FS7 (Karimi et al., 2002) by Gateway reaction following the manufacturer's instruction (Thermo Fisher). The pKGW-FS7 contains the glucuronidase gene (GUS) used as a reporter gene and the red fluorescent (DsRed) gene, under the control of an ubiquitine promoter, to control the transformation status of the hairy roots.

Hairy Root Transformation of White Lupin

Hairy root transformation of white lupin was performed following protocol previously described (Gallardo et al., 2019), with the following modifications: six days after transformation, seedlings were transferred to vermiculite and put into little greenhouses to increase humidity level. Ten days later, 8 plants growing hairy roots were transferred into 1.6 L pot. After 8 to 12 days of culture in hydroponic conditions, roots were sampled and screened for red fluorescent protein (DsRed) as an *in vivo* marker for transformation allowing the selection of transformed roots. Each transformed root represents an independent transformation event.

Histochemical Analysis

Histochemical staining of β -glucuronidase was performed on transformed hairy roots. Roots were incubated in a phosphate buffer containing 1 mg/mL X-Gluc as a substrate (X-Gluc 0.1%; phosphate buffer 50 mM, pH 7, potassium ferricyanide 2 mM, potassium ferrocyanide 2 mM, Triton X-100 0.05%) during 60 to 90 min and then washed before fixation.

Fixation and Clearing Procedure

Roots dedicated to agarose inclusion were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) during 120 min at room temperature under vacuum treatment. The roots were then washed twice 2 min in 1X PBS and moved to the clearing solution ClearSee (Ursache et al., 2018) under vacuum treatment for 48 h. ClearSee solution was prepared by mixing 10% (w/v) Xylitol (W5079 Sigma), 15% (w/v) Sodium deoxycholate (D6750 Sigma) and 25% (w/v) Urea (EUOD14-D Euromedex) until complete dissolution of powders. Clearing solution was changed every day. Roots dedicated to resin inclusion were incubated in a fixative solution containing 2% formaldehyde, 1% glutaraldehyde and 1% caffeine for 2 h at 4°C.

Microscope Analysis of Resin-Included Samples

For resin inclusion, roots were dehydrated in successive ethanol baths: 50% (30 min), 70% (30 min), 90% (1 h), 95% (1 h), 100% (1 h) and 100% (overnight). Samples were impregnated with half pure ethanol and half Technovit 7100 resin (Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany) for half a day, then in 100% resin for 2 days. Roots were then embedded in resin following the manufacturer's recommendations. Thin resin sections of 8 μ m were produced using a microtome (RM2165, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) then stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 5 min in the dark. Staining solution was rinsed with MilliQ water. Resin sections

were mounted in water and observed either with an Olympus BX61 epifluorescence microscope (Tokyo, Japan) or a Zeiss observer 7/ApoTome.

Microscope Analysis of Agarose-Included Samples

For agarose inclusion, 14 days-old PFA-fixed and ClearSee-cleared cluster roots were transferred in 0.001% Calcofluor-ClearSee solution (Fluorescent Brightner 28 F3543 Sigma) during 1 h 30 under vacuum treatment. Roots were washed in 2 ClearSee baths for 10 min and then included in 4% (m/v) agarose. Thin sections of 80 to 100 μ m were cut with a vibratome (Microcut H1200, Bio Rad, Hercules, CA), mounted in ClearSee and observed with confocal laser scanning microscopy (Leica SP8 microscope) with a 20X water objective and the 401 nm line. Fluorescence emission was collected from 420 to 500 nm. Images were analyzed with Fiji Software and cell lengths were measured with Fiji macro Cell-O-Tape (French et al., 2012), along 300 μ m following a cortical cell line starting from the organization center.

Transcriptome Analysis

RNA-seq raw data were obtained by the team (Hufnagel et al., 2020) and are available from the white lupin publicly shared database (see text footnote 1). Briefly, after 12 days of culture, ten cluster roots coming from four plants were harvested and dissected in seven sections from the apex. Four biological replicates were produced. Independent cluster root RNA-seq libraries were constructed and sequenced at Get-PlaGe core facility (INRAE, Toulouse, France). Raw reads have been cleaned using Cutadapt (Martin, 2011), and then mapped on the white lupin genome using Hisat2 (Kim et al., 2019). Gene count data has been obtained using StringTie (Pertea et al., 2015). In this study, we extended previous study by re-analyzing the RNA-seq data using DIANE web interface, a recent application for the analysis of high throughput gene expression data (Cassan et al., 2021) in order to provide information on the global gene activity during rootlet life. We selected the differentially expressed transcripts (DETs) between the section with pre-emerging rootlets (S1) and the section with rootlets that have just reached their final size (S7) using absolute \log_2 (Fold Change) > 1 and False Discovery Rate (FDR) < 0.01. A clustering of the normalized gene expression profiles along cluster root of the 7,234 DETs obtained, has then been performed with the Coseq package in DIANE website, using Poisson mixture model (Cassan et al., 2021).

Sampling and Expression Analysis of Cluster Root Genes (qRT-PCR)

Fourteen days after germination, six different types of 0.5 cm-long fragments were dissected along the cluster roots: (i) cluster root tip, (ii) stage II, (iii) stage III, (iv) stage IV, (v) stage V, and (vi) link. The link segment, corresponding to the attachment of the cluster root to the primary root, where no rootlets develop, was used as a control. Total RNA was extracted for each sample using the Direct-zol RNA MiniPrep kit (Zymo Research, Irvine, CA). RNA concentration was measured on a

NanoDrop spectrophotometer (ND1000). cDNAs were prepared with 2 μ g total RNA using the revertaid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher). Gene expression was quantified by quantitative Real Time – Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) (LightCycler 480, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) using the SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH, Takara, Clontech, Mountain View, CA). Specific primer pairs were designed with Primer3plus² (Supplementary Table 2). Expression levels were normalized to a putative initiation factor eIF-4 gamma *LaNORM1* (Lalb_Ch07g0195211). Relative gene expression levels were calculated according to the $\Delta\Delta$ Ct using the link sample as a calibrator. Four biological replicates were performed.

Pi Influx Measurement in Rootlets

Cluster roots of 14 days old seedlings were dissected the same way as for the qRT-PCR analysis. Each sample contained 6 segments of 0.5 cm and triplicates were collected. Segments were washed 2 min in cold solution (MES 2 mM pH 4.5, CaSO₄ 0.2 mM, NaH₂PO₄ 50 μ M) and then incubated 45 min with 0.2 μ Ci ³³P/mL. Finally, segments were washed 3 times 15 s in 0.2 mM CaSO₄ kept on ice and transferred into 0.1 N HCl for 30 min under agitation. We aliquoted 300 μ L of HCl solutions in 5 mL counter tubes already containing 3 mL of scintillation liquid. Radioactivity was counted with the Liquid Scintillation Counter TRI-CARB (Packard 2100TR). The link segment, where no rootlets were developed, was used as a control.

Malate and Citrate Exudation in Rootlets

Cluster roots of 14 days old were dissected the same way as for the qRT-PCR analysis and five replicates were performed. For each developmental stage, the dissected fragments were put into Eppendorf tubes containing 1 mL of MilliQ water and agitated for 3h. The solution was used to quantify organic acids by ion exchange chromatography ICS-5000 HPIC system (Thermo Scientific Dionex), using an IonPac[®] AS11 analytical column (250 mm \times 4mm) with an isocratic gradient of 4 to 28 mM KOH for 16 min, with a volume of sample injected of 25 μ L.

Statistical Analysis

The results are presented as means \pm standard error (SE). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 9. Data were analyzed by ordinary one-way analysis of variance (ANOVA) and means were compared using Tukey multiple comparisons test at $p < 0.05$ to determine significant differences.

RESULTS

Characterization of Rootlets Development

The present study focused on the root systems of 16-days-old white lupin that produced several cluster roots in their upper part in response to phosphorus starvation (Figure 1A). Each young cluster root carried a single cluster of third-order lateral

roots with a determinate growth, named rootlets (Figure 1B). In our growing conditions, these rootlets reach a final length of about 3 mm in two to three days (Figure 1C). These rootlets successively emerge along the cluster root, and within a cluster, the youngest ones are always at the tip-side of the cluster root.

Along a cluster, the spatial gradient representing the dynamic evolution over time of rootlet development has been divided into five typical stages (Figure 2A). To investigate the different morphological stages of rootlet development, the cluster roots were stained with the fluorescent calcofluor–white dye which labels cellulose in cell walls. We defined stage I as the pre-emerging state in which the rootlet primordia are formed but have not yet cross the last layer of the cluster root epidermis (Figure 2B). In stage II, the rootlet has completely emerged and comes into contact with the rhizosphere (Figure 2C). Then, during stage III, a growing phase occurs while root hairs appear in the differentiating zone (Figure 2D). In stage IV, rootlets reach their final length and root hairs start to overrun the tip (Figure 2E). Finally, in stage V root hairs cover the entire rootlet including the tip (Figure 2F). These events are continuous and can be followed spatially along one young cluster. The presence of root hairs around the tip at stage V suggests a complete differentiation of all the rootlet cells and hypothesizes the disappearance of the meristematic zone.

In order to confirm this hypothesis and to describe more accurately the developmental evolution at a tissular level, the rootlet meristems were observed at different stages of development with DAPI staining to monitor cell divisions (Figure 3). Up to stage III, rootlet tips showed a pattern similar to that of the cluster root tip (Figure 3A), with a typical root cap and a characteristic stem-cell niche, giving rise to cell lines with dividing activity (Figures 3B–D). Nonetheless, from stage IV to stage V, quite different patterns were observed including a decline followed by the complete disappearance of mitotic activities (Figures 3E,F). To support these findings, we performed confocal microscopy analyses on longitudinal sections stained with calcofluor-white dye in order to measure cell lengths of a cortical lineage from stage III to V (Figures 4A–C). Small meristematic cells with an average size of 13.7 μ m were found at stage III, elongating cells with an average size of 35.1 μ m at stage IV, and fully differentiated cells with an average cell size of 48.8 μ m at stage V (Figure 4D). At this final stage of development, the vasculature has reached the apex of the rootlet, the root cap has disappeared and root hairs have covered the tip.

Finally, the loss of cell division activity, the elongation of the cells, the root hairs covering the apex and the central cylinder reaching the tip of the rootlet, reveal the exhaustion of the meristem and the complete differentiation of the rootlet, but nevertheless, it remains well-structured and organized without damage or swelling, as illustrated in the summary drawing (Figure 4E).

Meristem Molecular Markers

In order to characterize the development of the rootlet tip at a molecular level, we monitored the tissular expression of some canonical meristematic markers during the rootlet development. GUS reporter constructs, introduced in white lupin by hairy root

²<http://primer3plus.com>

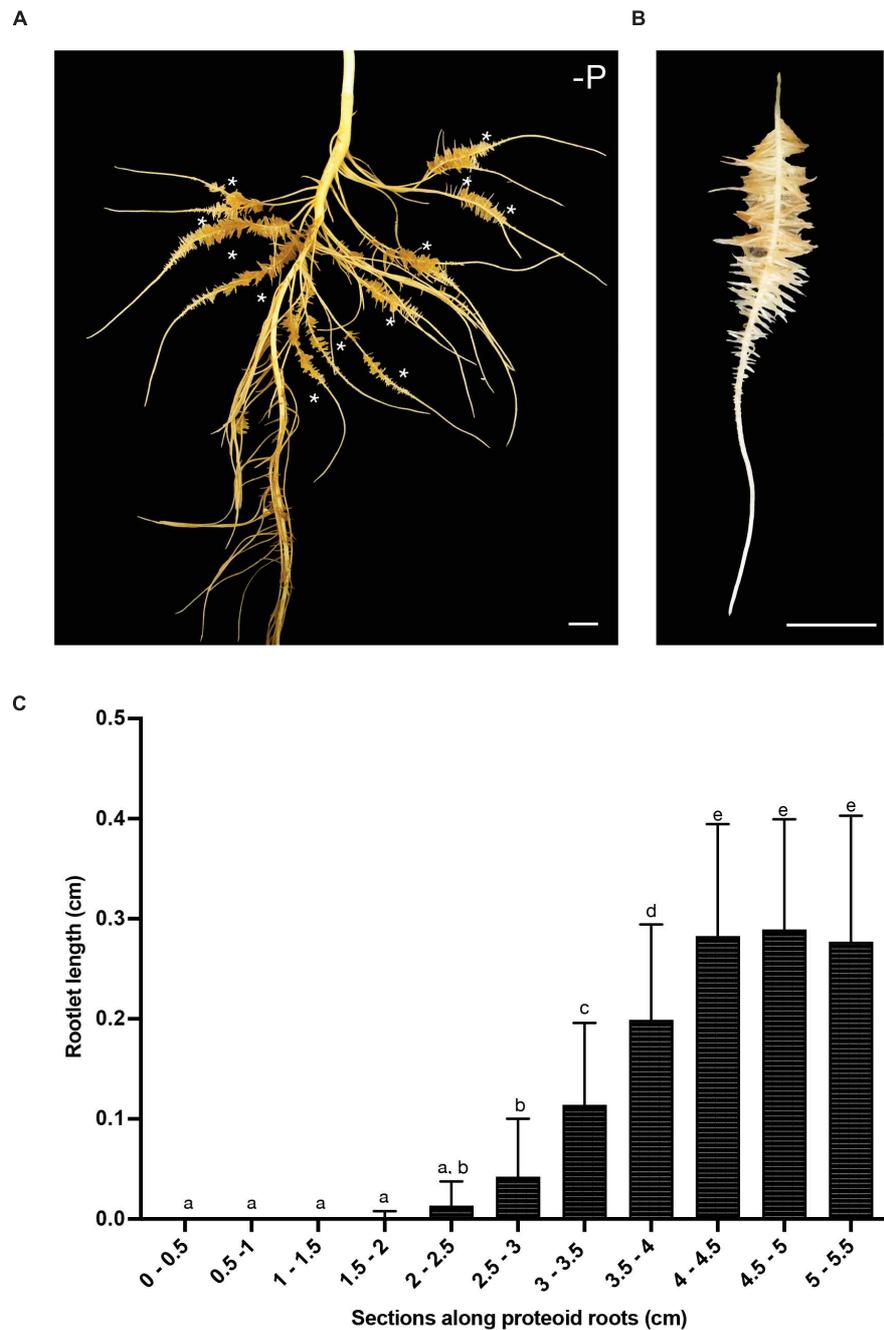


FIGURE 1 | White lupin root system architecture. **(A)** Root system of a 16-days-old white lupin hydroponically grown in Pi deficiency conditions resulting in the development of several cluster roots each bearing a single cluster of rootlets (*). **(B)** A typical 7 cm-long cluster root displaying one cluster of rootlets. **(C)** Measurement of rootlet length: 5 rootlets were measured in 0.5 cm sections from the tip of the root to the end of the cluster ($n = 21$). Scale bars: **(A–B)** 1 cm.

transformation, were used to monitor the expression patterns of these genes. We observed GUS staining patterns in hairy-roots morphologically similar to young wild cluster roots and whose transformation was confirmed by the visualization of a constitutive DsRed marker. All the GUS reporter genes were highly expressed in the earliest rootlet primordia stages (Figure 5). In stage I (primordia) and II (post-emergence),

the *pLaSCR-like:GUS* construct was expressed in the organizing center and endodermal cells (Figures 5A,B), and the *pLaROW1-like:GUS*, in the proximal zone above the organizing center (Figures 5E,F). These expression profiles are fully comparable to the canonical profiles observed in the meristem of the model plant *A. thaliana* (Sabatini et al., 2003; Zhang et al., 2015). *pLaWOX5.1-like:GUS* did not show a specific expression pattern

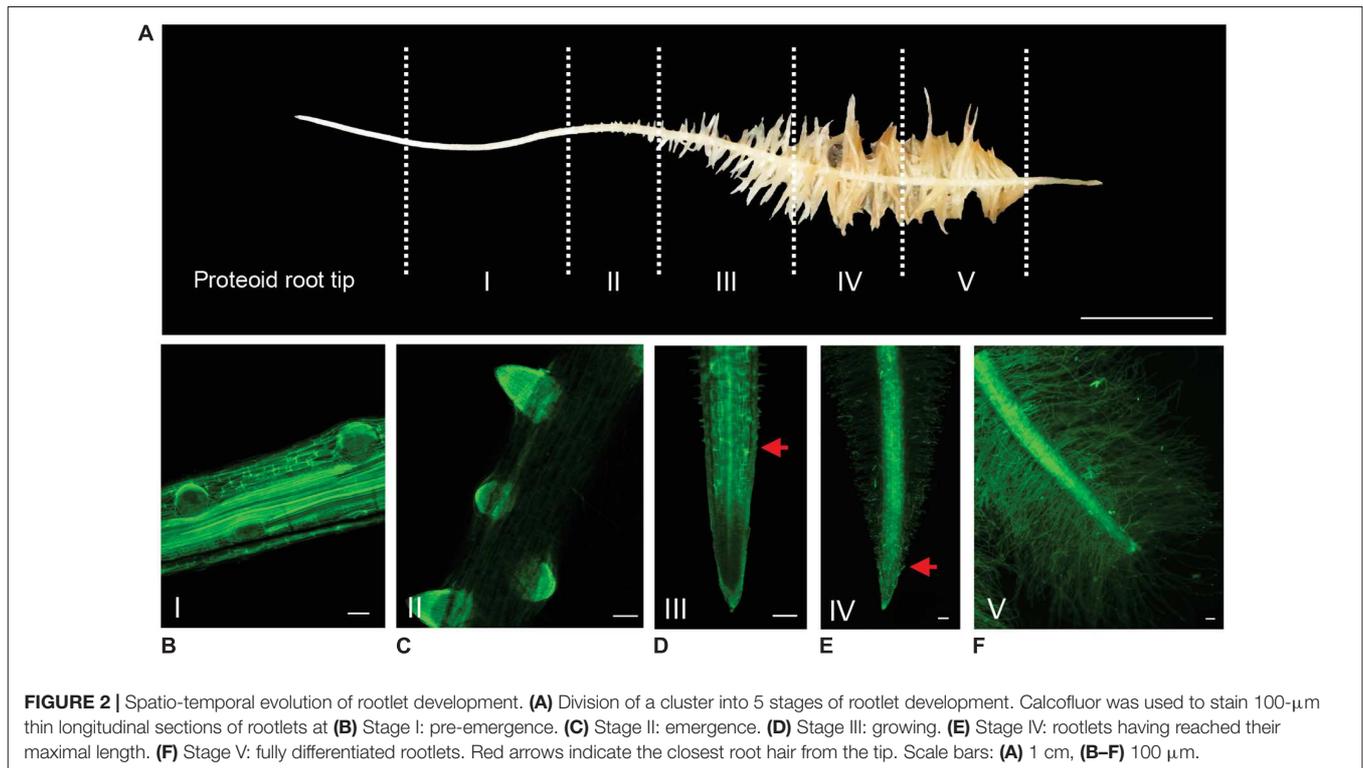


FIGURE 2 | Spatio-temporal evolution of rootlet development. **(A)** Division of a cluster into 5 stages of rootlet development. Calcofluor was used to stain 100- μm thin longitudinal sections of rootlets at **(B)** Stage I: pre-emergence. **(C)** Stage II: emergence. **(D)** Stage III: growing. **(E)** Stage IV: rootlets having reached their maximal length. **(F)** Stage V: fully differentiated rootlets. Red arrows indicate the closest root hair from the tip. Scale bars: **(A)** 1 cm, **(B-F)** 100 μm .

(data not shown), whereas *pLaWOX5.2-like:GUS* expression was localized in the rootlet primordia, and we therefore chose this gene for further analysis. *pLaWOX5.2-like:GUS* was expressed in the apex of the rootlet at stages I and II but more broadly than expected by strict analogy with *A. thaliana* meristem (Pi et al., 2015) (**Figures 5I,J**). Nonetheless, the three meristematic molecular markers tested highlighted that a typical meristematic zone is present at the tip of the rootlet in the very first developmental stages. Then, from the growing stage III, GUS staining completely disappeared for the *pLaSCR-like:GUS* and *pLaROW1-like:GUS* constructs (**Figures 5C,G**), while it was still maintained for *pLaWOX5.2-like:GUS* (**Figure 5K**). At stage IV, we mainly observed GUS staining in the vascular tissues of hairy-roots expressing *pLaWOX5.2-like:GUS*, while the intensity of the staining in the meristematic zone weakened, confirming the very special expression profile of the *LaWOX5-like* genes (**Figure 5L**). For the other markers, there was no more staining in the root tissues from stage III onward (**Figures 5D,H**).

These results confirm the previous anatomical observations. Indeed, a canonical meristematic zone is present at the rootlet tip at the early stages of development, and gradually depletes during the growth phase until the determinate state.

Spatial Transcriptomic Analysis of the Rootlet Life

In order to get a global vision of gene expression during the different phases of the rootlet development, from the pre-emergence to the final growth stage, the transcriptome of each of the 8 zones of one cluster of rootlets (named S0 to S7),

previously carried out (Hufnagel et al., 2020) was analyzed using DIANE, a tool for the analysis of high throughput gene expression data (Cassan et al., 2021). A total of 7,234 differentially expressed transcripts (DETs), including 3,329 up-regulated and 3,905 down-regulated genes, were detected comparing the pre-emergence stage (S1) and final growing stage (S7). The time courses of expression of these DETs along the cluster of rootlets were then analyzed and grouped into 6 spatial/temporal profiles (**Figure 6**). Interestingly, the profiles present maxima of transcript accumulation in, respectively, the S1/S2 (profile 1), S4 (profile 2), S5/S6 (profile 3) and S6/S7 (profile 4) and S7 (profile 5 and 6), revealing five successive waves of developmental stages. To gain an insight into the differences in biological processes that are likely to characterize these successive waves of gene expression, a GO enrichment analysis was performed on the set of DETs from the six profiles (**Supplementary Figure 2** and **Supplementary Table 1**). Among the most significantly overrepresented GO terms for the profile 1, we find several GO terms associated with “auxin-activated signaling pathway,” “regulation of growth meristem,” and “procambium histogenesis,” reflecting the biological processes of root meristem organogenesis, with for instance, the presence in this profile of genes encoding *PLETHORA-like* (*Lalb_Chr01g0003341*, *Lalb_Chr01g0003331*), *PUCHI-like* (*Lalb_Chr07g0177601*, *Lalb_Chr13g0303751*, *Lalb_Chr15g0086951*, *Lalb_Chr18g0055601*), *LBD16-like* (*Lalb_Chr02g0142301*, *Lalb_Chr06g0162491*) and *WOX5-like* (*Lalb_Chr04g0250731*, *Lalb_Chr18g0052701*). All these genes are known to be involved in morphogenesis of the early lateral root primordium. In the profile 2, a large proportion of

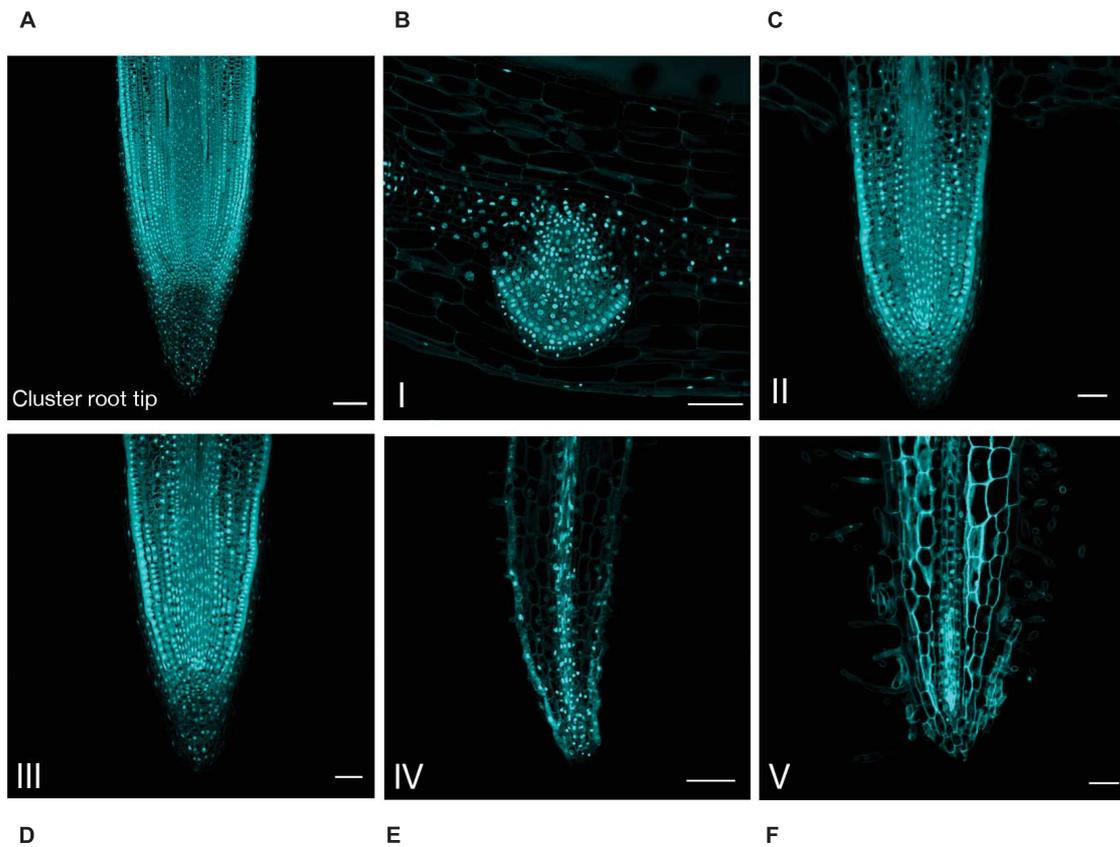


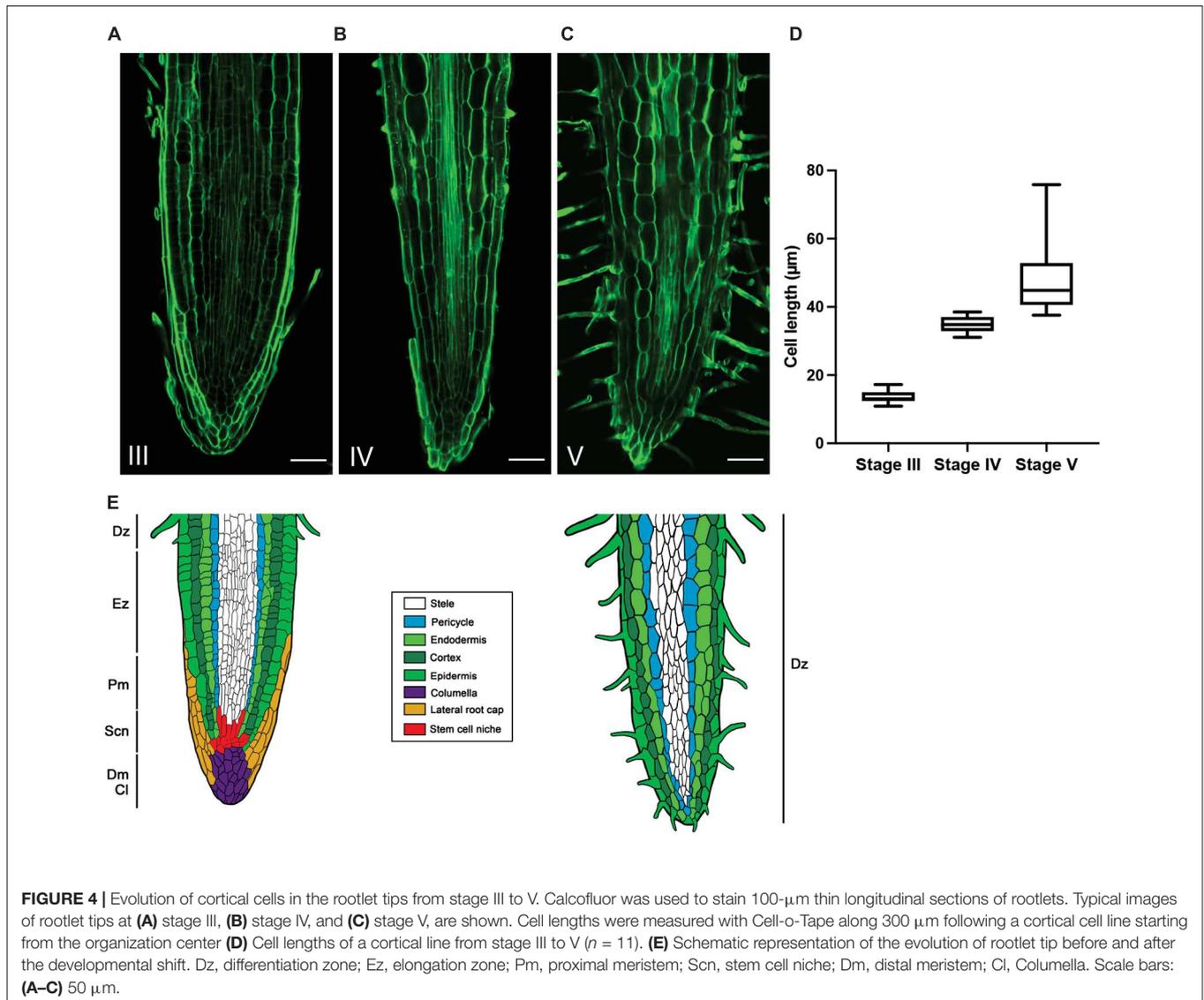
FIGURE 3 | Anatomical study of the cluster root tip, and rootlet tips at different stages of development. DAPI was used to stain 8- μm thin longitudinal sections of (A) cluster root tip, and rootlet tips at (B) stage I, (C) stage II, (D) stage III, (E) stage IV, (F) stage V. Scale bars: (A-F) 50 μm .

DETs are enriched into the category of biological processes as “cell division” and “microtubule-based movement” including genes such as *ANTEGUMENTA-like* (*Lalb_Chr16g0381611*), *BABYBOOM/PTL4-like* (*Lalb_Chr06g0168521*), *ROW1-like* (*Lalb_Chr01g0019561*), and *PLETHORA1/2-like* (*Lalb_Chr19g0138171*) and a large number of cyclins (*Lalb_Chr10g0101501*, *Lalb_Chr20g0108171*, *Lalb_Chr10g0106101*, *Lalb_Chr09g0321281*, *Lalb_Chr08g0241201*, *Lalb_Chr11g0063951*, *Lalb_Chr22g0354811* and others). All these genes are expressed in meristematic and division-competent states. As expected, profiles 1 and 2 are therefore clearly characteristic of meristem formation and activity.

In profiles 3 and 4, a clear shift occurs. Seventeen genes encoding Pectin Methyl Esterase Inhibitors (PMEIs) are found in profile 3. Pectin Methyl Esterase Inhibitors can be considered as a determinant of cell adhesion, cell wall porosity and elasticity, as well as a source of signaling molecules released upon cell wall remodeling. In profile 4, a strong enrichment for “cell wall organization” and “oxidative stress” marker genes including peroxidase gene family, stand out. Deep changes in cell walls seem to characterize these stages of rootlet development.

Both profiles 5 and 6 show a peak of transcript accumulation in section S7. In profile 5, physiological responses to Pi

starvation appear with the biological functions “cellular responses to phosphate starvation” and “dephosphorylation” including the phosphatase acid gene family. This is an expected response as the plants were grown in Pi deficient condition. In profile 6, the enriched GO terms detected the term “tricarboxylic acid cycle” (**Supplementary Table 1**) in which are found genes coding for enzymes such as citrate synthase (*Lalb_Chr04g0248661*, *Lalb_Chr25g0283641*, *Lalb_Chr10g0106821*), malate dehydrogenase (*Lalb_Chr21g0312041*, *Lalb_Chr13g0303211*), isocitrate dehydrogenase (*Lalb_Chr10g0104131*), succinate dehydrogenase (*Lalb_Chr23g0273091*, *Lalb_Chr16g0377871*) and also three phosphoenolpyruvate carboxylase (*Lalb_Chr01g0006821*, *Lalb_Chr25g0285901*, *Lalb_Chr20g0109301*). These root PEPcase are typical of lupin root metabolism. In the late stages of sampling (S6-S7), rootlets reached their maximum of physiological activity with activation of PEPcases and TCA cycle supporting the burst of citrate exudation characteristic of the response of white lupin to phosphate deficiency. Interestingly, among the transcripts upregulated at the late developmental stages, a huge over-representation of transcripts involved in transmembrane transport occurs (**Supplementary Figure 2**) with 51 genes encoding for members of the plasma membrane



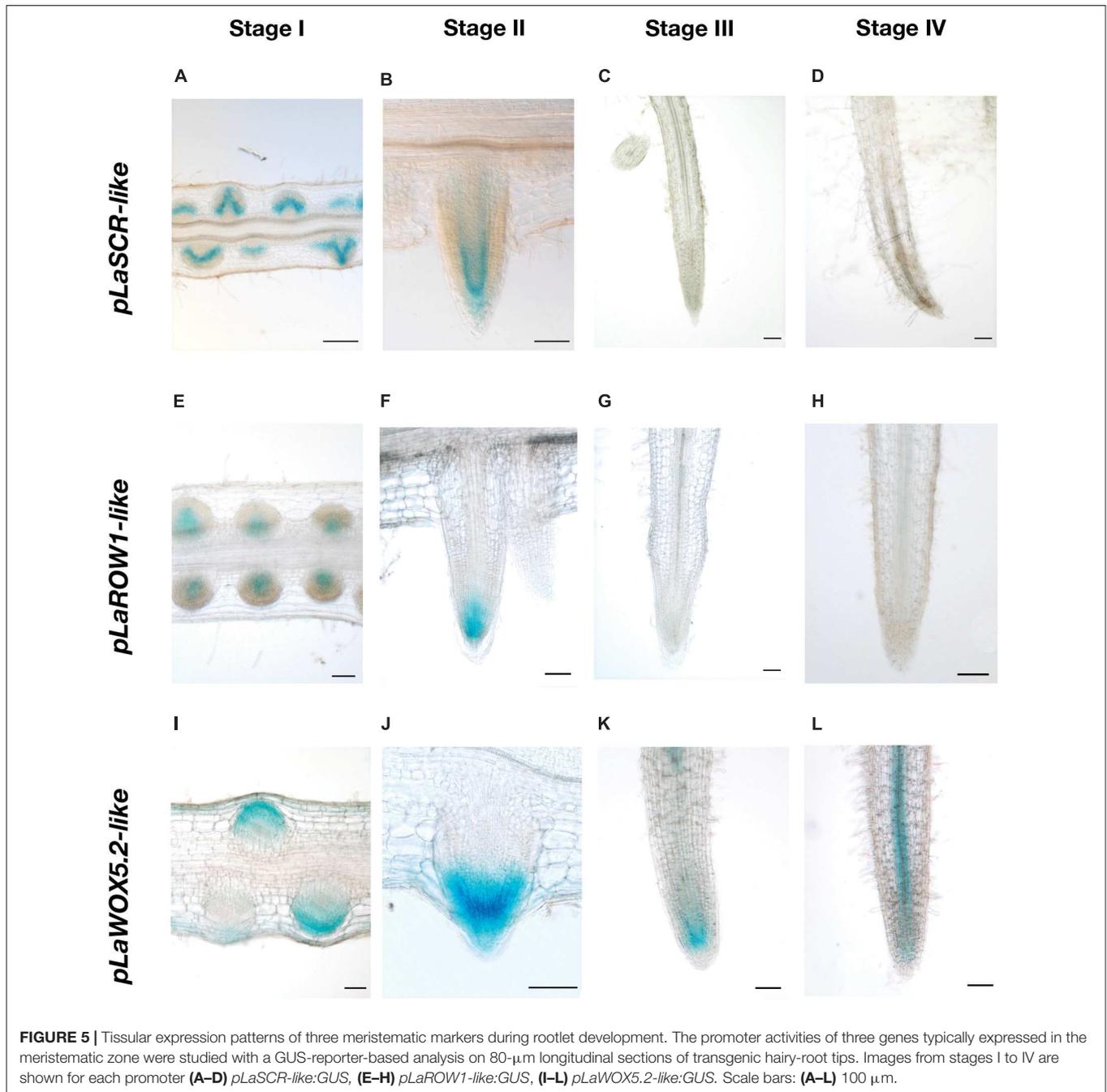
transporters involved in phosphate, nitrate, ammonium, potassium, sulfate, iron, zinc, and calcium transport (Table 1). Other genes implicated in H^+ , sugar or water transport, ABC transporters and major facilitator superfamily are likewise present. Many homologs of membrane transport genes involved in nutrition are found to be highly expressed in later phases of rootlet development. These data confirm the total integrity of the plasma membrane and its high activity level at these stages.

In order to validate the results from RNA-seq analysis, transcripts of 6 selected genes, which were significantly expressed and mostly implied in nutrient transport were analyzed by Real-Time-qPCR (Supplementary Figure 3). Genes considered for this analysis are coding for a Pi transporter (*LaPHT1*;5-like *Lalb_Chr04g0259111* – profile 4), a sulfate transporter (*LaSULTR1*;3-like *Lalb_Chr20g0123111* – profile 4), a H^+ -ATPase (*LaHA9*-like *Lalb_Chr18g0052441* – profile 4), an iron transporter (*LaIRT1*-like *Lalb_Chr13g0291391* – profile 5),

a nitrate transporter (*LaWR3*-like *Lalb_Chr07g0183011* – profile 6) and an ammonium transporter (*LaNH4*-like *Lalb_Chr07g0184111* – profile 4). The expression of these 6 genes was assessed in stage II to V of rootlet development, in the cluster root tip, and in the link section corresponding to the attachment of the cluster root to the primary root where no rootlets are developed. The results obtained were fully consistent with the RNA-seq analysis (Supplementary Figure 3).

Rootlet Functional Phase

As we could observe in the late stages of rootlet development a burst of genes implied in responses to phosphate starvation as well as genes implied in phosphate transport, we decided to assess phosphate absorption and organic acid exudation during the course of rootlet development as defined in Figure 1 in order to detect at which stage of development the Pi metabolism is boosted.



Uptake of Pi was investigated by performing ^{33}P labeling assays using excised cluster root segments corresponding to stage II to V of rootlet development. Pi influx significantly increased in stages IV and V, with at least a 2-fold higher uptake compared to stages II and III (Figure 7A).

Citrate and malate exudations were also quantified in stage II to V of rootlet development, on the cluster root tip and the link segment (Figures 7B,C). Malate exudation remained constant in the root tip and the stages II, III and V but a two-fold increase was observed in stage IV (Figure 7B). No detectable excretion of citrate was observed in the cluster root tip. However, a gradual

increase in citrate exudates was detected during the rootlet development. The amount of released citrate was at least 100% to 150% higher in stage IV and stage V, respectively, compared to the cluster root tip, link and stages II and III (Figure 7C). These data indicate that rootlets exudate large amounts of citrate as soon as they reach their final length. The same profile was obtained with a normalization by fresh weight (data not shown).

Taken together, these findings indicate that rootlets at the end of the growing phase evolve in specialized structures able to uptake large amounts of Pi and to exudate large amounts of organic acids.

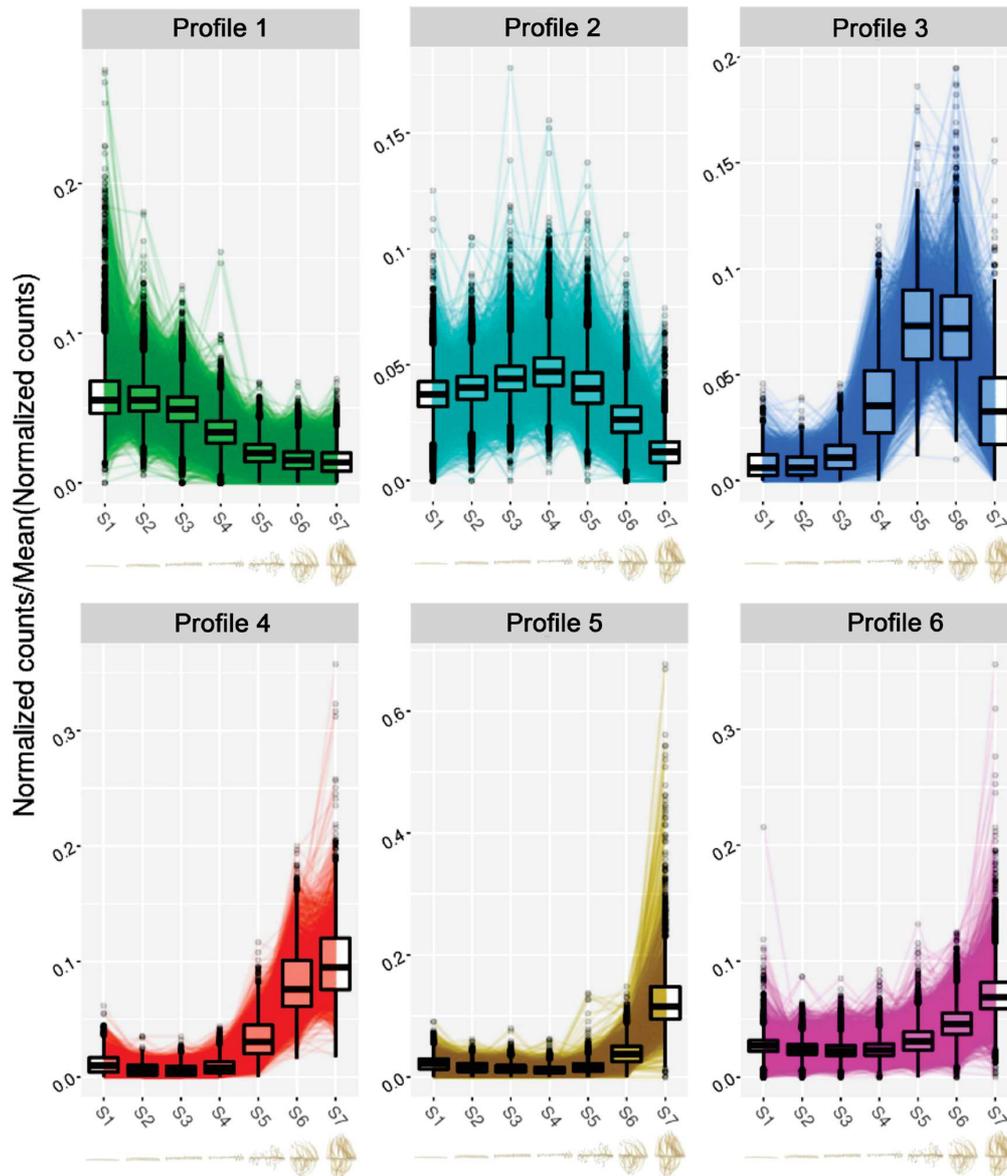


FIGURE 6 | Clustering analysis of the normalized expression profiles of the differentially expressed transcripts between S1 and S7 sections of the RNA-seq experiment. Normalized gene expression profiles come from our previous RNA-seq study (Hufnagel et al., 2020). The clustering was performed with the Coseq package in DIANE (Cassan et al., 2021). The numbers of genes clustered in each gene expression profile are the following: Profile 1: 1,792; Profile 2: 2,129; Profile 3: 411; Profile 4: 482; Profile 5: 584; Profile 6: 1,836. Below each profile, the cluster root sections from S1 to S7 of the RNA-seq analysis are presented.

DISCUSSION

From the End of Its Growth, the Rootlet Is a Highly Active Nutrition-Specialized Organ

The formation of clusters of rootlets constitute a spectacular developmental and functional adaptation of white lupin to cope with phosphorus deficiency (Neumann and Martinoia, 2002). Their physiological activity has been widely documented (Dinkelaker et al., 1989; Neumann et al., 2000; Massonneau et al., 2001; Tomasi et al., 2009; Müller et al., 2015). However,

few studies have been dedicated to the development of these structures. The very early developmental stages, including the initiation and the formation of rootlet primordia, have been described (Cheng et al., 2011; Gallardo et al., 2019). They appeared to be very similar to the lateral root formation in the model plant *A. thaliana*, with the establishment of an auxin maximum and the progressive organogenesis of a new meristem from the inner tissues of the root. The development of the rootlet itself is then more specific. Many works studied long cluster roots bearing several clusters of rootlets of different age: emergent, juvenile, mature and senescent, but did not describe the dynamics

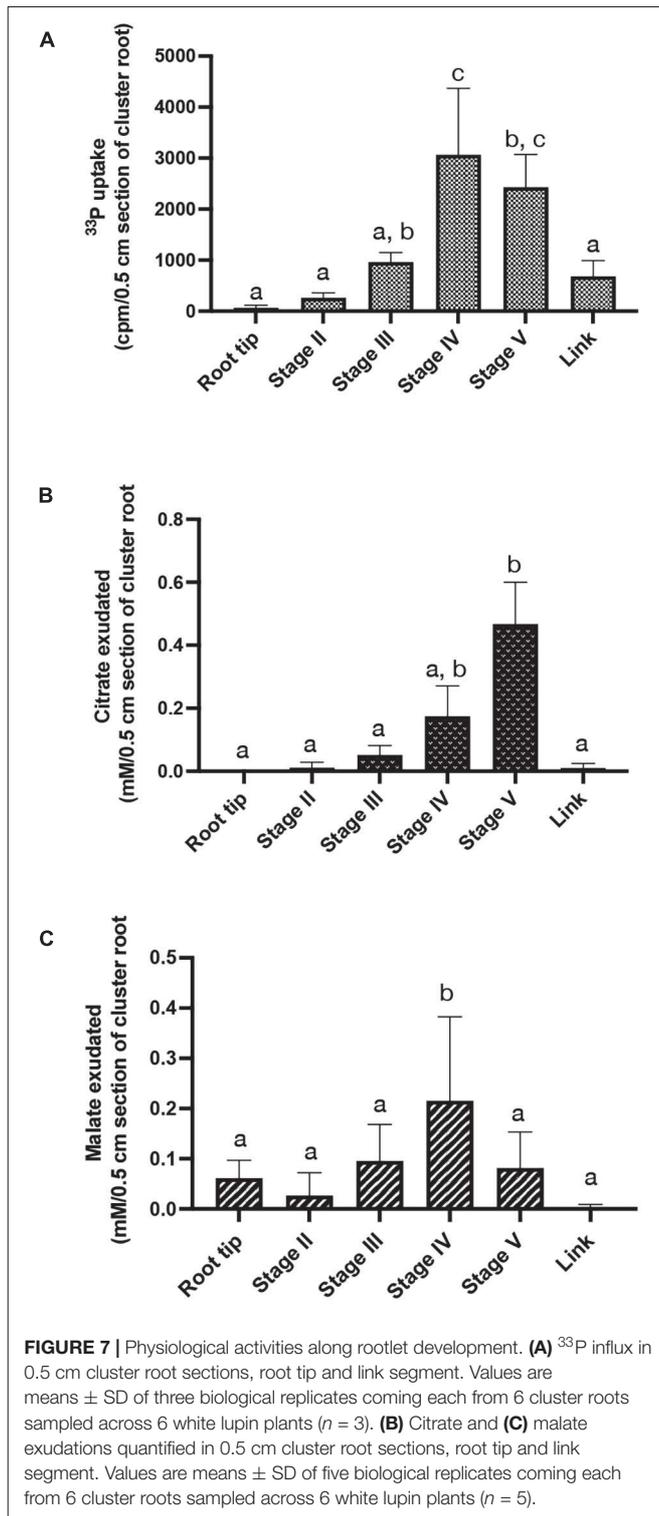
TABLE 1 | List of plasma membrane transport genes overexpressed in the late stages of rootlet development.

Lupin gene code	Arabidopsis gene code	Gene description	Element	Profile number
Lalb_Chr20g0113031	AT2G37330	Aluminum sensitive 3 (ALS3)	Aluminum	Profile 5
Lalb_Chr07g0185661	AT4G21120	Amino acid transporter 1 (AAT1)	Amino acid	Profile 6
Lalb_Chr14g0363171	AT5G40780	Lysine histidine transporter 1 (LHT1)	Amino acid	Profile 6
Lalb_Chr03g0042381	AT3G09330	Amino acid transporter (AVT1G)	Amino acid	Profile 6
Lalb_Chr13g0295001	AT3G13620	Polyamine uptake transporter 4 (PUT4)	Amino acid	Profile 6
Lalb_Chr17g0344301	AT3G13620	Polyamine uptake transporter 4 (PUT4)	Amino acid	Profile 6
Lalb_Chr07g0184111	AT2G38290	Ammonium transporter 2 (AMT2)	Ammonium	Profile 4
Lalb_Chr18g0052441	AT1G80660	H(+)-ATPase 9	ATPase	Profile 4
Lalb_Chr20g0116471	AT1G80660	H(+)-ATPase 9	ATPase	Profile 5
Lalb_Chr13g0303081	AT5G61350	Protein kinase superfamily protein (CAP1)	Calcium	Profile 5
Lalb_Chr14g0362681	AT4G22120	Calcium-permeable stretch activated cation channel (CSC1)	Calcium	Profile 4
Lalb_Chr05g0218691	AT2G29120	Glutamate receptor 2.7 (GLR2.7)	Calcium	Profile 5
Lalb_Chr05g0218701	AT2G29120	Glutamate receptor 2.7 (GLR2.7)	Calcium	Profile 5
Lalb_Chr25g0283091	AT3G08040	Ferric reductase defective (FRD3)	Citrate	Profile 5
Lalb_Chr13g0291391	AT2G38460	Iron-regulated transporter 1 (IRT1)	Iron	Profile 5
Lalb_Chr14g0367651	AT1G60960	Iron regulated transporter 3 (IRT3)	Iron	Profile 5
Lalb_Chr24g0394061	AT5G59520	ZRT/IRT-like protein 2 (ZIP2)	Iron	Profile 5
Lalb_Chr02g0149651	AT4G00910	Aluminum-activated malate transporter 10 (ALMT10)	Malate	Profile 5
Lalb_Chr03g0027601	AT1G08100	High-affinity nitrate transporter 2.2 (NRT2.2)	Nitrate	Profile 5
Lalb_Chr05g0228311	AT1G12940	Nitrate transporter2.5 (NRT 2.5)	Nitrate	Profile 4
Lalb_Chr07g0183011	AT5G50200	High-affinity nitrate transporter (NRT3.1)	Nitrate	Profile 6
Lalb_Chr08g0234171	AT2G23980	Cyclic Nucleotide-Gated Channel 6 (CNGC6)	Nitrate	Profile 4
Lalb_Chr01g0000701	AT3G47420	Phosphate starvation-induced glycerol-3-phosphate permease (G3PP1)	Phosphate	Profile 6
Lalb_Chr04g0259111	AT2G32830	Phosphate transporter 1;5 (PHT1;5)	Phosphate	Profile 4
Lalb_Chr05g0219741	AT1G76430	Phosphate transporter 1;9 (PHT1;9)	Phosphate	Profile 4
Lalb_Chr09g0328731	AT1G76430	Phosphate transporter 1;9 (PHT1;9)	Phosphate	Profile 5
Lalb_Chr10g0094631	AT2G32830	Phosphate transporter 1;5 (PHT1;5)	Phosphate	Profile 5
Lalb_Chr04g0259111	AT2G32830	Phosphate transporter 1;5 (PHT1;5)	Phosphate	Profile 4
Lalb_Chr09g0330281	AT2G40540	Potassium transporter 2 (POT2)	Potassium	Profile 6
Lalb_Chr24g0393761	AT4G10310	High-affinity K ⁺ transporter 1 (HKT1)	Potassium	Profile 5
Lalb_Chr09g0332731	AT4G23700	Cation/H ⁺ exchanger 17 (CHX17)	Sodium	Profile 5
Lalb_Chr05g0210921	AT5G26340	Sugar transport protein 13 (STP13)	Sugar	Profile 6
Lalb_Chr06g0160591	AT5G26340	Sugar transport protein 13 (STP13)	Sugar	Profile 5
Lalb_Chr20g0123111	AT1G22150	Sulfate transporter 1;3 (Sultr1;3)	Sulfate	Profile 4
Lalb_Chr01g0018841	AT2G16850	Plasma membrane intrinsic protein 2;8 (PIP2;8)	Water	Profile 5
Lalb_Chr02g0142171	AT2G37170	Plasma membrane intrinsic protein 2;2 (PIP2;2)	Water	Profile 5
Lalb_Chr02g0142181	AT5G60660	Plasma membrane intrinsic protein 2;4 (PIP2;4)	Water	Profile 5
Lalb_Chr03g0027361	AT5G60660	Plasma membrane intrinsic protein 2;4 (PIP2;4)	Water	Profile 6
Lalb_Chr24g0401831	AT1G05300	Zinc transporter 5 (ZIP5)	Zinc	Profile 5
Lalb_Chr02g0151441	AT2G36380	Pleiotropic drug resistance 6 (ABCG34)	Others	Profile 4
Lalb_Chr03g0024501	AT3G21090	ABC-2 type transporter family protein (ABCG15)	Others	Profile 5
Lalb_Chr04g0261571	AT1G01340	Cyclic Nucleotide Gated Channel 10 (CNGC10)	Others	Profile 5
Lalb_Chr08g0242031	AT1G34580	Major facilitator superfamily protein	Others	Profile 4
Lalb_Chr08g0242041	AT1G34580	Major facilitator superfamily protein	Others	Profile 5
Lalb_Chr16g0391341	AT4G10770	Oligopeptide transporter 7 (OPT7)	Others	Profile 6
Lalb_Chr19g0130401	AT4G27970	SLAC1 homolog 2 (SLAH2)	Others	Profile 4
Lalb_Chr20g0113531	AT1G15520	ATP-binding cassette G40 (ABCG40)	Others	Profile 6
Lalb_Chr21g0305601	AT1G80760	NOD26-like intrinsic protein 6;1 (NIP6;1)	Others	Profile 4
Lalb_Chr24g0402281	AT1G15520	ATP-binding cassette G40 (ABCG40)	Others	Profile 4
Lalb_Chr25g0284471	AT1G16310	Cation efflux family protein	Others	Profile 5

The plasma membrane transport genes from profiles 4, 5, and 6 of the clustering analysis are listed.

of rootlet development within a single cluster (Neumann and Römheld, 1999; Weisskopf et al., 2006; Tomasi et al., 2008; Wang et al., 2010; Tiziani et al., 2020). We focused on young

white lupin root system, with cluster roots bearing a single cluster and studied its rootlets from emergence to final growth. It is well known that rootlet growth is determinate (Skene, 1998;



initial cells, orchestrates a proper balance between cell division and cell differentiation (Van Den Berg et al., 1997). The regulation of the meristematic zone implies complex regulatory mechanisms involving phytohormones, transcription factors such as *WOX5* and *SCR*, and regulatory proteins like *ROW1* (Drisch and Stahl, 2015; Zhang et al., 2015). We therefore identified *LaWOX5-like*, *LaSCR-like* and *LaROW1-like* as white lupin homologs of these main regulators of the stem cell niche function. At the beginning of rootlet development, anatomical observations and RNA-seq analysis demonstrated the establishment and maintenance of a normal root meristem with high dividing activities along with elongation and differentiation zones. However, the anatomical description of the rootlet development highlighted a major transition between emergence and rootlet growth arrest at stage IV, corresponding to the S5 and S6 portions of the RNA-seq sampling. Our results suggest an exhaustion of stem cells and a complete differentiation of the rootlet which becomes determinate. It is known that root determinacy is usually related to developmental changes within the root apical meristem and that any disruption in the balance between cell division and cell differentiation would lead to the deregulation or even the exhaustion of the meristem. These changes are often accompanied with multiple growth defects including swelling or program cell death (Shishkova et al., 2008; Hernández-Barrera et al., 2011). However, no tissue damages have been observed in the rootlets studied. On the contrary, our RNA-seq analysis showed an impressive burst of metabolic and membrane transport activities in the S6/S7 samples. In the time course of the analysis, the final determinate stage is clearly reached but the rootlet is not yet senescent and its physiological activities are high. Interestingly, RNA-seq data analysis suggested an increase in membrane proteins dedicated to the uptake of many essential nutrients such as phosphate, nitrate, ammonium, potassium, sulfate, iron, zinc or calcium. Such a result was already present in previous white lupin transcriptome analysis (Secco et al., 2014; Wang et al., 2014; Zanin et al., 2019), but the focus was only on Pi nutrition. At the end of the growing phase, massive secretion of protons and citrate into the rhizosphere may affect not only the availability of phosphate, but also the solubility of other nutrients. The simultaneous increase of several membrane transporters boosts overall nutrient-uptake efficiency. Finally, our study underlines that the rootlet becomes a hyper-specialized organ dedicated to nutrient acquisition just after its growth arrest. Its high physiological activities at its determinate state lead to the complete nutrient exploitation of a small patch of soil.

White Lupin Rootlet Determinacy Is Different From *A. thaliana* Primary Root Growth Arrest in Response to Pi Deficiency

The primary root of *A. thaliana* has been extensively studied for its growth arrest in response to Pi starvation (Sánchez-Calderón et al., 2005; Svistoonoff et al., 2007; Péret et al., 2014). However, the QTL analysis based on the differential responses of *Col* and *Ler A. thaliana* accessions to Pi deprivation identified that the main determinants of this process reside in an alteration in

Neumann and Römheld, 1999; Watt and Evans, 1999). However, how rootlets tips shift from a growing to a determinate state is not yet clear. Indeterminate root growth is sustained by the root apical meristem (RAM). The maintenance of the stem cell niche, composed by the mitotically less active quiescent center and the

the functioning of primary root apex (Reymond et al., 2006) while our results show that it is not the case for white lupin rootlets. Indeed, when the tip of the *A. thaliana* primary root detects external Pi limitation, a rapid inhibition of cell elongation occurs in the transition zone followed by a progressive arrest of cell proliferation (Svistoonoff et al., 2007; Ward et al., 2008; Ticconi et al., 2009; Müller et al., 2015). The fine molecular dissection of this process has highlighted the involvement of LPR1-PDR2 and STOP1-ALMT modules leading to ROS regeneration and callose deposition in the plasmodesmata of the root apical meristem, inducing the root tip decay (Balzergue et al., 2017; Mora-Macías et al., 2017; Gutiérrez-Alanís et al., 2018). In opposition to the *A. thaliana* primary root response, the anatomic and molecular descriptions of white lupin rootlet development show a rapid exhaustion of stem cell niche after emergence, and then, an arrest of cell divisions while elongation goes on, along with the differentiation of all rootlet cells. As quoted earlier, the necrotic appearance described in *A. thaliana* primary root (Sánchez-Calderón et al., 2005) was not observed in the rootlets studied. In opposition, rootlets remain fully active with a burst of membrane transporters, phosphatases, PEP-carboxylase and pentose phosphate cycle activities, revealing a very intense metabolic phase. All these results led to propose that the determinate growth of the white lupin rootlet is not similar to that of *A. thaliana* primary root, but rather looks like a transition from canonical meristematic structures to differentiated tissues highly active and specialized in nutritional activities.

Root Determinacy Is a Hallmark of Plants Growing in Adverse Conditions to Cope With Water or Pi Deficiency

In many plants, the determinacy of root growth is only induced by mechanical or nutritional stresses (Shishkova et al., 2008). In white lupin, or some Cactaceae, a more regular determinacy appears in the root system (Dubrovsky, 1997; Shishkova et al., 2008). These plants naturally grow in adverse environments. In white lupin, formation of cluster roots is a response to Pi shortage and allows the exploitation of a low mobile Pi pool. We showed that rootlet reaches its higher metabolic activity when it stops growing. In the same way, recent transcriptome analysis has underlined the role of water stress in the regulation of the cactus *Pachycereus pringlei* primary root determinacy to favor the development of the upper part of the root system (Rodríguez-Alonso et al., 2018). In maize (Varney and McCully, 1991) and, more recently, in other cereals such as rice (Rebouillat et al., 2009) or pearl millet (Passot et al., 2018), lateral roots with a determinate fate have also been described. The proportion of short and long lateral roots was shown to be under the control of both environmental and genetic factors (Vejchasarn et al., 2016). In maize, the presence of short determinate roots is genetically controlled and varies between cultivars (Dowd et al., 2019). Short determinate maize lateral roots have open xylem vessels down to the tip, favoring high water conductivity (Wang et al., 1994). However, water deficit conditions delay the determinacy program to give priority to root elongation and water foraging (Dowd et al., 2020). It is interesting to

note that root determinacy in cactus and white lupin is an adaptation to low mobile resources, rain water and Pi pools, respectively, whereas it is delayed in cereals to favor a deeper root system, illustrating the root dilemma between maximizing soil exploitation or soil exploration.

The fine study of white lupin rootlet development gave a clear illustration of this dilemma showing that exhaustion of the meristematic zone is required to build a short organ specialized in soil mining to optimize solubilization and absorption. The intricate molecular controls of the determinate growth leading to a complete differentiation into specialized roots dedicated to mining instead of foraging, is fully unknown and the study of white lupin rootlet development provides a powerful model to gain insight into this question.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding authors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PD, LM, and TL contributed to conception and design of the study. TL performed the main experiments. CC and LB provided technical assistance in molecular biology and hairy root transformation. LM supervised microscope experiments. AS and PD analyzed the transcriptome data. BH, BP, and FD generated tools and analyzed data. LM and TL wrote the article. All authors contributed to manuscript revision, read, and approved the submitted version.

FUNDING

This project has received funding from the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Program (Starting Grant LUPINROOTS – grant agreement No 637420 to BP).

ACKNOWLEDGMENTS

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 Carine Alcon from the platform PHIV (Plateforme d’Histocytologie et d’Imagerie Cellulaire Végétale), for her valuable comments and technical assistance on microscopy imaging.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.738172/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Abdolzadeh, A., Wang, X., Veneklaas, E. J., and Lambers, H. (2010). Effects of phosphorus supply on growth, phosphate concentration and cluster-root formation in three *Lupinus* species. *Ann. Bot.* 105, 365–374. doi: 10.1093/aob/mcp297
- Al-Ghazi, Y., Muller, B., Pinloche, S., Tranbarger, T. J., Nacry, P., Rossignol, M., et al. (2003). Temporal responses of *Arabidopsis* root architecture to phosphate starvation: evidence for the involvement of auxin signalling. *Plant Cell. Environ.* 26, 1053–1066. doi: 10.1046/j.1365-3040.2003.01030.x
- Balzergue, C., Dartevelle, T., Godon, C., Laugier, E., Meisrimler, C., Teulon, J.-M., et al. (2017). Low phosphate activates STOP1-ALMT1 to rapidly inhibit root cell elongation. *Nat. Commun.* 8:15300.
- Bouain, N., Doumas, P., and Rouached, H. (2016). Recent advances in understanding the molecular mechanisms regulating the root system response to phosphate deficiency in *Arabidopsis*. *Curr. Genom.* 17:308. doi: 10.2174/1389202917666160331201812
- Cassan, O., Lèbre, S., and Martin, A. (2021). Inferring and analyzing gene regulatory networks from multi-factorial expression data: a complete and interactive suite. *BMC Genom.* 22:387. doi: 10.1186/s12864-021-07659-2
- Cheng, L., Bucciarelli, B., Shen, J., Allan, D., and Vance, C. P. (2011). Update on white lupin cluster root acclimation to phosphorus deficiency update on lupin cluster roots. *Plant Physiol.* 156:1025. doi: 10.1104/pp.111.175174
- Chiou, T. J., and Lin, S. I. (2011). Signaling network in sensing phosphate availability in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62, 185–206. doi: 10.1146/annurev-arplant-042110-103849
- Dinkelaker, B., Römheld, V., and Marschner, H. (1989). Citric acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant Cell. Environ.* 12, 285–292. doi: 10.1111/j.1365-3040.1989.tb01942.x
- Dowd, T. G., Braun, D. M., and Sharp, R. E. (2019). Maize lateral root developmental plasticity induced by mild water stress. I: Genotypic variation across a high-resolution series of water potentials. *Plant Cell. Environ.* 42, 2259–2273. doi: 10.1111/pce.13399
- Dowd, T. G., Braun, D. M., and Sharp, R. E. (2020). Maize lateral root developmental plasticity induced by mild water stress. II: Genotype-specific spatio-temporal effects on determinate development. *Plant Cell. Environ.* 43, 2409–2427. doi: 10.1111/pce.13840
- Driscoll, R. C., and Stahl, Y. (2015). Function and regulation of transcription factors involved in root apical meristem and stem cell maintenance. *Front. Plant Sci.* 6:505. doi: 10.3389/fpls.2015.00505
- Du, Y., and Scheres, B. (2017). PLETHORA transcription factors orchestrate de novo organ patterning during *Arabidopsis* lateral root outgrowth. *PNAS* 114, 11709–11714. doi: 10.1073/pnas.1714410114
- Dubrovsky, J. G. (1997). Determinate primary-root growth in seedlings of sonoran desert cactaceae; its organization, cellular basis, and ecological significance. *Planta* 203, 85–92. doi: 10.1007/s004250050168
- French, A. P., Wilson, M. H., Kenobi, K., Dietrich, D., Voß, U., Ubeda-Tomás, S., et al. (2012). Identifying biological landmarks using a novel cell measuring image analysis tool: Cell-o-Tape. *Plant Methods* 8:7. doi: 10.1186/1746-4811-8-7
- Gallardo, C., Hufnagel, B., Casset, C., Alcon, C., Garcia, F., Divol, F., et al. (2019). Anatomical and hormonal description of rootlet primordium development along white lupin cluster root. *Physiol. Plant* 165, 4–16. doi: 10.1111/ppl.12714
- Goh, T., Toyokura, K., Wells, D. M., Swarup, K., Yamamoto, M., Mimura, T., et al. (2016). Quiescent center initiation in the *Arabidopsis* lateral root primordia is dependent on the SCARECROW transcription factor. *Development* 143, 3363–3371.
- Gutiérrez-Alanís, D., Ojeda-Rivera, J. O., Yong-Villalobos, L., Cárdenas-Torres, L., and Herrera-Estrella, L. (2018). Adaptation to phosphate scarcity: Tips from *Arabidopsis* roots. *Trends Plant Sci.* 23, 721–730. doi: 10.1016/j.tplants.2018.04.006
- Hernández-Barrera, A., Ugartechea-Chirino, Y., Shishkova, S., Napsucialy-Mendivil, S., Soukup, A., Reyes-Hernández, B. J., et al. (2011). Apical meristem exhaustion during determinate primary root growth in the moods koom 1 mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 234, 1163–1177. doi: 10.1007/s00425-011-1470-4
- Holford, I. C. R. (1997). Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. *Soil Res.* 35, 227–240.
- Hufnagel, B., Marques, A., Soriano, A., Marqués, L., Divol, F., Doumas, P., et al. (2020). High-quality genome sequence of white lupin provides insight into soil exploration and seed quality. *Nat. Commun.* 11:492.
- Johnson, J. F., Vance, C. P., and Allan, D. L. (1996). Phosphorus deficiency in *Lupinus albus* (Altered lateral root development and enhanced expression of Phosphoenolpyruvate Carboxylase). *Plant Physiol.* 112, 31–41. doi: 10.1104/pp.112.1.31
- Karimi, M., Inzé, D., and Depicker, A. (2002). GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 7, 193–195. doi: 10.1016/s1360-1385(02)02251-3
- Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C., and Salzberg, S. L. (2019). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat. Biotechnol.* 37, 907–915. doi: 10.1038/s41587-019-0201-4
- Lambers, H., Shane, M. W., Cramer, M. D., Pearse, S. J., and Veneklaas, E. J. (2006). Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. *Ann. Bot.* 98, 693–713. doi: 10.1093/aob/mcl114
- López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., and Herrera-Estrella, L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 280–287. doi: 10.1016/s1369-5266(03)00035-9
- López-Bucio, J., Hernández-Abreu, E., Sánchez-Calderón, L., Nieto-Jacobo, M. A. F., Simpson, J., and Herrera-Estrella, L. (2002). Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiol.* 129, 244–256. doi: 10.1104/pp.010934
- Lyu, Y., Tang, H., Li, H., Zhang, F., Rengel, Z., Whalley, W. R., et al. (2016). Major crop species show differential balance between root morphological and physiological responses to variable phosphorus supply. *Front. Plant Sci.* 7:1939. doi: 10.3389/fpls.2016.01939
- Malamy, J. E., and Benfey, P. N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124, 33–44. doi: 10.1242/dev.124.1.33
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. J.* 17:3.
- Massonneau, A., Langlade, N., Léon, S., Smutny, J., Vogt, E., Neumann, G., et al. (2001). Metabolic changes associated with cluster root development in white lupin (*Lupinus albus* L.): relationship between organic acid excretion, sucrose metabolism and energy status. *Planta* 213, 534–542. doi: 10.1007/s004250100529
- Mora-Macías, J., Ojeda-Rivera, J. O., Gutiérrez-Alanís, D., Yong-Villalobos, L., Oropeza-Aburto, A., Raya-González, J., et al. (2017). Malate-dependent Fe accumulation is a critical checkpoint in the root developmental response to low phosphate. *PNAS* 114:E3563.
- Müller, J., Gödde, V., Niehaus, K., and Zörb, C. (2015). Metabolic adaptations of white lupin roots and shoots under phosphorus deficiency. *Front. Plant Sci.* 6:1014. doi: 10.3389/fpls.2015.01014
- Nacry, P., Canivenc, G. V., Muller, B., Azmi, A., Van Onckelen, H., Rossignol, M., et al. (2005). A role for auxin redistribution in the responses of the root system architecture to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 138, 2061–2074. doi: 10.1104/pp.105.060061
- Neumann, G., and Martinoia, E. (2002). Cluster roots – an underground adaptation for survival in extreme environments. *Trends Plant Sci.* 7, 162–167. doi: 10.1016/s1360-1385(02)02241-0
- Neumann, G., Massonneau, A., Langlade, N., Dinkelaker, B., Hengeler, C., Römheld, V., et al. (2000). Physiological aspects of cluster root function and development in phosphorus-deficient white lupin (*Lupinus albus* L.). *Ann. Bot.* 85, 909–919. doi: 10.1006/anbo.2000.1135
- Neumann, G., and Römheld, V. (1999). Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant Soil* 211, 121–130.
- Pantigoso, H. A., Yuan, J., He, Y., Guo, Q., Vollmer, C., and Vivanco, J. M. (2020). Role of root exudates on assimilation of phosphorus in young and old *Arabidopsis thaliana* plants. *PLoS One* 15:e0234216. doi: 10.1371/journal.pone.0234216
- Passot, S., Moreno-Ortega, B., Moukouanga, D., Balsara, C., Guyomarc'h, S., Lucas, M., et al. (2018). A new phenotyping pipeline reveals three types of lateral roots and a random branching pattern in two cereals. *Plant Physiol.* 177, 896–910.
- Péret, B., Desnos, T., Jost, R., Kanno, S., Berkowitz, O., and Nussaume, L. (2014). Root architecture responses: In search of phosphate. *Plant Physiol.* 166, 1713–1723. doi: 10.1104/pp.114.244541

- Pertea, M., Pertea, G. M., Antonescu, C. M., Chang, T.-C., Mendell, J. T., and Salzberg, S. L. (2015). StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat. Biotechnol.* 33, 290–295. doi: 10.1038/nbt.3122
- Pi, L., Aichinger, E., Van der graaff, E., Llavata-Peris, C. I., Weijers, D., Hennig, L., et al. (2015). Organizer-Derived WOX5 signal maintains root columella stem cells through chromatin-mediated repression of CDF4 expression. *Dev. Cell.* 33, 576–588.
- Puga, M. I., Rojas-Triana, M., De Lorenzo, L., Leyva, A., Rubio, V., and Paz-Ares, J. (2017). Novel signals in the regulation of Pi starvation responses in plants: facts and promises. *Curr. Opin. Plant Biol.* 39, 40–49. doi: 10.1016/j.copbio.2017.05.007
- Rebouillat, J., Dievart, A., Verdeil, J. L., Escoute, J., Giese, G., Breitler, J. C., et al. (2009). Molecular genetics of rice root development. *Rice* 2, 15–34. doi: 10.1007/s12284-008-9016-5
- Reymond, M., Svistoonoff, S., Loudet, O., Nussaume, L., and Desnos, T. (2006). Identification of QTL controlling root growth response to phosphate starvation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell. Environ.* 29, 115–125. doi: 10.1111/j.1365-3040.2005.01405.x
- Rodríguez-Alonso, G., Matvienko, M., López-Valle, M. L., Zaro-Mixteco, P. E., Napsucialy-Mendivil, S., Dubrovsky, J. G., et al. (2018). Transcriptomics insights into the genetic regulation of root apical meristem exhaustion and determinate primary root growth in *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *Sci. Rep.* 8:8529.
- Rogers, E. D., and Benfey, P. N. (2015). Regulation of plant root system architecture: implications for crop advancement. *Curr. Opin. Biotech.* 32, 93–98. doi: 10.1016/j.copbio.2014.11.015
- Sabatini, S., Heidstra, R., Wildwater, M., and Scheres, B. (2003). SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Genes. Dev.* 17, 354–358. doi: 10.1101/gad.252503
- Sánchez-Calderón, L., López-Bucio, J., Chacón-López, A., Cruz-Ramírez, A., Nieto-Jacobo, F., Dubrovsky, J. G., et al. (2005). Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 46, 174–184. doi: 10.1093/pcp/pci011
- Sbabou, L., Bucciarelli, B., Miller, S., Liu, J., Berhada, F., Filali-Maltouf, A., et al. (2010). Molecular analysis of SCARECROW genes expressed in white lupin cluster roots. *J. Exp. Bot.* 61, 1351–1363. doi: 10.1093/jxb/erp400
- Secco, D., Jabnune, M., Walker, H., Shou, H., Wu, P., Poirier, Y., et al. (2013). Spatio-temporal transcript profiling of rice roots and shoots in response to phosphate starvation and recovery. *Plant Cell.* 25, 4285–4304. doi: 10.1105/tpc.113.117325
- Secco, D., Shou, H., Whelan, J., and Berkowitz, O. (2014). RNA-seq analysis identifies an intricate regulatory network controlling cluster root development in white lupin. *BMC Genom.* 15:230. doi: 10.1186/1471-2164-15-230
- Shishkova, S., Rost, T. L., and Dubrovsky, J. G. (2008). Determinate root growth and meristem maintenance in angiosperms. *Ann. Bot.* 101, 319–340. doi: 10.1093/aob/mcm251
- Skene, K. R. (1998). Cluster roots: some ecological considerations. *J. Ecol.* 86, 1060–1064. doi: 10.1046/j.1365-2745.1998.00326.x
- Svistoonoff, S., Creff, A., Reymond, M., Sigoillot-Claude, C., Ricaud, L., Blanchet, A., et al. (2007). Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nat. Genet.* 39, 792–796. doi: 10.1038/ng2041
- Ticconi, C. A., Lucero, R. D., Sakhonwasee, S., Adamson, A. W., Creff, A., Nussaume, L., et al. (2009). ER-resident proteins PDR2 and LPR1 mediate the developmental response of root meristems to phosphate availability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 106, 14174–14179. doi: 10.1073/pnas.0901778106
- Tiziani, R., Mimmo, T., Valentinuzzi, F., Pii, Y., Celletti, S., and Cesco, S. (2020). Root handling affects carboxylates exudation and phosphate uptake of white lupin roots. *Front. Plant Sci.* 11:584568. doi: 10.3389/fpls.2020.584568
- Tomasi, N., Kretschmar, T., Espen, L., Weisskopf, L., Fuglsang, A., Palmgren, M., et al. (2009). Plasma membrane H⁺-ATPase-dependent citrate exudation from cluster roots of phosphate-deficient white lupin. *Plant Cell Environ.* 32, 465–475. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.01938.x
- Tomasi, N., Weisskopf, L., Renella, G., Landi, L., Pinton, R., Varanini, Z., et al. (2008). Flavonoids of white lupin roots participate in phosphorus mobilization from soil. *Soil Biol. Biochem.* 40, 1971–1974. doi: 10.1016/j.soilbio.2008.02.017
- Trinh, C. D., Laplace, L., and Guyomarç'h, S. (2018). Lateral root formation: building a meristem de novo. *Annu. Plant Rev. Online* 1, 847–890. doi: 10.1002/9781119312994.apr0650
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., et al. (2012). Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40:e115. doi: 10.1093/nar/gks596
- Ursache, R., Andersen, T. G., Marhavı, P., and Geldner, N. (2018). A protocol for combining fluorescent proteins with histological stains for diverse cell wall components. *Plant J.* 93, 399–412. doi: 10.1111/tpj.13784
- Van Den Berg, C., Willemsen, V., Hendriks, G., Weisbeek, P., and Scheres, B. (1997). Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* 390, 287–289. doi: 10.1038/36856
- Varney, G. T., and Mccully, M. E. (1991). The branch roots of *Zea*. II. Developmental loss of the apical meristem in field-grown roots. *New Phytol.* 118, 535–546. doi: 10.1111/j.1469-8137.1991.tb00993.x
- Vejchasharn, P., Lynch, J. P., and Brown, K. M. (2016). Genetic variability in phosphorus responses of rice root phenotypes. *Rice* 9:29.
- Wang, B. L., Tang, X. Y., Cheng, L. Y., Zhang, A. Z., Zhang, W. H., Zhang, F. S., et al. (2010). Nitric oxide is involved in phosphorus deficiency-induced cluster-root development and citrate exudation in white lupin. *New Phytol.* 187, 1112–1123. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03323.x
- Wang, X. L., Mccully, M. E., and Canny, M. J. (1994). The branch roots of *zea*. *New Phytol.* 126, 21–29.
- Wang, Z., Straub, D., Yang, H., Kania, A., Shen, J., Ludewig, U., et al. (2014). The regulatory network of cluster-root function and development in phosphate-deficient white lupin (*Lupinus albus*) identified by transcriptome sequencing. *Physiol. Plant* 151, 323–338. doi: 10.1111/ppl.12187
- Ward, J. T., Lahner, B., Yakubova, E., Salt, D. E., and Raghothama, K. G. (2008). The effect of iron on the primary root elongation of *arabidopsis* during phosphate deficiency. *Plant Physiol.* 147, 1181–1191. doi: 10.1104/pp.108.118562
- Watt, M., and Evans, J. R. (1999). Proteoid roots. Physiology and development. *Plant Physiol.* 121, 317–323. doi: 10.1104/pp.121.2.317
- Weisskopf, L., Abou-Mansour, E., Fromin, N., Tomasi, N., Santelia, D., Edelkott, I., et al. (2006). White lupin has developed a complex strategy to limit microbial degradation of secreted citrate required for phosphate acquisition. *Plant Cell. Environ.* 29, 919–927. doi: 10.1111/j.1365-3040.2005.01473.x
- Willemsen, V., Bauch, M., Bennett, T., Campilho, A., Wolkenfelt, H., Xu, J., et al. (2008). The NAC domain transcription factors FEZ and SOMBRERO control the orientation of cell division plane in *arabidopsis* root stem cells. *Dev. Cell.* 15, 913–922. doi: 10.1016/j.devcel.2008.09.019
- Williamson, L. C., Ribrioux, S. P. C. P., Fitter, A. H., and Leyser, H. M. O. (2001). Phosphate availability regulates root system architecture in *arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126, 875–882. doi: 10.1104/pp.126.2.875
- Zanin, L., Venuti, S., Marroni, F., Franco, A., Morgante, M., Pinton, R., et al. (2019). Physiological and RNA sequencing data of white lupin plants grown under Fe and P deficiency. *Data Brief* 25:104069. doi: 10.1016/j.dib.2019.10.4069
- Zhang, Y., Jiao, Y., Liu, Z., and Zhu, Y. X. (2015). ROW1 maintains quiescent centre identity by confining WOX5 expression to specific cells. *Nat. Commun.* 6:6003.

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Le Thanh, Hufnagel, Soriano, Divol, Brottier, Casset, Péret, Doumas and Marquès. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

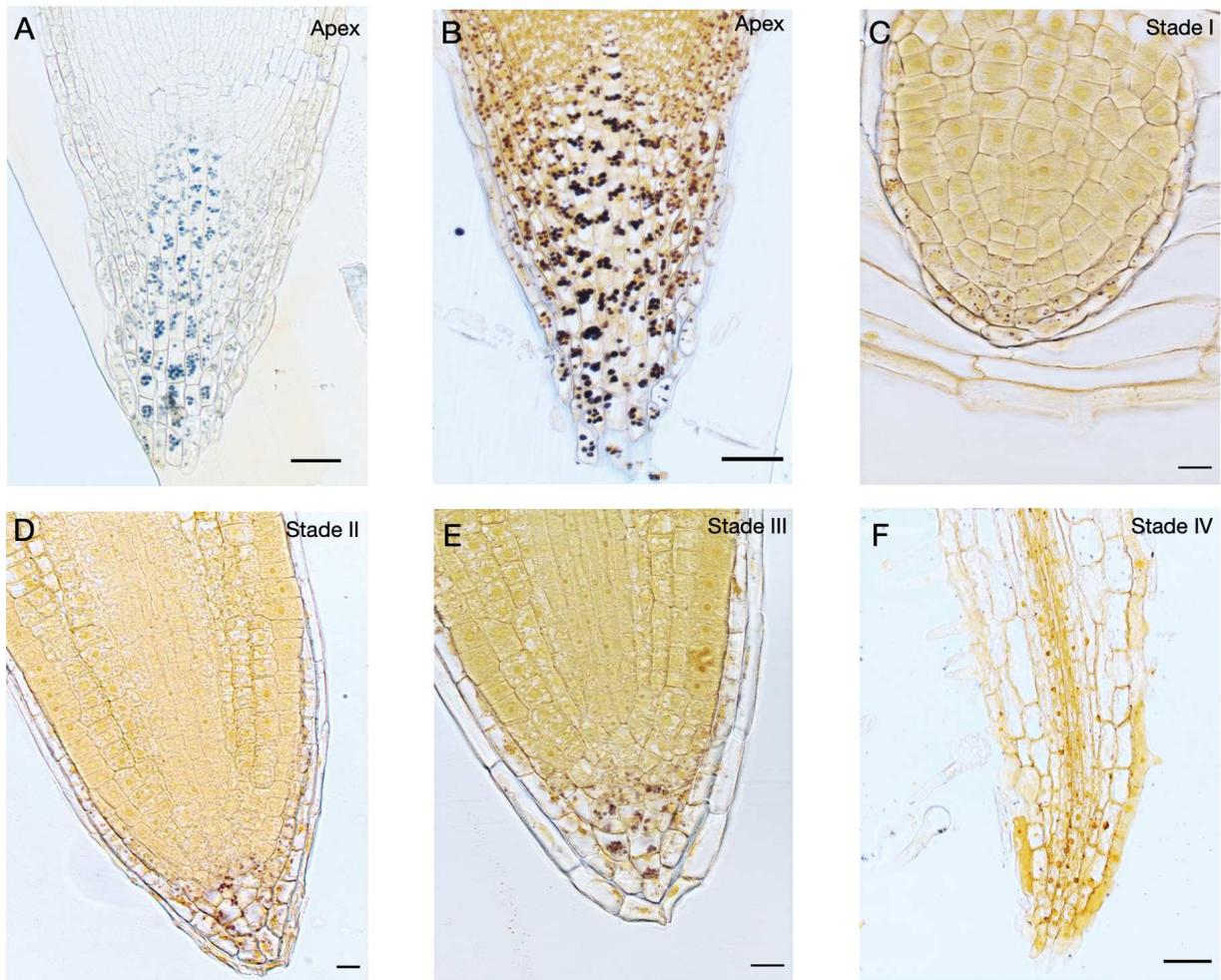


Figure 1.1 : Accumulation des grains d'amidon dans la coiffe de l'apex de la racine protéoïde et des rootlettes à différents stades de développement. Les grains d'amidon présents dans les statolithes ont été colorés au lugol (A) 10% et (B) pur sur des coupes de résine de 8 μm de l'apex de la racine protéoïde. Une coloration au lugol pur a également été effectuée sur les apex des stades (C) I, (D) II, (E) III et (F) IV des rootlettes. Echelles : (A-B) 50 μm , (C-F) 10 μm .

2.2 Résultats complémentaires

2.2.1 Les amyloplastes disparaissent durant le développement des rootlettes

Les résultats présentés dans l'article ci-dessus (cf. section 2.1) montrent une disparition de la coiffe latérale et de la columelle chez les rootlettes suite à leur arrêt de croissance. Afin de confirmer cette hypothèse, il me semblait pertinent de suivre la présence des statocytes dans les différents stades de développement des rootlettes. A l'instar d'une racine latérale classique, on observe la présence de statocytes dans la coiffe de l'apex de la racine protéoïde, particulièrement dans la columelle (Figure 1.1A, B). Plusieurs dilutions ont été testées mais seule l'utilisation du lugol pur a pu mettre en évidence la présence de statolithes dans l'apex des différents stades de développement des rootlettes (Figure 1.1.C-F). Globalement, le nombre de statolithes dans la columelle des rootlettes est très faible et l'on observe notamment que le nombre de couches cellulaires dans la columelle est largement réduit comparé à l'apex de la racine protéoïde (Figure 1.1B-F). Dès le stade I du développement des rootlettes, la présence de statolithes dans l'apex du primordium suggère la mise en place précoce de la coiffe racinaire (Figure 1.1B). Après émergence (Figure 1.1C) et durant la croissance des rootlettes (Figure 1.1D), on observe un nombre réduit de statocytes dans la columelle des rootlettes en comparaison avec l'apex de la racine protéoïde. Le nombre de statolithes dans les cellules semble similaire mais leur taille est fortement réduite. A partir du stade IV, aucun statocyte n'est observable (Figure 1.1E) et, comme décrit dans l'article ci-dessus (cf. section 2.1), l'apex de la rootlette présente des changements structurels importants avec (i) une augmentation de la taille des cellules, (ii) un cylindre central se développant jusqu'à l'extrémité de l'apex et (iii) la disparition de la coiffe laissant place au développement des poils absorbants sur la totalité de la rootlette. Ces images, réalisées après la finalisation de l'article scientifique, confortent les conclusions apportées par celui-ci, stipulant un arrêt précoce de l'auto-maintien du méristème, entraînant ainsi la différenciation

RAPPEL

- Les statocytes sont des cellules végétales polarisées présentes dans la coiffe et impliquées dans la perception de la gravité chez les racines (Iijima et al., 2008).
- Ils contiennent des amyloplastes (organites impliqués dans le stockage d'amidon) spécialisés appelés statolithes, dont le positionnement est dépendant de la gravité.

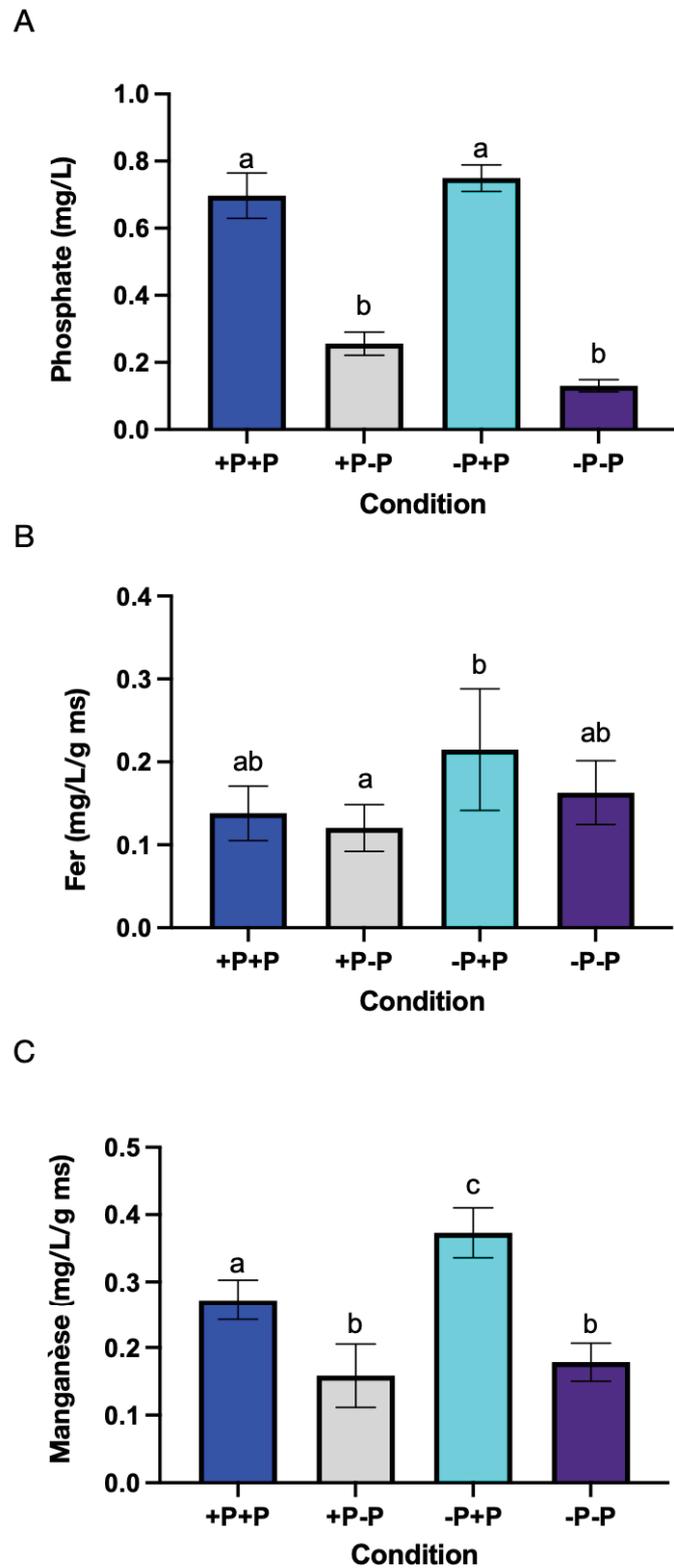


Figure 1.2 : Quantification des nutriments présents dans la sève brute de plantes de lupin blanc cultivées en condition de Pi contrastées pendant 3 jours. Les quantités en (A) phosphate, (B) fer et (C) manganèse ont été quantifiées dans la sève brute, 3 jours après transfert des plantes dans un nouveau milieu (cf. matériel et méthodes pour la nomenclature). La quantité de phosphate a été mesurée par HPLC tandis que les quantités de fer et manganèse ont été mesurées par MP-AES.

des cellules souches initiales et ainsi la perte du maintien de la coiffe. Une fois de plus, il est pertinent de souligner une différence structurelle entre l'apex des rootlettes et l'apex d'une racine primaire ou secondaire.

2.2.2 Le transport des nutriments : des racines jusqu'aux feuilles

Les nutriments sont absorbés par les racines, et transloqués vers les feuilles par la sève brute qui suit un flux ascendant. L'importante capacité d'absorption du Pi par les rootlettes (cf section 2.1) nous a amenés à nous demander si la présence des racines protéoïdes chez le lupin blanc permet une plus grande absorption de Pi lors d'une exposition à un milieu en contenant. Afin de répondre à cette question, j'ai quantifié le Pi contenu dans la sève brute de plantes ayant développé, ou non, des racines protéoïdes et ayant, par la suite, été transférées sur des milieux contenant, ou non, du Pi. Les plantes ont ainsi été réparties en 4 catégories selon le milieu dans lequel elles ont été cultivées et le milieu dans lequel elles ont été transférées : (i) des plantes cultivées en condition de carence en Pi puis transférées sur un milieu riche en Pi : **-P+P** ; (ii) des plantes cultivées dans un milieu contenant du Pi puis transférées *en* condition de carence en Pi : **+P-P** ; (iii) des plantes cultivées en condition de carence en Pi puis transférées dans un nouveau milieu en condition de carence en Pi : **-P-P** (contrôle négatif) et (iv) des plantes cultivées dans un milieu contenant du Pi puis transférées dans un nouveau milieu contenant du Pi : **+P+P** (contrôle positif). Notre condition d'intérêt - P+P représente ainsi les plantes ayant développé des racines protéoïdes avant d'être transférées sur un milieu contenant du Pi. Il est important de noter que ces expériences ont été réalisées en milieu hydroponique.

2.2.2.1 Après 3 jours, les plantes ayant développé des racines protéoïdes présentent un statut phosphaté similaire aux plantes contrôles

Après le développement, ou non, de racines protéoïdes, les plantes ont été transférées durant 3 jours dans le nouveau milieu comme explicité ci-dessus. La sève brute a été récoltée puis analysée par Chromatographie Ionique à Haute Pression (HPIC) afin de doser sa teneur en Pi (Figure 1.2A). Nos contrôles +P+P et -P-P attestent de la présence ou non de Pi dans le milieu d'hydroponie. Au bout de 3 jours, on observe, dans la condition +P-P, une carence en

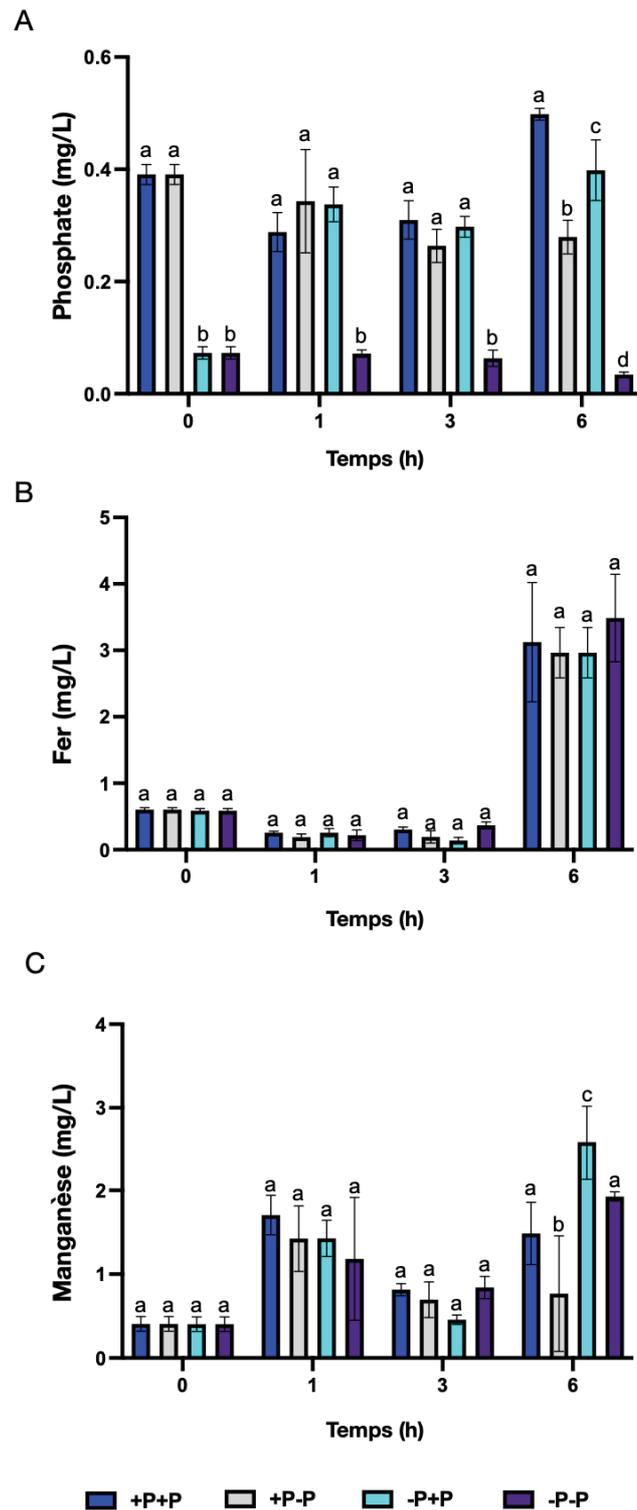


Figure 1.3 : Quantification des nutriments présents dans la sève brute de plantes de lupin blanc cultivées en condition de Pi contrastées (cinétique de 0h à 6h). Les quantités en (A) phosphate, (B) fer et (C) manganèse ont été quantifiées dans la sève brute 0 h, 1 h, 3 h et 6 h après transfert des plantes dans un nouveau milieu (cf. matériel et méthodes pour la nomenclature). La quantité de phosphate a été mesurée par HPIC tandis que les quantités de fer et manganèse ont été mesurées par MP-AES.

Pi similaire à notre condition contrôle -P-P. Concernant notre condition d'intérêt -P+P, le transfert dans un milieu contenant du Pi entraîne la récupération d'un statut phosphaté normal et semblable à notre condition contrôle +P+P. Ce résultat suggère qu'en 3 jours, les plantes ayant développé des racines protéoïdes et se trouvant sur un milieu contenant du Pi arrivent à pallier à leur statut carencé. Il serait alors intéressant de suivre l'évolution des teneurs en Pi de la sève brute sur une cinétique plus courte. Il est aussi intéressant de noter que la présence de racines protéoïdes ne semble pas entraîner une plus grande absorption de Pi que ce qui est nécessaire, ce qui suggère une forte régulation de la nutrition phosphatée chez les plantes.

2.2.2.2 En 1 heure, les plantes carencées en Pi retrouvent un statut phosphaté normal

Pour aller plus loin, j'ai réalisé la même expérience sur un pas de temps plus court dans le but d'évaluer à quelle rapidité les plantes carencées arrivent à pallier le manque de Pi. La sève brute a été récoltée en suivant la cinétique suivante : 0 h, 1 h, 3 h et 6 h (Figure 1.3A). De manière impressionnante, les plantes ayant développé des racines protéoïdes récupèrent un statut phosphaté similaire aux plantes contrôles +P+P en 1 h. En contraste, les plantes cultivées en +P et transférées sur milieu -P sont impactées par la carence au bout de 6 heures seulement. On observe ainsi un contraste entre la rapidité d'absorption du Pi chez les plantes carencées et l'impact de la carence chez les plantes préalablement cultivées en présence de Pi. La dynamique d'absorption et du transport du Pi (Figure 1.4A) couplée à la spécialisation structurelle et fonctionnelle des rootlettes peut expliquer cette rapidité d'absorption.

2.2.2.3 Quand est-il des autres nutriments ?

Lors de la phase fonctionnelle des rootlettes, l'analyse du transcriptome a montré que de nombreux transporteurs de molécules liés à la nutrition de la plante sont exprimés de manière accrue dans les phases tardives du développement de la rootlette (cf. section 2.1 – Le Thanh et al., 2021). Je me suis donc demandé si la présence de racines protéoïdes pouvait avoir un impact sur l'accumulation d'autres nutriments que le Pi. J'ai ainsi quantifié le contenu de différents éléments de la sève brute par spectroscopie d'émission atomique par plasma

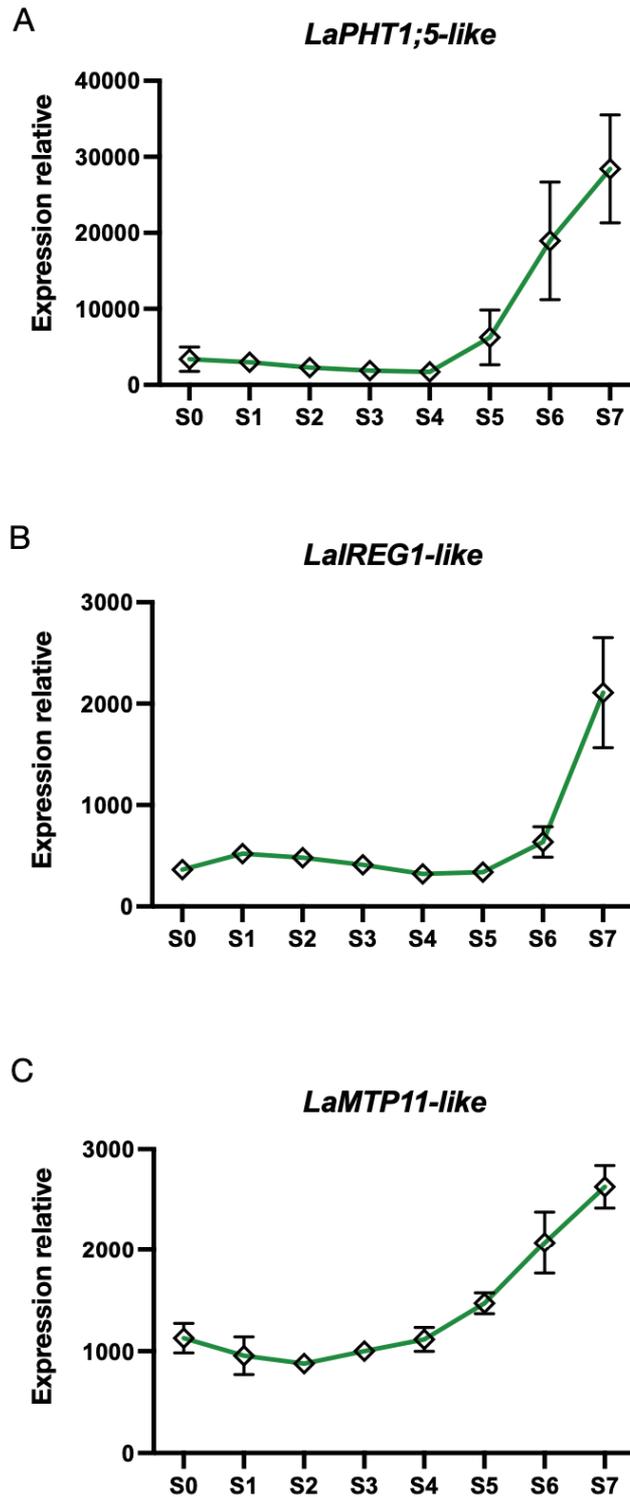


Figure 1.4 : Profils d'expression de 3 transporteurs le long de la racine protéoïde. Expression relative de transporteurs de (A) phosphate, (B) de fer et (C) de manganèse le long de la racine protéoïde segmentée en 8 morceaux à partir de l'apex (S0 à S7). Les profils d'expression ont été obtenus à partir de données transcriptomiques générées dans l'équipe et publiées dans Hufnagel et al., 2020.

micro-ondes (MP-AES). Les variations entre les conditions concernent le fer et le manganèse, 2 nutriments secondaires dont les transporteurs sont fortement exprimés dans les rootlettes en phase fonctionnelle (Figure 1.4B et 4C). Dans la sève brute de la condition d'intérêt -P+P, on observe au bout de 3 jours une accumulation plus importante de ces 2 micronutriments par rapport aux 3 autres conditions (Figure 1.2B, et 2C). Sur un laps de temps plus court, nous n'observons pas de changement pour la quantité de fer présente dans la sève brute au bout de 6h (Figure 1.3B). En revanche, concernant le manganèse, on observe une accumulation significativement plus importante dans la sève des plantes -P+P que dans les autres conditions au bout de 6 h (Figure 1.3C).

3. Discussion

Ce premier chapitre vise à décrire finement les caractéristiques développementales et physiologiques de notre modèle d'étude : les rootlettes de racines protéoïdes de lupin blanc. Alors que de nombreuses recherches ont porté sur leur activité physiologique au détriment de leur développement déterminé, ce chapitre met en lumière les particularités développementales des rootlettes, liant leur arrêt de croissance à leurs capacités physiologiques. Cette première partie met ainsi en évidence une transition structurale et moléculaire des rootlettes rapide sur une cinétique courte d'évolution le long de jeunes racines protéoïdes, alors que les études précédentes ont toujours porté sur des systèmes racinaires de lupin blanc plus âgés et sur des catégories de rootlettes discontinues. Une première discussion a été rédigée dans le cadre de la publication scientifique dans « Frontiers in Plant Science ». Dans la partie suivante, j'intégrerai les résultats complémentaires décrits ci-dessus afin de les discuter.

3.1 Les rootlettes, des structures parfaitement adaptées à l'absorption de Pi

Bien qu'indispensable pour le développement des végétaux, le Pi est fortement réactif, ce qui fait de lui un élément très peu mobile dans le sol et faiblement biodisponible pour les plantes (Hinsinger, 2001). La capacité des plantes à s'approvisionner en Pi réside donc dans leur aptitude à explorer et exploiter le sol et la modification du système racinaire en réponse à une carence en Pi a été largement étudiée chez de nombreuses espèces (López-Bucio et al.,

2002; Lynch, 2005; Lambers et al., 2006; Péret et al., 2014; Rogers and Benfey, 2015; Lyu et al., 2016; Vejchasarn et al., 2016). Une stratégie d'adaptation communément appelée « topsoil foraging » favorise le développement d'un système racinaire peu profond permettant d'explorer la partie supérieure du sol où le Pi tend à s'accumuler (Lynch and Brown, 2001; Zhu et al., 2005; Péret et al., 2011). Le mécanisme d'adaptation du lupin blanc aux sols pauvres en Pi est semblable à la stratégie de « topsoil foraging » avec l'émergence de nombreuses racines protéoïdes augmentant la surface d'échange entre la plante et la partie supérieure du sol. La taille réduite des rootlettes, ainsi que leur abondance, leur confère un avantage afin d'exploiter la partie du sol dans laquelle elles se trouvent. De manière intéressante, la modification structurelle impliquant la perte du maintien de la coiffe n'a jusqu'ici jamais été décrite chez les rootlettes de lupin blanc. Alors que la coiffe assure usuellement un rôle de protection du méristème apical racinaire (MAR) (Arnaud et al., 2010), il est cohérent que la disparition de la zone méristématique entraîne une perte du maintien de la coiffe chez les rootlettes. Il est intéressant de noter que la columelle des rootlettes présente moins d'assises cellulaires que la columelle de l'apex de la racine protéoïde ce qui suggère un épuisement des cellules initiales de la coiffe qui pourrait être corrélé à la perte d'expression du gène WOX5 observé lors de l'arrêt de croissance des rootlettes (cf. section 2.1 – Le Thanh et al., 2021). De plus, la différenciation des cellules de la coiffe permet la progression du cylindre central jusqu'à l'apex ainsi que la prolifération des poils absorbants sur toute la surface de la rootlette, lui conférant un avantage notable pour l'exsudation de molécules et l'absorption de Pi. Parallèlement, la coiffe, et plus précisément la sédimentation des statolithes dans les statocytes de la columelle, est impliquée dans la perception de la gravité chez les plantes, initiant ainsi une cascade de signalisation impliquant des changements de concentrations d'auxine dans l'apex pour permettre la courbure de la racine (Kiss et al., 1989; Blancaflor et al., 1998; Strohm et al., 2012; Baldwin et al., 2013). Des recherches ont démontré que la carence en Pi entraînait une modification de l'orientation des racines en modifiant leur gravitropisme afin de mettre en place un système racinaire adapté à la présence de Pi dans la partie supérieure du sol (Bai et al., 2013; Huang et al., 2018). Il est pertinent de mentionner qu'il a été nécessaire de ne pas diluer la coloration de lugol afin de mettre en évidence les quelques statolithes présents dans la columelle des rootlettes, ce qui suggère une faible quantité initiale et atteste donc d'une faible réponse à la gravité des rootlettes. De plus, chez les rootlettes ayant arrêté leur croissance, la disparition des statolithes

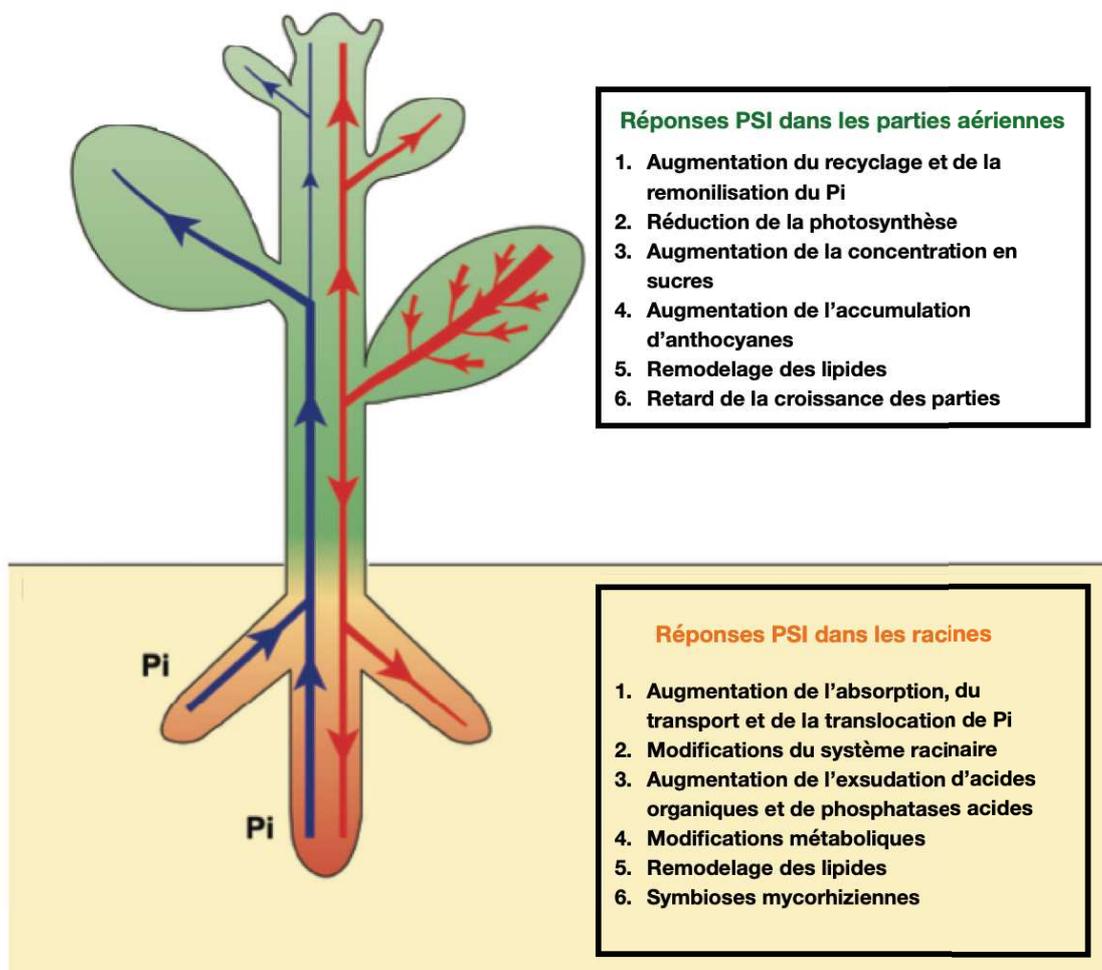


Figure 1.5 : Vue d'ensemble des mécanismes mis en place en réponse à une carence en Pi. Les racines ainsi que les parties aériennes mettent en place des réponses locales et systémiques afin de pallier la déficience en Pi dans le milieu. La perception locale de la carence en Pi entraîne une signalisation systémique délivrée par le flux ascendant de la sève brute dans le xylème et le flux descendant de la sève élaborée dans le phloème (d'après Zhang et al., 2014). PSI : Pi-starvation inducible (inductible par la carence en Pi). RSA : Root system architecture (architecture du système racinaire).

suggère une perte totale de la perception de la gravité et leur confère ainsi un caractère agravitropique. Cette caractéristique pourrait ainsi permettre aux rootlettes de maximiser leur surface d'échange et de solubiliser le Pi présent de part et d'autre de la racine protéoïde. On observe un phénomène similaire chez les plantes en condition de stress hydrique où le manque d'eau entraîne une dégradation rapide des amyloplastides dans la columelle menant à une réduction de la réponse à la gravité des racines (Takahashi et al., 2003). Cette stratégie favoriserait ainsi l'hydrotropisme des racines. En perspective, une étude de l'expression des gènes impliqués dans le gravitropisme comme ARG1, ARL2 et PIN3 (Harrison and Masson, 2008), ainsi que l'étude des mécanismes de dégradation des grains d'amidon, permettraient d'apporter de nouvelles connaissances quant au lien entre le gravitropisme et la nutrition phosphatée chez les rootlettes de racines protéoïdes de lupin blanc.

3.2 De la carence à l'homéostasie du Pi

Lorsque la disponibilité du Pi est limitée dans les sols, les plantes entreprennent une série de réponses adaptatives au niveau du système racinaire incluant : (i) le remodelage de la morphologie et de l'architecture des racines, (ii) l'exsudation d'acides organiques et de phosphatases, (iii) l'augmentation de l'expression de transporteurs de Pi à haute affinité et (iv) l'établissement d'associations symbiotiques avec des champignons mycorhiziens (Figure 1.5) (Péret et al., 2011; Liang et al., 2014; Péret et al., 2014; Zhang et al., 2014). Parallèlement, les plantes ont la capacité de remobiliser le Pi présent dans leur organisme, en impliquant notamment (i) le recyclage et la réallocation du Pi dans différents organes et tissus, (ii) le remodelage des lipides dans les membranes et (iii) la réduction de certains mécanismes comme la photosynthèse (Figure 1.5) (Chiou and Lin, 2011; Zhang et al., 2014). Alors que le taux d'absorption de Pi est usuellement quantifié par le suivi d'isotopes radioactif ^{32}P ou ^{33}P chez le lupin blanc (Keerthisinghe et al., 1998; Neumann et al., 2000; Massonneau et al., 2001; Tiziani et al., 2020), la quantification du Pi présent dans la sève brute apporte une nouvelle vision sur l'absorption et la translocation de ce nutriment, des racines jusqu'aux feuilles. L'expression exacerbée de transporteurs de Pi à haute affinité dans les rootlettes ainsi que le nombre de rootlettes présentes sur une racine protéoïde pourraient expliquer la rapidité d'absorption du Pi chez les plantes carencées puis transférées vers un milieu en contenant. Afin de maintenir l'homéostasie du Pi, les plantes mettent en place de nombreux mécanismes

largement étudiés et référencés (Liang et al., 2014; Wang et al., 2014; Zhang et al., 2014). L'augmentation de la concentration intracellulaire en Pi entraînerait une répression des réponses adaptatives à la carence (Chiou and Lin, 2011). L'une des stratégies mises en place par les plantes pour réguler les concentrations de Pi internes est la régulation post-traductionnelle des transporteurs. Par exemple, chez *A. thaliana*, le transporteur membranaire PHT1 ;1 est dirigé vers la vacuole afin d'être dégradé lorsque le Pi est présent dans le milieu (Bayle et al., 2011). De même, en présence de Pi, l'expression du tandem NITROGEN LIMITATION ADAPTATION (NLA) – UBC24 (PHO2) entraîne la poly-ubiquitination de PHT1 ;4 (Park et al., 2014). Il est ainsi possible que les transporteurs de Pi de lupin blanc, fortement exprimés dans les rootlettes de racine protéoïde, soient dégradés suite au transfert des plantes dans un milieu riche en Pi, après absorption des quantités nécessaires à la plante pour pallier la carence. De plus, ce type de régulation pourrait aussi être à l'origine du fait que les plantes ayant développé des racines protéoïdes n'accumulent pas plus de Pi que les plantes n'ayant pas subi de carence, permettant ainsi de maintenir une homéostasie phosphatée. En perspective, il serait, dans un premier temps, intéressant de quantifier l'expression du transporteur LaPHT1 ;5-like (mis en évidence dans la section 2.1) dans des rootlettes de plantes carencées après leur transfert dans un milieu riche en Pi. L'échantillonnage devra suivre la même cinétique : 0 h, 1 h, 3 h et 6 h afin d'évaluer une potentielle différence d'expression dans le temps. Si aucune baisse du niveau d'expression de LaPHT1 ;5-like est observée, alors l'hypothèse d'une régulation post-traductionnelle entraînant la dégradation de ce transporteur en présence de Pi pourra être émise et examinée. Il est aussi important de noter que, bien qu'effectuées avec plusieurs réplicats biologiques, les expériences de sève brute ont chacune été réalisées une seule fois et les interprétations de ces résultats sont donc à nuancer. De même, les temps de prélèvement de la sève sont différents entre la cinétique longue (3 jours) et courte (0 h, 1 h, 3 h et 6 h). Par la suite, la répétition de l'expérience suivant la cinétique de prélèvement 0 h, 1 h, 3 h, et 6 h serait intéressante et indispensable afin de confirmer les résultats obtenus. De même, deux méthodes de prélèvement de la sève brute ont été testées durant ma thèse : (i) à l'aide d'une pipette et (ii) à l'aide de pastilles de papier wattman. Une comparaison des deux techniques serait de ce fait intéressante afin de mettre en évidence la plus pratique, et la plus cohérente.

3.3 La relation Fer-Pi

Le Pi est connu pour son importante réactivité avec les cations présents dans le sol et la forte exsudation d'acides organiques, comme le citrate, par les racines protéoïdes chez le lupin blanc permet la solubilisation des complexes formés dans le sol (Dinkelaker et al., 1989; Neumann and Römheld, 1999). La dissociation de ces complexes résulte en une augmentation de la biodisponibilité du Pi pour la plante mais pourrait aussi entraîner une augmentation de la disponibilité d'autres ions. Lors d'une carence en Pi chez *A. thaliana*, on observe une forte accumulation de fer dans la plante résultant en l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie ou bien le stockage du fer (Misson et al., 2005; Hirsch et al., 2006). En contrepartie, la présence de Pi entraîne des concentrations en fer basses, et mène à l'expression du transporteur de fer à haute affinité IRT1, spécifiquement induit lors d'une carence en fer (Vert et al., 2002; Hirsch et al., 2006). La forte accumulation de fer dans la sève brute 3 jours après transfert des plants de lupin blanc carencés sur un milieu non carencé semble surprenante et suggère que les mécanismes permettant la régulation de l'homéostasie du fer ne fonctionnent pas de la même manière que chez *A. thaliana*. L'accumulation de fer dans les plantes -P+P pourrait être expliquée par la forte expression de LalRT1-like dans les rootlettes. Au vu de la régulation positive de nombreux transporteurs membranaires de nutriments dans les rootlettes, il semblerait que celles-ci expriment ces transporteurs de manière non spécifique, indépendamment du niveau de concentration de ces nutriments dans le milieu. Il semblerait ainsi que la racine protéoïde, bien que développée en réponse à une carence en Pi, soit un organe spécialisé dans l'absorption de nombreux nutriments.

3.4 Le manganèse, un indicateur de la présence d'acides organiques dans le sol

Comme expliqué précédemment, l'exsudation d'acides organiques permet, en plus du Pi, la libération d'autres ions dans la rhizosphère. C'est le cas du manganèse dont la disponibilité dans le sol est augmentée suite à la formation de racines protéoïdes chez le lupin blanc (Gardner et al., 1982; Dinkelaker et al., 1989). Il est pertinent de souligner que ce phénomène est aussi observable chez d'autres plantes développant des racines protéoïdes comme *Banksia attenuata* et *Hakea prostrata* (Shane and Lambers, 2005; Muler et al., 2014). La concentration foliaire en manganèse a plusieurs fois été citée comme corrélée à la présence d'acides

organiques dans le sol (Lambers et al., 2015; Pang et al., 2018) et à la présence de racines protéoïdes chez *Hakea prostrata* (Shane and Lambers, 2005). Il est acquis que les rootlettes de racines protéoïdes excrètent de grandes quantités d'acides organiques dans le sol et la présence d'une plus grande quantité de manganèse dans la sève brute serait liée à sa libération et sa forte absorption par les transporteurs induits dans les rootlettes. Le manganèse serait aussi plus disponible pour les plantes dans les milieux au pH bas (Sims, 1986) et l'exsudation de protons par les racines protéoïdes permet d'acidifier la rhizosphère, ce qui pourrait aussi expliquer la forte concentration de manganèse dans la sève. Il est important de garder en tête que les expériences conduites ici sont en système hydroponie, néanmoins la capacité des racines protéoïdes à solubiliser les nutriments dans le sol est très intéressante d'un point de vue agronomique et certaines études ont relevé la pertinence de l'utilisation du lupin blanc en tant que culture intercalaire afin de mobiliser et rendre disponibles les nutriments pour d'autres plantes (Gardner and Boundy, 1983; Dissanayaka et al., 2015). L'étude du développement des racines protéoïdes s'inscrit dans une plus grande problématique visant à (i) réduire l'impact des engrais phosphatés sur les sols et les cours d'eau, (ii) offrir de nouvelles perspectives quant à l'épuisement de la roche de phosphate et (iii) améliorer la culture de plantes d'intérêt agronomique sur des sols pauvres, permettant ainsi d'augmenter l'accessibilité des ressources alimentaires dans un contexte où la population ne cesse d'augmenter.

4. Matériel et méthodes des résultats complémentaires

4.1 Matériel végétal et conditions de culture

Pour l'ensemble des expériences, des graines de 8 mm de la variété Amiga (Florimond Desprez) ont été utilisées. Les plantules ont été cultivées dans des chambres de culture selon les conditions suivantes : 16 h jour / 8 h nuit, 25°C jour/ 20°C nuit, 65 % humidité relative, et intensité PAR $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Les graines ont été germées dans de la vermiculite durant 4 jours, avant d'être transférées dans des bacs d'hydroponie de 200 L. La solution nutritive déficiente en phosphate, permettant ainsi le développement des racines protéoïdes, a été modifiée du protocole d'Abdolzadeh et al., 2010 : MgSO_4 , 54 μM ; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 400 μM ; K_2SO_4

200 μM ; Na-Fe-EDTA 10 μM ; H_3BO_3 2.4 μM ; MnSO_4 0.24 μM ; ZnSO_4 0.1 μM ; CuSO_4 0.018 μM . La solution nutritive riche en phosphate, ne permettant pas le développement des racines protéoïdes, contient : MgSO_4 , 54 μM ; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 400 μM ; KH_2PO_4 400 μM ; Na-Fe-EDTA 10 μM ; H_3BO_3 2.4 μM ; MnSO_4 0.24 μM ; ZnSO_4 0.1 μM ; CuSO_4 0.018 μM .

4.2 Analyses microscopiques et visualisation des statolithes

Des racines protéoïdes issues de plantes cultivées durant 14 jours en hydroponie ont été échantillonnées et fixées dans une solution contenant 2% de formaldéhyde, 1% de glutaraldéhyde et 1% de caféine durant 2 h à 4°C. Afin de préparer les échantillons à l'inclusion en résine, une déshydratation progressive a été effectuée dans des bains successifs d'éthanol : 50% (30 min), 70% (30 min), 90% (1 h), 95% (1 h), 100% (1 h) et 100% (une nuit). Avant inclusion, les racines ont été imprégnées durant 1 2h avec un ratio 1/1 (v/v) éthanol 100%/résine Technovit 700, puis 2 jours dans 100% de résine. Par la suite, les racines ont été incluses selon les recommandations du fabricant. De fines sections de 8 μm ont été produites à l'aide d'un microtome (RM2165, Leica Microsystems) et ont été colorées avec une solution de Lugol (Electron Microscopy Science) (i) à 10% durant 2 min, mais cette coloration n'a marché que pour le TIP et (ii) pure pour le reste de l'expérience.

4.3 Analyses physiologiques de la sève brute

Les plantules de lupin blanc ont été initialement cultivées dans 4 bacs d'hydroponie de 200 L à raison de 2 bacs en absence de Pi (-P) et 2 bacs en présence de Pi (+P) durant 14 jours, afin de favoriser, ou non, le développement des racines protéoïdes. Après 14 jours, les plantules ont été transférées de leur bac d'origine vers un nouveau bac. Ainsi, 4 conditions ont été définies selon le milieu dans lequel les plantes ont été cultivées, et le milieu dans lequel elles ont été transférées : (i) plantes cultivées en condition de carence en Pi puis transférées sur un milieu contenant du Pi : **-P+P** ; (ii) plantes cultivées dans un milieu contenant du Pi puis transférées *en* condition de carence en Pi : **+P-P** ; (iii) plantes cultivées en condition de carence en Pi puis transférées dans un nouveau milieu en condition de carence en Pi : **-P-P** (contrôle négatif) et (iv) plantes cultivées dans un milieu contenant du Pi puis transférées dans un nouveau milieu contenant du Pi : **+P+P** (contrôle positif).

4.3.1 Récolte de la sève pour l'expérience 3 jours

Lors de cette première expérience, les plantules ont été laissées durant 3 jours après transfert avant d'entreprendre la récolte de la sève. Pour cette expérience, 5 répétitions biologiques de 6 plantes par condition ont été effectuées. Afin d'entreprendre la récolte de la sève, des tubes eppendorf ont été préalablement annotés et déposés sur de la glace. Pour chaque condition, les parties aériennes ont été simultanément (dans la mesure du possible) découpées à environ 1 cm en dessous des cotylédons. La sève brute, formant une goutte au sommet de la tige découpée, a été récoltée à l'aide d'une pipette P200 durant 30 min. In fine, la sève des 6 plantes par réplicat a été poolée dans un tube eppendorf, et les échantillons ont été conservés à -20°C jusqu'au jour de l'analyse.

4.3.2 Récolte de la sève pour l'expérience à cinétique courte

Pour cette expérience, la sève brute a été récoltée à 0 h, 15 min, 30 min, 45 min et 60 min après transfert dans plantes de leur milieu de culture initial vers leur nouveau milieu de culture (cf. matériel et méthodes). Une méthode différente de récolte de la sève a été entreprise pour cette expérience. Au temps donné, les parties aériennes des plantules ont été découpées à environ 1 cm en dessous des cotylédons, puis 2 pastilles de papier Wattman de 5 mm de diamètre ont été déposées sur la tige coupée. 10 min après imbibition, les pastilles ont été transférées dans 350 µL d'eau puis agitées durant 30 min. Les échantillons ont été conservés à -20°C jusqu'au jour de l'analyse. Pour cette expérience, un échantillon représente une plante et 6 réplicats biologiques ont été effectués par condition.

4.3.3 Analyse des échantillons de sève brute

Les échantillons de sève brute ont été utilisés afin de quantifier la teneur en ions phosphatés par chromatographie ionique à haute performance (HPIC, ICS-500 Thermo Scientific Dionex) à l'aide d'une colonne analytique AS11 (250 mm x 4 mm) en suivant un gradient isocratique de 4 à 28 mM KOH pour 16 min, avec un volume d'injection de 25 µL. Les quantités de manganèse et de fer ont été quantifiées par spectroscopie d'émission atomique à plasma microondes (MP-AES 4200, Agilent).

C H A P I T R E

2



**Recherche d'acteurs moléculaires impliqués
dans le développement déterminé des
rootlettes de racine protéoïde de lupin blanc
approche ciblée et crible génétique.**

1. Introduction

L'arrêt de croissance des rootlettes des racines protéoïdes de lupin blanc a été décrit précédemment dans la littérature (Watt and Evans, 1999; Neumann et al., 2000) mais les mécanismes moléculaires impliqués sont méconnus. Le chapitre 2 est consacré aux démarches engagées pour identifier les acteurs moléculaires majeurs impliqués dans la transition des rootlettes d'un développement indéterminé vers un développement déterminé. Les résultats obtenus lors du chapitre 1 mettent en évidence la chute de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le maintien du méristème. C'est notamment le cas de *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like*, homologues du gène *AtWOX5* connu pour être spécifiquement exprimé dans le centre quiescent et pour son rôle central dans le maintien du pool de cellules souches (Drisch and Stahl, 2015; Kong et al., 2015). Chez *A. thaliana*, la perte de fonction de *AtWOX5*, comme celles de *AtSHR* ou *AtSCR*, entraîne la différenciation des cellules souches de la columelle et provoque la différenciation du méristème proximal (Sarkar et al., 2007). On peut donc formuler l'hypothèse que la disparition de l'expression de *LaWOX5-like* est la cause de la perte du maintien du pool de cellules souches causant la différenciation des cellules du méristème et provoquant l'arrêt de croissance des rootlettes. Cette hypothèse nous amène à la question suivante : est-ce que le maintien de l'expression de *LaWOX5-like* lors du développement des rootlettes peut permettre de maintenir une activité méristématique et donc la croissance indéterminée des rootlettes ? Développée chez une autre légumineuse (*Medicago truncatula*) et adaptée au lupin blanc, la transformation hairy-root permet l'introduction rapide et l'expression de gènes d'intérêt dans les racines transformées (Boisson-Dernier et al., 2001; Uhde-Stone et al., 2005). Alors que cette technique est usuellement utilisée chez le lupin blanc pour la visualisation tissulaire de l'expression de promoteurs de gènes d'intérêt couplés au gène rapporteur GUS (Uhde-Stone et al., 2005; Sbabou et al., 2010; Gallardo et al., 2019; Le Thanh et al., 2021), ce chapitre 2 propose l'utilisation du système hairy-root pour des études fonctionnelles de sur-expression des *LaWOX5s* dans le cadre d'une approche gène-candidat. Une seconde approche, sans a

RAPPEL

- La régénération de plantes transformées à partir de cals n'est pas possible chez le lupin blanc.
- Les racines protéoïdes générées par la transformation hairy-root sont similaires aux racines protéoïdes sauvages (Uhde-Stone et al., 2005).

priori, consistant à mener un crible génétique sera également décrite dans le chapitre 2. Dans mon équipe d'accueil, un crible génétique d'une population EMS de lupin blanc cultivée en présence de Pi a pu mettre en évidence 3 plantes mutantes développant des racines protéoïdes de manière constitutive. L'utilisation de cette population EMS dans le cadre de mon projet de thèse pourrait donc permettre d'identifier des plantes mutantes dont les phénotypes, à terme, pourraient mener à l'identification de gènes impliqués dans l'arrêt de croissance des rootlettes. Ainsi, dans un premier temps, ce chapitre abordera l'implication de *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like* dans la croissance déterminée des rootlettes via la visualisation du phénotype racinaire de plantes sur-exprimant ces gènes. Dans un second temps, ce chapitre discutera des résultats préliminaires obtenus lors du crible génétique de la population EMS générée dans l'équipe.

2. Matériel et méthodes

Au cours de ce chapitre, la partie technique occupe une place importante, ce qui justifie l'emplacement du matériel et méthodes en tête de chapitre.

2.1 La transformation hairy-root

Le matériel végétal et les conditions de culture sont identiques à ceux décrits dans le chapitre 1 (Chapitre 1, 4.1 Matériel végétal et conditions de culture).

*Le protocole utilisé pour la fixation des échantillons et la visualisation des promoteurs en fusion avec la β -glucuronidase est identique à celui décrit dans le chapitre 1 (Chapitre 1, 2.1 Article publié dans « *Frontiers in Plant Science* », Le Thanh et al., 2021).*

2.1.1 Le clonage moléculaire pour la sur-expression de *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like*

Les constructions ont été générées en utilisant la méthode de clonage Gateway (Invitrogen) en suivant les instructions du fabricant. Les séquences codantes de *LaWOX5.1-like* (*Lalb_Chr04g0250731*) et *LaWOX5.2-like* (*Lalb_Chr18g0052701*) ont été amplifiées par PCR (Phusion, ThermoFisher) sur un pool de cDNA de racines. Les séquences codantes

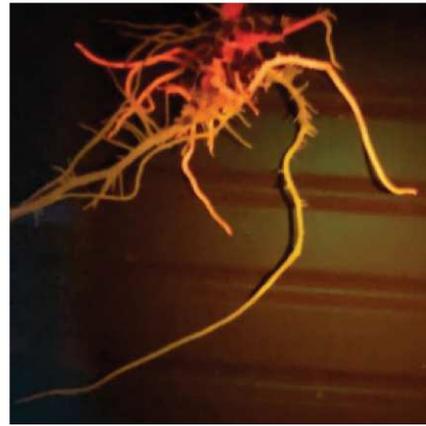
A**B****C**

Figure 2.1 : Utilisation de la construction mCherry en tant que marqueur fluorescent de la transformation génétique. (A) Schéma du vecteur (pK7m24GW-CR) utilisé pour la sur-expression d'un gène d'intérêt dans un système de transformation hairy-root. Le gène d'intérêt est sous le contrôle du promoteur fort 35S. Le gène marqueur fluorescent mCherry est sous le contrôle d'un promoteur ubiquitine. (B) Image d'une racine hairy-root. (C) Image d'un système racinaire hairy-root dont la transformation de certaines racines est confirmée par la fluorescence de la protéine mCherry après illumination avec la lampe FastGene Blue/Green LED Flashlight.

résultantes, d'une taille finale de 534 bp et 566 bp, respectivement, ont été intégrées dans le vecteur d'entrée Gateway pDONR221. Par la suite, ces séquences ont été recombinées par réaction Gateway avec le vecteur pENTR-35S-M4 (Invitrogen) contenant le promoteur 35S issu du virus de la mosaïque du chou-fleur (CAMV35S) ainsi qu'un vecteur contenant le gène fluorescent mCherry sous contrôle d'un promoteur constitutif ubiquitine (vecteur CR pour Constitutive Red), dans le plasmide pK7m24GW afin d'obtenir les plasmides pK7m24GW-35S-WOX5.1-CR et pK7m24GW-35S-WOX5.2-CR (Figure 2.1A). Ces constructions ont été vérifiées par séquençage d'ADN (Eurofins). Il est pertinent de mentionner que le vecteur CR, mis en place dans l'équipe par l'ingénieur d'étude Laurent Brottier, permet de vérifier la transformation des racines par visualisation de la fluorescence mCherry et que cette vérification est indispensable pour conduire des expériences fonctionnelles car le système racinaire des plantes hairy-root est une mosaïque de racines transformées et non transformées. Le plasmide pK7m24GW-35S-GUS-CR sur-exprimant la séquence codante de la β -glucuronidase a été utilisé en tant que contrôle.

2.1.2 La souche bactérienne utilisée

Tous les vecteurs ont été introduits par électroporation dans *Agrobacterium rhizogenes*. Les transformations des bactéries avec les plasmides ont été vérifiées par PCR. Les racines de plantules de lupin blanc ont été transformées à l'aide d'un tapis bactérien de *Agrobacterium rhizogenes* lors de la transformation hairy-root. Le tapis bactérien a été généré en inoculant 200 μ L de culture bactérienne liquide sur des boîtes d'agar contenant 2% de sucrose, 100 μ M d'acetosyringone et les antibiotiques appropriés, incubées à 28°C durant 24 heures.

2.1.3 La transformation hairy-root des racines de lupin blanc

Les plantules de lupin blanc ont été transformées à partir d'un protocole adapté à partir d'un protocole publié (Uhde-Stone et al., 2005). Des graines de calibre 8 mm ont été stérilisées durant 30 min plongées dans une solution de javel (Halonet 20%), puis rincées 6 fois dans de l'eau osmosée stérile. Les graines germent sur un milieu $\frac{1}{2}$ Murashige and Skoog (MS). Après germination (environ 40 h), les radicules mesurant environ 1 cm ont été coupées

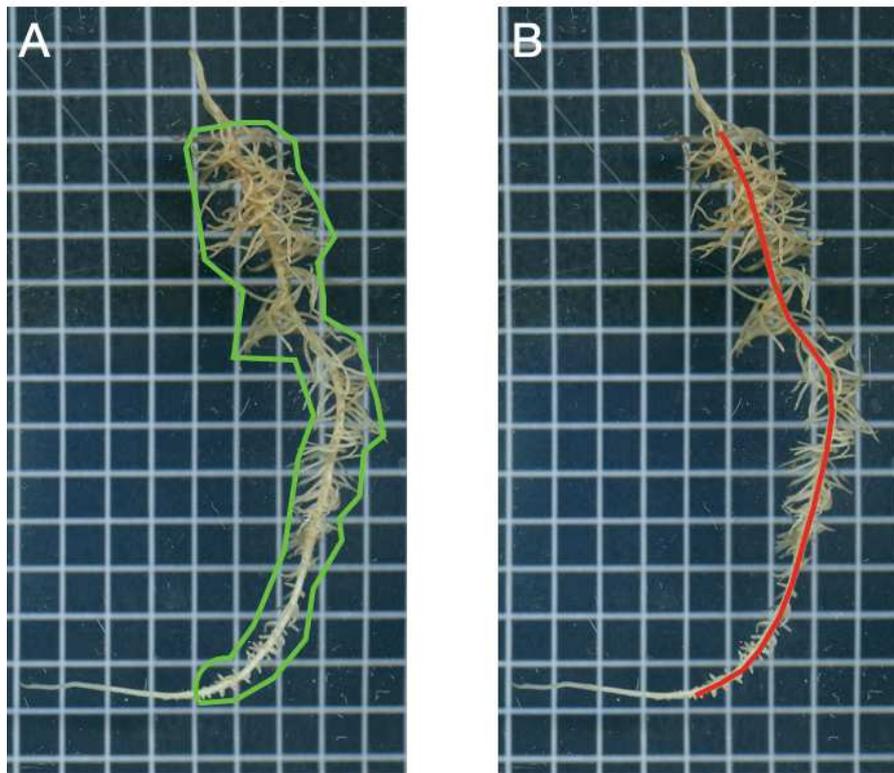


Figure 2.2 : Méthode d'analyse des phénotypes racinaires hairy root. La méthode d'analyse utilisée consiste à calculer un index aire/longueur en divisant (A) la surface occupée par les rootlettes (en vert), par (B) la longueur de racine protéoïde portant les rootlettes (en rouge).

de moitié à l'aide d'un scalpel stérile puis inoculées avec le tapis bactérien d'*Agrobacterium rhizogenes*. Les plantules inoculées ont été disposées dans des boîtes de pétri contenant (0,7% d'agar dans une solution 1X Hoagland contenant MgSO_4 , 200 μM ; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 400 μM ; KNO_3 325 μM ; NH_4Cl 100 μM ; Na-Fe-EDTA 10 μM ; H_3BO_3 9,3 μM ; MnCl_2 1,8 μM ; ZnSO_4 0,17 μM ; CuSO_4 0,06 μM ; Na_2MoO_4 2,3 μM). Les boîtes de pétri ont été placées verticalement dans une chambre de culture in vitro dont les conditions sont les suivantes : 16 h jour / 8 h nuit, 25°C jour / 20°C nuit, 65 % d'humidité relative, et l'intensité PAR de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. 6 jours après transformation, les plantules ont été transférées dans des plateaux de 12x16,5x5,5 cm contenant de la vermiculite et ces plateaux ont été disposés dans des mini serres permettant d'augmenter le niveau d'humidité. 10 jours plus tard, 12 plantes par construction ont été transférées dans des pots de 1,6 L contenant une solution nutritive renouvelée une fois par semaine. Après 10 jours en condition hydroponique, les racines « hairy-root protéoïdes-like » ont été prélevées pour les analyses.

2.1.4 Méthode d'analyse des racines transformées

Les racines « protéoïdes-like » des plantes hairy-root ont été échantillonnées 10 jours après leur passage en hydroponie en choisissant uniquement les racines transformées par visualisation de la fluorescence du marqueur constitutif mCherry à l'aide d'une lampe FastGene Blue/Green LED (Figure 2.1B, C). Les racines transformées ont été disposées sur un quadrillage afin d'être scannées. Pour chaque construction et pour chaque racine « protéoïde-like », un index aire/longueur calculé en mesurant la surface occupée par les rootlettes (Figure 2.2A) divisée par la longueur de racine protéoïde sur laquelle les rootlettes se développent (Figure 2.2B).

2.1.5 Vérification de la sur-expression de *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like*

La sur-expression de *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like* dans les racines transformées sélectionnées a été vérifiée par RT-qPCR à raison de 4 réplicats biologiques. Chaque racine transformée correspond à un événement indépendant de transformation, et 4 racines ont été échantillonnées pour des extractions d'ARN. Les ARN totaux ont été extraits de chaque échantillon en utilisant le kit Direct-zol RNA Miniprep (Zymo Research). La concentration en

ARN a été mesurée à l'aide d'un NanoDrop (ND1000). Les ADNc ont été synthétisés avec 2 µg d'ARN total en utilisant le kit Revertaid First Strand cDNA synthesis (Thermo Fisher). L'expression des gènes a été quantifiée par RT-qPCR (LightCycler 480, Roche Diagnostics) en utilisant du SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH, Takara, Clontech). Des amorces spécifiques ont été dessinées à l'aide de Primer3plus. Les niveaux d'expression ont été normalisés par rapport au gène *LaNORM1* (*Lalb_Chr07g0195211*). L'expression relative des gènes a été calculée selon la formule $\Delta\Delta Ct$ en utilisant les plantes contrôles en tant que calibreur.

2.1.6 Analyses microscopiques des racines transformées avec *pAtWOX5::GFP*

Les apex de rootlettes de racines exprimant la construction *pAtWOX5::GFP* ont été fixés au paraformaldéhyde 4%, colorés avec une solution de 0,001% de Calcofluor dans du ClearSee, incluses en agarose 4% (m/v) et coupés en sections longitudinales de 80 µm selon le protocole décrit dans le chapitre 1 (Chapitre 1, 2.1 ; Le Thanh et al., 2021). La fluorescence de la protéine GFP a été visualisée à l'aide du filtre GFP du microscope Zeiss Observer 7/Apotome.

2.2 Le crible génétique

2.2.1 Matériel végétal et conditions de culture du crible

La population EMS utilisée lors de ce crible a été générée dans l'équipe. Sur les 5000 lots de graines M2 mutées, 112 lots de 24 à 30 plantes ont été utilisés pour le criblage phénotypique en condition de carence en Pi. Les plantes de lupin blanc mutagénisées ont été cultivées en système hydroponique, dans des bacs de 200 L à raison de 4 lots de plantes par bac selon les conditions suivantes : 25°C jour/20°C nuit, intensité lumineuse : 200 µE, durée du jour/nuit 16h/8h. La solution nutritive utilisée est la suivante : MgSO₄ 54 µM, Na-Fe-EDTA 50 µM, Ca(NO₃)₂ 1,5 mM, KH₂PO₄ 500 µM (+P) ou K₂SO₄ 200 µM (-P) ; H₃BO₃ 2.4 µM ; MnSO₄ 0.24 µM ; ZnSO₄ 0.1 µM ; CuSO₄ 0.018 µM

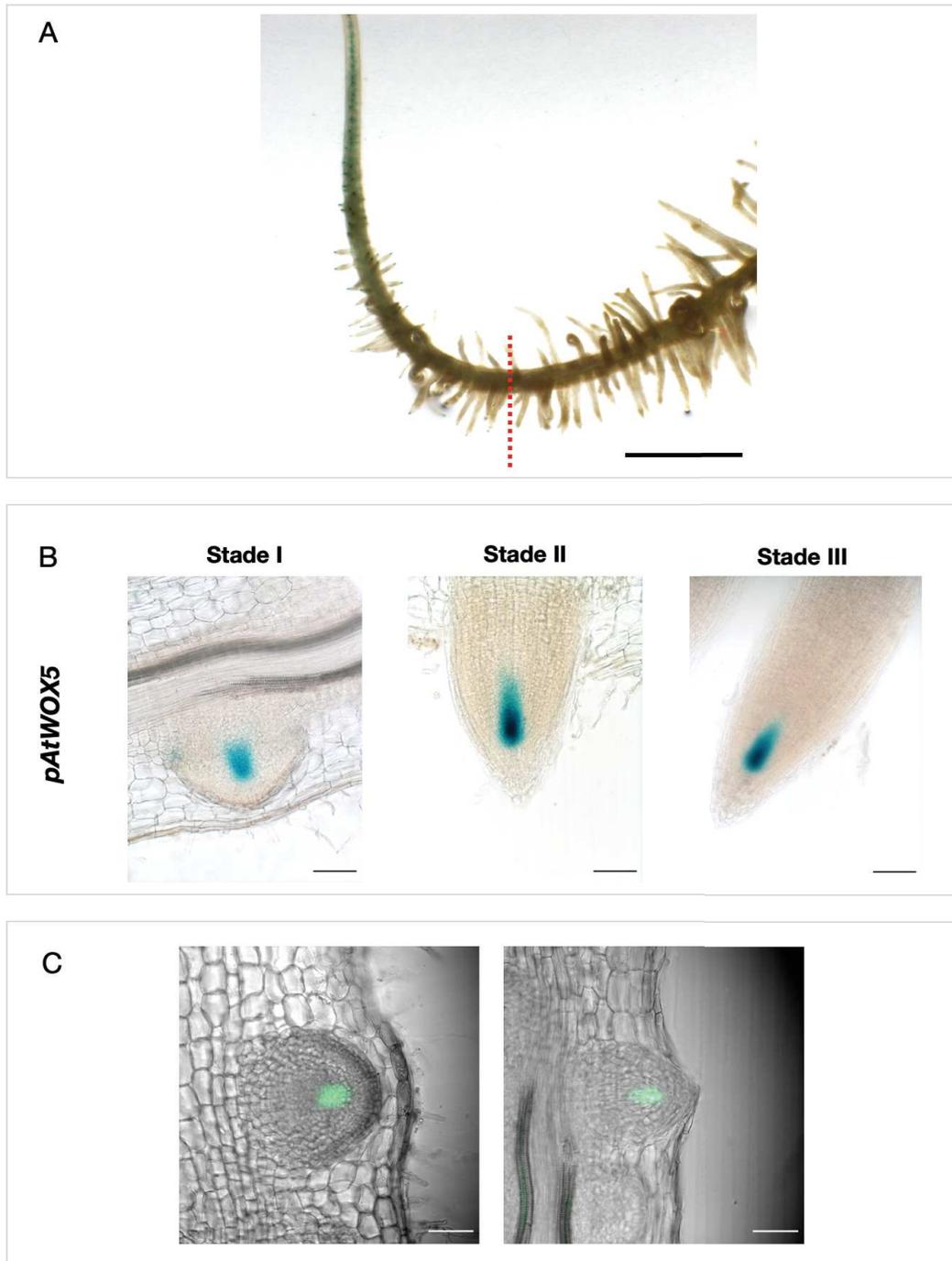


Figure 2.3 : Etude de l'expression du promoteur du gène *AtWOX5* dans une racine « protéoïde-like hairy root ». (A) Coloration histochimique GUS d'une racine « protéoïde-like hairy root » exprimant la construction *pAtWOX5::GUS::GFP*. Les pointillés rouges représentent la transition entre la présence de la coloration GUS et son absence, (B) Coloration histochimique GUS de coupes d'agarose de 80 µm d'épaisseur des rootlettes aux stades I, II et III de leur développement, (C) Fluorescence GFP de coupes d'agarose de 80 µm d'épaisseur de rootlettes aux stades I et II se développant sur une racine « protéoïde-like hairy root » exprimant la construction *pAtWOX5::GUS::GFP*. Echelles (A) 0,5 cm (B-C) 100 µm.

2.2.2 Conditions de culture de l'amplification

Les mutants présentant des phénotypes intéressants ont été transférés en serre et cultivés en ratio 1/1 (v/v) dans du « Huminsubstrat » (NEUHAUS) et du « Substrates select spécial mixture » (Klasmann Deilmann) selon les conditions suivantes : 23-25°C jour/18-19°C nuit, lumière du soleil avec complément éclairage LED.

3. Résultats

3.1 L'approche gène candidat

3.1.1 Profil d'expression du promoteur du gène *AtWOX5* chez le lupin blanc

Avant l'obtention du séquençage du génome dans l'équipe, l'expression du promoteur de *AtWOX5* a été visualisée le long d'une racine de lupin blanc transformée par la technique hairy-root avec une fusion transcriptionnelle de *pAtWOX5* avec les régions codantes de la β -glucuronidase (GUS) et de la Green Fluorescent Protein (GFP). L'activité de *pAtWOX5::GUS::GFP* est très rapidement observable dans les primordia en développement et cette activité s'estompe progressivement jusqu'à disparaître lorsque les rootlettes arrêtent leur croissance (rootlettes de stade IV) (Figure 2.3A - pointillés). En suivant l'activité GUS, on observe que l'expression tissulaire de *pAtWOX5::GUS::GFP* chez le lupin blanc est localisée dans le centre quiescent (Figure 2.3B, C) ce qui est cohérent avec la littérature (Kong et al., 2015; Pi et al., 2015). Il est intéressant de noter que nous avons également pu observer cette localisation en microscopie fluorescente à l'aide de la GFP (Figure 2.3C). La perte d'activité de ce promoteur nous suggère une perte du maintien de l'activité du méristème.

3.1.2 *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like*, deux homologues à *AtWOX5*

Suite au séquençage du génome de lupin blanc (Hufnagel et al., 2020), nous avons recherché les homologues de *AtWOX5* chez le lupin, *LaWOX5-like*, en tant que gènes candidats régulateurs de la croissance déterminée des rootlettes. Le génome du lupin blanc présente une triplication (Hufnagel et al., 2020), rendant difficile la recherche de gènes

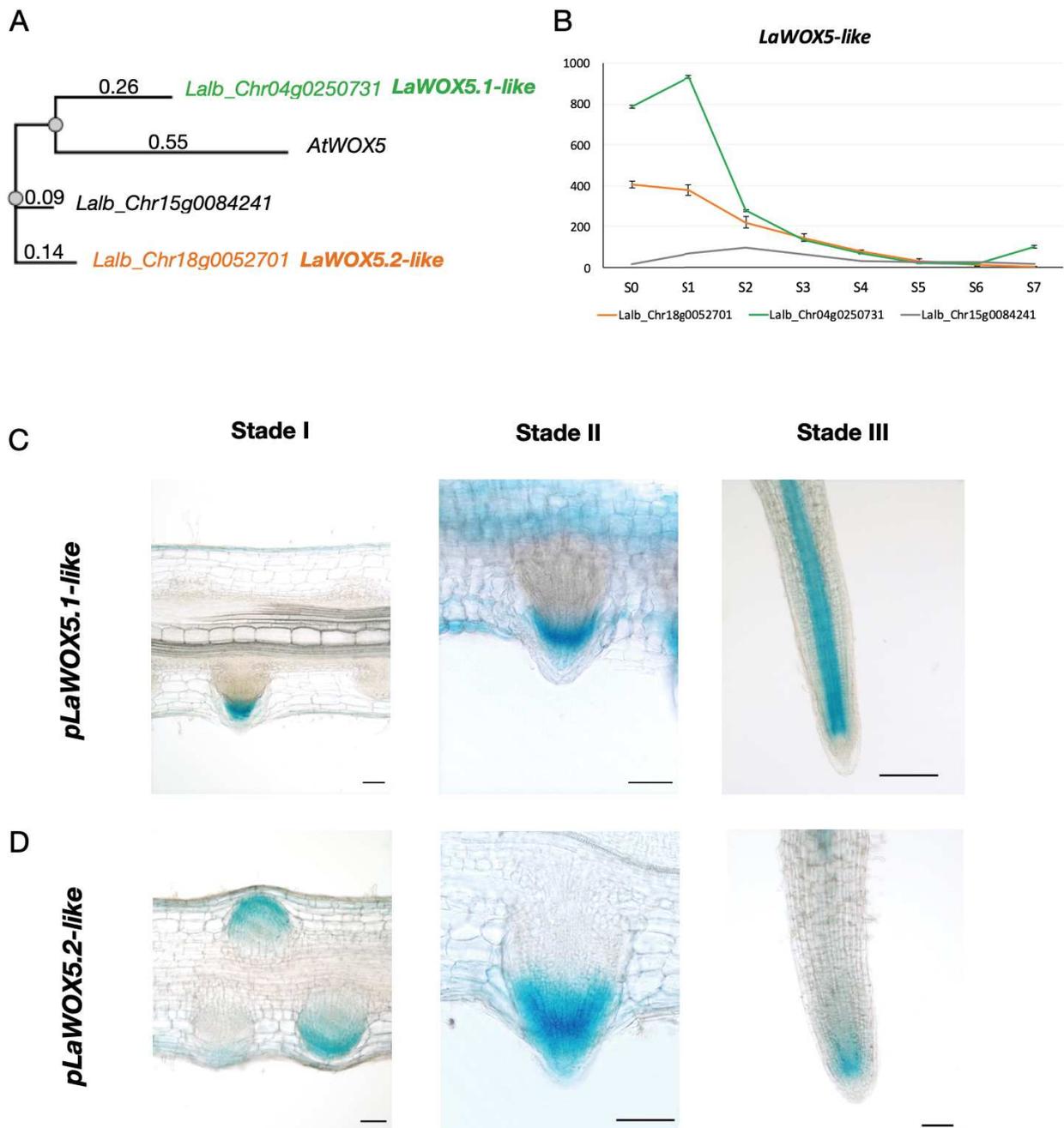


Figure 2.4 : Etude de l'expression de *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like*, deux gènes de lupin blanc homologues de *AtWOX5*. (A) Arbre phylogénétique basé sur les séquences protéiques de la famille *LaWOX5-like*, (B) Profils d'expression des 3 gènes de lupin blanc de la famille *LaWOX5-like*. Les 2 gènes dont le niveau d'expression moyen est supérieur à 100 ont été retenus, en vert, *LaWOX5.1-like* et, en orange, *LaWOX5.2-like*. Colorations histochimiques GUS sur des coupes d'agarose de 80 μ m d'épaisseur, de stades I, II et III de rootlettes se développant sur des racines « protéoïde-like hairy root » exprimant la construction (C) *pLaWOX5.1::GUS::GFP* et (D) *pLaWOX5.2::GUS::GFP*.

homologues. A partir des données génomiques générées par l'équipe, 3 gènes ont été mis en évidence sur la base de leur homologie avec *AtWOX5* et 2 candidats ont été retenus sur la base de leur profil d'expression (supérieur à 100) : *LaWOX5.1-like* (*Lalb_04g0250731*) et *LaWOX5.2-like* (*Lalb_18g0052701*) (Figure 2.4A, B). Dans le but de confirmer si la localisation du promoteur de ces deux gènes est similaire à *pAtWOX5*, j'ai suivi l'expression des promoteurs endogènes *pLaWOX5.1-like* et *pLaWOX5.2-like* en fusion transcriptionnelle avec le gène GUS dans différents stades de développement des rootlettes (Chapitre 1 + Figure 2.4C, D). L'expression de *pLaWOX5.1-like::GUS* et *pLaWOX5.2-like::GUS* est visualisée dans le centre quiescent des rootlettes (Figure 2.4C, D), mais le profil d'expression paraît plus large et plus diffus que celui de *pAtWOX5::GUS::GFP* (Figure 2.3B). Ce résultat démontre, dans un premier temps, la difficulté de trouver des gènes d'intérêt endogènes et orthologues à ceux d'*A. thaliana*. Néanmoins, la localisation similaire de *pLaWOX5.1-like::GUS* et *pLaWOX5.2-like::GUS* à *pAtWOX5::GUS::GFP* suggère une expression différente de ce gène chez le lupin blanc, probablement pas seulement confinée au centre quiescent. Il est à noter que la fluorescence de la GFP n'a jamais pu être observée dans les racines transformées avec les promoteurs de lupin.

3.1.3 La sur-expression de *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like*

La sur-expression de *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like* a pour but de mettre en évidence l'implication des *LaWOX5-like* dans l'arrêt de croissance des rootlettes. En effet, en sur-exprimant les gènes *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like*, nous espérons maintenir l'activité méristématique des rootlettes et ainsi obtenir des plantes avec un phénotype « rootlettes longues ». Afin de pouvoir comparer les phénotypes racinaires de nos conditions d'intérêt avec une condition contrôle, nous avons également généré des plantes transformées avec un plasmide dont le gène d'intérêt a été remplacé par le gène de la β -glucuronidase. 3 types de construction ont ainsi été générées et les plantes exprimant ces constructions adopteront la nomenclature suivante lors de ce travail de thèse : (i) 35S::GUS pour la condition contrôle, (ii) 35S::WOX5.1 pour les racines sur-exprimant *LaWOX5.-like1* et (iii) 35S::WOX5.2 pour les racines sur-exprimant *LaWOX5.2-like* (Figure 2.4A).

La sur-expression de *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like* a été vérifiée par RT-qPCR. On observe que l'expression de *LaWOX5.1-like* est 1 500 fois plus importante dans les

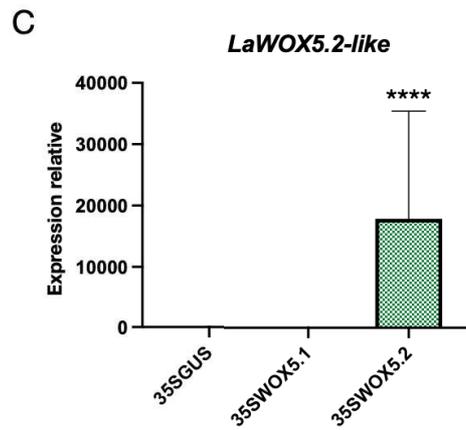
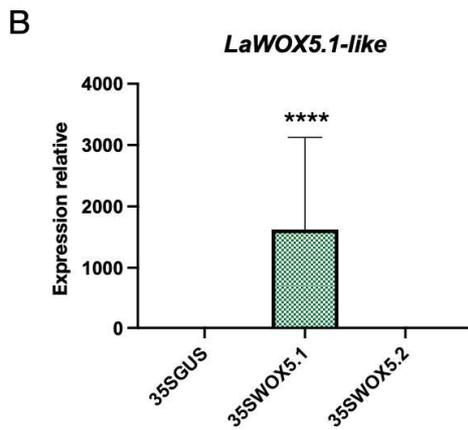
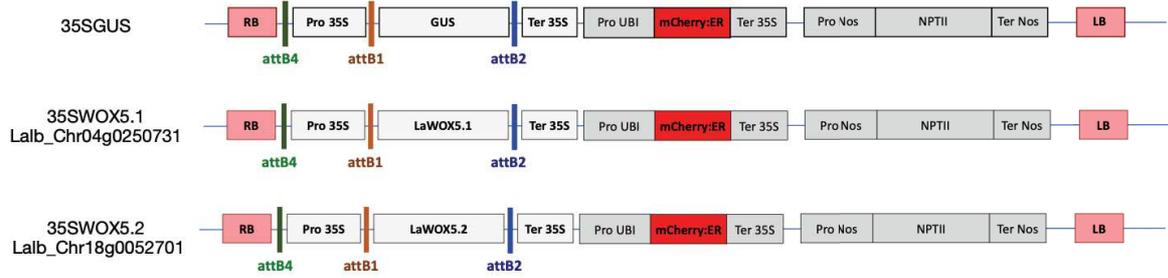


Figure 2.5 : Production de racines de lupin sur-exprimant les gènes *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like* par transformation hairy root. (A) Plasmides de transformation utilisés pour produire des racines contrôles 35S::GUS et les racines d'intérêt 35S::WOX5.1 et 35S::WOX5.2. La sur-expression de (B) *LaWOX5.1-like* (*Lalb_Ch04g0250731*) et de (C) *LaWOX5.2-like* (*Lalb_Ch18g0052701*) a été confirmée par qPCR. L'expression est relative au gène de référence *LaNORM1* (*Lalb_Ch07g0195211*) et à la condition contrôle 35S::GUS. Les valeurs sont les moyennes +/- écartype de 4 réplicats biologiques.

plantes 35S::WOX5.1 que dans les plantes 35S::WOX5.2 et 35S::GUS (Figure 2.5B). De même, l'expression de *LaWOX5.2-like* est environ 20 000 fois plus importante dans les plantes 35S::WOX5.2 que dans les autres conditions (Figure 2.5C).

Les racines protéoïdes transformées de chaque condition ont été échantillonnées en sélectionnant les racines fluorescentes exprimant le marqueur mCherry (cf. matériel et méthodes). Dans un premier temps, les phénotypes racinaires obtenus chez 35S::WOX5.1 et chez 35S::WOX5.2 ne correspondent pas au phénotype « rootlettes longues » attendu (Figure 2.6.B, C). Au contraire, l'observation des images suggère la présence de rootlettes plus courtes dont la densité semble parfois plus importante chez les transformants 35S::WOX5.1 et 35S::WOX5.2 en comparaison avec le contrôle 35S::GUS (Figure 2.6.A-C). Ces caractères ne sont néanmoins pas homogènes le long de la racine protéoïde transformée et sont, de ce fait, difficilement quantifiables. Également, il semblerait que le patron de développement des rootlettes ainsi que la cinétique d'apparition soient dérégulés chez certaines racines protéoïdes-like sur-exprimant *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like*. En effet, on observe des rootlettes seulement d'un côté de l'axe principal et non pas de part et d'autre de la racine mais également des rootlettes plus courtes vers la fin de la racine protéoïde transformée suggérant que ces rootlettes apparaîtraient plus tard que les précédentes ou bien qu'elles aient arrêté leur croissance plus tôt (Figure 2.6.B, C). Il est intéressant de mentionner que l'on observe aussi un phénotype agravitropique de l'apex des racines protéoïdes sur-exprimant nos gènes d'intérêt en comparaison avec le contrôle 35S::GUS (Figure 2.6.A-C). Une méthode d'analyse consistant à calculer un index aire/longueur a été mise en place pour pallier à la difficulté de quantifier le phénotype observé (Matériel et méthodes, section 2.1.4). On observe un ratio aire/longueur significativement plus important chez les plantes contrôles 35S::GUS ce qui suggère que la surface occupée par le cluster de rootlettes est réduite chez les plantes sur-exprimant *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like* (Figure 2.7) et confirmant donc bien le fait que les rootlettes ne sont pas plus longues chez les transformants.

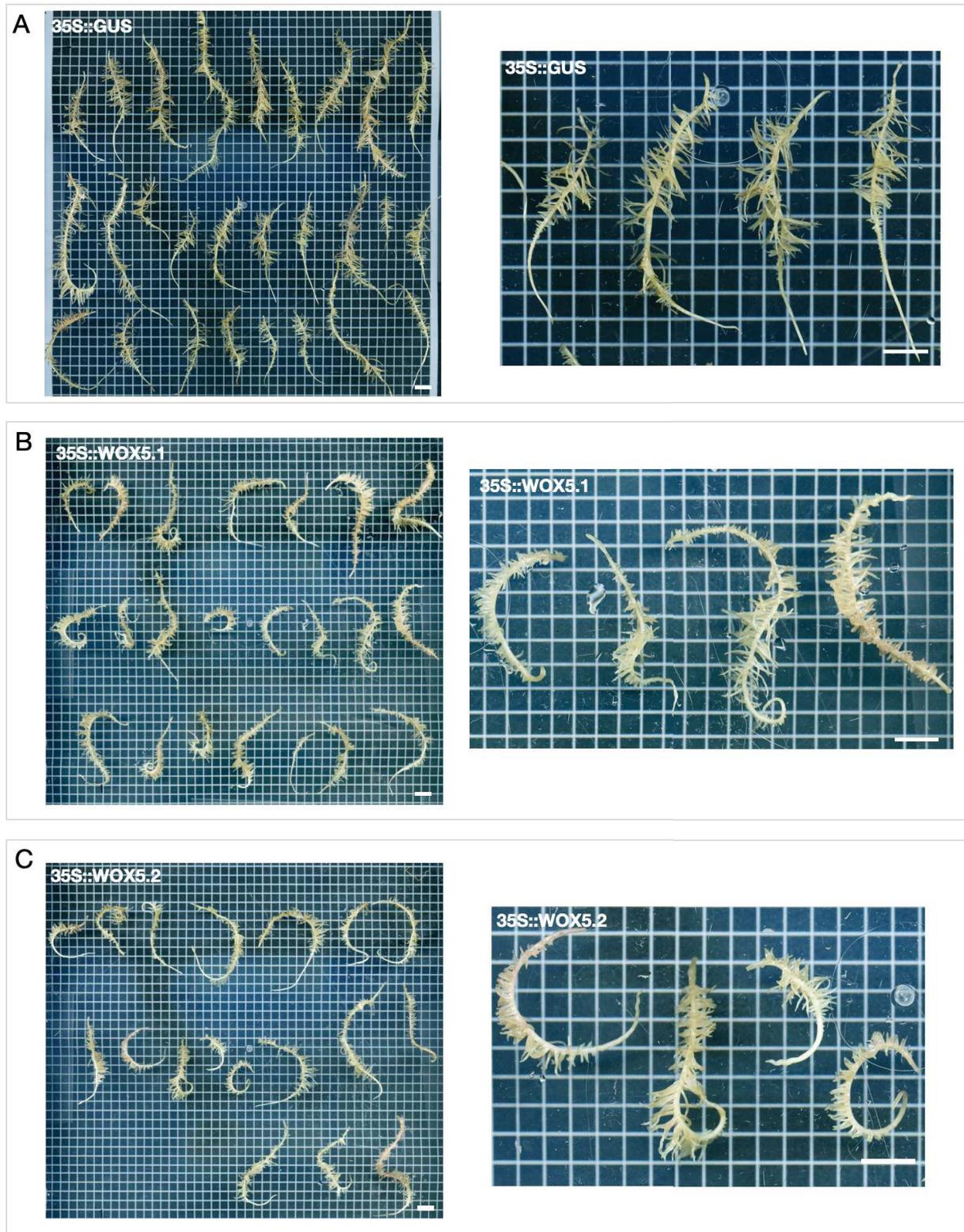


Figure 2.6 : Phénotypes des racines « protéoïde-like hairy root » contrôles et sur-exprimant *LaWOX5.1-like* ou *LaWOX5.2-like*. Les racines protéoïde-like issues des transformations (A) 35S::GUS, (B) 35S::WOX5.1 et (C) 35S::WOX5.2 ont été sélectionnées grâce au marqueur de transformation mCherry puis scannées.

3.1.4 L'impact de la sur-expression de *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like*

Afin de mettre en évidence si la sur-expression de *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like* a un impact sur d'autres gènes impliqués dans le maintien du méristème, j'ai quantifié l'expression de *LaPLT1-like* et *LaROW1-like* dans nos 3 conditions par RT-qPCR (Figure 2.8A, B). Aucune différence significative n'a pu être observée concernant l'expression de *LaPLT1-like* (Figure 2.8A). Cependant, on observe une régulation négative de l'expression de *LaROW1-like* chez les plantes sur-exprimant *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like* (Figure 2.8B).

RAPPEL

- *AtROW1* est un régulateur négatif de *AtWOX5*. Il permet notamment de confiner l'expression de *AtWOX5* dans le centre quiescent.
- Le complexe *AtPLT1-AtSCR-AtTCP* régule positivement *AtWOX5* en se fixant sur son promoteur. Réciproquement, *AtWOX5* est un régulateur positif mais indirecte de *AtPLT1*.

Finalement, la sur-expression de *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like* ne permet pas de conférer une croissance indéterminée aux rootlettes ce qui suggère que ces gènes ne sont pas directement impliqués dans la transition développementale conduisant au caractère déterminé des rootlettes. Néanmoins, le phénotype observé montre que ces gènes sont impliqués dans le développement des rootlettes et plus précisément dans la cinétique d'émergence. La dérégulation de l'expression de *LaROW1-like* dans les racines 35S::*WOX5.1* et 35S::*WOX5.2* suggère également que la sur-expression de *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like* entraîne une dérégulation de certains acteurs du réseau de gènes impliqués dans le maintien du méristème, résultant en des rootlettes plus courtes et plus abondantes.

3.2 L'approche sans apriori : le crible génétique

Disposant d'une population EMS dans l'équipe, j'ai participé à la mise en place d'un criblage de mutants. Cette approche sans a priori s'est déroulée en condition de carence en Pi afin de favoriser le développement des racines protéoïdes. Le crible portait sur la recherche d'un mutant affecté dans le développement de ses rootlettes, présentant plus particulièrement un phénotype « rootlette longue » et qui serait donc affecté dans le programme développemental contrôlant la croissance déterminée. En parallèle, un

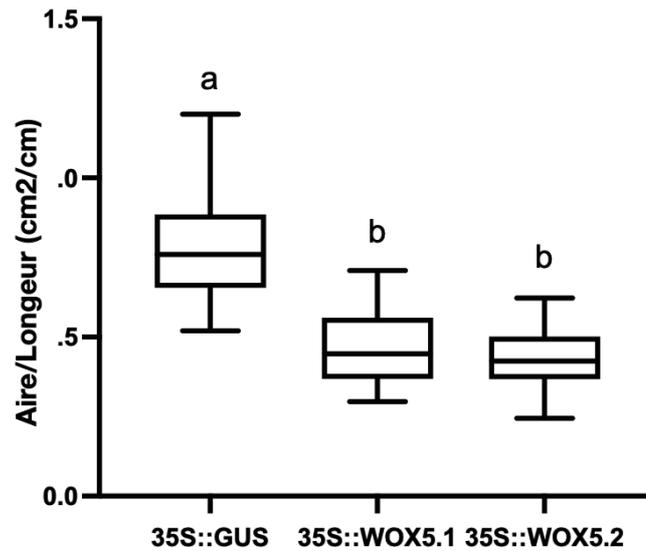


Figure 2.7 : Ratio aire/longueur des rootlettes de racines « protéoïde-like hairy root » contrôles et sur-exprimant *LaWOX5.1-like* ou *LaWOX5.2-like*. Les racines ont été soumises à une méthode d'analyse consistant à diviser la surface occupée par les rootlettes par la longueur sur laquelle les rootlettes se développent. Les analyses ont été effectuées sur n = 61 pour 35S::GUS et n = 36 pour 35S::WOX5.1 et 35S::WOX5.2.

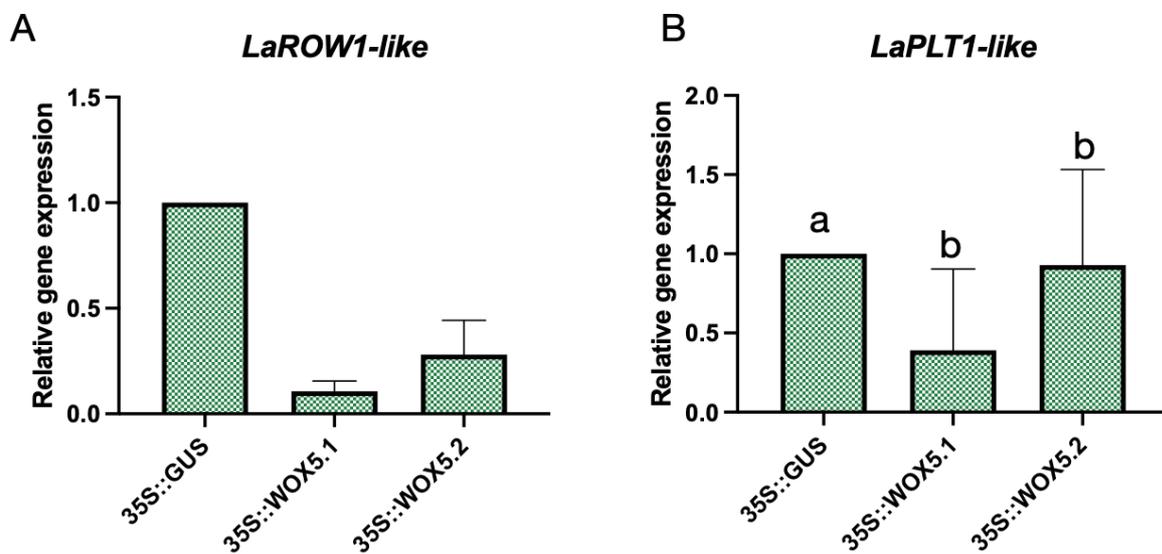


Figure 2.8 : Etude par RT-qPCR de l'expression de deux gènes de lupin homologues de gènes d'*A. thaliana* impliqués dans le maintien du méristème. L'impact de la sur-expression de des gènes *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like* sur d'autres acteurs du réseau de gènes impliqué dans le maintien du méristème a été évalué en suivant l'expression de (A) *LaROW1-like* (*LaLB_Chr01g0019561*) et (B) *LaPLT1-like* (*LaLB_Chr01g0003331*). L'expression est relative au gène de référence *LaNORM1* (*LaLB_Chr07g0195211*) et à la condition contrôle 35S::GUS. Les valeurs sont les moyennes +/- écartype de 4 réplicats biologiques.

phénotype d'absence de rootlettes a également été recherché. Le système de support des plantules dans le bac d'hydroponie dont nous disposons permet l'identification facile et rapide des différents phénotypes racinaires), ce qui constitue un atout essentiel pour la réalisation d'un crible génétique (Figure 2.9A). Un phénotype est retenu dès lors où il est visible sur au minimum 3 plantes/lot. Lors de ce crible, 10 mutants ont été retenus pour un passage en serre afin d'effectuer une confirmation du phénotype à la génération suivante. Un seul présentait un phénotype intéressant pour la suite de mon projet de thèse. Il s'agit du mutant nommé 2083 qui présente un phénotype très particulier de développement de « rootlettes-like » longues le long de sa racine primaire (Figure 2.9B). La racine primaire de ce mutant ressemble à une grande racine protéoïde portant de longues « rootlettes » comparée à celle de la variété contrôle Amiga (Figure 2.9C). Malheureusement, à la génération suivante, plusieurs phénotypes dont le phénotype du mutant 2083 n'ont pas pu être confirmés, ce qui a mis un terme à la poursuite de cette approche sans a priori dans le cadre de mon projet de thèse. Néanmoins, ce crible génétique a permis l'identification de 5 mutants présentant des phénotypes intéressants pour l'équipe : (i) le mutant 2051 qui présente de courtes racines secondaires agravitropiques le long de la racine primaire (Figure 2.10A), (ii) le mutant 2070 qui possède une racine primaire très courte et développe beaucoup de racines protéoïdes (Figure 2.10B), (iii) le mutant 2085 qui a une racine primaire courte formant une racine protéoïde-like à l'extrémité, dont les racines secondaires sont assez courtes et qui présente très peu de racines protéoïdes (Figure 2.10C), (iv) le mutant 2115, qualifié NCR pour No Cluster Root, qui présente une racine primaire normale mais avec aucune racine protéoïde sur les secondaires (Figure 2.10D), et (v) le mutant 2117 qui présente une racine primaire courte et peu de racines secondaires (Figure 2.10E).

Bien que les outils dont l'équipe dispose soient amplement adaptés et efficaces pour mener à bien le phénotypage requis pour effectuer un crible génétique, la génétique du lupin est une limite forte à ce type d'approche. Compte-tenu du temps de génération graine à graine long (6 mois), de la faible quantité de graines produites (3 à 12 graines), et de la complexité de son génome liée à la triplication de celui-ci (Huffnagel et al, 2020), le lupin blanc est une espèce difficile à utiliser pour mener à bien des approches génétiques.



Figure 2.9 : Isolement d'un mutant EMS à rootlettes longues. Un crible génétique en condition de carence en Pi a été mené dans l'équipe. 112 lots d'une population EMS de lupin blanc comprenant chacun 24 à 30 plantes ont été cultivés en bac d'hydroponie et phénotypés. (A) Le système de support pour les plantes dont disposent les bacs hydroponie permet une identification rapide et efficace des phénotypes racinaires. 5 plantes contrôle Amiga sont présentées. (B) Le mutant 2083 présente le long de sa racine primaire des racines courtes que l'on peut considérer comme des « rootlettes-like ». Ces rootlettes sont plus longues que (C) celles présentes sur les racines protéides de la variété Amiga. Le trait rouge permet de visualiser la différence de taille. Echelle (B-C) : 1 cm.

4. Discussion

Les acteurs moléculaires contrôlant la transition développementale des rootlettes sont méconnus, et les approches fonctionnelles abordées dans ce chapitre visent à mieux comprendre ce processus. La transgénèse n'étant pas possible chez le lupin blanc, une approche gène candidat a été menée en sur-exprimant les gènes *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like* dans des racines de lupin blanc par le système de transformation hairy-root. Enfin, un crible génétique sur une population EMS disponible dans l'équipe a été conduit afin de mettre en évidence un mutant présentant un phénotype de « rootlettes longues », qui serait ainsi affecté dans le programme développemental de la croissance déterminée des rootlettes.

4.1 La sur-expression de *LaWOX5-like* ne permet pas de maintenir une croissance indéterminée des rootlettes

Chez la plante modèle *A. thaliana*, *AtWOX5* est un gène central du réseau de gènes impliqués dans le maintien du méristème (Drisch and Stahl, 2015; Kong et al., 2015). Sa perte de fonction, comme celles de *AtSHR* ou *AtSCR*, entraîne la différenciation des cellules souches de la columelle et provoque la différenciation du méristème proximal (Sarkar et al., 2007). Durant le développement des rootlettes de lupin blanc, on observe une corrélation entre la croissance déterminée et la perte d'activité des promoteurs de *LaWOX5-like*, *LaSCR-like* et *LaROW1-like* (chapitre 1). L'implication de plusieurs acteurs du maintien d'une zone méristématique est également décrite chez certaines Cactaceae présentant une croissance déterminée de leur racine primaire (Rodríguez-Alonso et al., 2018). Alors que la croissance déterminée semble associée à l'arrêt de fonctionnement de gènes clés du méristème, les résultats présentés dans ce chapitre démontrent que la sur-expression de *LaWOX5-like* ne permet pas de maintenir une croissance indéterminée des rootlettes. Chez *A. thaliana*, le mutant *moots koom 1 (mko1)*, identifié lors d'un crible génétique visant à sélectionner des plantes développant des systèmes racinaires anormaux, présente aussi un phénotype de croissance déterminée (Hernández-Barrera et al., 2011). A

INFO

- *Moots koom* signifie « racine courte » en langage Maya.

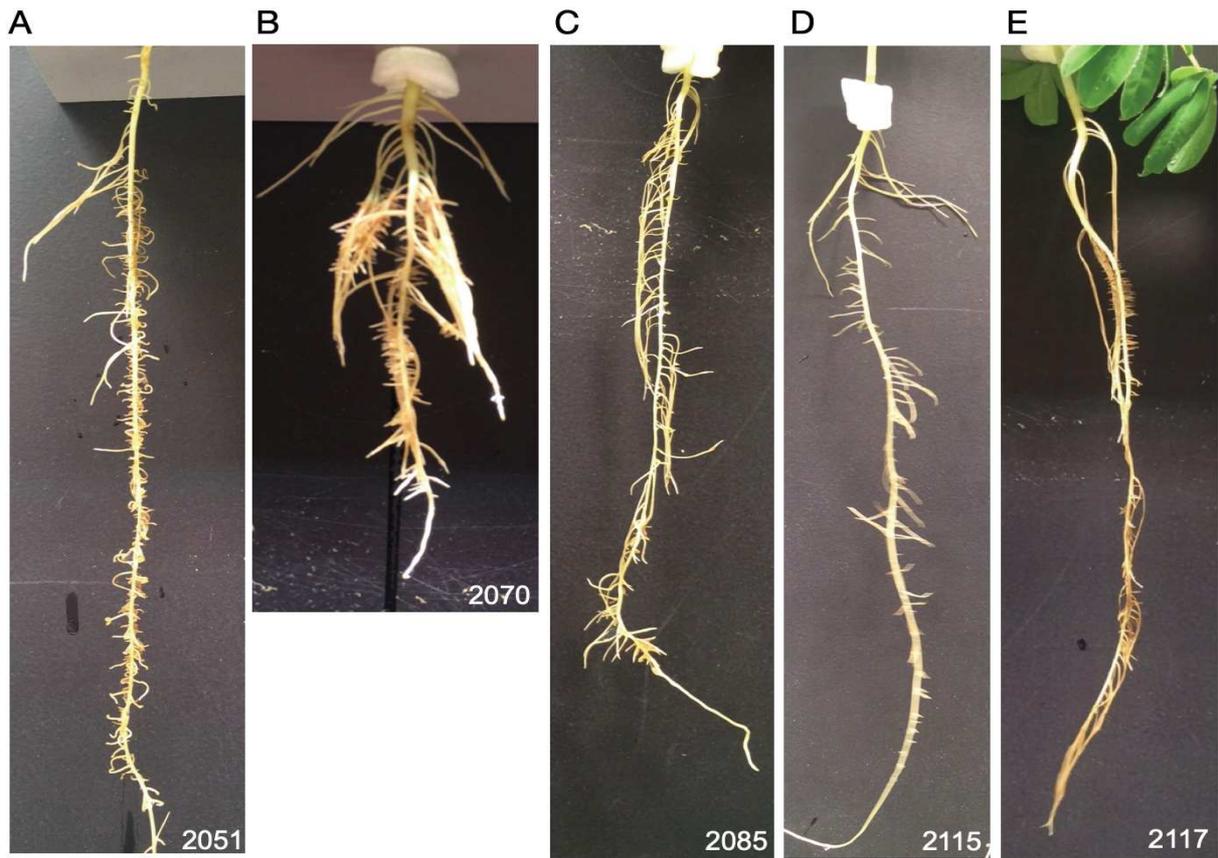


Figure 2.10 : Phénotypes de différents mutants mis en évidence lors du crible génétique. Lors du crible génétique dirigé en condition de carence en Pi, 5 mutants ont été mis en évidence, amplifiés et confirmés: (A) le mutant 2051 présente de courtes racines secondaires agravitropiques le long de la racine primaire, (B) le mutant 2070 possède une racine primaire très courte portant de nombreuses racines protéoïdes, (C) le mutant 2085 a une racine primaire courte formant une racine protéoïde-like au bout et dont les racines secondaires sont assez courtes et présentent très peu de racines protéoïdes, (D) le mutant 2115, qualifié NCR pour No Cluster Root, qui présente une racine primaire normale mais aucune racine protéoïde et (E) le mutant 2117 qui présente une racine primaire courte et aucune racine protéoïde.

l'instar des rootlettes de lupin blanc et de la racine primaire de plusieurs Cactaceae du désert de Sonaran, on observe chez *mko1* des évidences morphologiques de la différenciation du méristème de la racine primaire incluant (i) le développement des poils absorbants sur la totalité de la racine, (ii) la présence d'une vasculature dans la région ex-méristématique et (iii) des cellules anormalement grandes dans l'apex racinaire (Dubrovsky, 1997b; Watt and Evans, 1999; Hernández-Barrera et al., 2011). De manière étonnante, on observe, chez ce mutant, que les gènes *AtWOX5* et *AtSCR*, marqueurs de la présence d'un centre quiescent, sont toujours exprimés durant la différenciation du méristème et que le domaine d'expression de *AtWOX5* est étendu aux cellules initiales environnantes (Hernández-Barrera et al., 2011). Un résultat similaire est observable dans la racine primaire différenciée de *P. pringlei* où l'expression de *WOX5* est plus importante après différenciation de l'apex (Rodríguez-Alonso et al., 2018). Il est alors intéressant de remarquer que la visualisation de l'activité des promoteurs de *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like* dans notre étude, suggère aussi un patron d'expression plus étendu que l'expression du promoteur *pAtWOX5* chez le lupin blanc. Cette recherche démontre ainsi que la différenciation du méristème menant à une croissance déterminée peut être associée à la perte du patron d'expression de certains gènes impliqués dans le maintien du méristème plutôt que la perte de leur expression. Cependant, les résultats obtenus dans ce chapitre, ne permettent de donner aux *LaWOX5-like* un rôle central dans la transition vers la croissance déterminée des rootlettes.

4.2 35SWOX5.1 et 35SWOX5.2, des phénotypes pas si surprenants

Chez les plantes sur-exprimant *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like*, la densité de rootlettes semble plus importante comparée aux plantes contrôles 35S::GUS, bien que cette caractéristique n'ait pas pu être quantifiée. Ce phénotype ne semble pas surprenant compte-tenu de l'implication de *WOX5* dans l'organogénèse racinaire et particulièrement dans l'initiation et le développement des racines latérales chez *A. thaliana* (Tian et al., 2014; Hu and Xu, 2016). En effet, la sur-expression de *AtWOX5* dans des explants de feuille cultivés *in vitro* promeut la rhizogénèse (Hu and Xu, 2016). Plusieurs études montrent également que, chez *A. thaliana*, la sur-expression de *AtWOX5* entraîne la dé-différenciation des cellules souches de la columelle, conduisant à une réduction du gravitropisme (Sarkar et al., 2007; Pi et al., 2015). Une étude plus récente précise que cette sur-expression empêche en fait la différenciation

des cellules souches filles de la columelle (Savina et al., 2020). Il est intéressant de noter que plusieurs racines proteoïdes-like sur-exprimant *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like* présentent une courbure, voire même une torsion, de l'apex. Finalement, une étude tissulaire de l'anatomie de l'apex des racines transformées aurait permis d'en savoir plus sur la structure de la zone méristématique.

4.3 Le lupin blanc, un modèle difficile pour la génétique

Le chapitre 1 de ce manuscrit de thèse met en évidence le lupin blanc comme un excellent modèle pour l'étude du développement racinaire. Néanmoins, dans ce chapitre 2, j'aimerais mettre en lumière les difficultés rencontrées concernant l'utilisation de cette plante pour des approches génétiques. Dans un premier temps, les nombreuses duplications présentes dans le génome du lupin rendent difficiles la mise en évidence de gènes orthologues. En prenant exemple sur *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like*, on observe qu'il existe 3 gènes homologues à *AtWOX5*. La localisation de l'activité du promoteur des deux gènes les plus exprimés dans les rootlettes n'est pas strictement confinée aux quelques cellules du centre organisateur comme observé pour celui de *AtWOX5* chez le lupin blanc. Ce résultat peut remettre en cause la pertinence de l'homologie faite durant ce chapitre entre *AtWOX5* et *LaWOX5.1-like* / *LaWOX5.2-like*. Malgré sa faible expression, la visualisation de la localisation du gène *Lalb_Chr15g0084241* (*LaWOX5.3-like*) pourrait permettre d'éclaircir et de confirmer nos choix pour les études fonctionnelles.

De nombreux efforts ont été dédiés dans l'équipe à la transformation stable par *Agrobacterium tumefaciens* mais le lupin blanc reste une plante récalcitrante à la régénération à partir de cals. La transformation hairy-root s'avère être une alternative relativement rapide et efficace afin de faire exprimer des constructions transgéniques dans les racines de lupin blanc. Néanmoins, les limites rencontrées, durant les 2 premières années de ma thèse, concernent la vérification de la bonne transformation des racines hairy-root, notamment pour des études fonctionnelles de type sur-expression. En effet, les racines développées par les plantes hairy-root ne sont pas toutes transformées et, mis à part pour les transformations comportant un gène rapporteur GUS, nous n'avions aucun moyen d'attester de la bonne transformation de celles-ci. Cependant, la mise en place d'un système de sélection par fluorescence mCherry des racines transformées a permis de rendre pertinentes les

expériences fonctionnelles en système hairy-root. Une autre limite du système hairy-root concerne le dérèglement hormonal et, plus précisément, celui de la balance auxine/cytokinine au sein des racines transformées. Lors d'études fonctionnelles, l'impact de ce déséquilibre est atténué par la comparaison avec une condition contrôle néanmoins les conclusions impliquant des gènes régulés ou régulant les flux d'auxine ou de cytokinine (comme *WOX5*) peuvent être impactées.

En regard du crible génétique, nous avons à notre disposition dans l'équipe les infrastructures nécessaires pour le bon déroulement de ce type d'approche. En effet, les systèmes hydroponiques permettant de cultiver le lupin blanc sont adaptés à un phénotypage racinaire rapide et haut débit. Néanmoins, le temps long de génération graine à graine (plus de 6 mois), la faible quantité de graines obtenues (3 à 12 graines par plante) et la quantité de rétrocroisements nécessaires pour stabiliser une lignée EMS (7 générations) font du lupin blanc une plante complexe pour les méthodes de génétique classique. De plus, le timing décrit ci-dessus démontre de l'incompatibilité d'un projet d'une telle envergure avec le temps imposé à la réalisation d'une thèse. Il est également important de noter que la culture de la plante de lupin blanc n'est pas compatible avec les sols de l'Hérault riches en calcaire. De plus, les fortes chaleurs d'été ne permettent pas non plus la culture du lupin blanc en serre dans le sud de la France, imposant ainsi la nécessité d'une multiplication à Poitiers (Collaboration avec Jouffray Drillaud, grand semencier français).

CHAPITRE 3



**Analyse anatomique et transcriptomique de
rootlettes longues échappant temporairement
à la croissance déterminée**

1. Introduction

Chez les plantes, la croissance indéterminée des racines repose sur le maintien et la régulation du méristème apical racinaire (MAR). L'activité méristématique se définit par un équilibre entre le renouvellement constant des cellules souches et leur transition vers un état différencié, permettant la formation de différentes lignées cellulaires à l'origine des différents types de tissus composant la racine. Cet équilibre peut être perturbé par des facteurs abiotiques, biotiques ou génétiques, et peut mener dans certains cas à une croissance dite déterminée du système racinaire (Shishkova et al., 2008). Chez la plante modèle *A. thaliana*, l'arrêt de croissance de la racine primaire en réponse à une carence en Pi implique les modules STOP1-ALMT1 et PDR2-LPR1, provoquant un arrêt rapide de l'élongation cellulaire, un arrêt progressif de l'activité mitotique de la niche de cellules souches du méristème, puis *in fine* une nécrose de la racine (Balzergue et al., 2017; Mora-Macías et al., 2017; Gutiérrez-Alanís et al., 2018). Cet arrêt de croissance de la racine primaire chez *A. thaliana* n'est pas comparable à celui des rootlettes de racines protéoïdes de lupin blanc. Bien que les racines protéoïdes de lupin blanc se développent en réponse à un stress abiotique identique, la carence en Pi, la réponse racinaire est très différente. Notamment, l'arrêt des divisions cellulaires dans la zone méristématique de l'apex des rootlettes subvient rapidement (moins de 24 heures après émergence), avant un arrêt progressif de l'élongation des cellules. De plus, aucune nécrose n'est observée suite à l'arrêt de croissance des rootlettes (Le Thanh et al., 2021). Dans la littérature, la croissance déterminée de la racine primaire de certaines Cactacées du désert de Sonora est largement référencée (Dubrovsky, 1997a; Dubrovsky, 1997b; Dubrovsky and Gómez-Lomelí, 2003; Rodríguez-Rodríguez et al., 2003; Kirschner et al., 2021). A l'instar des rootlettes de racine protéoïde de lupin blanc, cette caractéristique développementale implique l'épuisement des cellules souches du méristème, menant à la différenciation de toutes les cellules et à l'apparition de poils absorbants sur la totalité de l'apex de la racine (Dubrovsky, 1997a; Dubrovsky, 1997b; Dubrovsky and Gómez-Lomelí, 2003; Shishkova et al., 2008; Kirschner et al., 2021). Lors de l'arrêt de croissance de la racine primaire

INFO

- Le désert de Sonora, ou désert de Gila se situe en Amérique du Nord, à cheval entre les Etats-Unis et le Mexique. Il occupe une superficie d'environ 310 000 km² et représente la plus grande zone désertique d'Amérique du Nord (Shreve, 1951).

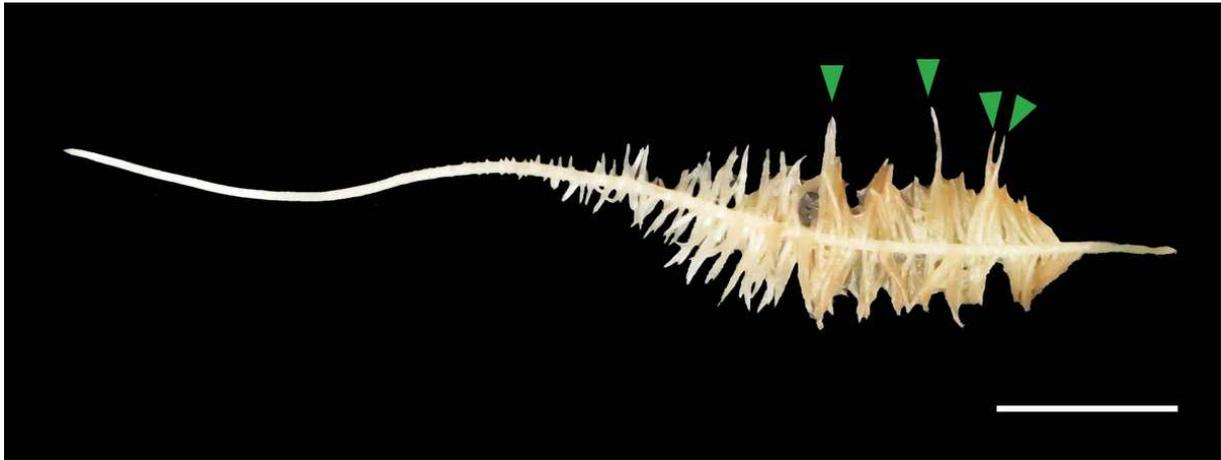


Figure 3.1 : Image d'une racine protéoïde de lupin blanc présentant quelques « Longues Rootlettes ». La racine protéoïde a été échantillonnée sur des plantes cultivées durant 16 jours en milieu carencé en Pi. Le long de la racine protéoïde, de nombreuses rootlettes se développent de manière successive et ont pour caractéristique une croissance déterminée. Certaines rootlettes, que l'on a appelé « Longues Rootlettes » (LR), semblent échapper à ce programme développemental. Flèches vertes : LR. Echelle : 1 cm.

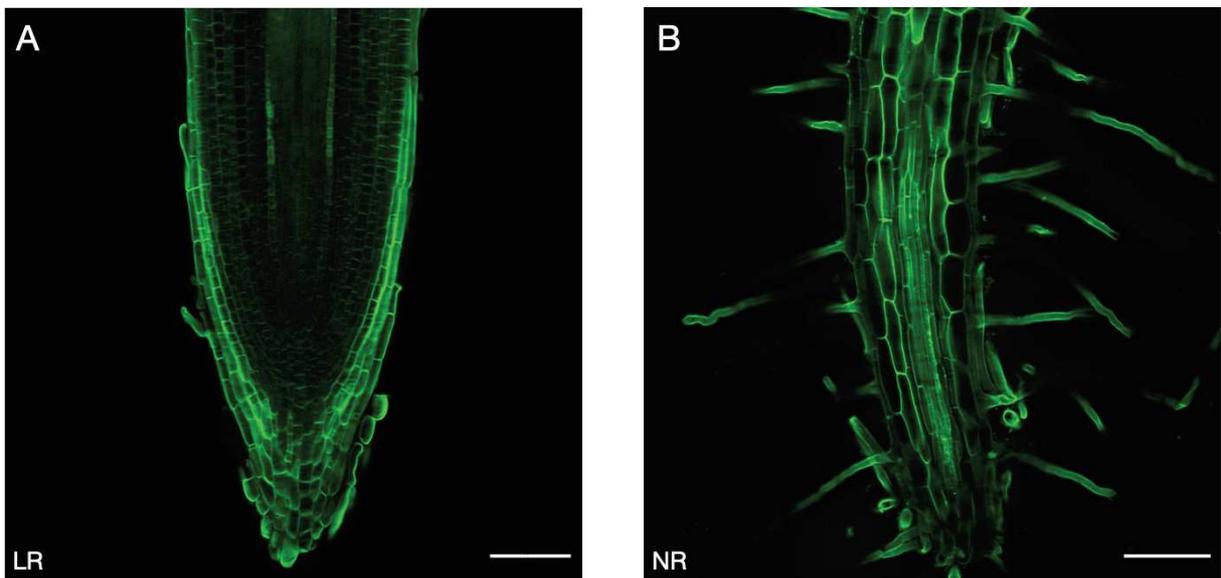


Figure 3.2 : Comparaison anatomique entre une « Longue Rootlette » (LR) et une « Normale Rootlette » (NR). Coloration au calcofluor de coupes longitudinales de 80 μm d'épaisseur de (A) LR et (B) NR. La structure des LR est semblable à une rootlette de stade III (Le Thanh et al., 2021) suggérant que celle-ci est toujours en croissance. En contraste, la NR juxtaposée présente les caractéristiques d'une rootlette de stade V avec la présence (i) de cellules totalement différenciées, (ii) d'une vasculature allant jusqu'au bout de l'apex et (iii) de poils absorbants sur la totalité de la rootlette. Echelle (A-B) : 100 μm .

de *P. pringlei*, une analyse transcriptomique menée par l'équipe de Rodriguez-Alonso a mis en évidence la perte d'expression de plusieurs gènes orthologues à des gènes impliqués dans le maintien du méristème chez *A. thaliana* comme, par exemple, *PpPLT1*, *PpBBM*, *PpSHR*, *PpSCR* et *PpWOX* (Rodríguez-Alonso et al., 2018). Il est intéressant de noter que des résultats similaires ont pu être observés chez les rootlettes de lupin blanc (cf chapitre 1). En effet, on a pu observer, lors du développement des rootlettes, l'arrêt progressif de l'expression de gènes impliqués dans le maintien du méristème comme *LaWOX5.1-like*, *LaWOX5.2-like*, *LaSCR-like* et *LaROW1-like* (Le Thanh et al., 2021) mais aussi des modifications de leur patron d'expression dans les stades précoces (Chapitre 2). Il est acquis que, lors de carence en Pi, le lupin blanc induit la formation de racines protéoïdes sur lesquelles se développent un nombre important de rootlettes dont la croissance est déterminée (Watt and Evans, 1999; Neumann and Martinoia, 2002), cependant les mécanismes moléculaires impliqués restent méconnus. De manière surprenante, certaines rootlettes semblent échapper au programme développemental induisant une croissance déterminée, et se différencient des autres rootlettes par une longueur plus importante (Figure 3.1).

Le chapitre 3 de cette thèse portera ainsi sur (i) l'analyse anatomique de ces « longues rootlettes » (LR), (ii) l'analyse d'un jeu de données transcriptomiques permettant de comparer les LR à des rootlettes à croissance déterminée et situées directement à côté des LR, appelées ici « normales rootlettes » (NR), et (iii) l'étude fonctionnelle d'un gène candidat mis en évidence lors de cette analyse transcriptomique. Cette étude sur le comportement particulier des LR pourra, à terme, apporter de nouvelles connaissances permettant d'améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires menant à la croissance déterminée des rootlettes de racine protéoïde chez le lupin blanc.

2. Résultats

2.1 Caractérisation anatomique des LR

Le long de la racine protéoïde, les rootlettes émergent de manière successive, générant ainsi un gradient développemental spatial et temporel (Figure 3.1). Curieusement, lors des observations menées sur les racines protéoïdes, j'ai fréquemment pu observer que

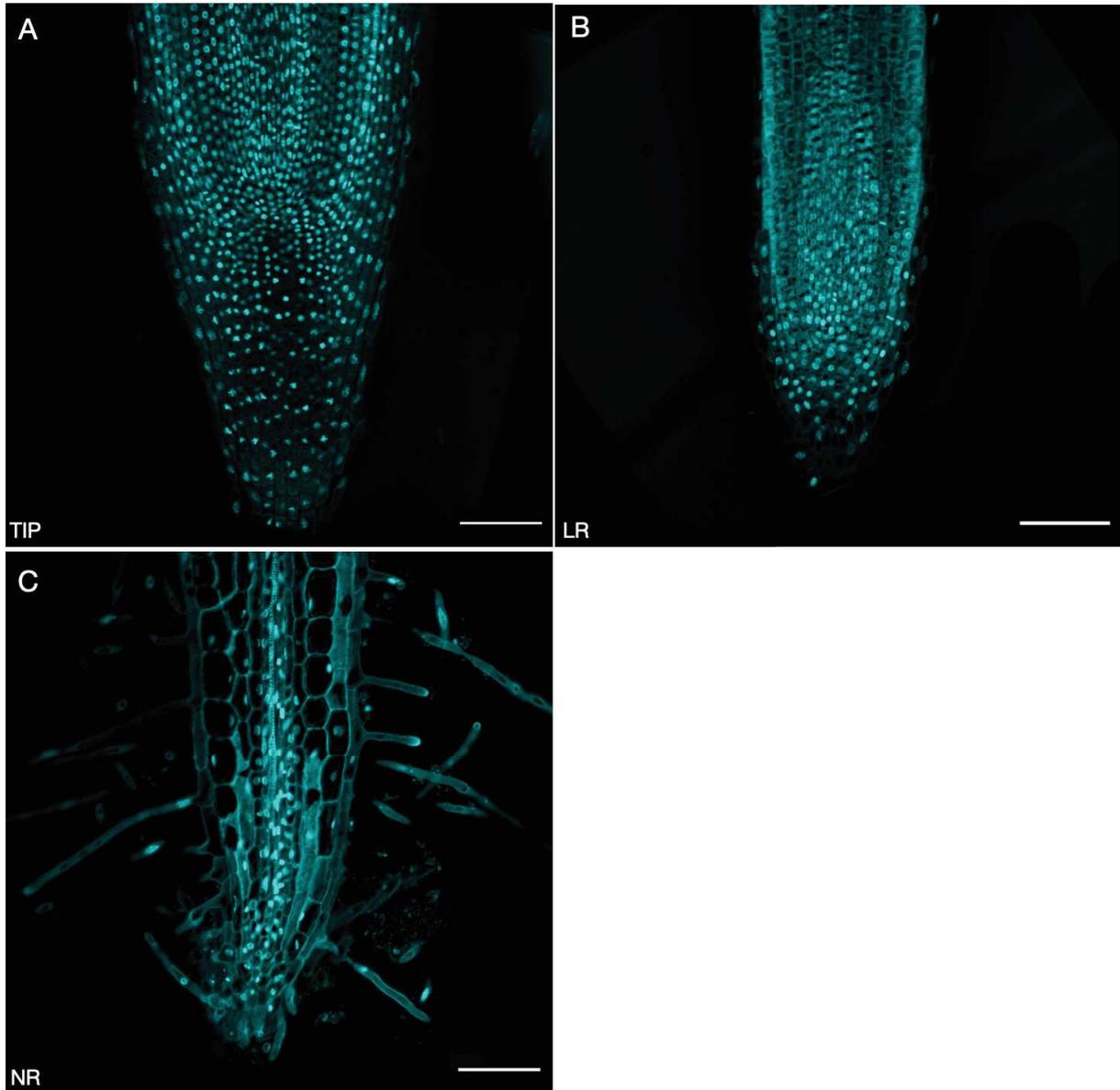


Figure 3.3 : Etude anatomique des apex d'une racine protéoïde, d'une « Longue Rootlette » (LR) et d'une « Normale Rootlette » (NR). La coloration au DAPI a été utilisée sur des coupes longitudinales de 8 μm d'épaisseur afin de visualiser les potentielles divisions cellulaires dans (A) l'apex d'une racine protéoïde (TIP), (B) l'apex d'une longue rootlette (LR) et (C) l'apex d'une rootlette à croissance déterminée (NR). Echelle : (A-C) 100 μm .

certaines de ces rootlettes se démarquaient des autres par une longueur plus importante et interrompaient donc ce gradient caractéristique (Figure 3.1 – flèches vertes). Lors du chapitre 1, 5 stades de développement des rootlettes, basés sur leur morphologie et anatomie, ont pu être mis en évidence (Le Thanh et al., 2021). Les LR se situent spatialement à côté de rootlettes de stade IV et V, suggérant qu’elles continueraient de croître et qu’elles ne seraient pas soumises au programme développemental induisant une croissance déterminée auquel sont soumises les rootlettes directement voisines (Figure 3.1). Afin de les caractériser anatomiquement, j’ai, dans un premier temps, comparé la structure morphologique des LR à celle des NR, rootlettes à croissance déterminée juxtaposées (Figure 3.2). La structure des LR est similaire à une structure de racine à croissance indéterminée, avec la présence (i) de petites cellules typiques d’une zone méristématique, (ii) d’une columelle et d’une coiffe latérale, et (iii) de lignées cellulaires organisées (Figure 3.2A). La différence est notable en comparaison avec la structure des NR, qui présente une organisation typique d’une rootlette en stade V où la zone méristématique a disparu, avec (i) des cellules totalement différenciées, (ii) la présence de tissus conducteurs allant jusqu’au bout de l’apex et (iii) la présence de poils absorbants couvrant la totalité de la rootlette (Figure 3.2B). Ces observations suggèrent que les LR, émergées au même moment que les NR adjacentes, semblent toujours posséder une zone méristématique active leur permettant de continuer de croître. Dans le but de confirmer cette hypothèse, j’ai observé les divisions cellulaires présentes dans l’apex des racines protéoïdes (TIP), des LR et des NR à l’aide d’une coloration au DAPI (Figure 3.3). La coloration au DAPI permet de visualiser les noyaux, la présence de cellules en télophase est ainsi observable, attestant une activité de division cellulaire. L’apex des LR présente un patron similaire à celui de l’apex des TIP, avec la présence d’une niche de cellules souches donnant naissance à des lignées cellulaires possédant une activité mitotique (Figure 3.3A, B). En contrepartie, l’apex des NR ne présente aucune activité de division cellulaire (Figure 3.3C). Une analyse en microscopie confocale focalisée sur la zone méristématique des LR a permis de montrer que toutes les LR ne présentent pas la même structure cellulaire. Ainsi 3 stades de développement des LR, similaires aux stades III (Figure

RAPPEL

Les stades de développement des rootlettes:

- Stade I: pré-émergence
- Stade II: émergence
- Stade III: en croissance
- Stade IV: ayant atteint sa taille maximale
- Stade V: totalement différenciée

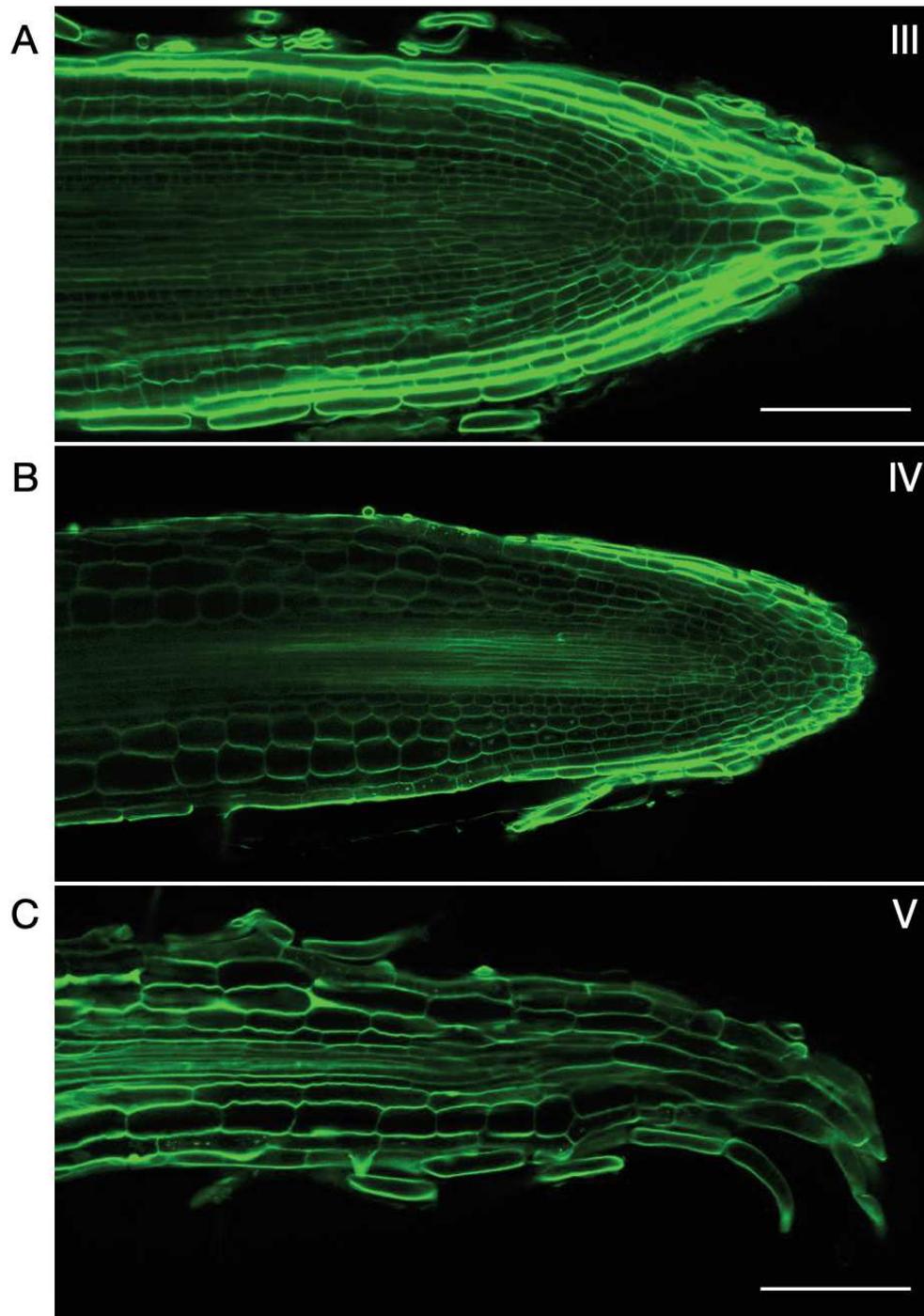


Figure 3.4 : Etude tissulaire de l'apex de différentes « Longues Rootlettes ». Des coupes longitudinales de 100 μm d'épaisseur ont été colorées au calcofluor afin de suivre l'évolution anatomique de plusieurs rootlettes longues (LR). Les LR présentent, bien que plus tardivement que les NR, une croissance déterminée pouvant être associée anatomiquement aux stades de développement des rootlettes décrits dans Le Thanh et al. 2021 : (A) Stade III, où la rootlette est toujours en croissance (B) Stade IV, où l'on observe une élongation des cellules et (C) stade V, où toutes les cellules de la rootlette sont différenciées, le cylindre central vient rejoindre l'apex de la rootlette et les poils absorbants se développent sur la totalité de l'apex. Echelle : (A-C) 100 μm

3.4A), IV (Figure 3.4B) et V (Figure 3.4C) du développement des rootlettes à croissance déterminée, ont été identifiés. Toutefois, la très grande majorité des LR observées présentent des similarités avec le stade III des rootlettes, voire même avec celui d'un apex de racine protéoïde, avec de nombreuses petites cellules caractéristiques d'une zone méristématique, et la présence d'une columelle et d'une coiffe latérale (Figure 3.4A). Avec une fréquence faible, j'ai également pu observer quelques LR présentant une structure proche de celles des rootlettes de stade IV (Figure 3.4B) et quelques rares apex de LR totalement différenciés, possédant de fortes similitudes avec des rootlettes de stade V (Figure 3.4C). Il est pertinent de mentionner que les LR visualisées durant cette expérience ont toutes été échantillonnées en même temps, suggérant que certaines LR continuent de croître, tandis que d'autres se différencient mais de manière très tardive comparé au NR voisines. La similitude entre la columelle d'une LR et d'un apex de racine protéoïde laisse sous-entendre que les LR mettent en place précocement au cours de leur développement un plus grand nombre d'assises cellulaires comparativement aux NR. Il semblerait ainsi que les LR maintiennent une activité méristématique plus longtemps que les NR, mais néanmoins restent soumises au programme développemental entraînant une croissance déterminée.

2.2 Analyse transcriptionnelle des « Longues Rootlettes »

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires menant à la croissance déterminée des rootlettes, une approche transcriptomique a été engagée pour comparer l'expression des gènes dans les trois types de racines précédemment décrites : j'ai généré un jeu de données transcriptomiques en tirant profit de la croissance prolongée des LR. Trois types de racines sont représentées dans ce jeu de données : (i) **LR**, représentant les rootlettes longues, suggérant une croissance indéterminée, (ii) **NR**, les rootlettes ayant arrêté leur croissance, spatialement directement juxtaposées aux LR, représentant la condition de référence et (iii) **TIP**, correspondant à l'apex de la racine protéoïde portant ces rootlettes, représentant une référence de racine à croissance indéterminée. L'analyse transcriptomique par RNASeq a été réalisée sur des fragments racinaires d'apex de 0.5 cm. 12 librairies ARN ont ainsi été générées par séquençage à haut débit (NovaSeq, Illumina) à raison de 4 réplicats biologiques par type de racine, représentant environ 200 millions de couples de « reads » par condition (Table 1 – Annexe). L'analyse de ce transcriptome a été effectuée à l'aide de

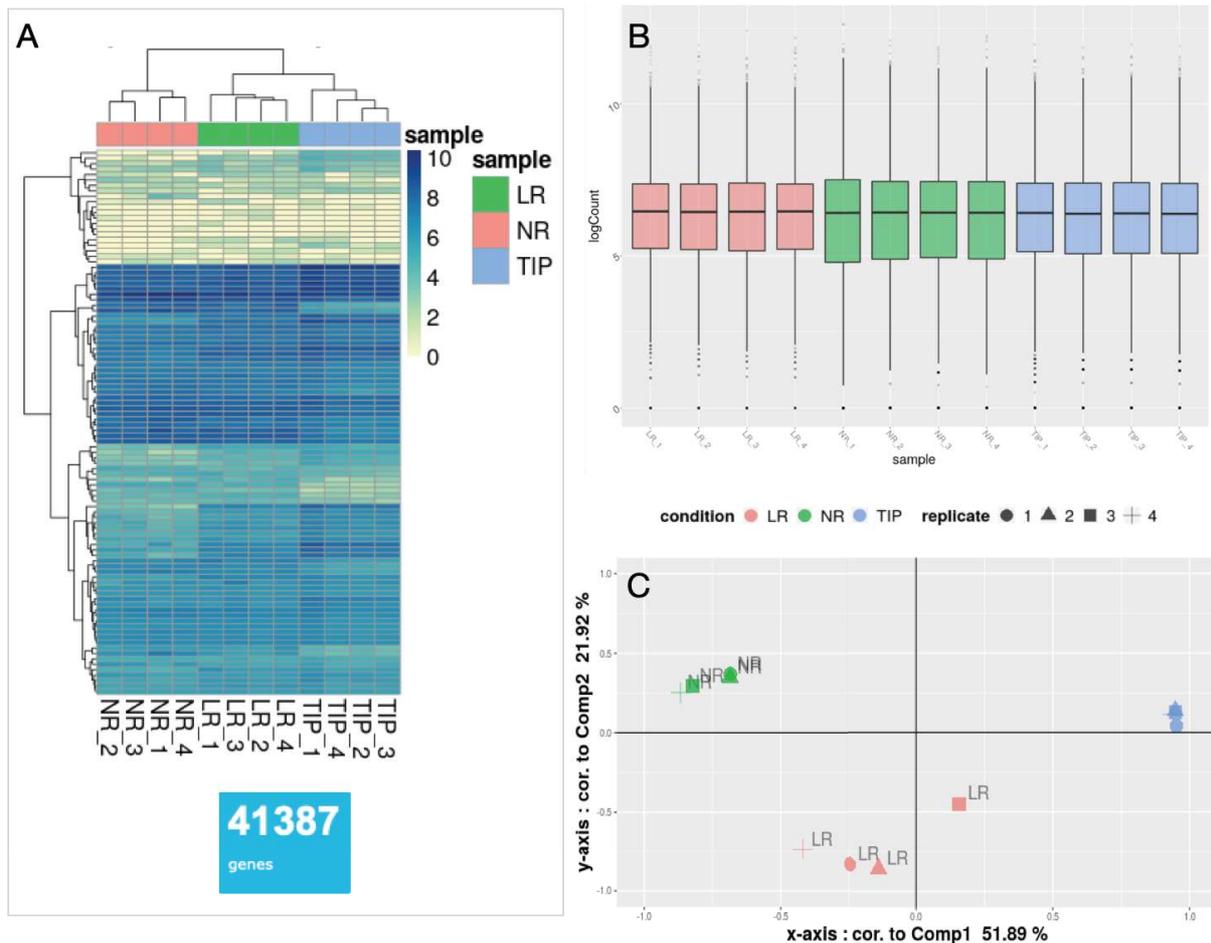


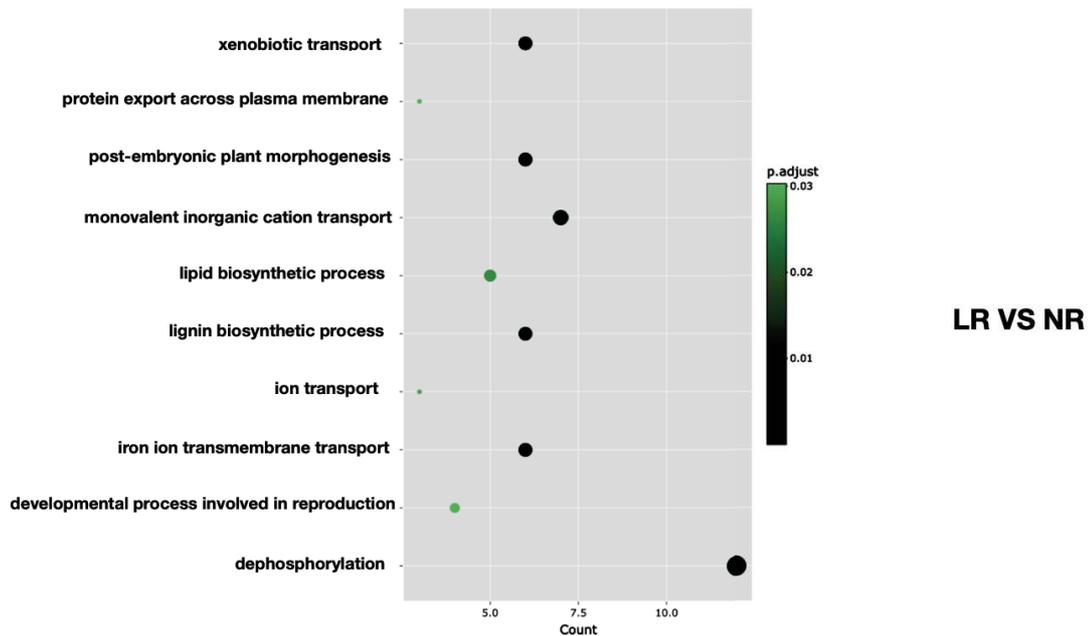
Figure 3.5 : Analyse du jeu de données transcriptomiques nommé « Longues Rootlettes ». Trois conditions sont représentées dans ce jeu de données : LR (Longue Rootlette), NR (Normale Rootlette) et TIP (apex de la racine protéoïde). LR représente la condition anormale, NR la condition de référence et TIP une racine à croissance indéterminée. Les analyses ont été effectuées à l'aide de l'outil DIANE (Cassan et al. 2020). (A) 41 387 gènes sont présents dans ce jeu de données transcriptomiques. (B) Suite à une étape de normalisation de type DESeq et de filtration des gènes présentant un « count » inférieur à 200, 28 109 gènes ont été mis en évidence. (C) Répartition des échantillons du jeu de données sur l'analyse en composante principale représentant plus de 50% de la variabilité de l'expression des gènes, et attestant de la qualité de l'échantillonnage.

l'application DIANE (<https://diane.bpmp.inrae.fr/>), outil développé par Océane Cassan, doctorante au sein du laboratoire BPMP (Cassan et al., 2021). Selon la dernière annotation produite par l'équipe, le génome du lupin blanc est représenté par 41 387 gènes (<https://www.whitelupin.fr/>). L'analyse globale des données montre, d'une part, une faible variabilité de l'expression des gènes au sein de chaque groupe d'échantillons et, d'autre part, un rapprochement dans les échantillons des conditions LR et TIP, qui s'avèrent être très différents de la condition NR (Figure 3.5A). Suite à une étape de normalisation (méthode DESeq2) et de filtration du bruit de fond (low counts 200), les analyses ont été poursuivies avec 28 109 gènes (Figure 3.5B). La répartition des échantillons sur l'analyse en composantes principales, représentant sur un plan (Composante1 vs Composante2) plus de 50% de la variabilité de l'expression des gènes, atteste de la qualité des données et de l'échantillonnage (Figure 3.5C). Au cours de cette analyse, les conditions LR et TIP sont comparées à la condition de référence NR. Ainsi, dans la suite du travail, la « condition LR » correspondra à la comparaison LR vs NR et la « condition TIP » correspondra à la comparaison TIP vs NR.

2.2.1 Identification des gènes différentiellement exprimés

Dans le but de mettre en évidence les mécanismes moléculaires menant à l'arrêt de croissance des rootlettes, j'ai recherché les gènes différentiellement exprimés dans la condition LR et la condition TIP par rapport à la condition NR en prenant comme paramètres : un Log de Fold Change (LogFC) supérieur à 2 et une pvalue de 0.001. 2 467 gènes ont pu être ainsi identifiés chez LR et 6380 gènes chez TIP. Parmi ceux-ci, 453 gènes sont régulés négativement dans la condition LR, et 3027 dans la condition TIP. Pour chaque condition, les 50 premiers gènes les plus négativement régulés ont été référencés sous la forme d'un tableau (Table 2 et 3 - Annexe). Il est intéressant de noter que le 3^{ème} gène présentant la plus forte dérégulation dans la condition LR est un homologue d'un des gènes de la famille des transporteurs de phosphate *AtPHTs* (*Lalb_Chr10g0094631*). Le premier gène présentant la régulation négative la plus forte dans la condition TIP présente une homologie avec le gène *AtFRO1* (*Lalb_Chr17g0339251*) codant pour une réductase ferrique, et ce gène est aussi présent parmi les 10 premiers gènes les plus négativement régulés chez LR. De même, 2 014 gènes sont régulés positivement chez les LR, et 3 353 chez les TIP. Pour chaque condition, les 50 premiers gènes les plus positivement régulés ont été référencés sous la forme d'un tableau

A



B

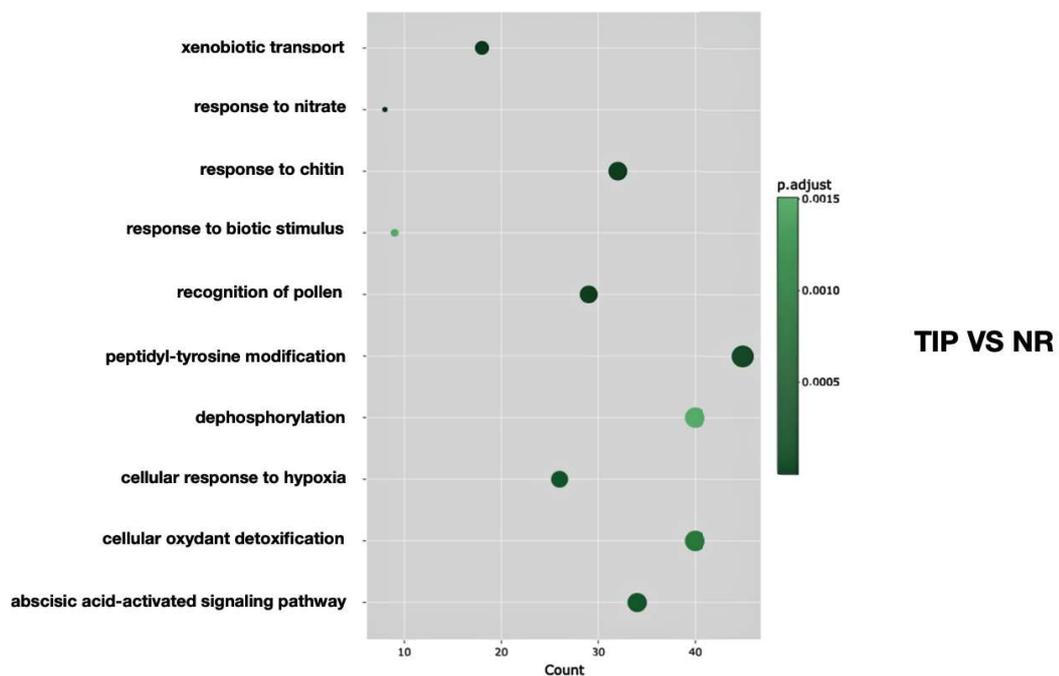


Figure 3.6 : Diagramme à points représentant les différents processus biologiques enrichis parmi les gènes différentiellement exprimés et négativement régulés dans la condition LR vs NR et la condition TIP vs NR. L'analyse d'ontologie génique a été effectuée à l'aide de l'outil DIANE (Cassan et al., 2021) dans la condition (A) LR vs NR et (B) TIP vs NR. Les points suivent un code couleur défini en fonction de leur p-value ajustée, et sont placés sur l'abscisse en fonction du nombre de gènes correspondant à ce processus biologique.

(Table 4 et 5 - Annexe). Il est intéressant de mentionner que parmi ces gènes, et communément aux deux conditions, le gène le plus différentiellement exprimé et régulé positivement code pour une protéine annotée root meristem growth factor 2-like (*Lalb_Chr04g0255371*), faisant référence au gène *AtRGF2*, codant pour un peptide sécrété impliqué dans la maintenance du méristème chez *A. thaliana* (Matsuzaki et al., 2010) dont les logFC sont de 10.91 et 12.82 dans LR et dans TIP comparés à NR respectivement.

2.2.2 Analyse de l'enrichissement des ontologies des gènes

A partir des gènes différentiellement exprimés, une analyse de l'enrichissement des ontologies des gènes (GO enrichment) a été effectuée pour les gènes régulés négativement (down-regulated genes) pour les conditions LR et TIP (Figure 3.6) en se focalisant sur les processus biologiques. Dans la condition LR, on observe un enrichissement de gènes impliqués dans des processus de transport (transport d'ions, monovalent cation transport), et particulièrement d'ions ferriques comme *LaFRO1-like* (*Lalb_Chr17g0339341*, *Lalb_Chr17g0339251*, *Lalb_Chr17g033932*) ou encore le transporteur vacuolaire *LaVIT-like* (*Lalb_Chr08g0245581*, *Lalb_Chr07g0189361*). Dans la condition TIP, les processus biologiques les plus représentés sont majoritairement impliqués dans la réponse de la plante à divers stress (Figure 3.6B). Ce résultat est appuyé par la présence d'un nombre important de gènes de la famille des récepteurs-like kinases *LaCRKs-like* (*Lalb_Chr21g0307921*, *Lalb_Chr21g0307891*, *Lalb_Chr21g0307901*, *Lalb_Chr06g0165361*, *Lalb_Chr21g0307881*), mais également de gènes codant pour les transporteurs *LaMATE-like* (*Lalb_Chr25g0283091*, *Lalb_Chr05g0223261*, *Lalb_Chr21g0308651*, *Lalb_Chr14g0372101*, *Lalb_Chr24g0397991*). Cette analyse, effectuée sur les gènes régulés négativement dans la condition LR et la condition TIP, a révélé un enrichissement de gènes correspondant à des processus de déphosphorylation (Figure 3.6A), caractérisés par la présence d'homologues à *AtPS2* (*Lalb_Chr22g0351731*) ou encore *AtPAPs* (*Lalb_Chr09g0335191*, *Lalb_Chr01g0018231*, *Lalb_Chr20g0117951*).

Suite à l'analyse de l'enrichissement des termes ontologiques, on observe que de nombreux processus biologiques sont communs entre la condition LR et la condition TIP. Le processus biologique le plus représenté dans ces deux conditions est la division cellulaire, avec la présence de gènes codant pour *LaCYCB1-like* (*Lalb_Chr20g0108171*, *Lalb_Chr14g0365621*,

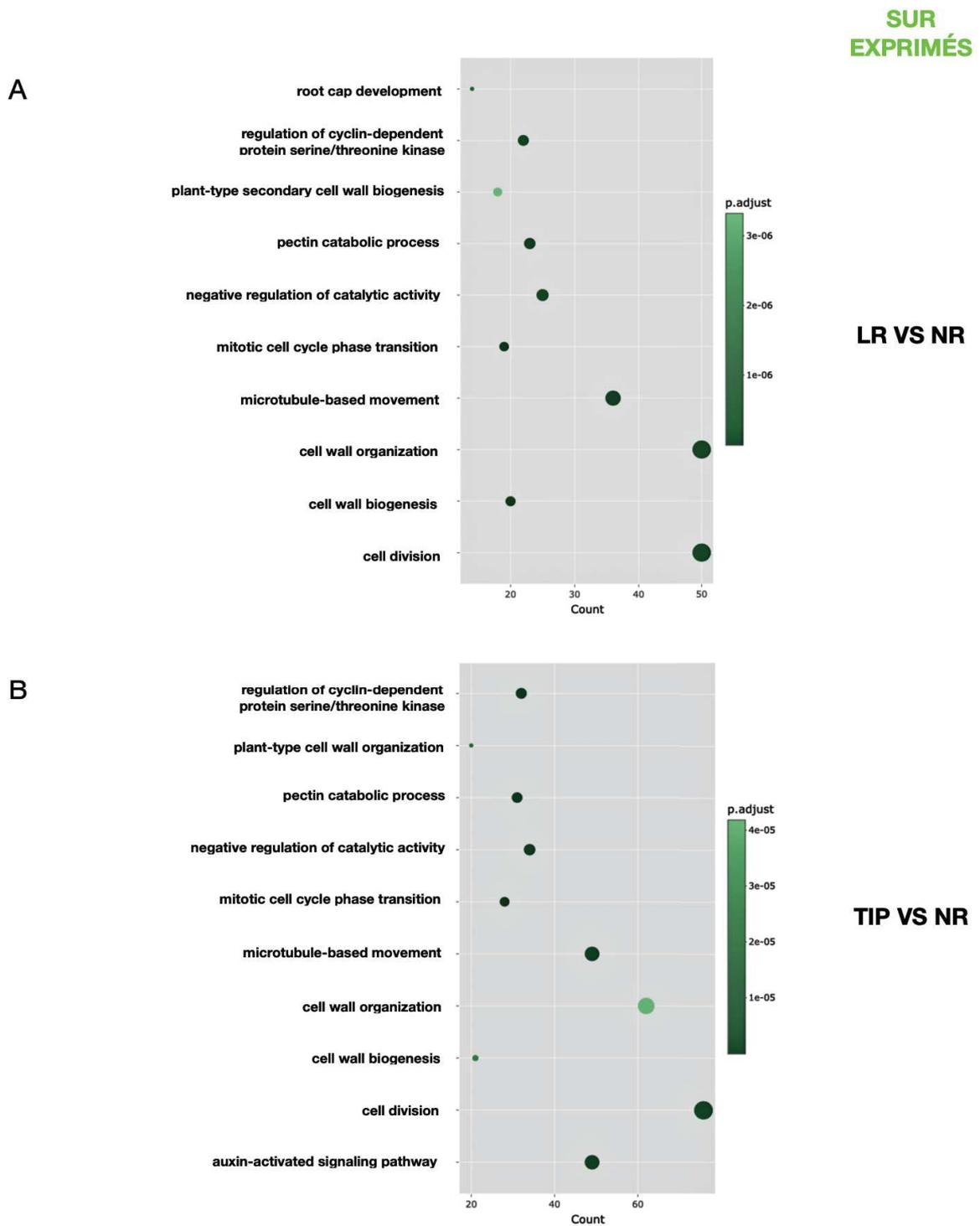


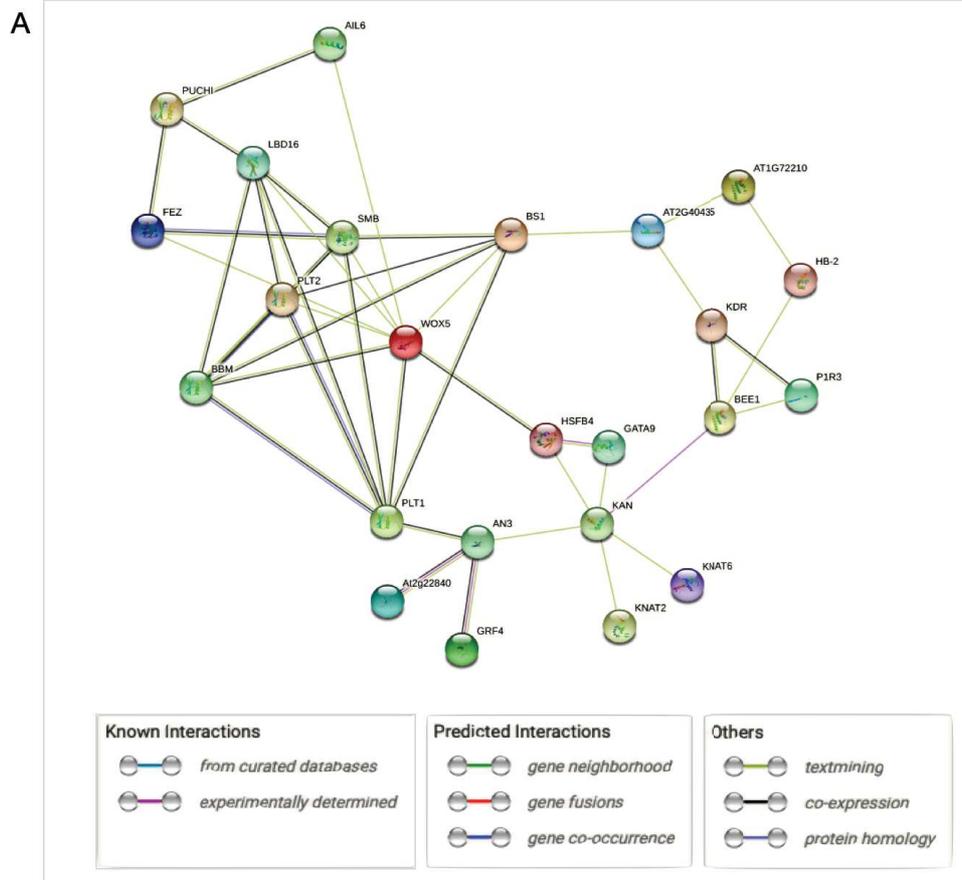
Figure 3.7 : Diagramme à points représentant les différents processus biologiques enrichis parmi les gènes différentiellement exprimés et positivement régulés dans la condition LR vs NR et la condition TIP vs NR. L'analyse d'ontologie génique a été effectuée à l'aide de l'outil DIANE (Cassan et al., 2021) dans la condition (A) LR vs NR et (B) TIP vs NR. Les points suivent un code couleur défini en fonction de leur p-value ajustée, et sont placés sur l'abscisse en fonction du nombre de gènes correspondant à ce processus biologique.

Lalb_Chr10g0106101), *LaARF10-like* et *LaARF16-like* (*Lalb_Chr06g0162381*), ou encore *LaWOX4-like* (*Lalb_Chr11g0062671*) (Figure 3.7). Des gènes impliqués dans le processus d'organisation de la paroi cellulaire sont aussi largement représentés dans les conditions LR et TIP, notamment avec des fonctions contribuant à la mise en place des parois cellulaires, comme la cellulose synthase *LaCSLA2-like* (*Lalb_Chr01g0004721*, *Lalb_Chr19g0136761*), ainsi que de nombreux xycoglycan endotransglucosylase *LaXTH-like* (*Lalb_Chr24g0393581*, *Lalb_Chr03g0028941*, *Lalb_Chr14g0375571*, *Lalb_Chr08g0230531*, *Lalb_Chr08g0230531* etc...) (Figure 3.7).

La présence de plusieurs processus biologiques communs entre les conditions LR et TIP, principalement chez les gènes positivement régulés, appuie les résultats précédemment obtenus, suggérant une forte similitude entre ces deux organes, autant anatomique que biologique.

2.2.3 Focus sur les facteurs de transcription

Les facteurs de transcription sont à l'origine de la modulation de l'expression des gènes (Latchman, 1997; Hobert, 2008). Plusieurs facteurs de transcription sont impliqués dans le maintien du méristème chez *A. thaliana*, et permettent ainsi à la racine de croître de manière indéterminée (Drisch and Stahl, 2015; Trinh et al., 2018). Il est donc probable que la croissance déterminée des rootlettes soit, elle aussi, modulée par un ou plusieurs facteurs de transcription. Pour aller plus loin dans cette hypothèse, je me suis focalisée sur les facteurs de transcription présents parmi les gènes différentiellement exprimés dans les conditions LR et TIP avec un Log FC > 4. En effet, suite à l'abondance de gènes présents dans la précédente analyse en Log FC > 2, l'augmentation du Log FC permet une sélection plus drastique des facteurs de transcription. Parmi les 63 gènes régulés négativement dans la condition LR, 9 facteurs de transcription sont présents. Pour la condition TIP, on retrouve 112 facteurs de transcription parmi les 869 gènes négativement régulés. L'ensemble des facteurs de transcription négativement régulés dans les conditions LR et TIP sont réunis sous la forme d'un tableau (Table 6 – Annexe). Il est intéressant de noter que les 9 facteurs de transcription présents dans la condition LR sont aussi présents dans la condition TIP. Parmi eux, on retrouve plusieurs homologues de gènes impliqués dans des réponses à divers stress chez la plante modèle *A. thaliana* comme *LaFIT1-like* (*Lalb_Chr14g0374401*), *LaWRKY47-like*



B

#	White lupin gène ID	<i>A. thaliana</i> homologue gène ID	Symbole	LR	NR	TIP
1	Lalb_Ch18g0052701	AT3G11260.1	WOX5	39	0	248
2	Lalb_Ch16g0385821	AT1G26870.1	FEZ	117	2	328
3	Lalb_Ch10g0177601	AT5G18560.1	PUCHI	22	0	271
4	Lalb_Ch13g0303321	AT1G74500.1	BS1	31	0	511
5	Lalb_Ch10g0168521	AT5G17430.1	BBM	594	18	1207
6	Lalb_Ch10g0142291	AT2G42430.1	LBD16	822	19	2440
7	Lalb_Ch10g0003331	AT3G20840.1	PLT1	45	2	140
8	Lalb_Ch10g0003341	AT1G51190.1	PLT2	95	3	427
9	Lalb_Ch10g0284001	AT1G79580.1	SMB	605	35	1836
10	Lalb_Ch10g0325961	AT5G10510.3	AIL6	355	17	1104
11	Lalb_Ch18g0044001	AT5G28640.1	AN3	23	0	109
12	Lalb_Ch10g0106161	AT1G46264.1	HSFB4	114	2	334
13	Lalb_Ch16g0382101	AT1G70510.1	KNAT2	11	0	77
14	Lalb_Ch11g0070471	AT1G23380.2	KNAT6	10	0	93
15	Lalb_Ch14g0368051	AT2G22840.1	/	1329	71	2922
16	Lalb_Ch17g0345921	AT5G16560.1	KAN	66	4	111
17	Lalb_Ch10g0013141	AT4G32890.1	GATA9	809	32	2399
18	Lalb_Ch10g0288591	AT3G52910.1	GRF4	976	40	1797
19	Lalb_Ch10g0098151	AT1G26945.1	KDR	483	18	1387
20	Lalb_Ch16g0379461	AT4G16780.1	HB-2	1837	102	3707
21	Lalb_Ch10g0270311	AT1G72210.1	/	126	0	505
22	Lalb_Ch17g0347051	AT2G40435.1	/	40	0	396
23	Lalb_Ch10g0222461	AT1G18400.1	BEE1	94	0	230
24	Lalb_Ch10g0158971	AT3G29370.1	P1R3	1414	64	2465

Figure 3.8 : Réseau de gènes d'*A. thaliana* homologues aux facteurs de transcription de lupin blanc positivement régulés dans la condition LR vs NR et la condition TIP vs NR. (A) Réseau de gènes généré à l'aide de l'outil en ligne STRING permettant de visualiser les associations prédictives entre les 24 facteurs de transcription mis en évidence lors de l'analyse transcriptomique comme étant positivement régulés à la fois dans la condition LR vs NR et la condition TIP vs NR. Ce réseau de gènes s'articule particulièrement autour de *AtWOX5*, gène ayant un rôle primordial dans le maintien du pool de cellules souches dans le méristème apical racinaire. B) Les expressions relatives des 24 facteurs de transcription dans les LR, NR et TIP issues du jeu de données transcriptomiques sont présentées.

(*Lalb_Chr18g0046381*) ou encore *LabZIP34-like* (*Lalb_Chr24g0400011*). De plus, on observe la présence d'un homologue du gène *AtOFP1* (*Lalb_Chr24g0400011*), impliqué dans la mise en place des parois secondaire chez *A. thaliana*. Enfin, il est également intéressant de mentionner la présence de *LaSHI-like* (*Lalb_Chr09g0322101*), impliqué dans la régulation négative de l'élongation cellulaire chez la plante modèle (Fridborg et al., 2001). En parallèle, 61 facteurs de transcription sont présents parmi les 353 gènes positivement régulés dans la condition LR. La condition TIP, elle, présente 146 facteurs de transcription parmi les 972 gènes positivement régulés. 55 facteurs de transcription sont communs aux deux conditions LR et TIP (Table 7 – Annexe). Afin d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes communs aux conditions LR et TIP, j'ai utilisé l'application STRING, une base de données permettant de visualiser des réseaux d'associations prédictives prenant en compte à la fois des interactions directes (physiques) et indirectes (fonctionnelles) (Szklarczyk et al., 2019). Il est important de mentionner que le réseau de gènes généré par STRING est produit à partir des bases de données disponibles sur l'espèce modèle *A. thaliana* et en conséquence, le réseau a été construit en utilisant les gènes d'*A. thaliana* homologues aux 55 facteurs de transcription de lupin blanc. Après élimination des facteurs de transcriptions redondants issus de la forte présence de duplications dans le génome du lupin, ainsi que des facteurs de transcription isolés ne présentant pas d'interactions avec les autres, un réseau de 24 facteurs de transcription a pu être généré (Figure 3.8). Ce réseau de gènes s'articule autour de *AtWOX5* (*LaWOX5.2 - Lalb_Chr18g0052701*), facteur de transcription majeur de l'auto-maintien du méristème chez *A. thaliana* (Forzani et al., 2014; Kong et al., 2015). Il me semble pertinent de mentionner que *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like* avaient fait l'objet de l'approche gène-candidat décrite dans le Chapitre 2, et les résultats obtenus lors de cette analyse transcriptomique me permettent de confirmer la cohérence de mes expériences. Un sous-réseau de facteurs de transcription centré sur *WOX5* regroupe les gènes connus chez *A. thaliana* pour leur implication dans les processus d'émergence des racines latérales et du maintien du MAR comme *AtPLT1*, *AtPLT2*, *AtLBD16*, *AtPUCHI*, *AtBBM*, *AtAIL6* et *AtFEZ* (Aida et al., 2004; Hirota et al., 2007; Willemsen et al., 2008; Goh et al., 2012). Ainsi, la présence d'un réseau de facteurs de transcriptions homologues à des gènes impliqués dans le maintien du méristème chez *A. thaliana* dans la condition LR et la condition TIP suggère que les longues rootlettes, tout comme les apex de racines protéoïdes, sont des organes en croissance, et confirme la présence d'un méristème actif. De plus, l'absence d'expression de ces gènes dans

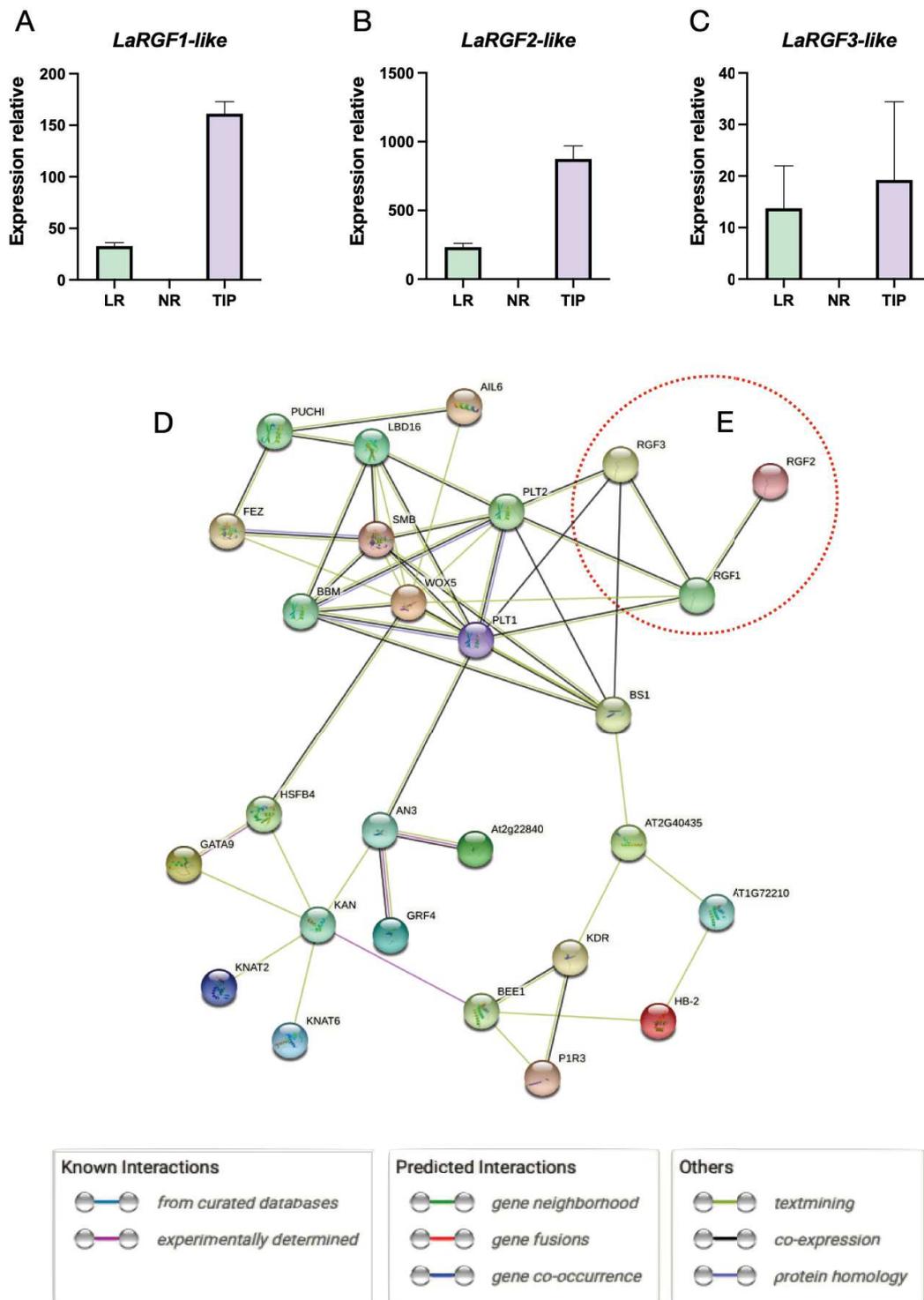


Figure 3.9 : Intégration des 3 gènes codant pour les peptides Root Meristem Growth Factor (RGFs) dans le réseau de gènes d'*A. thaliana* homologues aux facteurs de transcription de lupin blanc positivement régulés dans la condition LR vs NR et la condition TIP vs NR. Expressions relatives de (A) *LaRGF1-like*, (B) *LaRGF2-like*, (C) *LaRGF3-like* dans les conditions LR, NR et TIP issues du jeu de données transcriptomiques. (D) Réseau de gènes généré à l'aide de l'outil en ligne STRING permettant de visualiser des associations prédictives. (E) Le réseau de gènes des RGFs interagit avec plusieurs acteurs du maintien du méristème.

NR suggère que leur croissance déterminée est la conséquence de la perte du fonctionnement de ce réseau de facteurs de transcription responsable de l'auto-maintien du méristème.

2.2.4 *LaRGF2-like*, un gène candidat à la croissance déterminée des rootlettes ?

L'analyse globale du jeu de données transcriptomiques a permis l'identification du gène *LaRGF2-like* (*Lalb_Chr04g0255371*), codant pour un homologue du peptide *AtRGF2* (*Lalb_Chr04g0255371*). Ce gène est le plus fortement sur-exprimé, dans les longues rootlettes ainsi que les apex de racines protéoïdes en comparaisons aux rootlettes à croissance déterminée. Chez la plante modèle *A. thaliana*, les 11 peptides composant la famille des RGFs sont majoritairement exprimés dans la zone méristématique et dans la columelle, et participent de manière redondante au maintien du pool de cellules souches ainsi qu'à la prolifération des cellules indifférenciées en transit (Matsuzaki et al., 2010; Meng et al., 2012; Whitford et al., 2012). Par analogie, j'ai pu identifier deux autres RGFs parmi les gènes différentiellement exprimés : *LaRGF1-like* (*Lalb_Chr17g0341561*), et *LaRGF3-like* (*Lalb_Chr12g0203411*), également exprimés dans les conditions LR et TIP, mais pas dans la condition NR (Figure 3.9A-C). Ces trois gènes possèdent ainsi des profils d'expression analogues aux facteurs de transcriptions ayant servi à la génération du réseau de gènes STRING (Figure 3.8B). Dans le but de mettre en évidence une potentielle implication de ces peptides dans la maintenance du méristème, j'ai intégré les 3 peptides *AtRGFs* au réseau de gènes généré à partir des 24 facteurs de transcriptions d'*A. thaliana* homologues aux facteurs de transcription de lupin blanc positivement régulés dans la condition LR et la condition TIP (Figure 3.9D). De manière notoire, ces 3 gènes, et notamment *AtRGF2*, sont situés en amont du réseau (Figure 3.9E), et la modulation de l'expression des RGFs pourrait alors avoir un impact direct sur l'expression du reste du réseau de gènes contrôlant la maintenance du méristème. Ainsi, *LaRGF2-like* (*Lalb_Chr04g0255371*) constituerait un gène candidat potentiel pertinent ayant un rôle majeur dans la croissance déterminée des rootlettes, et la dérégulation de son expression mènerait ainsi à la perte du réseau de gènes impliqués dans le maintien du méristème, et à l'arrêt de la croissance des rootlettes.

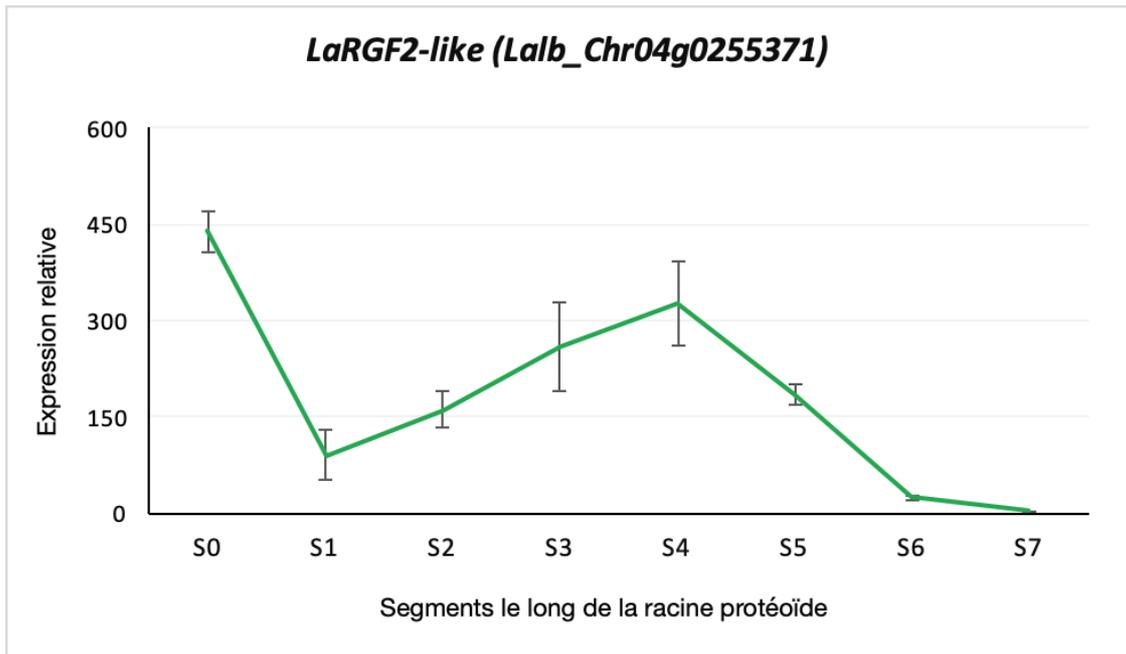


Figure 3.10 : Profil d'expression de *LaRGF2-like*. Expression relative de *LaRGF2-like* le long de la racine protéoïde. Le profil d'expression a été réalisé à partir de données transcriptomiques générées dans l'équipe et publiées dans Hufnagel et al., 2020. Ces données sont disponibles en ligne sur www.whitelupin.fr. Ces données transcriptomiques ont été générées à partir de 10 racines protéoïdes segmentées en 8 morceaux à partir de l'apex de la racine protéoïde (S0). 4 réplicats biologiques ont été effectués.

2.3 Approche gène-candidat avec *LaRGF2-like*

2.3.1 La surexpression de *LaRGF2-like*

De la même manière que *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like* dans le chapitre 2, la surexpression de *LaRGF2-like* a été effectuée en système hairy root, sous le contrôle d'un promoteur 35S dans des racines de lupin blanc. Cette expérience a pour but de mettre en évidence la potentielle implication de *LaRGF2-like* dans la croissance déterminée des rootlettes. Les rootlettes ayant arrêté leur croissance n'expriment plus *LaRGF2-like* (Figure 3.10), et l'hypothèse en découlant est que la surexpression de ce gène pourrait permettre de maintenir l'activité du méristème via l'action de *LaRGF2-like* sur le réseau de gènes impliqués dans le maintien du méristème. Les racines sur-exprimant *LaRGF2-like* sont comparées aux racines contrôles sur-exprimant le gène de la β -glucuronidase (GUS). Lors de ce chapitre, les racines sur-exprimant *LaRGF2-like* seront annotées 35S::RGF2, et les racines contrôles sur-exprimant *GUS* seront appelées 35S::GUS.

Dans un premier temps, la surexpression de *LaRGF2-like* a été vérifiée par RTqPCR (Figure 3.11A-B) sur 4 racines protéoïdes-like issues de racines transformées 35S::RGF2 (Figure 3.12C), représentant ainsi 4 évènements de transformation distincts. Il est intéressant de noter que l'expression de *LaRGF2-like* est racine-dépendante (Figure 3.11A), néanmoins l'expression relative moyenne des 4 racines est 8×10^4 fois plus importante chez les racines 35S::RGF2 que chez les racines contrôles 35S::GUS (Figure 3.11B). Le potentiel impact de la surexpression de *LaRGF2* sur plusieurs gènes impliqués dans le maintien du méristème *LaRGF1-like* (*Lalb_Chr17g0341561*), *LaRGF3-like* (*Lalb_Chr12g0203411*), *LaPLT2-like* (*Lalb_Chr01g0003331*), *LaLBD16-like* (*Lalb_Chr06g0162491*), *LaSMB-like* (*Lalb_Chr25g0284001*) et *LaBBM1-like* (*Lalb_Chr06g0168521*) a été évalué par RTqPCR (Figure 3.11C). Cependant, la grande variabilité d'expression racine-dépendante ne nous permet pas de conclure sur des potentielles dérégulations.

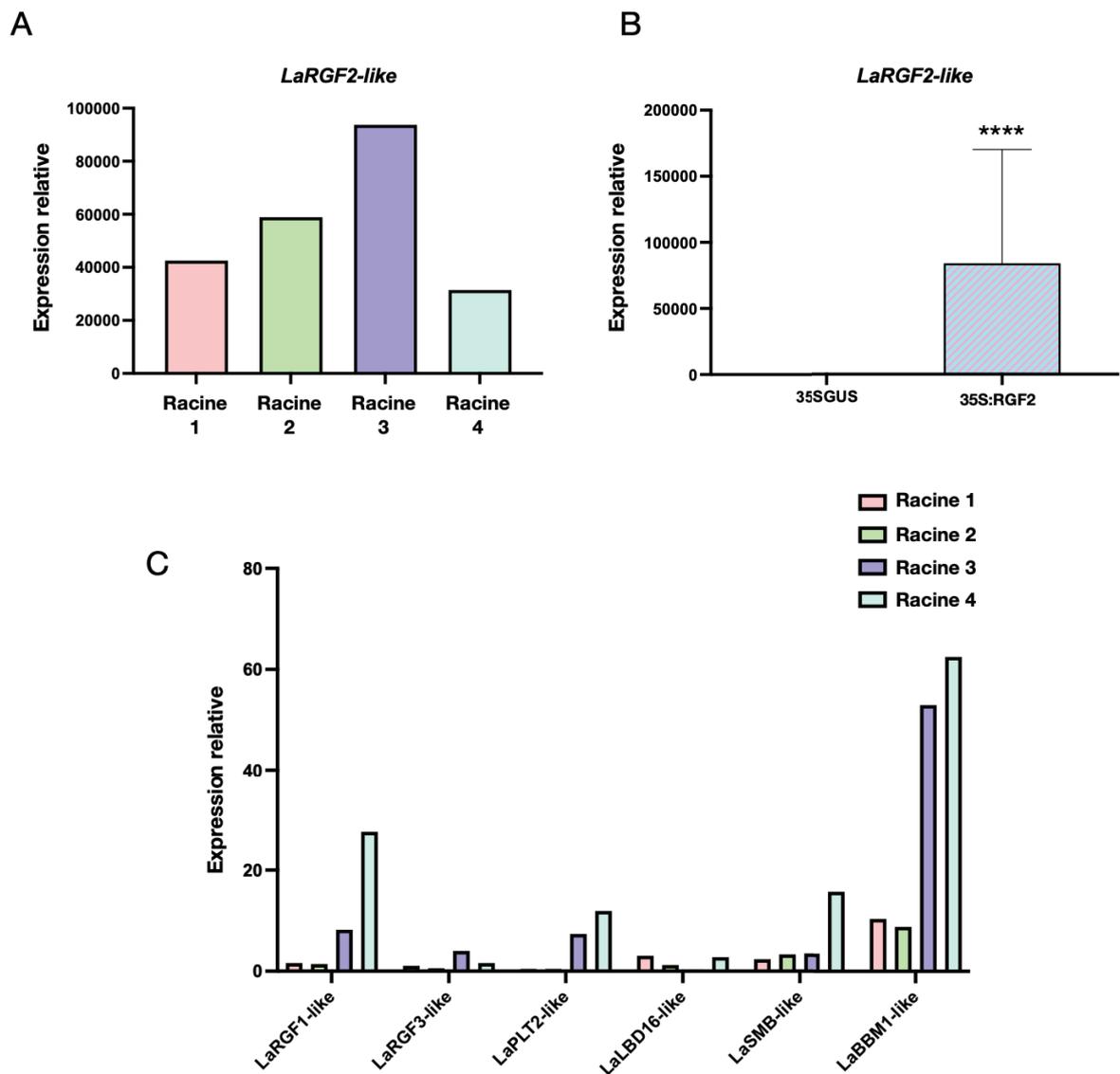


Figure 3.11 : Impact de la sur-expression du gène *LaRGF2-like* sur l'expression de différents gènes impliqués dans le maintien du méristème. La sur-expression de *LaRGF2-like* (*Lalb_Chr04g0255371*) effectuée par transformation hairy root a été confirmée par RTqPCR dans (A) 4 racines transformées représentant 4 événements de transformation distincts. Les variations d'expression racine-dépendant sont importants. (B) La moyenne de l'expression de *LaRGF2-like* confirme la surexpression de ce gène dans les plantes 35S::RGF2. L'impact de la surexpression de *LaRGF2-like* sur d'autres acteurs du réseau de gènes impliqués dans le maintien du méristème a été évaluée en suivant l'expression de (C) *LaRGF1-like* (*Lalb_Chr17g0341561*), *LaRGF3-like* (*Lalb_Chr12g0203411*), *LaPLT2-like* (*Lalb_Chr01g0003331*), *LaLBD16-like* (*Lalb_Chr06g0162491*), *LaSMB-like* (*Lalb_Chr25g0284001*) et *LaBBM1-like* (*Lalb_Chr06g0168521*) dans 4 racines transformées représentant 4 événements de transformation distincts. La grande variation racine-dépendant ne permet pas de conclure. L'expression est relative au gène de référence *LaNORM1* (*Lalb_Chr07g0195211*) et à la condition contrôle 35S::GUS. Les valeurs sont les moyennes +/- écart-type de 4 réplicats biologiques.

2.3.2 Le phénotype racinaire induit par la sur-expression de *LaRGF2-like*

Afin de caractériser phénotypiquement l'impact de la sur-expression de *LaRGF2-like*, les racines protéoïdes-like présentes 35S::RGF2 et 35S::GUS ont été échantillonnées après confirmation de leur transformation par visualisation du marqueur de transformation fluorescent, puis scannées (Figure 3.12A, B). Les racines protéoïdes-like issues de la construction 35S::RGF2 présentent des rootlettes de taille variable mais les phénotypes se démarquent globalement assez nettement de la condition contrôle, ce qui est assez remarquable pour une expérimentation de ce type (Figure 3.12D). Un certain nombre de rootlettes 35S::RGF2 sont plus longues que chez les racines contrôles (Figure 3.12C), mais la variabilité de cette propriété la rend difficilement quantifiable. On observe de manière notoire une discontinuité dans l'apparition des rootlettes chez les racines sur-exprimant *LaRGF2-like* (Figure 3.11D), alors que les rootlettes se développent usuellement de manière successive comme on peut l'observer chez les racines contrôle (Figure 3.11C), à l'instar des racines sauvages. Il est également intéressant de noter que la surexpression de *LaRGF2-like* semble affecter l'épaisseur des rootlettes, et que certains apex de rootlettes sont recourbés.

2.3.3 Analyse microscopique de l'apex des rootlettes-like de 35S::RGF2

Afin d'aller plus loin dans l'analyse du phénotype racinaire des racines 35S::RGF2, des analyses microscopiques au confocal ont été conduites. Les structures cellulaires des apex de rootlettes à différents stades de développement de 35S::RGF2 ont été comparées à celles des racines contrôle 35S::GUS (Figure 3.13). Dans la condition 35S::RGF2, on observe un défaut d'organisation des cellules, notamment dans les TIP et les rootlettes pré-émergentes (Figure 3.13E, F) en comparaison avec celles des racines 35S::GUS (Figure 3.13A, B). Cette absence d'organisation cellulaire se traduit par un enrichissement surnuméraire des lignées cellulaires entraînant l'élargissement du méristème, une perte de la symétrie des organes ainsi qu'un nombre réduit de cellules dans la columelle des apex de racines protéoïdes-like. Il est intéressant de noter que cette propriété confère aux rootlettes issues des plantes 35S::RGF2 (Figure 3.13G) une structure similaire aux apex de racine protéoïdes-like 35S::GUS (Figure 3.13A) suggérant la présence d'une zone méristématique, qui s'éloigne d'une structure de rootlette en croissance issue des racines contrôles (Figure 3.13C). Lors de cette analyse, aucune rootlette présentant un phénotype de croissance déterminée (Figure 3.13D) n'a pu

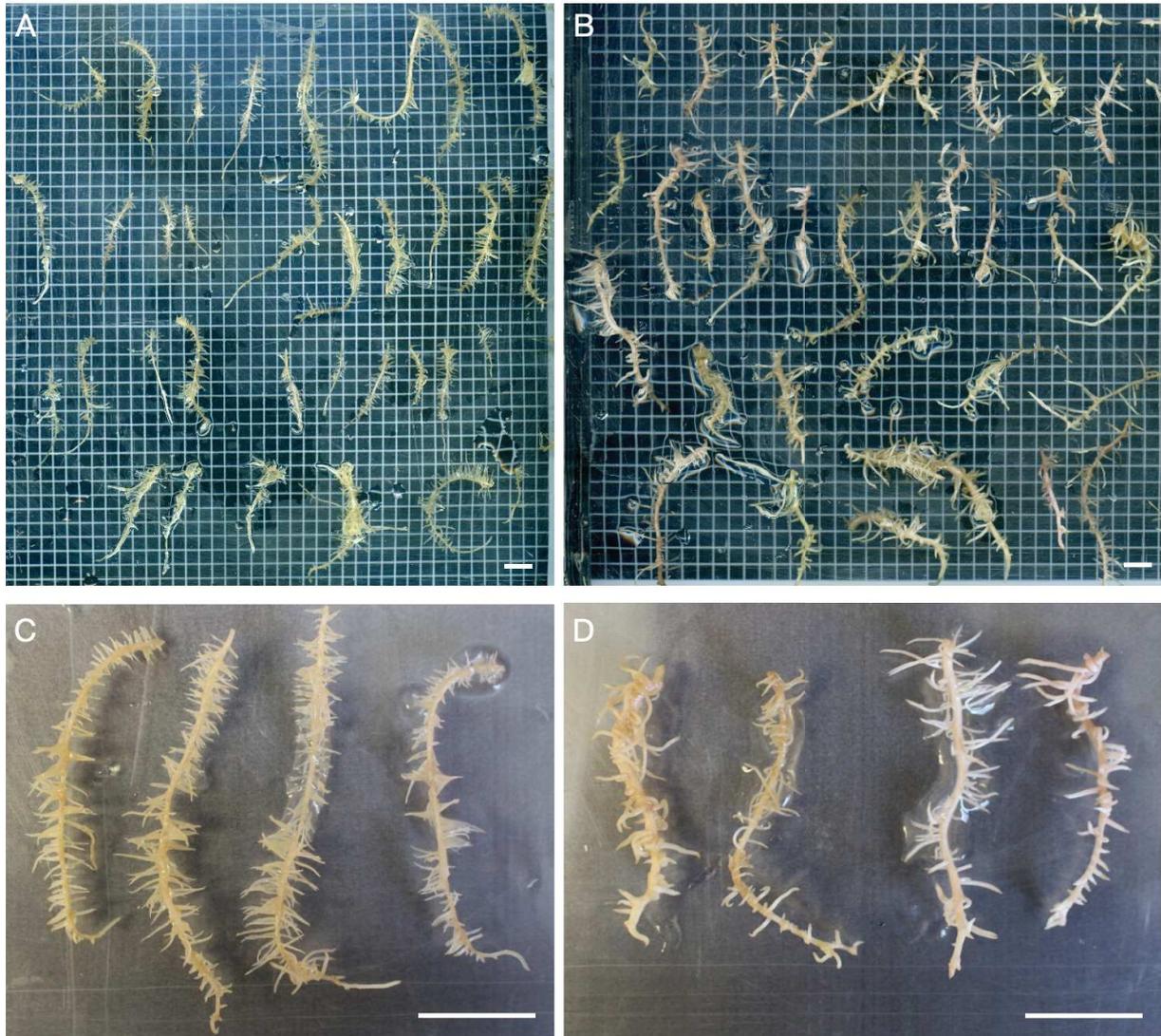


Figure 3.12 : Phénotypes racinaires résultant de la sur-expression du gène *LaRGF2-like* dans des racines « hairy-root ». Les racines protéoïdes-like issues des transformations (A) 35S::GUS et (B) 35S::RGF2-like ont été échantillonnées et scannées. 4 racines types de (C) 35S::GUS et (D) 35S::RGF2-like ont été sélectionnées pour des analyses tissulaires et des analyses d'expression par qPCR. Echelle : (A-D) 1cm.

être observée chez les racines sur-exprimant *LaRGF2-like*. Parallèlement, une analyse à la loupe binoculaire des rootlettes de 14 racines protéoïdes-like sur-exprimant *LaRGF2-like* a démontré qu'aucune d'entre elles ne possédaient de poils absorbants recouvrant l'apex, suggérant ainsi qu'aucune rootlette n'était différenciée, ce qui est particulièrement remarquable. Ainsi, ces résultats confirment l'hypothèse que la surexpression de *LaRGF2-like* permet de conserver l'activité du méristème et donc de maintenir les rootlettes dans un stade indifférencié malgré les défauts d'organisation cellulaire visualisés.

3. Discussion

Il est acquis que, outre leurs capacités fonctionnelles étonnantes, les rootlettes de lupin blanc se caractérisent par une croissance déterminée (Watt and Evans, 1999; Neumann et al., 2000). Mes travaux montrent pour la première fois l'existence de rootlettes longues, spatialement juxtaposées à des rootlettes normales ayant arrêté leur croissance. En s'appuyant sur les caractéristiques anatomiques et moléculaires des rootlettes longues, ce chapitre 3 a permis d'accroître nos connaissances sur les mécanismes moléculaires menant à la croissance déterminée des rootlettes en mettant en lumière l'implication du gène *LaRGF2-like*.

3.1 Les rootlettes longues ne sont pas dédiées à la nutrition, contrairement aux rootlettes à croissance déterminée

Les rootlettes de racines protéoïdes, développées en réponse à une carence en Pi, sont connues pour leur capacité à exsuder des acides organiques, des protons et des phosphatases afin d'améliorer la biodisponibilité du Pi et de faciliter son absorption (Dinkelaker et al., 1989; Neumann et al., 2000; Massonneau et al., 2001; Tomasi et al., 2009; Müller et al., 2015a). Le chapitre 1 de cette thèse a mis en évidence une transition progressive mais rapide de la croissance des rootlettes vers une phase entièrement dédiée à la nutrition, marquée par l'arrêt de leur croissance. À la différence des rootlettes à croissance déterminée, les analyses transcriptomiques conduites suggèrent que les rootlettes longues ne sont pas fonctionnellement spécialisées dans la nutrition comme les rootlettes courtes. En effet, chez les longues rootlettes comparées aux rootlettes à croissance déterminée, on observe une

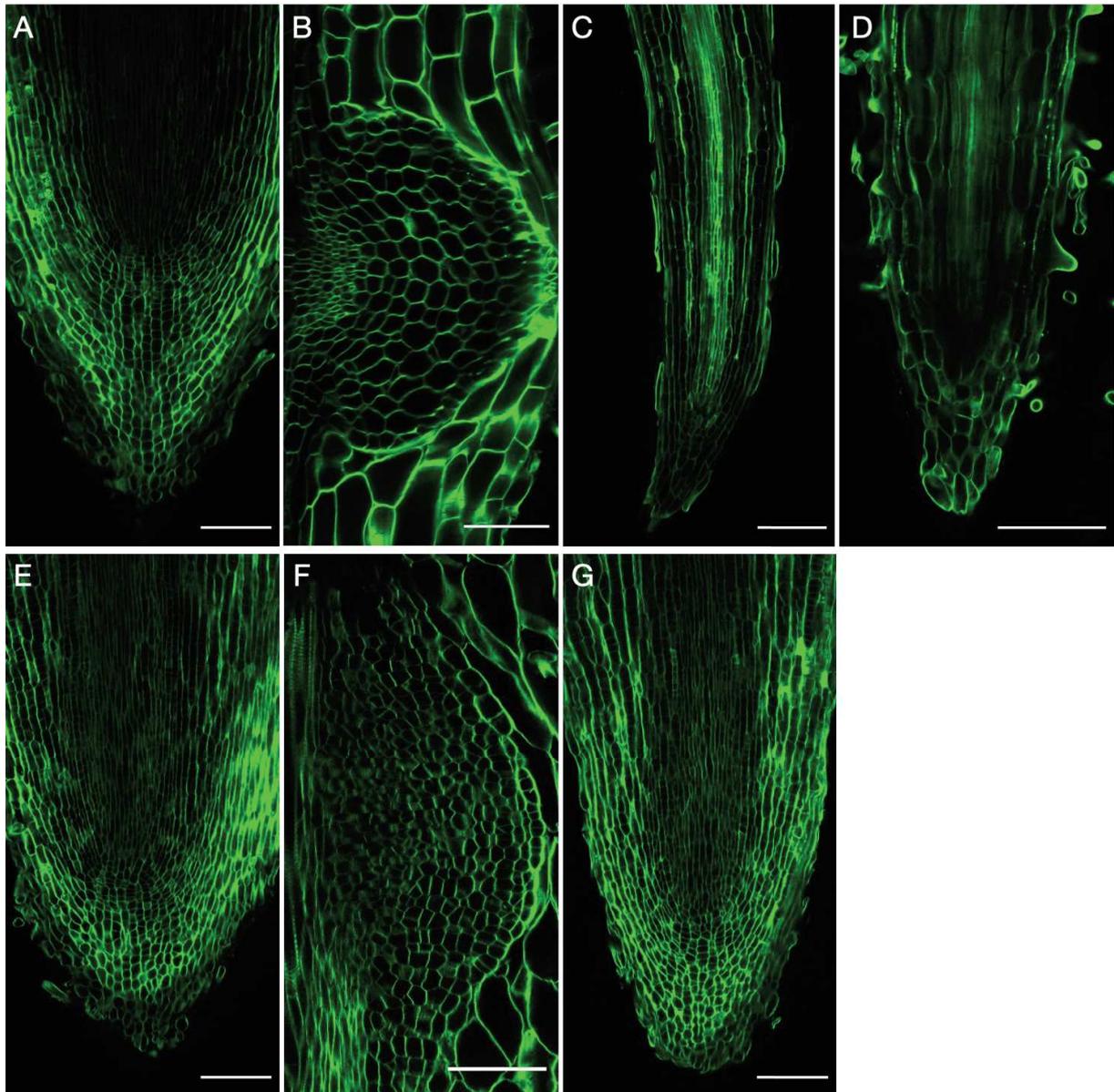


Figure 3.13 : Etude tissulaire de l'apex de racines sur-exprimant le gène *LaRGF2-like* et de racines contrôles 35S::GUS. Des coupes longitudinales de 100 μm ont été colorées au calcofluor afin de suivre l'évolution anatomique des rootlettes issues de racines de lupin blanc transformées avec les constructions 35S::GUS (A-D) et 35S::LaRGF2-like (E-G). Pour la construction 35S::GUS sont représentés (A) l'apex de la racine protéoïde-like transformée, (B) le stade I pré-émergent des rootlettes, (C) le stade III en croissance des rootlettes et (D) le stade IV arrêt de croissance des rootlettes. Pour la construction 35S::LaRGF2-like sont représentés (E) l'apex de la racine protéoïde-like transformée, (F) le stade pré-émergent, (G) les rootlettes développées. Echelle : (A-G) 100 μm .

régulation négative de nombreux gènes impliqués dans la réponse à la carence en phosphate comme (i) l'ubiquitine ligase E3 *LaPUB35-like* induite lors d'une déficience en Pi (Jost et al., 2015), (ii) le transporteur à haute affinité *LaPHT1;5-like* (*Lalb_Chr10g0094631*) impliqué dans la remobilisation du Pi (Nagarajan et al., 2011), (iii) la phosphatase acide sécrétée *LaPAP10-like* (*Lalb_Chr20g0117951*, *Lalb_Chr20g0117941*, *Lalb_Chr20g0117931*, *Lalb_Chr20g0117961*) impliquée dans la solubilisation du Pi à partir d'organo-phosphates (Wang et al., 2011) et (iv) la multicopper oxidase *LaLPR2-like* (*Lalb_Chr02g0145381*), paralogue du gène *AtLPR1* impliqué dans l'arrêt de la croissance de la racine primaire en réponse à une carence en Pi (Svistoonoff et al., 2007; Ticconi et al., 2009). Bien que les rootlettes à croissance déterminée soient spécialisées dans l'absorption de Pi, ces processus sont également accompagnés par l'activation de transporteurs membranaires de divers autres nutriments (Chapitre 1, Table 1 de Le Thanh et al., 2021). En effet, plusieurs gènes impliqués dans la réponse à la carence en fer sont aussi régulés négativement dans les rootlettes longues comparées aux rootlettes à croissance déterminées comme (i) la réductase ferrique *LaFRO1-like* (*Lalb_Chr17g0339341*, *Lalb_Chr17g0339251*, *Lalb_Chr17g033932*) impliquée dans l'acquisition du fer chez le pois (Waters et al., 2002), (ii) le facteur de transcription *LaFIT-like* impliqué dans la régulation des gènes de réponses à la carence en fer (Bauer et al., 2007) ou encore (iii) le transporteur vacuolaire *LaVIT-like* (*Lalb_Chr08g0245581*, *Lalb_Chr07g0189361*) impliqué dans le stockage de fer (Cao, 2019). Également parmi les gènes régulés négativement dans les longues rootlettes, on observe une diversité de gènes impliqués dans différents processus de réponses à des stress biotiques et abiotiques comme (i) le transporteur ABC *LaABCG34-like* (*Lalb_Chr02g0151441*) impliquée dans la défense des plantes aux pathogènes nécrotiques (Khare et al., 2017), (ii) le gène *LaLSU2-like* (*Lalb_Chr10g0102971*) dont l'expression est induite en réponse à une carence en soufre (Sirko et al., 2015) et (iii) l'ATPase *LaAHA5-like* impliquée dans la tolérance à la sécheresse (Lu et al., 2021). Ainsi, ces analyses confirment les observations du chapitre 1 stipulant que les rootlettes à croissance déterminées sont des organes entièrement dédiés à la nutrition, et pas seulement phosphatée. Mais surtout, ces résultats nous indiquent que les longues rootlettes ne sont pas dédiées à la nutrition et donc qu'elles diffèrent profondément des rootlettes à croissance déterminée.

3.2 Les rootlettes longues possèdent toujours une activité méristématique

Le chapitre 1 de cette thèse a montré la perte de la zone méristématique chez les rootlettes, entraînant leur arrêt de croissance (Le Thanh et al., 2021). En opposition, les rootlettes longues se caractérisent par la présence de nombreuses petites cellules ainsi que d'une coiffe latérale et d'une columelle, éléments caractéristiques de la présence d'une zone méristématique. La similarité structurelle entre les rootlettes longues et les apex de racines protéoïdes suggèrent chez les longues rootlettes le maintien d'une activité méristématique. Les résultats obtenus lors des analyses anatomiques ont été renforcées par un enrichissement, dans ces deux organes en comparaison avec les rootlettes à croissance déterminée, de gènes positivement régulés impliqués dans des processus de division cellulaire comme *LaCYCB1-like* (*Lalb_Chr20g0108171*, *Lalb_Chr14g0365621*, *Lalb_Chr10g0106101*), protéine contrôlant la transition de la phase G2 à M lors de la division cellulaire (Beeckman et al., 2001) ou encore *LaARF10-like* et *LaARF16-like* (*Lalb_Chr06g0162381*) impliqués chez *A. thaliana* dans la restriction de *AtWOX5* dans le centre quiescent (Ding and Friml, 2010). Le réseau de gènes d'*A. thaliana* homologues aux facteurs de transcription de lupin blanc positivement régulés chez les longues rootlettes et les apex de racines protéoïdes comparés aux rootlettes à croissance déterminée a révélé la présence de plusieurs gènes impliqués dans le maintien du méristème comme *AtWOX5*, *AtPLT1* et *AtPLT2* (Aida et al., 2004; Drisch and Stahl, 2015; Kong et al., 2015), mais aussi de gènes impliqués dans des processus d'initiation des racines latérales comme *AtLBD16*, *AtPUCHI*, *AtBBM*, *AtAIL6* et *AtFEZ* (Aida et al., 2004; Hirota et al., 2007; Willemsen et al., 2008; Goh et al., 2012). Également, on retrouve dans ce réseau de gènes la présence d'homologues de gènes connus pour leur implication dans le maintien du méristème apical caulinaire et prolifération cellulaire des organes aériens chez *A. thaliana* comme *AtKNAT2*, *AtKNAT6*, *AtGRF4*, et *AtAN3* (Horiguchi et al., 2005; Belles-Boix et al., 2006; Kim and Lee, 2006; Truernit et al., 2006). Ces résultats, appuyés par des analyses anatomiques, confirment la présence d'une activité méristématique chez les rootlettes longues.

3.3 *LaRGF2-like* est impliqué dans le maintien d'une activité méristématique

La famille des peptides ROOT MERISTEM GROWTH FACTOR (RGF), aussi référencés sous le nom de GOLVEN (GLV) ou CLEL (CLE-like), sont connus pour leurs divers rôles dans le développement des plantes, dont le maintien du méristème (Matsuzaki et al., 2010; Whitford et al., 2012; Fernandez et al., 2013a; Fernandez et al., 2013b). Le gène *LaRGF2-like* a été mis en évidence lors de notre analyse transcriptomique comme étant le gène le plus positivement exprimé dans les longues rootlettes et dans l'apex de la racine protéoïde comparés aux rootlettes à croissance déterminée. Qui plus est, sa position dans le réseau de gènes, en amont des facteurs de transcription impliqués dans le maintien du méristème, suggère un potentiel rôle régulateur de *LaRGF2-like* sur le réseau. Chez *A. thaliana*, la mutation seule de *rgf2* n'entraîne pas de phénotype, néanmoins le triple mutant *rgf1 rgf2 rgf3* présente un phénotype de racine courte, avec un nombre réduit de cellules méristématiques (Matsuzaki et al., 2010), suggérant d'un côté la redondance de ces peptides, mais aussi leur implication dans le maintien d'une activité méristématique. Dans un premier temps, chez le lupin blanc, la surexpression de *LaRGF2-like* dans des racines « hairy-root » a mis en évidence le maintien d'une zone méristématique dans les rootlettes normalement déterminées. L'absence de poils absorbants autour de l'apex des rootlettes-like atteste de l'absence de la différenciation totale des rootlettes et suggère que l'expression de *LaRGF2-like* joue un rôle primordial dans le maintien d'une activité méristématique chez les rootlettes de lupin blanc. Il est intéressant de noter que la surexpression de *AtRGF1* entraîne chez *A. thaliana* l'élargissement du méristème (Matsuzaki et al., 2010). Des résultats similaires ont pu être observés chez les racines sur-exprimant *LaRGF2-like*. En effet, un plus grand nombre de lignées cellulaires est observable, et l'organisation cellulaire est nettement perturbée, suggérant que la surexpression de *LaRGF2-like* entraîne une prolifération excessive des cellules. On peut par ailleurs observer un nombre surnuméraire de cellules très précocement, lors de la formation du primordia. Ce résultat est cohérent avec la détection de l'activité transcriptionnelle de *AtRGF2/AtGLV5* dès le stade II du développement des primordium chez *A. thaliana* (Fernandez et al., 2013a). Il semblerait ainsi que *LaRGF2-like* soit impliqué dans le maintien d'une activité méristématique et régule positivement la division cellulaire, dès le début de la formation des primordia.

3.4 Comment *LaRGF2-like* maintient l'activité méristématique ?

Le gradient d'auxine, établi et maintenu par les transporteurs d'efflux d'auxine PIN-FORMED (PIN) contrôle la position de la niche de cellules souches chez *A. thaliana*, et influe également sur la division et l'élongation cellulaire, ainsi que le gravitropisme (Müller et al., 1998; Blilou et al., 2005). Il est intéressant de noter que certains peptides de la famille des RGFs/GLVs/CLEs sont impliqués dans le gravitropisme des racines (Fernandez et al., 2013b). Chez *A. thaliana*, les peptides *AtRGF6/AtGLV1* et *AtRGF4/AtGLV3* induisent une augmentation rapide du niveau d'expression de *AtPIN2* dans la membrane plasmique des cellules de l'épiderme dans le MAR, entraînant une perte de la répartition symétrique d'auxine nécessaire à une réponse gravitropique normale des racines (Whitford et al., 2012). Des résultats similaires ont été observés avec le peptide *AtRGF2/AtGLV5* (Fernandez et al., 2013a), suggérant que la courbure de l'apex de certaines rootlettes observée chez les plantes surexprimant *LaRGF2-like* n'est pas anodine. Il est intéressant de noter que le gradient d'auxine contrôle également le niveau d'expression de gènes indispensables au maintien du méristème, comme les gènes *AtPLTs* (Aida et al., 2004). Les PLTs présentent également des gradients d'expression et agissent de manière dose-dépendante sur l'identité des cellules : un haut niveau d'expression des PLTs maintient l'identité des cellules souches, un niveau intermédiaire promeut la division cellulaire des cellules souches filles, et un niveau d'expression bas induit la différenciation des cellules dans la zone d'élongation (Galinha et al., 2007). Il a été décrit chez *A. thaliana* que les RGFs maintiennent la niche de cellules souches en définissant le patron d'expression de *AtPLT1* et *AtPLT2* (Matsuzaki et al., 2010; Shinohara et al., 2016). Il est intéressant de noter que l'accumulation des transcrits de *AtPLT2* est réduite à la niche de cellules souches, mais que la localisation de la protéine est plus étendue dans la zone basale de l'apex, suggérant une régulation également post-traductionnelle (Matsuzaki et al., 2010; Shinohara et al., 2016). Néanmoins, l'impact de la surexpression de *LaRGF2-like* sur *LaPLT2-like* n'a pas pu être mise en évidence à cause des variations d'expression racines-dépendantes observées en système hairy root.

3.5 La régulation de *LaRGF2-like*

Le maintien d'une zone caractéristique d'un méristème chez les rootlettes sur-exprimant *LaRGF2-like* suggère l'implication de ce gène dans la croissance déterminée des rootlettes. En effet, la chute de l'expression de ce gène entraînerait l'arrêt de leur croissance via la perte du maintien du méristème. Dans les données transcriptomiques spatiales (Hufnagel et al., 2020), l'expression de *LaRGF2-like* chute le long de la racine protéoïde, lorsque les rootlettes atteignent le stade S4. Le stade S4 est également marqué par le début de la phase fonctionnelle des rootlettes, là où de nombreux transporteurs comme *LaPHT1;5-like* commencent à être exprimés (Chapitre 1). Ces résultats indiquent qu'un acteur régule négativement l'expression de *LaRGF2-like*.

D'autre part, les RGFs sont post-traductionnellement modifiés par l'enzyme tyrosylproteine sulfotransférase AtTPST afin de permettre l'activation du peptide mature (Matsuzaki et al., 2010). Les modifications post-traductionnelles sont connus pour considérablement améliorer la bioactivité des peptides en augmentant leur affinité à se lier à leurs récepteurs (Matsubayashi, 2011). Une expérience impliquant l'apport exogène de *LaRGF2-like* sulfaté et non sulfaté pourrait ainsi permettre d'évaluer l'importance de la sulfatation sur la bio-activité de *LaRGF2-like*.

4. Matériel et méthodes

Le matériel végétal et les conditions de culture sont identiques à ceux décrits dans le chapitre 1 (Chapitre 1, 4.1 Matériel végétal et conditions de culture).

Les protocoles utilisés pour les analyses anatomiques des rootlettes longues sont identiques à ceux décrits dans le chapitre 1 (Chapitre 1, 2.1 Article publié dans « Frontiers in Plant Science », Le Thanh et al., 2021).

*Le protocole utilisé pour la sur-expression de *LaRGF2-like* en système hairy root est identique à celui décrit dans le chapitre 2, excepté la méthode d'analyse des racines transformées (Chapitre 2, 2.1 « La transformation Hairy-root » excepté la section 2.1.4).*

4.1 L'analyse du transcriptome « rootlettes longues »

4.1.1 Echantillonnage et la création de librairies ARN

L'échantillonnage a été effectué sur les racines protéoïdes de plantes cultivées durant 16 jours en condition de carence en Pi. 0.5 cm des apex de 15 à 20 rootlettes longues (LR), et 0.5 cm de 15 à 20 rootlettes à croissance déterminée (NR), juxtaposées aux LR, ont été récoltées. 0.5 cm de 10 à 12 apex de racine protéoïde (TIP) ont été également prélevés en tant que contrôle d'une racine en croissance indéterminée. La taille des échantillons prélevés (0.5 cm) est basée sur la taille moyenne d'une rootlette à croissance déterminée. 4 réplicats biologiques ont été effectués. Les ARN totaux de ces échantillons ont été extraits en utilisant le kit Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research), selon les recommandations du fabricant. 12 librairies ARN ont ainsi été générées et séquencées à la plateforme technologique GeT-PlaGe à Toulouse (INRAE). 12 librairies ARN ont ainsi été générées par séquençage à haut débit (NovaSeq, Illumina) à raison de 4 réplicats biologiques par type de racine, représentant environ 200 millions de couples de « reads » par condition. Les séquences brutes ont été nettoyées en utilisant Cutadapt (Martin, 2011), puis alignées sur le génome du lupin blanc en utilisant Hisat2 (Kim et al., 2019). Les données de niveaux d'expression des gènes ont été obtenues avec StringTie (Pertea et al., 2015).

4.1.2 L'analyse du transcriptome

L'application DIANE (<https://diane.bpmp.inrae.fr/>), développée par Océane Cassan, doctorante au sein du laboratoire BPMP (Cassan et al., 2021), a été utilisée pour l'analyse du jeu de données transcriptomiques. Une normalisation des données (méthode DESeq2) et une filtration du bruit de fond (low counts 200) a été effectuée afin de poursuivre l'analyse sur 28 108 gènes. Les gènes différentiellement exprimés ont été sélectionnés chez LR et TIP en utilisant NR en tant que condition de référence, en utilisant un $\text{Log}_2(\text{FoldChange}) > 2$ et une p-value de 0.001. La sélection des facteurs de transcription différentiellement exprimés chez LR et TIP en utilisant NR en tant que condition de référence, a été effectuée en utilisant un $\text{Log}_2(\text{FoldChange}) > 4$ et une Pvalue 0.001. Le réseau de gènes permettant de visualiser des associations prédictives entre les facteurs de transcriptions d'*A. thaliana* homologues aux gènes de lupin blanc positivement régulés dans la condition LR et la condition TIP par rapport à NR a été généré avec l'application STRING (Szklarczyk et al., 2019).

Discussion générale et perspectives

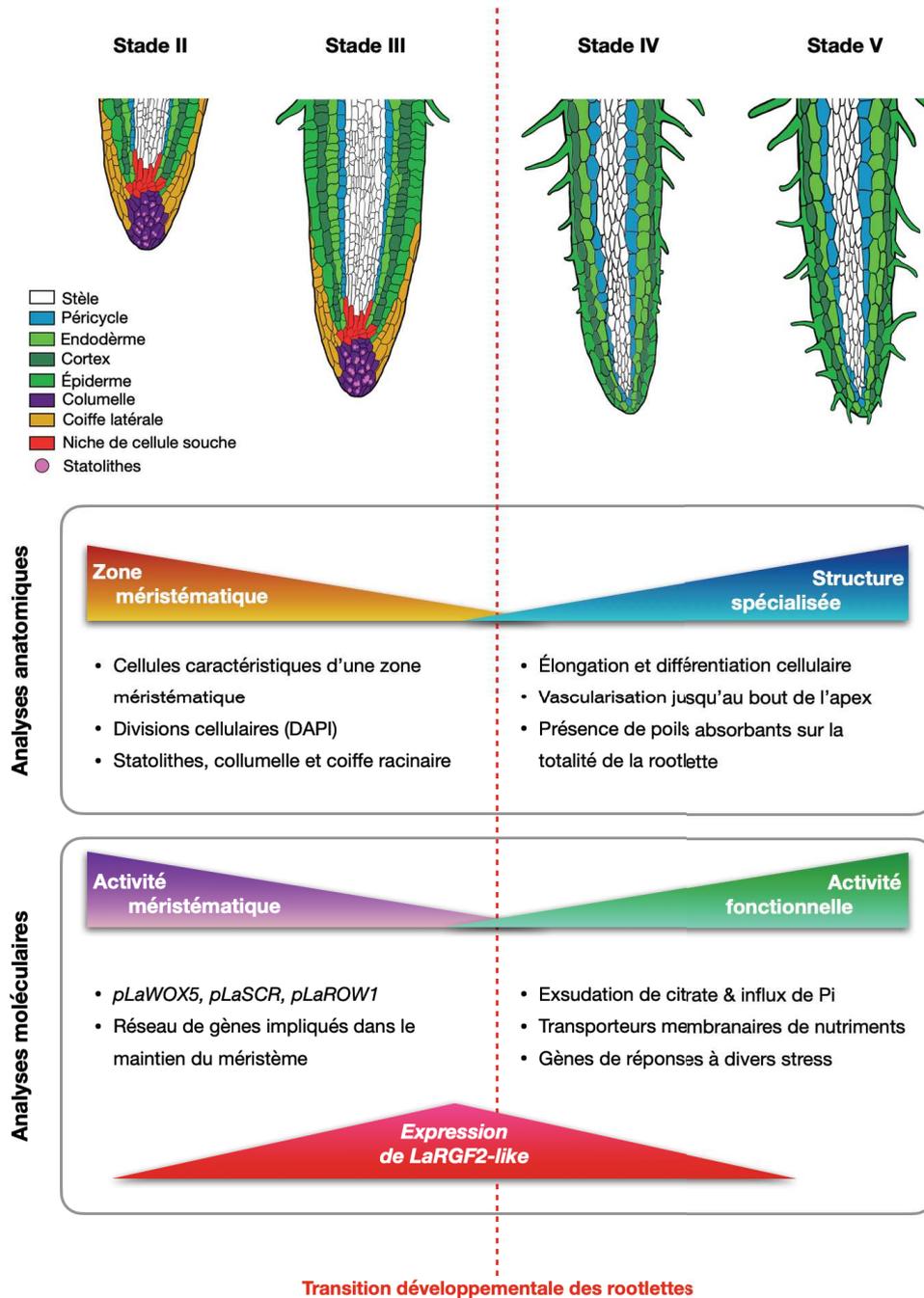


Figure d.1 : La transition développementale des rootlettes. Les rootlettes transitent d'une phase développementale de croissance vers une phase fonctionnelle uniquement dédiée à la nutrition. La phase de croissance est marquée par la présence d'une activité méristématique impliquant une structure type d'une zone méristématique ainsi que par l'expression d'un réseau de gènes connus pour leur implication dans l'auto-maintien du méristème. La phase fonctionnelle est marquée par une différenciation totale de la rootlette impliquant des modifications anatomiques importantes qui favorisent la nutrition de la plante. Ce changement structural est accompagné d'activités physiologiques ainsi que de l'expression de nombreux transporteurs de nutriments et gènes de réponse à divers stress. La chute de l'expression du gène *LaRGF2-like* est impliquée dans la transition développementale des rootlettes.

L'objectif principal de mes travaux de thèse était de mettre en évidence des acteurs moléculaires impliqués dans la croissance déterminée des rootlettes de racine protéoïde de lupin blanc. Mes travaux ont contribué à améliorer nos connaissances sur le développement des rootlettes, d'un point de vue anatomique et moléculaire, et ont permis de mettre en évidence le gène *LaRGF2-like* comme un acteur potentiel de la transition des rootlettes vers une croissance déterminée.

1. La transition développementale des rootlettes

Dans la littérature, la première et unique description anatomique d'une rootlette date des années 2000, où Watt et Evans ont comparé la structure d'un apex de racine protéoïde à une rootlette à croissance déterminée chez le lupin blanc (Watt and Evans, 1999). Dans cette étude très succincte de la structure anatomique d'une rootlette, une différenciation de la zone méristématique, la présence de poils absorbants sur la totalité de la rootlette, ainsi qu'une différenciation du xylème jusqu'au bout de l'apex, ont été décrites sur un stade avancé de développement des rootlettes (Watt and Evans, 1999). Jusqu'à présent, aucune étude n'avait été menée sur l'évolution fine d'une rootlette de son émergence jusqu'à son stade final de développement. Notre travail a permis d'identifier l'existence d'une transition développementale, à la fois anatomique mais aussi moléculaire et fonctionnelle des rootlettes. Nous avons tiré avantage du développement séquentiel des rootlettes le long de la racine protéoïde pour mener une fine description anatomique et moléculaire des rootlettes. Nous avons défini 5 stades de développement et confirmé la disparition de la zone d'activité méristématique ainsi que la différenciation complète de la rootlette rapidement après émergence. Cette étude était indispensable pour permettre d'identifier spatialement, le long de la racine protéoïde, à quel moment la transition développementale se déroule et ainsi permettre de faire les prélèvements nécessaires à l'étude transcriptomique. Celle-ci a mis en évidence qu'une transition moléculaire et fonctionnelle très claire accompagne la transition anatomique. La rootlette devient, après cette transition, un organe entièrement dédié à la nutrition ayant stoppé sa croissance. La croissance déterminée s'accompagne donc d'une spécialisation fonctionnelle (Figure d.1).

Chez *A. thaliana*, la croissance indéterminée des racines repose sur l'activité du méristème, et sur l'auto-maintien de la niche de cellules souches. Cette niche de cellules souches est formée du centre quiescent et des cellules initiales qui l'entourent. Les cellules initiales se différencient et approvisionnent les différentes lignées cellulaires afin de former les différents tissus de la racine (Dolan et al., 1993). Le centre quiescent est décrit comme un réservoir de cellules souches dont l'activité mitotique est réduite (voire nulle) (van den Berg et al., 1995). Chez la plante modèle *Arabidopsis*, il est acquis que la maintenance de la niche de cellules souches repose sur l'expression du gène *AtWOX5* dans le centre quiescent, et qu'il joue un rôle central dans le réseau de gènes permettant l'auto-maintien de la zone méristématique (Drisch and Stahl, 2015; Kong et al., 2015).

Les premières expériences menées au cours de cette thèse ont reposé sur l'hypothèse d'une potentielle implication des gènes *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like* dans la croissance déterminée des rootlettes. L'expression de *pLaWOX5.1-like* et *pLaWOX5.2-like*, homologues à *AtWOX5* montre un patron d'expression plus large que dans le méristème d'*Arabidopsis*, ce qui pourrait être déterminant dans l'épuisement rapide de la zone méristématique des rootlettes. D'autre part l'expression du gène rapporteur GUS sous le contrôle de ces promoteurs chute très précocement dans les rootlettes le long de la racine protéoïde. Ces données ont également été appuyées par la ré-analyse du jeu de données transcriptomiques spatial généré dans l'équipe (Hufnagel et al., 2020), où ces deux gènes étaient différentiellement sur-exprimés dans les stades très précoces S1-S3 du développement des rootlettes, comparé au stade S7. Ces résultats ont renforcé l'hypothèse d'une perte rapide du maintien du centre quiescent lors du développement des rootlettes médié par la perte d'expression de *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like*, qui entraînerait par la suite la différenciation des cellules initiales et causerait l'arrêt de croissance des rootlettes. Cependant, cette hypothèse n'a pas pu être confirmée par la sur-expression de *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like* dans des racines de lupin blanc car cette sur-expression n'a pas permis de maintenir une croissance indéterminée des rootlettes transformées. Ce résultat suggère que l'expression de ces gènes ne semble pas constituer le facteur de régulation central de la transition structurale et fonctionnelle des rootlettes.

Dans la littérature, lors d'une analyse transcriptomique menée chez le lupin blanc, il avait été démontré que le facteur de transcription *WOX5* n'était pas différentiellement exprimé

entre les « rootlettes immatures » et les « rootlettes matures » (Secco et al., 2014). Il me semble important de souligner que l'échantillonnage ponctuel consistant à comparer des « rootlettes immatures » et des « rootlettes matures » n'a pas permis d'obtenir une description fine de l'évolution de l'expression de *WOX5*. De nombreuses études concernant les racines protéoïdes ont adopté un échantillonnage similaire consistant à comparer des rootlettes « juvéniles/immatures », « matures » et « sénescents » (Neumann and Römheld, 1999; Weisskopf et al., 2006; Tomasi et al., 2008; Wang et al., 2010; Tiziani et al., 2020). L'étude cinétique à la fois spatiale et temporelle que permet la racine protéoïde et qui a été menée pour la première fois dans notre analyse transcriptomique, s'est avérée beaucoup plus puissante pour décrire l'évolution moléculaire de la rootlette.

2. *LaRGF2-like*, acteur de la transition développementale des rootlettes

Les rootlettes se développent de manière successive, formant un gradient développemental, spatial et temporel, le long de la racine protéoïde. Nous avons exploité l'apparition de quelques rootlettes se démarquant de ce gradient par leur longueur plus importante. L'analyse anatomique de ces rootlettes longues a révélé une structure similaire à un apex de racine protéoïde, typique d'une racine à croissance indéterminée, suggérant ainsi la présence d'une zone méristématique active. En prenant avantage de cette caractéristique, un jeu de données transcriptomiques visant à comparer les longues rootlettes, les rootlettes normales et les apex de racine protéoïde a été généré dans le but de mieux comprendre les mécanismes menant à l'arrêt de croissance des rootlettes. Un réseau de gènes de lupin blanc, homologues à des facteurs de transcription connus pour leur implication dans le maintien du méristème, est clairement sur-exprimé dans les longues rootlettes, en comparaison avec les rootlettes normales, confirmant que ces rootlettes n'ont pas la même cinétique d'évolution développementale que les rootlettes normales voisines. Bien que *WOX5* soit un gène clé du maintien du pool de cellules souches (Kong et al., 2015), de nombreux gènes sont impliqués dans la maintenance du méristème, et agissent de manière redondante (Drisch and Stahl, 2015). Notre étude montre une dérégulation globale du réseau de facteurs de transcription impliqué dans le maintien du méristème chez les rootlettes normales par rapport aux rootlettes longues, mais ne nous a pas permis d'en identifier un contrôlant ce réseau et donc l'arrêt de croissance des rootlettes.

Par contre, l'analyse transcriptomique a permis d'identifier le gène *LaRGF2-like*, comme gène candidat intéressant pouvant jouer un rôle clé en amont du réseau de facteurs de transcription contrôlant l'auto-maintien du méristème. En effet, chez *Arabidopsis*, l'outil « STRING », permettant de synthétiser les données *in silico* disponibles, place l'homologue de ce gène comme potentiel régulateur du réseau identifié comme dérégulé lors de la croissance déterminée. Les approches fonctionnelles entreprises ont montré que la sur-expression de ce gène dans des racines de lupin blanc semble maintenir une activité méristématique dans la majorité des rootlettes transformées, suggérant un rôle déterminant de *LaRGF2-like* dans la transition vers la croissance déterminée des rootlettes. Chez *A. thaliana*, 7 *AtRGFs* sont transcrits dans le MAR, et des expériences ont démontré que la mutation seule de *RGF2* n'entraînait pas de phénotype, contrairement au triple mutant *rgf1 rgf2 rgf3* qui montre un phénotype de racine courte résultant d'une réduction de la zone méristématique (Matsuzaki et al., 2010; Fernandez et al., 2013a). Chez le lupin blanc, plusieurs gènes *LaRGFs-like* ont été mis en évidence lors de l'analyse transcriptomique, et compte tenu de la redondance de ces gènes chez *A. thaliana*, leur implication dans l'arrêt de croissance des rootlettes de lupin blanc reste à définir. Il est intéressant de noter que chez la plante modèle *Arabidopsis*, l'apport exogène du peptide *AtRGF1* provoque le même phénotype que la surexpression de ce même gène (Matsuzaki et al., 2010). L'apport exogène du peptide *LaRGF2-like* sur des racines protéoïdes sauvages pourrait permettre de confirmer la possibilité de reproduire le phénotype observé lors de la sur-expression en système hairy-root, et d'ainsi de maintenir des rootlettes en croissance indéterminée.

3. Comment *LaRGF2-like* régule l'activité méristématique ?

Tandis que *LaRGF2-like* pourrait être un acteur majeur de la croissance déterminée des rootlettes, la manière dont il régule l'activité méristématique reste inconnue. Hypothétiquement, la chute de l'expression de *LaRGF2-like* au cours du développement des rootlettes entraînerait la dérégulation du réseau de gènes dont il est en amont. Chez *A. thaliana*, une modification post-traductionnelle par l'enzyme TPST, tyrosyl-protein sulfotransferase, permet d'améliorer considérablement l'activité des RGFs, qui est donc fortement corrélée à leur niveau de sulfatation (Matsuzaki et al., 2010; Matsubayashi, 2011). On pourrait ainsi formuler l'hypothèse que, lors du développement des rootlettes, une

absence de la sulfatation de *LaRGF2-like* empêche l'activation du peptide, et entraîne ainsi une chute de l'expression du réseau de gène impliqué dans le maintien du méristème. Cependant, en suivant le profil d'expression de *LaRGF2-like* dans les données transcriptomiques spatiales, il semblerait que *LaRGF2-like* soit également transcriptionnellement réprimé au cours du développement des rootlettes. Il serait intéressant de rechercher si on a une régulation post-traductionnelle de l'activité de LaRGF2 et/ou une régulation transcriptionnelle.

Une voie de régulation en aval des RGFs a été décrite chez Arabidopsis, permettant, par analogie, de faire des hypothèses sur le mode d'action de LaRGF2-like dans la régulation de l'activité méristématique des rootlettes de racine protéoïdes. Chez *A. thaliana*, 5 leucine-rich receptor kinases (LRR-RKs), nommés RGI1 à RGI5 et exprimés dans le méristème proximal, ont été identifiés comme des récepteurs spécifiques de *AtRGF1* (Ou et al., 2016; Shinohara et al., 2016). Les récepteurs kinases (RK) constituent une large famille de récepteurs transmembranaires et sont connus pour être impliqués dans de nombreux processus dont la régulation du méristème (Shiu and Bleeker, 2001). Par exemple, chez Arabidopsis, le peptide signal *AtCLE40* se lie aux récepteurs kinases *AtACR4* et *AtCLV1* afin de contrôler la prolifération des cellules dans le MAR (Stahl et al., 2009; Drisch and Stahl, 2015). Il est intéressant de noter que le quadruple mutant *rgi1 rgi2 rgi3 rgi4* est significativement moins sensible à la présence du peptide *AtRGF1* tandis que le quintuple mutant *rgi1 rgi2 rgi3 rgi4 rgi5* est totalement insensible à la présence de *AtRGF1*, suggérant une forte redondance de ces récepteurs. Chez le lupin blanc, le récepteur de *LaRGF2-like* n'est pas connu. Afin de mieux comprendre comment *LaRGF2-like* régule l'activité méristématique, il serait intéressant de comprendre avec quels partenaires ce peptide interagit. Une première stratégie serait d'identifier les gènes candidats de lupin blanc homologues aux récepteurs *AtRGIs*. Afin de mettre en évidence si un des récepteurs candidats interagit avec *LaRGF2-like*, une expérience de « ligand-fishing » pourrait être effectuée. En deuxième stratégie, une expérience de co-immunoprécipitation pourrait permettre d'identifier les protéines interagissant avec *LaRGF2-like*, sans a priori. Ces deux stratégies peuvent être croisées : l'identification de gènes de lupin blanc homologues aux *AtRGIS* pourrait permettre d'effectuer une recherche ciblée dans les complexes protéiques obtenus lors de l'expérience de co-immunoprécipitation.

Des études ont mis en évidence que les *AtRGFs* maintiennent l'activité méristématique en régulant le gradient d'expression de *AtPLT1* et *AtPLT2* (Matsuzaki et al., 2010; Shinohara et al., 2016). Le couple ligand-récepteur *AtRGF1-AtRGI1* régulerait l'activité de *AtPLT1* et *AtPLT2* en activant une cascade de signalisation impliquant les kinases YDA-MKK4/MKK5-MPK3-MPK6 (Lu et al., 2020). Compte-tenu des variations racines-dépendantes observées lors de la transformation hairy-root, nous n'avons pas pu observer un impact de la sur-expression de *LaRGF2-like* sur l'expression de *LaPLT2-like*. Il serait intéressant d'observer si *LaRGF2-like* impacte l'expression des gènes *LaPLT1-like* et *LaPLT2-like* afin de définir, par analogie à *A. thaliana*, si les mécanismes régulant le maintien du méristème sont similaires chez le lupin blanc. Une perspective envisageable serait d'appliquer de manière exogène le peptide *LaRGF2-like* sur des racines protéoïdes sauvages pendant un temps défini, de les échantillonner et d'analyser par RT-qPCR le niveau d'expression de *LaPLT1-like* et *LaPLT2-like* en comparaison avec des plantes non-traitées. Chez *A. thaliana* l'impact d'un apport exogène de *AtRGF1* est visible sur des plantes exprimant des fusions *AtPLT1-GFP* et *AtPLT2-GFP* (Shinohara and Matsubayashi, 2018), mais les limites de la génétique du lupin blanc ne nous permettent pas de développer des stratégies basées sur des transformations stables. Ce facteur limitant rend ces approches plus délicates et nécessite d'utiliser la transformation hairy-root, et donc des racines chimériques. Jusqu'ici la visualisation de l'expression de gènes endogènes de lupin blanc couplé avec la protéine fluorescente GFP n'a pas été concluante. Ainsi, la caractérisation d'un couple *LaRGF2-like*-récepteur et l'identification de la cascade de signalisation en aval par analogie avec *A. thaliana* pourrait permettre de mieux comprendre le mécanisme permettant de contrôler l'activité méristématique chez les rootlettes.

4. Une potentielle implication de l'auxine dans l'arrêt de croissance des rootlettes ?

Les hormones végétales régulent de nombreux processus développementaux chez les plantes. Notamment, la balance auxine/cytokine est connue pour son implication dans la régulation des méristèmes racinaires et caulinaires (Su et al., 2011). Dans le méristème racinaire, la distribution non homogène de l'auxine, avec un maximum d'auxine situé dans le centre quiescent et les cellules initiales de la columelle, participe à l'auto-maintien de la niche de cellule souche (Sabatini et al., 1999; Blilou et al., 2005; Ding and Friml, 2010). Alors qu'une première étude avait exclu l'implication de l'auxine dans la régulation de *AtRFG1*, *AtRGF2*,

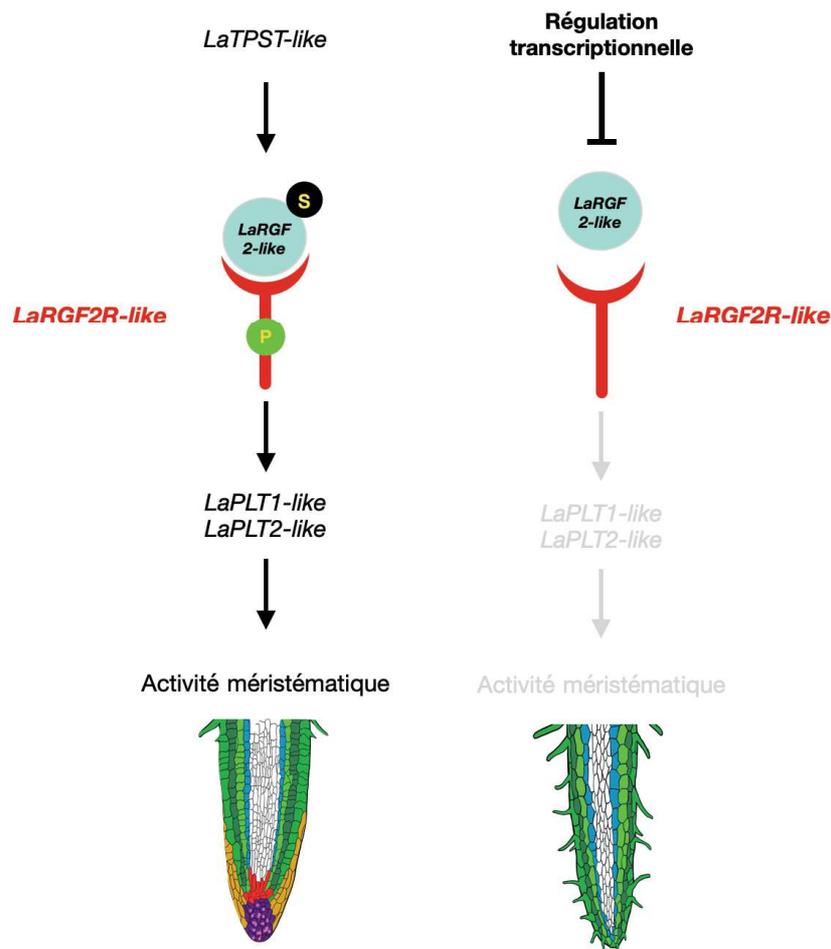
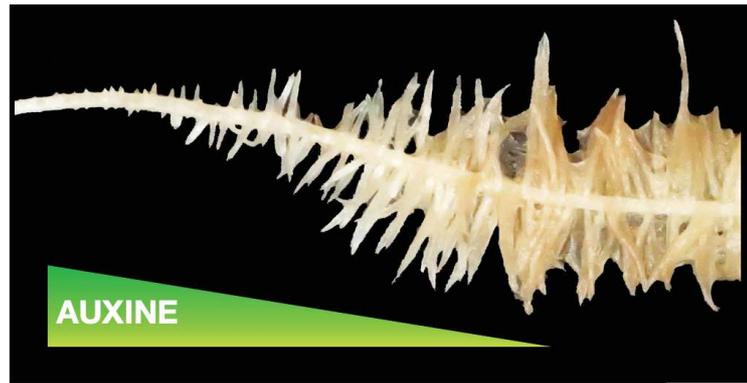


Figure d.2 : Schéma hypothétique de la régulation de l'activité méristématique des rootlettes par le gène *LaRGF2-like*. Par analogie avec *A. thaliana*, nous formulons l'hypothèse que l'accumulation d'auxine lors de l'initiation et de la croissance des rootlettes entraînerait la régulation positive de *LaTPST-like*. Cette enzyme permettrait d'activer, par sulfatation, *LaRGF2-like* entraînant une meilleure affinité avec le récepteur kinase *LaRGF2R-like*. Une cascade de signalisation en aval régulerait positivement les gènes *LaPLT1-like* et *LaPLT2-like* et permettrait de conserver l'activité méristématique des rootlettes en croissance. Au cours du développement des rootlettes, la régulation négative du gène *LaRGF2-like* inhiberait cette voie de signalisation, entraînant ainsi un arrêt du maintien de l'activité méristématique et ainsi l'arrêt de croissance des rootlettes.

AtRGF3 et *AtRGF4* (Matsuzaki et al., 2010), une autre recherche a mis en évidence que la transcription de *AtRGF5*, *AtRGF6*, *AtRGF7*, *AtRGF8* et *AtRGF9* est induite par des traitements auxiniques (Zhou et al., 2010). Il est acquis que l'accumulation d'auxine entraîne la transcription des gènes PLTs (Aida et al., 2004), et que les peptides RGFs définissent le patron d'expression de *AtPLT1* et *AtPLT2* (Matsuzaki et al., 2010; Shinohara et al., 2016). L'enzyme TPST nécessaire à la bio-activation des peptides RGFs matures, est régulée positivement par l'auxine (Zhou et al., 2010). Un modèle, proposé par l'équipe de Zhou, stipule que la présence d'auxine entraînerait l'activation des RGFs via l'enzyme TPST, menant à l'auto-maintien de la niche de cellule souche. Chez le lupin blanc, l'observation de DR5::GUS suggère qu'un gradient d'auxine est établi durant l'initiation des rootlettes jusqu'à leur émergence (Gallardo et al., 2019). Lors de l'analyse du jeu de données transcriptomiques, nous avons pu observer qu'au cours du développement des rootlettes, de nombreux gènes impliqués dans des processus dépendants de l'auxine sont régulés négativement très précocement après émergence. Ce résultat pourrait suggérer que le gradient d'auxine, à l'instar des gènes impliqués dans le maintien du méristème, disparaîtrait lors de la transition développementale des rootlettes. Par analogie avec les mécanismes observés chez *A. thaliana*, nous pouvons émettre l'hypothèse que la baisse du niveau d'auxine lors du développement des rootlettes régulerait négativement *LaTPST-like* et empêcherait ainsi l'activation de *LaRGF2-like*, entraînant une cascade de signalisation menant à la perte de l'auto-maintien de la niche de cellules souches, via *LaPLT1-like* et *LaPLT2-like* et peut-être aussi à la chute de l'expression de *LaRGF2-like* (Figure d.2).

5. Vers des plantes adaptées à l'appauvrissement croissant des sols, et une meilleure utilisation des ressources

Au détriment de leur développement, nous avons pu démontrer que les rootlettes transitent structurellement et fonctionnellement afin de se spécialiser dans la nutrition. Anatomiquement, la différenciation du xylème, la présence de poils absorbants sur la totalité de la rootlette, leur caractère agravitropique et leur courte taille confère aux rootlettes une structure totalement adaptée à l'absorption du Pi, nutriment très peu mobile dans les sols. Additionnellement à cette anatomie particulière, l'exsudation de citrate et la régulation positive de nombreux transporteurs, phosphatases et gènes connus pour leur implication

dans divers stress démontrent la capacité fonctionnelle des rootlettes (Gilbert et al., 1999; Neumann and Römheld, 1999; Neumann et al., 2000; Massonneau et al., 2001; Peñaloza et al., 2002; Shen et al., 2005; Tomasi et al., 2008; Cheng et al., 2011). La régulation positive de nombreux gènes impliqués dans des voies nutritionnelles différentes que celle du Pi suggère que les rootlettes ont la capacité d'absorber d'autres nutriments, cependant, cela reste encore à étudier. La stratégie d'une croissance déterminée de certaines racines afin de s'adapter à des stress abiotiques est également observable chez d'autres plantes (Shishkova et al., 2008). Nous avons pu discuter lors de ces travaux de thèse de l'arrêt de croissance de la racine primaire d'*A. thaliana* en réponse de carence en Pi, et de celle de certains *Cactacées* du désert de Sonora, génétiquement programmée (Dubrovsky, 1997b; Sánchez-Calderón et al., 2005; Péret et al., 2011; Shishkova et al., 2013). Contrairement à la stratégie adoptée par le lupin blanc, l'arrêt de croissance de la racine primaire de ces plantes promeut le développement des racines latérales (Péret et al., 2011; Kirschner et al., 2021). Pour *A. thaliana*, le développement de racines latérales permet d'augmenter la surface d'échange dans la partie supérieure du sol, là où le Pi tend à s'accumuler (Lynch and Brown, 2001). Dans le cas des *Cactacées*, le développement de racines latérales à la surface du sol permet un accès à l'eau de pluie accumulée dans les parties superficielles du sol (Kirschner et al., 2021). Chez le lupin blanc, la carence en Pi entraîne la prolifération de racines protéoïdes dans la partie supérieure du sol, sur lesquelles les rootlettes à croissance déterminées se développent. Contrairement à *A. thaliana* et aux *Cactacées*, chez le lupin blanc, ce sont bien les racines à croissance déterminée qui sont spécialisées dans les fonctions de nutrition. Bien que les adaptations développementales impliquant la détermination de la croissance racinaire sont similaires, la stratégie fonctionnelle adoptée est différente et ainsi montre l'originalité du modèle des rootlettes de racines protéoïdes de lupin blanc.

La réponse adaptative impliquant de fortes activités physiologiques des racines au détriment de leur développement est donc une stratégie originale mais qui peut être observée chez d'autres espèces. De petites racines de 2 à 12 mm à la forme de carotte appelées racines dauciformes présentent des caractéristiques similaires aux racines protéoïdes de lupin blanc (Lamont, 1974). Les racines dauciformes de la monocotylédone *Cyathochaeta avenacea* ont une croissance déterminée et sont entièrement couvertes de long poils absorbants, mais leur structure est tout de même distincte des rootlettes de racines protéoïde de lupin blanc

(Lamont, 1974; Shane et al., 2006). Développées lors de carence en Pi et fonctionnellement analogues aux racines protéoïdes, les racines dauciformes ont également la capacité d'exsuder de grandes quantités d'acides organiques et de phosphatases acides, permettant une meilleure solubilisation du Pi (Playsted et al., 2006; Shane et al., 2006). Cette stratégie semble donc particulièrement adaptée à l'optimisation de la nutrition en phosphate.

La capacité de ce type de racines à solubiliser le Pi est intéressante dans la pratique de la cultures mixtes (intercropping). A l'inverse de la monoculture, la culture mixte consiste à cultiver plusieurs espèces végétales sur une même parcelle en même temps afin de permettre une meilleure fertilisation. En plus de développer des structures spécialisées capables d'améliorer la nutrition en Pi, le lupin blanc est également une légumineuse capable de fixer l'azote de l'air via son association avec des bactéries symbiotiques. Une culture associée de lupin blanc et de coton a permis de considérablement augmenter la croissance des parties aériennes des plants de cotons, ainsi que leur teneur en phosphore (Cu et al., 2005). De même, une expérience menée en pots a démontré que la présence du lupin blanc permettait au maïs d'accumuler de plus grandes quantités de Pi dans les parties aériennes (Dissanayaka et al., 2015). Les cultures mixtes avec le lupin blanc constituent donc des pistes à explorer dans le cadre d'une agriculture durable. Face à l'augmentation constante de la population, les demandes en production alimentaire ne cessent de croître. Suite à la révolution verte, de nombreux impacts écologiques ont été recensés. La surexploitation des sols, l'utilisation intensive de machines modernes par l'agriculture conventionnelle et l'utilisation extensive d'intrants et d'herbicides ont entraîné l'érosion, la salinisation, la compaction et la perte de fertilité des sols, causant ainsi une forte réduction des terrains exploitables (Fitzgerald-Moore and Parai, 1996; Pimentel and Burgess, 2013; Nachshon, 2021). Ainsi, dans un contexte d'appauvrissement croissant des sols, l'amélioration de la capacité d'adaptation des plantes à être cultivées sur des sols infertiles semble être une solution d'avenir (Lynch, 2007). Dans cette optique, la compréhension des régulations permettant une plasticité du développement racinaire est une approche relativement nouvelle qu'il faut « creuser » !

Bibliographie

- Aida, M., Beis, D., Heidstra, R., Willemsen, V., Blilou, I., Galinha, C., Nussaume, L., Noh, Y.-S., Amasino, R., and Scheres, B. (2004). The PLETHORA Genes Mediate Patterning of the Arabidopsis Root Stem Cell Niche. *Cell* 119, 109-120.
- Al-Ghazi, Y., Muller, B., Pinloche, S., Tranbarger, T.J., Nacry, P., Rossignol, M., Tardieu, F., and Doumas, P. (2003). Temporal responses of Arabidopsis root architecture to phosphate starvation: evidence for the involvement of auxin signalling. *Plant, Cell & Environment* 26, 1053-1066.
- Arnaud, C., Bonnot, C., Desnos, T., and Nussaume, L. (2010). The root cap at the forefront. *Comptes Rendus Biologies* 333, 335-343.
- Bai, H., Murali, B., Barber, K., and Wolverton, C. (2013). Low Phosphate Alters Lateral Root Setpoint Angle and Gravitropism. *American Journal of Botany* 100, 175-182.
- Baldwin, K.L., Strohm, A.K., and Masson, P.H. (2013). Gravity Sensing and Signal Transduction in Vascular Plant Primary Roots. *American Journal of Botany* 100, 126-142.
- Balzergue, C., Dartevelle, T., Godon, C., Laugier, E., Meisrimler, C., Teulon, J.-M., Creff, A., Bissler, M., Brouchoud, C., Hagège, A., Müller, J., Chiarenza, S., Javot, H., Becuwe-Linka, N., David, P., Péret, B., Delannoy, E., Thibaud, M.-C., Armengaud, J., Abel, S., Pellequer, J.-L., Nussaume, L., and Desnos, T. (2017). Low phosphate activates STOP1-ALMT1 to rapidly inhibit root cell elongation. *Nat. Commun.* 8, 15300.
- Bauer, P., Ling, H.-Q., and Guerinot, M.L. (2007). FIT, the FER-LIKE IRON DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR in Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry* 45, 260-261.
- Baum, S.F., and Rost, T.L. (1996). Root apical organization in Arabidopsis thaliana 1. Root cap and protoderm. *Protoplasma* 192, 178-188.
- Bayle, V., Arrighi, J.F., Creff, A., Nespoulous, C., Vialaret, J., Rossignol, M., Gonzalez, E., Paz-Ares, J., and Nussaume, L. (2011). Arabidopsis thaliana high-affinity phosphate transporters exhibit multiple levels of posttranslational regulation. *Plant Cell* 23, 1523-1535.
- Belles-Boix, E., Hamant, O., Witiak, S.M., Morin, H., Traas, J., and Pautot, V.R. (2006). KNAT6: An Arabidopsis Homeobox Gene Involved in Meristem Activity and Organ Separation. *Plant Cell* 18, 1900-1907.
- Benedetto, A., Magurno, F., Bonfante, P., and Lanfranco, L. (2005). Expression profiles of a phosphate transporter gene (GmosPT) from the endomycorrhizal fungus Glomus mosseae. *Mycorrhiza* 15, 620-627.
- Bennett, E.M., Carpenter, S.R., and Caraco, N.F. (2001). Human Impact on Erodeable Phosphorus and Eutrophication: A Global Perspective: Increasing accumulation of phosphorus in soil threatens rivers, lakes, and coastal oceans with eutrophication. *BioScience* 51, 227-234.
- Bennett, T., Van Den Toorn, A., Sanchez-Perez, G.F., Campilho, A., Willemsen, V., Snel, B., and Scheres, B. (2010). SOMBRERO, BEARSKIN1, and BEARSKIN2 Regulate Root Cap Maturation in Arabidopsis. *Plant Cell* 22, 640-654.
- Bieleski, R.L. (1973). Phosphate Pools, Phosphate Transport, and Phosphate Availability. *Annual Review of Plant Physiology* 24, 225-252.
- Blancaflor, E.B., Fasano, J.M., and Gilroy, S. (1998). Mapping the Functional Roles of Cap Cells in the Response of Arabidopsis Primary Roots to Gravity1. *Plant Physiol.* 116, 213-222.
- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K., and Scheres, B. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature* 433, 39-44.

- Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Bécard, G., Rosenberg, C., and Barker, D.G. (2001). *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14, 695-700.
- Burkart, R.C., Strotmann, V., Kirschner, G.K., Akinci, A., Czempik, L., Maizel, A., Weidtkamp-Peters, S., and Stahl, Y. (2019). PLETHORA and WOX5 interaction and subnuclear localisation regulates *Arabidopsis* root stem cell maintenance. *bioRxiv*.
- Calleja-Cabrera, J., Boter, M., Oñate-Sánchez, L., and Pernas, M. (2020). Root Growth Adaptation to Climate Change in Crops. *Front. Plant Sci.* 11.
- Cao, J. (2019). Molecular Evolution of the Vacuolar Iron Transporter (VIT) Family Genes in 14 Plant Species. *Genes* 10.
- Carpenter, S., Caraco, N.F., Correll, D.L., Howarth, R., Sharpley, A.N., and Smith, V. (1998). Non-Point Pollution of Surface Waters With Phosphorus and Nitrogen. *Ecological Applications* 8.
- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R.P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inzé, D., Sandberg, G., Casero, P.J., and Bennett, M. (2001). Auxin Transport Promotes *Arabidopsis* Lateral Root Initiation. *Plant Cell* 13, 843-852.
- Cassan, O., Lèbre, S., and Martin, A. (2021). Inferring and analyzing gene regulatory networks from multi-factorial expression data: a complete and interactive suite. *BMC Genomics* 22, 387.
- Cheng, L., Bucciarelli, B., Shen, J., Allan, D., and Vance, C.P. (2011). Update on White Lupin Cluster Root Acclimation to Phosphorus Deficiency Update on Lupin Cluster Roots. *Plant Physiol.* 156, 1025.
- Chiou, T.J., and Lin, S.I. (2011). Signaling network in sensing phosphate availability in plants. *Annu Rev Plant Biol* 62, 185-206.
- Cho, H.-T., and Cosgrove, D.J. (2002). Regulation of Root Hair Initiation and Expansin Gene Expression in *Arabidopsis*[W]. *Plant Cell* 14, 3237-3253.
- Cock, J.M., and McCormick, S. (2001). A Large Family of Genes That Share Homology with CLAVATA3. *Plant Physiol.* 126, 939-942.
- Cordell, D., Drangert, J.-O., and White, S. (2009). The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change* 19, 292-305.
- Cu, S., Hutson, J., and Schuller, K. (2005). Mixed culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) with white lupin (*Lupinus albus* L.) improves the growth and phosphorus nutrition of the wheat. *Plant Soil* 272, 143-151.
- Di Mambro, R., De Ruvo, M., Pacifici, E., Salvi, E., Sozzani, R., Benfey, P.N., Busch, W., Novak, O., Ljung, K., Di Paola, L., Marée, A.F.M., Costantino, P., Grieneisen, V.A., and Sabatini, S. (2017). Auxin minimum triggers the developmental switch from cell division to cell differentiation in the *Arabidopsis* root. *PNAS* 114, E7641.
- Ding, Z., and Friml, J. (2010). Auxin regulates distal stem cell differentiation in *Arabidopsis* roots. *PNAS* 107, 12046-12051.
- Dinkelaker, B., Hengeler, C., and Marschner, H. (1995). Distribution and Function of Proteoid Roots and other Root Clusters. *Botanica Acta* 108, 183-200.
- Dinkelaker, B., Römheld, V., and Marschner, H. (1989). Citric acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant, Cell & Environment* 12, 285-292.
- Dissanayaka, D.M.S.B., Maruyama, H., Masuda, G., and Wasaki, J. (2015). Interspecific facilitation of P acquisition in intercropping of maize with white lupin in two

- contrasting soils as influenced by different rates and forms of P supply. *Plant Soil* 390, 223-236.
- Dolan, L. (2001). The role of ethylene in root hair growth in Arabidopsis. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 164, 141-145.
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., and Scheres, B. (1993). Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. *Development* 119, 71-84.
- Drisch, R.C., and Stahl, Y. (2015). Function and regulation of transcription factors involved in root apical meristem and stem cell maintenance. *Front. Plant Sci.* 6.
- Du, Y., and Scheres, B. (2017). PLETHORA transcription factors orchestrate de novo organ patterning during Arabidopsis lateral root outgrowth. *PNAS* 114, 11709-11714.
- Dubrovsky, J.G. (1997a). "Determinate Primary Root Growth in Stenocereus gummosus (Cactaceae)," in *Biology of root formation and development*. Springer), 13-20.
- Dubrovsky, J.G. (1997b). Determinate primary-root growth in seedlings of Sonoran Desert Cactaceae; its organization, cellular basis, and ecological significance. *Planta* 203, 85-92.
- Dubrovsky, J.G., Doerner, P.W., Colón-Carmona, A.N., and Rost, T.L. (2000). Pericycle Cell Proliferation and Lateral Root Initiation in Arabidopsis1. *Plant Physiol.* 124, 1648-1657.
- Dubrovsky, J.G., and Gómez-Lomelí, L.F. (2003). Water deficit accelerates determinate developmental program of the primary root and does not affect lateral root initiation in a Sonoran Desert cactus (*Pachycereus pringlei*, Cactaceae). *Am J Bot* 90, 823-831.
- Feng, Y., Xu, P., Li, B., Li, P., Wen, X., An, F., Gong, Y., Xin, Y., Zhu, Z., Wang, Y., and Guo, H. (2017). Ethylene promotes root hair growth through coordinated EIN3/EIL1 and RHD6/RSL1 activity in Arabidopsis. *PNAS* 114, 13834.
- Fernandez, A., Drozdzecki, A., Hoogewijs, K., Nguyen, A., Beeckman, T., Madder, A., and Hilson, P. (2013a). Transcriptional and Functional Classification of the GOLVEN/ROOT GROWTH FACTOR/CLE-Like Signaling Peptides Reveals Their Role in Lateral Root and Hair Formation. *Plant Physiol.* 161, 954-970.
- Fernandez, A., Drozdzecki, A., Hoogewijs, K., Vassileva, V., Madder, A., Beeckman, T., and Hilson, P. (2015). The GLV6/RGF8/CLEL2 peptide regulates early pericycle divisions during lateral root initiation. *J. Exp. Bot.* 66, 5245-5256.
- Fernandez, A., Hilson, P., and Beeckman, T. (2013b). GOLVEN peptides as important regulatory signalling molecules of plant development. *J. Exp. Bot.* 64, 5263-5268.
- Filippelli, G.M. (2011). Phosphate rock formation and marine phosphorus geochemistry: The deep time perspective. *Chemosphere* 84, 759-766.
- Fitzgerald-Moore, P., and Parai, B. (1996). The green revolution. *University of Calgary*.
- Forzani, C., Aichinger, E., Sornay, E., Willemsen, V., Laux, T., Dewitte, W., and Murray, James a.H. (2014). WOX5 Suppresses CYCLIN D Activity to Establish Quiescence at the Center of the Root Stem Cell Niche. *Curr. Biol.* 24, 1939-1944.
- Fridborg, I., Kuusk, S., Robertson, M., and Sundberg, E. (2001). The Arabidopsis Protein SH1 Represses Gibberellin Responses in Arabidopsis and Barley. *Plant Physiol.* 127, 937-948.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R., and Jürgens, G. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature* 426, 147-153.
- Fukaki, H., Okushima, Y., and Tasaka, M. (2007). "Auxin - Mediated Lateral Root Formation in Higher Plants," in *International Review of Cytology*. Academic Press), 111-137.

- Fukaki, H., Tameda, S., Masuda, H., and Tasaka, M. (2002). Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of Arabidopsis. *Plant J* 29, 153-168.
- Fukuda, H., and Higashiyama, T. (2011). Diverse Functions of Plant Peptides: Entering a New Phase. *Plant Cell Physiol.* 52, 1-4.
- Galinha, C., Hofhuis, H., Luijten, M., Willemsen, V., Blilou, I., Heidstra, R., and Scheres, B. (2007). PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. *Nature* 449, 1053-1057.
- Gallardo, C., Hufnagel, B., Casset, C., Alcon, C., Garcia, F., Divol, F., Marquès, L., Dumas, P., and Péret, B. (2019). Anatomical and hormonal description of rootlet primordium development along white lupin cluster root. *Physiol Plant* 165, 4-16.
- Gardner, W.K., and Boundy, K.A. (1983). The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. IV. The effect of interplanting wheat and white lupin on the growth and mineral composition of the two species. *Plant Soil* 70, 391-402.
- Gardner, W.K., Parbery, D.G., and Barber, D.A. (1982). The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. I. Some characteristics of the soil/root interface. *Plant Soil* 68, 19-32.
- Gilbert, G., Knight, J., Vance, C., and Allan, D. (1999). Acid phosphatase activity in phosphorus - deficient white lupin roots. *Plant, Cell & Environment* 22, 801-810.
- Godon, C., Mercier, C., Wang, X., David, P., Richaud, P., Nussaume, L., Liu, D., and Desnos, T. (2019). Under phosphate starvation conditions, Fe and Al trigger accumulation of the transcription factor STOP1 in the nucleus of Arabidopsis root cells. *The Plant Journal* 99, 937-949.
- Goh, T., Joi, S., Mimura, T., and Fukaki, H. (2012). The establishment of asymmetry in Arabidopsis lateral root founder cells is regulated by LBD16/ASL18 and related LBD/ASL proteins. *Development* 139, 883-893.
- Goh, T., Toyokura, K., Wells, D.M., Swarup, K., Yamamoto, M., Mimura, T., Weijers, D., Fukaki, H., Laplaze, L., Bennett, M.J., and Guyomarc'h, S. (2016). Quiescent center initiation in the Arabidopsis lateral root primordia is dependent on the SCARECROW transcription factor. *Development* 143, 3363-3371.
- Gonzali, S., Novi, G., Loreti, E., Paolicchi, F., Poggi, A., Alpi, A., and Perata, P. (2005). A turanose - insensitive mutant suggests a role for WOX5 in auxin homeostasis in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* 44, 633-645.
- Gutiérrez-Alanís, D., Ojeda-Rivera, J.O., Yong-Villalobos, L., Cárdenas-Torres, L., and Herrera-Estrella, L. (2018). Adaptation to Phosphate Scarcity: Tips from Arabidopsis Roots. *Trends Plant Sci.* 23, 721-730.
- Han, P., and Zhu, Y.-X. (2009). BARD1 may be renamed ROW1 because it functions mainly as a REPRESSOR OF WUSCHEL1. *Plant Signaling & Behavior* 4, 52-54.
- Harrison, B.R., and Masson, P.H. (2008). ARL2, ARG1 and PIN3 define a gravity signal transduction pathway in root statocytes. *The Plant Journal* 53, 380-392.
- Harrison, M.J. (1997). The arbuscular mycorrhizal symbiosis: an underground association. *Trends Plant Sci.* 2, 54-60.
- Harrison, M.J., and Van Buuren, M.L. (1995). A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* 378, 626-629.
- Hernández-Barrera, A., Ugartechea-Chirino, Y., Shishkova, S., Napsucialy-Mendivil, S., Soukup, A., Reyes-Hernández, B.J., Lira-Ruan, V., Dong, G., and Dubrovsky, J.G. (2011). Apical meristem exhaustion during determinate primary root growth in the moots koom 1 mutant of Arabidopsis thaliana. *Planta* 234, 1163-1177.

- Hinsinger, P. (2001). Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil* 237, 173-195.
- Hirakawa, Y. (2021). CLAVATA3, a plant peptide controlling stem cell fate in the meristem. *Peptides* 142, 170579.
- Hirota, A., Kato, T., Fukaki, H., Aida, M., and Tasaka, M. (2007). The Auxin-Regulated AP2/EREBP Gene PUCHI Is Required for Morphogenesis in the Early Lateral Root Primordium of Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 2156-2168.
- Hirsch, J., Marin, E., Floriani, M., Chiarenza, S., Richaud, P., Nussaume, L., and Thibaud, M.C. (2006). Phosphate deficiency promotes modification of iron distribution in Arabidopsis plants. *Biochimie* 88, 1767-1771.
- Hobert, O. (2008). Gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Science* 319, 1785-1786.
- Horiguchi, G., Kim, G.-T., and Tsukaya, H. (2005). The transcription factor AtGRF5 and the transcription coactivator AN3 regulate cell proliferation in leaf primordia of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* 43, 68-78.
- Hu, X., and Xu, L. (2016). Transcription Factors WOX11/12 Directly Activate WOX5/7 to Promote Root Primordia Initiation and Organogenesis. *Plant Physiol.* 172, 2363-2373.
- Huang, G., Liang, W., Sturrock, C.J., Pandey, B.K., Giri, J., Mairhofer, S., Wang, D., Muller, L., Tan, H., York, L.M., Yang, J., Song, Y., Kim, Y.-J., Qiao, Y., Xu, J., Kepinski, S., Bennett, M.J., and Zhang, D. (2018). Rice actin binding protein RMD controls crown root angle in response to external phosphate. *Nat. Commun.* 9, 2346.
- Hufnagel, B., Marques, A., Soriano, A., Marquès, L., Divol, F., Dumas, P., Sallet, E., Mancinotti, D., Carrere, S., Marande, W., Arribat, S., Keller, J., Huneau, C., Blein, T., Aimé, D., Laguerre, M., Taylor, J., Schubert, V., Nelson, M., Geu-Flores, F., Crespi, M., Gallardo, K., Delaux, P.-M., Salse, J., Bergès, H., Guyot, R., Gouzy, J., and Péret, B. (2020). High-quality genome sequence of white lupin provides insight into soil exploration and seed quality. *Nat. Commun.* 11, 492.
- Iijima, M., Morita, S., and Barlow, P.W. (2008). Structure and Function of the Root Cap. *Plant Prod. Sci.* 11, 17-27.
- Ioio, R.D., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M.T., Aoyama, T., Costantino, P., and Sabatini, S. (2008). A Genetic Framework for the Control of Cell Division and Differentiation in the Root Meristem. *Science* 322, 1380.
- Iuchi, S., Koyama, H., Iuchi, A., Kobayashi, Y., Kitabayashi, S., Kobayashi, Y., Ikka, T., Hirayama, T., Shinozaki, K., and Kobayashi, M. (2007). Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in *Arabidopsis* and coregulates a key gene in aluminum tolerance. *PNAS* 104, 9900.
- Javot, H., Pumplin, N., and Harrison, M.J. (2007). Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant, Cell & Environment* 30, 310-322.
- Jiang, K., and Feldman, L.J. (2002). Root Meristem Establishment and Maintenance: The Role of Auxin. *J. Plant Growth Regul.* 21, 432-440.
- Johnson, J.F., Vance, C.P., and Allan, D.L. (1996). Phosphorus Deficiency in *Lupinus albus* (Altered Lateral Root Development and Enhanced Expression of Phosphoenolpyruvate Carboxylase). *Plant Physiol.* 112, 31-41.
- Jones, D.L. (1998). Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant Soil* 205, 25-44.
- Jost, R., Pharmawati, M., Lapis-Gaza, H.R., Rossig, C., Berkowitz, O., Lambers, H., and Finnegan, P.M. (2015). Differentiating phosphate-dependent and phosphate-independent

- systemic phosphate-starvation response networks in *Arabidopsis thaliana* through the application of phosphite. *J. Exp. Bot.* 66, 2501-2514.
- Julkowska, M.M., Hoefsloot, H.C.J., Mol, S., Feron, R., De Boer, G.-J., Haring, M.A., and Testerink, C. (2014). Capturing *Arabidopsis* Root Architecture Dynamics with root-fit Reveals Diversity in Responses to Salinity. *Plant Physiol.* 166, 1387-1402.
- Karthikeyan, A.S., Varadarajan, D.K., Mukatira, U.T., D'urzo, M.P., Damsz, B., and Raghothama, K.G. (2002). Regulated Expression of *Arabidopsis* Phosphate Transporters. *Plant Physiol.* 130, 221-233.
- Keerthisinghe, G., Hocking, P.J., Ryan, P.R., and Delhaize, E. (1998). Effect of phosphorus supply on the formation and function of proteoid roots of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant, Cell & Environment* 21, 467-478.
- Khare, D., Choi, H., Huh, S.U., Bassin, B., Kim, J., Martinoia, E., Sohn, K.H., Paek, K.-H., and Lee, Y. (2017). *Arabidopsis* ABCG34 contributes to defense against necrotrophic pathogens by mediating the secretion of camalexin. *PNAS* 114, E5712.
- Kim, D., Paggi, J.M., Park, C., Bennett, C., and Salzberg, S.L. (2019). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat. Biotechnol.* 37, 907-915.
- Kim, J.H., and Lee, B.H. (2006). GROWTH-REGULATING FACTOR4 of *Arabidopsis thaliana* is required for development of leaves, cotyledons, and shoot apical meristem. *Journal of Plant Biology* 49, 463-468.
- Kirschner, G.K., Xiao, T.T., and Blilou, I. (2021). Rooting in the Desert: A Developmental Overview on Desert Plants. *Genes* 12.
- Kiss, J.Z., Hertel, R., and Sack, F.D. (1989). Amyloplasts are necessary for full gravitropic sensitivity in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 177, 198-206.
- Kong, X., Lu, S., Tian, H., and Ding, Z. (2015). WOX5 is Shining in the Root Stem Cell Niche. *Trends Plant Sci.* 20, 601-603.
- Laffont, C., Ivanovici, A., Gautrat, P., Brault, M., Djordjevic, M.A., and Frugier, F. (2020). The NIN transcription factor coordinates CEP and CLE signaling peptides that regulate nodulation antagonistically. *Nat. Commun.* 11, 3167.
- Lambers, H., Hayes, P.E., Laliberté, E., Oliveira, R.S., and Turner, B.L. (2015). Leaf manganese accumulation and phosphorus-acquisition efficiency. *Trends Plant Sci.* 20, 83-90.
- Lambers, H., Shane, M.W., Cramer, M.D., Pearse, S.J., and Veneklaas, E.J. (2006). Root Structure and Functioning for Efficient Acquisition of Phosphorus: Matching Morphological and Physiological Traits. *Ann. Bot.* 98, 693-713.
- Lamont, B. (1974). The biology of dauciform roots in the sedge *Cyathochaete avenacea*. *New Phytol.* 73, 985-996.
- Laskowski, M.J., Williams, M.E., Nusbaum, H.C., and Sussex, I.M. (1995). Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development* 121, 3303-3310.
- Latchman, D.S. (1997). Transcription factors: An overview. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29, 1305-1312.
- Lavenus, J., Goh, T., Roberts, I., Guyomarc'h, S., Lucas, M., De Smet, I., Fukaki, H., Beeckman, T., Bennett, M., and Laplace, L. (2013). Lateral root development in *Arabidopsis*: fifty shades of auxin. *Trends Plant Sci.* 18, 450-458.
- Le, J., Vandenbussche, F., Van Der Straeten, D., and Verbelen, J.-P. (2001). In the Early Response of *Arabidopsis* Roots to Ethylene, Cell Elongation Is Up- and Down-Regulated and Uncoupled from Differentiation1. *Plant Physiol.* 125, 519-522.

- Le Thanh, T., Hufnagel, B., Soriano, A., Divol, F., Brottier, L., Casset, C., Péret, B., Doumas, P., and Marquès, L. (2021). Dynamic Development of White Lupin Rootlets Along a Cluster Root. *Front. Plant Sci.* 12.
- Lee, M.M., and Schiefelbein, J. (1999). WEREWOLF, a MYB-Related Protein in Arabidopsis, Is a Position-Dependent Regulator of Epidermal Cell Patterning. *Cell* 99, 473-483.
- Liang, C., Wang, J., Zhao, J., Tian, J., and Liao, H. (2014). Control of phosphate homeostasis through gene regulation in crops. *Curr. Opin. Plant Biol.* 21, 59-66.
- Lin, C., and Sauter, M. (2018). Control of Adventitious Root Architecture in Rice by Darkness, Light, and Gravity. *Plant Physiol* 176, 1352-1364.
- Lin, Q., Ohashi, Y., Kato, M., Tsuge, T., Gu, H., Qu, L.-J., and Aoyama, T. (2015). GLABRA2 Directly Suppresses Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Genes with Diverse Functions in Root Hair Development. *Plant Cell* 27, 2894-2906.
- Liu, J., Uhde-Stone, C., Li, A., Vance, C., and Allan, D. (2001). A phosphate transporter with enhanced expression in proteoid roots of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant Soil* 237, 257-266.
- López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., and Herrera-Estrella, L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr Opin Plant Biol* 6, 280-287.
- López-Bucio, J., Hernández-Abreu, E., Sánchez-Calderón, L., Nieto-Jacobo, M.a.F., Simpson, J., and Herrera-Estrella, L. (2002). Phosphate Availability Alters Architecture and Causes Changes in Hormone Sensitivity in the Arabidopsis Root System. *Plant Physiol.* 129, 244-256.
- Lu, X., Shi, H., Ou, Y., Cui, Y., Chang, J., Peng, L., Gou, X., He, K., and Li, J. (2020). RGF1-RGI1, a Peptide-Receptor Complex, Regulates Arabidopsis Root Meristem Development via a MAPK Signaling Cascade. *Molecular Plant* 13, 1594-1607.
- Lu, Y.-J., Chen, H., Corrion, A., Buyuk, I., Li, P., Samaradivakara, S., Wai, C.M., Sakamoto, H., Santos, P., Vanburen, R., Kim, Y., and Day, B. (2021). NDR1 and the Arabidopsis Plasma Membrane ATPase AHA5 are Required for Processes that Converge on Drought Tolerance and Immunity. *bioRxiv*, 2021.2006.2010.445978.
- Lynch, J.P. (2005). "Root Architecture and Nutrient Acquisition," in *Nutrient Acquisition by Plants: An Ecological Perspective*, ed. H. Bassirirad. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 147-183.
- Lynch, J.P. (2007). Roots of the second green revolution. *Australian Journal of Botany* 55, 493-512.
- Lynch, J.P., and Brown, K.M. (2001). Topsoil foraging – an architectural adaptation of plants to low phosphorus availability. *Plant Soil* 237, 225-237.
- Lyu, Y., Tang, H., Li, H., Zhang, F., Rengel, Z., Whalley, W.R., and Shen, J. (2016). Major Crop Species Show Differential Balance between Root Morphological and Physiological Responses to Variable Phosphorus Supply. *Front. Plant Sci.* 7.
- Malamy, J.E., and Benfey, P.N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124, 33-44.
- Maldonado-Mendoza, I.E., Dewbre, G.R., and Harrison, M.J. (2001). A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14, 1140-1148.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. J.* 17, 3.

- Massonneau, A., Langlade, N., Léon, S., Smutny, J., Vogt, E., Neumann, G., and Martinoia, E. (2001). Metabolic changes associated with cluster root development in white lupin (*Lupinus albus* L.): relationship between organic acid excretion, sucrose metabolism and energy status. *Planta* 213, 534-542.
- Masucci, J.D., and Schiefelbein, J.W. (1994). The *rhd6* Mutation of *Arabidopsis thaliana* Alters Root-Hair Initiation through an Auxin- and Ethylene-Associated Process. *Plant Physiol.* 106, 1335-1346.
- Masucci, J.D., and Schiefelbein, J.W. (1996). Hormones act downstream of TTG and GL2 to promote root hair outgrowth during epidermis development in the *Arabidopsis* root. *Plant Cell* 8, 1505-1517.
- Matsubayashi, Y. (2011). Post-Translational Modifications in Secreted Peptide Hormones in Plants. *Plant Cell Physiol.* 52, 5-13.
- Matsuzaki, Y., Ogawa-Ohnishi, M., Mori, A., and Matsubayashi, Y. (2010). Secreted Peptide Signals Required for Maintenance of Root Stem Cell Niche in *Arabidopsis*. *Science* 329, 1065.
- Maurel, C., and Nacry, P. (2020). Root architecture and hydraulics converge for acclimation to changing water availability. *Nature Plants* 6, 744-749.
- Mclaughlin, J.R., Ryden, J.C., and Syers, J.K. (1981). SORPTION OF INORGANIC PHOSPHATE BY IRON- AND ALUMINIUM- CONTAINING COMPONENTS. *Journal of Soil Science* 32, 365-378.
- Menand, B., Yi, K., Jouannic, S., Hoffmann, L., Ryan, E., Linstead, P., Schaefer, D.G., and Dolan, L. (2007). An ancient mechanism controls the development of cells with a rooting function in land plants. *Science* 316, 1477-1480.
- Meng, L., Buchanan, B.B., Feldman, L.J., and Luan, S. (2012). CLE-like (CLEL) peptides control the pattern of root growth and lateral root development in *Arabidopsis*. *PNAS* 109, 1760.
- Misson, J., Raghothama, K.G., Jain, A., Jouhet, J., Block, M.A., Bligny, R., Ortet, P., Creff, A., Somerville, S., Rolland, N., Doumas, P., Nacry, P., Herrerra-Estrella, L., Nussaume, L., and Thibaud, M.-C. (2005). A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana*; Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 11934.
- Mora-Macías, J., Ojeda-Rivera, J.O., Gutiérrez-Alanís, D., Yong-Villalobos, L., Oropeza-Aburto, A., Raya-González, J., Jiménez-Domínguez, G., Chávez-Calvillo, G., Rellán-Álvarez, R., and Herrera-Estrella, L. (2017). Malate-dependent Fe accumulation is a critical checkpoint in the root developmental response to low phosphate. *PNAS* 114, E3563.
- Moubayidin, L., Perilli, S., Dello Iorio, R., Di Mambro, R., Costantino, P., and Sabatini, S. (2010). The Rate of Cell Differentiation Controls the *Arabidopsis* Root Meristem Growth Phase. *Curr. Biol.* 20, 1138-1143.
- Muler, A.L., Oliveira, R.S., Lambers, H., and Veneklaas, E.J. (2014). Does cluster-root activity benefit nutrient uptake and growth of co-existing species? *Oecologia* 174, 23-31.
- Müller, A., Guan, C., Gälweiler, L., Tänzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E., and Palme, K. (1998). *AtPIN2* defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J* 17, 6903-6911.
- Müller, J., Gödde, V., Niehaus, K., and Zörb, C. (2015a). Metabolic Adaptations of White Lupin Roots and Shoots under Phosphorus Deficiency. *Front. Plant Sci.* 6.

- Müller, J., Toev, T., Heisters, M., Teller, J., Moore, Katie I., Hause, G., Dinesh, Dhurvas c., Bürstenbinder, K., and Abel, S. (2015b). Iron-Dependent Callose Deposition Adjusts Root Meristem Maintenance to Phosphate Availability. *Dev. Cell* 33, 216-230.
- Nachshon, U. (2021). Soil Degradation Processes: It's Time to Take Our Head Out of the Sand. *Geosciences* 11.
- Nacry, P., Canivenc, G.V., Muller, B., Azmi, A., Van Onckelen, H., Rossignol, M., and Dumas, P. (2005). A Role for Auxin Redistribution in the Responses of the Root System Architecture to Phosphate Starvation in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 138, 2061-2074.
- Nagarajan, V.K., Jain, A., Poling, M.D., Lewis, A.J., Raghothama, K.G., and Smith, A.P. (2011). Arabidopsis Pht1;5 Mobilizes Phosphate between Source and Sink Organs and Influences the Interaction between Phosphate Homeostasis and Ethylene Signaling *Plant Physiol.* 156, 1149-1163.
- Neumann, G., and Martinoia, E. (2002). Cluster roots – an underground adaptation for survival in extreme environments. *Trends Plant Sci.* 7, 162-167.
- Neumann, G., Massonneau, A., Langlade, N., Dinkelaker, B., Hengeler, C., Römheld, V., and Martinoia, E. (2000). Physiological Aspects of Cluster Root Function and Development in Phosphorus-deficient White Lupin (*Lupinus albus* L.). *Ann. Bot.* 85, 909-919.
- Neumann, G., and Römheld, V. (1999). Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant Soil* 211, 121-130.
- Nussaume, L., Kanno, S., Javot, H., Marin, E., Nakanishi, T.M., and Thibaud, M.-C. (2011). Phosphate Import in Plants: Focus on the PHT1 Transporters. *Front. Plant Sci.* 2.
- O'rourke, J.A., Yang, S.S., Miller, S.S., Bucciarelli, B., Liu, J., Rydeen, A., Bozsoki, Z., Uhde-Stone, C., Tu, Z.J., Allan, D., Gronwald, J.W., and Vance, C.P. (2013). An RNA-Seq transcriptome analysis of orthophosphate-deficient white lupin reveals novel insights into phosphorus acclimation in plants. *Plant Physiol* 161, 705-724.
- Ohyama, K., Ogawa, M., and Matsubayashi, Y. (2008). Identification of a biologically active, small, secreted peptide in Arabidopsis by in silico gene screening, followed by LC-MS-based structure analysis. *The Plant Journal* 55, 152-160.
- Okushima, Y., Fukaki, H., Onoda, M., Theologis, A., and Tasaka, M. (2007). ARF7 and ARF19 Regulate Lateral Root Formation via Direct Activation of LBD/ASL Genes in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 118-130.
- Ou, Y., Lu, X., Zi, Q., Xun, Q., Zhang, J., Wu, Y., Shi, H., Wei, Z., Zhao, B., Zhang, X., He, K., Gou, X., Li, C., and Li, J. (2016). RGF1 INSENSITIVE 1 to 5, a group of LRR receptor-like kinases, are essential for the perception of root meristem growth factor 1 in Arabidopsis thaliana. *Cell Research* 26, 686-698.
- Palomo, L., Claassen, N., and Jones, D.L. (2006). Differential mobilization of P in the maize rhizosphere by citric acid and potassium citrate. *Soil Biol. Biochem.* 38, 683-692.
- Pang, J., Bansal, R., Zhao, H., Bohuon, E., Lambers, H., Ryan, M.H., Ranathunge, K., and Siddique, K.H.M. (2018). The carboxylate-releasing phosphorus-mobilizing strategy can be proxied by foliar manganese concentration in a large set of chickpea germplasm under low phosphorus supply. *New Phytol.* 219, 518-529.
- Pardal, R., and Heidstra, R. (2021). Root stem cell niche networks: it's complexed! Insights from Arabidopsis. *J. Exp. Bot.*
- Park, B.S., Seo, J.S., and Chua, N.-H. (2014). NITROGEN LIMITATION ADAPTATION Recruits PHOSPHATE2 to Target the Phosphate Transporter PT2 for Degradation during the Regulation of Arabidopsis Phosphate Homeostasis. *Plant Cell* 26, 454-464.

- Peñaloza, E., Corcuera, L., and Martinez, J. (2002). Spatial and temporal variation in citrate and malate exudation and tissue concentration as affected by P stress in roots of white lupin. *Plant Soil* 241, 209-221.
- Péret, B., Clément, M., Nussaume, L., and Desnos, T. (2011). Root developmental adaptation to phosphate starvation: better safe than sorry. *Trends Plant Sci.* 16, 442-450.
- Péret, B., De Rybel, B., Casimiro, I., Benková, E., Swarup, R., Laplaze, L., Beeckman, T., and Bennett, M.J. (2009). Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci.* 14, 399-408.
- Péret, B., Desnos, T., Jost, R., Kanno, S., Berkowitz, O., and Nussaume, L. (2014). Root Architecture Responses: In Search of Phosphate. *Plant Physiol.* 166, 1713-1723.
- Perilli, S., Di Mambro, R., and Sabatini, S. (2012). Growth and development of the root apical meristem. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 17-23.
- Pertea, M., Pertea, G.M., Antonescu, C.M., Chang, T.-C., Mendell, J.T., and Salzberg, S.L. (2015). StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat. Biotechnol.* 33, 290-295.
- Pi, L., Aichinger, E., Van der graaff, E., Llavata-Peris, Cristina i., Weijers, D., Hennig, L., Groot, E., and Laux, T. (2015). Organizer-Derived WOX5 Signal Maintains Root Columella Stem Cells through Chromatin-Mediated Repression of CDF4 Expression. *Dev. Cell* 33, 576-588.
- Pimentel, D., and Burgess, M. (2013). Soil Erosion Threatens Food Production. *Agriculture* 3.
- Plassard, C., Robin, A., Le Cadre, E., Marsden, C., Trap, J., Herrmann, L., Waithaisong, K., Lesueur, D., Blanchart, E., Lardy, L., and Hinsinger, P. (2015). Améliorer la biodisponibilité du phosphore : comment valoriser les compétences des plantes et les mécanismes biologiques du sol. *Innovations Agronomiques* 43, 115-138.
- Playsted, C.W.S., Johnston, M.E., Ramage, C.M., Edwards, D.G., Cawthray, G.R., and Lambers, H. (2006). Functional significance of dauciform roots: exudation of carboxylates and acid phosphatase under phosphorus deficiency in *Caustis blakei* (Cyperaceae). *New Phytol.* 170, 491-500.
- Purnell, H.M. (1960). Studies of the family Proteaceae. I. Anatomy and morphology of the roots of some Victorian species. *Australian Journal of Botany* 8, 38-50.
- Rodríguez-Alonso, G., Matvienko, M., Lúpez-Valle, M.L., L-Zaro-Mixteco, P.E., Napsucialy-Mendivil, S., Dubrovsky, J.G., and Shishkova, S. (2018). Transcriptomics insights into the genetic regulation of root apical meristem exhaustion and determinate primary root growth in *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *Scientific Reports* 8.
- Rodríguez-Rodríguez, J.F., Shishkova, S., Napsucialy-Mendivil, S., and Dubrovsky, J.G. (2003). Apical meristem organization and lack of establishment of the quiescent center in Cactaceae roots with determinate growth. *Planta* 217, 849-857.
- Rogers, E.D., and Benfey, P.N. (2015). Regulation of plant root system architecture: implications for crop advancement. *Curr. Opin. Biotech.* 32, 93-98.
- Rosmarin, A. (2004). The Precarious Geopolitics of Phosphorous. *Down to Earth: Science and Environment Fortnightly*, 27-31.
- Ruttenberg, K. (2003). The Global Phosphorus Cycle. *Treatise on Geochemistry* 8, 585-643.
- Rychter, A., and Rao, I. (Year). "7 Role of Phosphorus in Photosynthetic Carbon Metabolism".
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P., and Scheres, B. (1999). An Auxin-Dependent Distal Organizer of Pattern and Polarity in the Arabidopsis Root. *Cell* 99, 463-472.

- Sabatini, S., Heidstra, R., Wildwater, M., and Scheres, B. (2003). SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the Arabidopsis root meristem. *Genes Dev* 17, 354-358.
- Sample, E., Soper, R., and Racz, G. (1980). Reactions of phosphate fertilizers in soils. *The role of phosphorus in agriculture*, 263-310.
- Sánchez-Calderón, L., López-Bucio, J., Chacón-López, A., Cruz-Ramírez, A., Nieto-Jacobo, F., Dubrovsky, J.G., and Herrera-Estrella, L. (2005). Phosphate Starvation Induces a Determinate Developmental Program in the Roots of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* 46, 174-184.
- Sarkar, A.K., Luijten, M., Miyashima, S., Lenhard, M., Hashimoto, T., Nakajima, K., Scheres, B., Heidstra, R., and Laux, T. (2007). Conserved factors regulate signalling in Arabidopsis thaliana shoot and root stem cell organizers. *Nature* 446, 811-814.
- Savina, M.S., Pasternak, T., Omelyanchuk, N.A., Novikova, D.D., Palme, K., Mironova, V.V., and Lavrekha, V.V. (2020). Cell Dynamics in WOX5-Overexpressing Root Tips: The Impact of Local Auxin Biosynthesis. *Front. Plant Sci.* 11.
- Sbabou, L., Bucciarelli, B., Miller, S., Liu, J., Berhada, F., Filali-Maltouf, A., Allan, D., and Vance, C. (2010). Molecular analysis of SCARECROW genes expressed in white lupin cluster roots. *J. Exp. Bot.* 61, 1351-1363.
- Schachtman, D.P., Reid, R.J., and Ayling, S.M. (1998). Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell. *Plant Physiol.* 116, 447-453.
- Secco, D., Shou, H., Whelan, J., and Berkowitz, O. (2014). RNA-seq analysis identifies an intricate regulatory network controlling cluster root development in white lupin. *BMC Genomics* 15, 230.
- Shane, M.W., Cawthray, G.R., Cramer, M.D., Kuo, J., and Lambers, H. (2006). Specialized 'dauciform' roots of Cyperaceae are structurally distinct, but functionally analogous with 'cluster' roots. *Plant, Cell & Environment* 29, 1989-1999.
- Shane, M.W., and Lambers, H. (2005). Manganese accumulation in leaves of Hakea prostrata (Proteaceae) and the significance of cluster roots for micronutrient uptake as dependent on phosphorus supply. *Physiol. Plant.* 124, 441-450.
- Shen, J., Li, H., Neumann, G., and Zhang, F. (2005). Nutrient uptake, cluster root formation and exudation of protons and citrate in *Lupinus albus* as affected by localized supply of phosphorus in a split-root system. *Plant Science* 168, 837-845.
- Shimotomno, A., Heidstra, R., Blilou, I., and Scheres, B. (2018). Root stem cell niche organizer specification by molecular convergence of PLETHORA and SCARECROW transcription factor modules. *Genes & development* 32, 1085-1100.
- Shin, H., Shin, H.-S., Dewbre, G.R., and Harrison, M.J. (2004). Phosphate transport in Arabidopsis: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments. *The Plant Journal* 39, 629-642.
- Shinohara, H., and Matsubayashi, Y. (2018). "Analysis of PLETHORA Gradient Formation by Secreted Peptides During Root Development," in *Morphogen Gradients: Methods and Protocols*, ed. J. Dubrulle. (New York, NY: Springer New York), 155-164.
- Shinohara, H., Mori, A., Yasue, N., Sumida, K., and Matsubayashi, Y. (2016). Identification of three LRR-RKs involved in perception of root meristem growth factor in Arabidopsis. *PNAS* 113, 3897.
- Shishkova, S., Las Peñas, M., Napsucialy-Mendivil, S., Matvienko, M., Kozik, A., Montiel Gonzalez, J., Patiño, A., and Dubrovsky, J. (2013). Determinate primary root growth as

- an adaptation to aridity in Cactaceae: Towards an understanding of the evolution and genetic control of the trait. *Ann. Bot.* 112.
- Shishkova, S., Rost, T.L., and Dubrovsky, J.G. (2008). Determinate root growth and meristem maintenance in angiosperms. *Ann. Bot.* 101, 319-340.
- Shiu, S.-H., and Bleecker, A.B. (2001). Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *PNAS* 98, 10763.
- Sims, J.T. (1986). Soil pH Effects on the Distribution and Plant Availability of Manganese, Copper, and Zinc. *Soil Science Society of America Journal* 50, 367-373.
- Sirko, A., Wawrzyńska, A., Rodríguez, M.C., and Sęktas, P. (2015). The family of LSU-like proteins. *Front. Plant Sci.* 5.
- Skene, K.R. (1998). Cluster roots: some ecological considerations. *J. Ecol.* 86, 1060-1064.
- Skene, K.R. (2000). Pattern Formation in Cluster Roots: Some Developmental and Evolutionary Considerations. *Ann. Bot.* 85, 901-908.
- Smalle, J., and Van Der Straeten, D. (1997). Ethylene and vegetative development. *Physiol. Plant.* 100, 593-605.
- Smith, S.E., and Read, D.J. (2010). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic press.
- Smith, S.E., Read, D.J., and Catska, V. (1998). "Mycorrhizal symbiosis". Academic press San Diego^ eCA CA).
- Smith, S.E., Smith, F.A., and Jakobsen, I. (2003). Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiol.* 133, 16-20.
- Smith, V., Tilman, G., and Nekola, J. (1999). Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environmental pollution* 100 1-3, 179-196.
- Stahl, Y., Wink, R.H., Ingram, G.C., and Simon, R. (2009). A signaling module controlling the stem cell niche in *Arabidopsis* root meristems. *Curr Biol* 19, 909-914.
- Strohm, A.K., Baldwin, K.L., and Masson, P.H. (2012). Molecular mechanisms of root gravity sensing and signal transduction. *WIREs Developmental Biology* 1, 276-285.
- Su, Y.-H., Liu, Y.-B., and Zhang, X.-S. (2011). Auxin–Cytokinin Interaction Regulates Meristem Development. *Molecular Plant* 4, 616-625.
- Svistoonoff, S., Creff, A., Reymond, M., Sigoillot-Claude, C., Ricaud, L., Blanchet, A., Nussaume, L., and Desnos, T. (2007). Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nature Genetics* 39, 792-796.
- Szklarczyk, D., Gable, A.L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N.T., Morris, J.H., Bork, P., Jensen, L.J., and Mering, C.V. (2019). STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res* 47, D607-d613.
- Takahashi, N., Yamazaki, Y., Kobayashi, A., Higashitani, A., and Takahashi, H. (2003). Hydrotropism Interacts with Gravitropism by Degrading Amyloplasts in Seedling Roots of *Arabidopsis* and Radish. *Plant Physiol.* 132, 805-810.
- Tatry, M.-V., El Kassis, E., Lambilliotte, R., Corratgé, C., Van Aarle, I., Amenc, L.K., Alary, R., Zimmermann, S., Sentenac, H., and Plassard, C. (2009). Two differentially regulated phosphate transporters from the symbiotic fungus *Hebeloma cylindrosporum* and phosphorus acquisition by ectomycorrhizal *Pinus pinaster*. *The Plant Journal* 57, 1092-1102.

- Tian, H., Jia, Y., Niu, T., Yu, Q., and Ding, Z. (2014). The key players of the primary root growth and development also function in lateral roots in Arabidopsis. *Plant Cell Reports* 33, 745-753.
- Ticconi, C.A., Lucero, R.D., Sakhonwasee, S., Adamson, A.W., Creff, A., Nussaume, L., Desnos, T., and Abel, S. (2009). ER-resident proteins PDR2 and LPR1 mediate the developmental response of root meristems to phosphate availability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 14174-14179.
- Tiessen, H. (2008). "Phosphorus in the Global Environment.", 1-7.
- Tilman, D. (1999). Global environmental impacts of agricultural expansion: The need for sustainable and efficient practices. *PNAS* 96, 5995.
- Tiziani, R., Mimmo, T., Valentinuzzi, F., Pii, Y., Celletti, S., and Cesco, S. (2020). Root Handling Affects Carboxylates Exudation and Phosphate Uptake of White Lupin Roots. *Front. Plant Sci.* 11, 584568-584568.
- Tokizawa, M., Kobayashi, Y., Saito, T., Kobayashi, M., Iuchi, S., Nomoto, M., Tada, Y., Yamamoto, Y.Y., and Koyama, H. (2015). SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY1, CALMODULIN BINDING TRANSCRIPTION ACTIVATOR2, and Other Transcription Factors Are Involved in ALUMINUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER1 Expression *Plant Physiol.* 167, 991-1003.
- Tomasi, N., Kretzschmar, T., Espen, L., Weisskopf, L., Fuglsang, A., Palmgren, M., Neumann, G., Varanini, Z., Pinton, R., Martinoia, E., and Cesco, S. (2009). Plasma membrane H⁺-ATPase-dependent citrate exudation from cluster roots of phosphate-deficient white lupin. *Plant, Cell & Environment* 32, 465-475.
- Tomasi, N., Weisskopf, L., Renella, G., Landi, L., Pinton, R., Varanini, Z., Nannipieri, P., Torrent, J., Martinoia, E., and Cesco, S. (2008). Flavonoids of white lupin roots participate in phosphorus mobilization from soil. *Soil Biol. Biochem.* 40, 1971-1974.
- Trinh, C.D., Laplaze, L., and Guyomarc'h, S. (2018). "Lateral Root Formation: Building a Meristem de novo," in *Annu. Plant Rev. online.*, 847-890.
- Truernit, E., Siemering, K.R., Hodge, S., Grbic, V., and Haseloff, J. (2006). A Map of KNAT Gene Expression in the Arabidopsis Root. *Plant Molecular Biology* 60, 1-20.
- Uhde-Stone, C., Liu, J., Zinn, K.E., Allan, D.L., and Vance, C.P. (2005). Transgenic proteoid roots of white lupin: a vehicle for characterizing and silencing root genes involved in adaptation to P stress. *Plant J* 44, 840-853.
- Van Den Berg, C., Willemsen, V., Hage, W., Weisbeek, P., and Scheres, B. (1995). Cell fate in the Arabidopsis root meristem determined by directional signalling. *Nature* 378, 62-65.
- Van Den Berg, C., Willemsen, V., Hendriks, G., Weisbeek, P., and Scheres, B. (1997). Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem. *Nature* 390, 287-289.
- Vance, C.P., Uhde-Stone, C., and Allan, D.L. (2003). Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol.* 157, 423-447.
- Vejchasarn, P., Lynch, J.P., and Brown, K.M. (2016). Genetic Variability in Phosphorus Responses of Rice Root Phenotypes. *Rice* 9, 29.
- Verbelen, J.P., De Cnodder, T., Le, J., Vissenberg, K., and Baluska, F. (2006). The Root Apex of Arabidopsis thaliana Consists of Four Distinct Zones of Growth Activities: Meristematic Zone, Transition Zone, Fast Elongation Zone and Growth Terminating Zone. *Plant Signal Behav* 1, 296-304.

- Vert, G.G., Grotz, N., Dédaldé-Champ, F., Gaymard, F.D.R., Guerinot, M.L., Briat, J.-F.O., and Curie, C. (2002). IRT1, an Arabidopsis Transporter Essential for Iron Uptake from the Soil and for Plant Growth. *Plant Cell* 14, 1223-1233.
- Vijayakumar, P., Datta, S., and Dolan, L. (2016). ROOT HAIR DEFECTIVE SIX-LIKE4 (RSL4) promotes root hair elongation by transcriptionally regulating the expression of genes required for cell growth. *New Phytol.* 212, 944-953.
- Vissenberg, K., Claeijs, N., Balcerowicz, D., and Schoenaers, S. (2020). Hormonal regulation of root hair growth and responses to the environment in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 71, 2412-2427.
- Wang, B.L., Tang, X.Y., Cheng, L.Y., Zhang, A.Z., Zhang, W.H., Zhang, F.S., Liu, J.Q., Cao, Y., Allan, D.L., Vance, C.P., and Shen, J.B. (2010). Nitric oxide is involved in phosphorus deficiency-induced cluster-root development and citrate exudation in white lupin. *New Phytol.* 187, 1112-1123.
- Wang, L., Li, Z., Qian, W., Guo, W., Gao, X., Huang, L., Wang, H., Zhu, H., Wu, J.-W., Wang, D., and Liu, D. (2011). The Arabidopsis Purple Acid Phosphatase AtPAP10 Is Predominantly Associated with the Root Surface and Plays an Important Role in Plant Tolerance to Phosphate Limitation. *Plant Physiol.* 157, 1283-1299.
- Wang, Z., Straub, D., Yang, H., Kania, A., Shen, J., Ludewig, U., and Neumann, G. (2014). The regulatory network of cluster-root function and development in phosphate-deficient white lupin (*Lupinus albus*) identified by transcriptome sequencing. *Physiol. Plant.* 151, 323-338.
- Wasaki, J., Yamamura, T., Shinano, T., and Osaki, M. (2003). Secreted acid phosphatase is expressed in cluster roots of lupin in response to phosphorus deficiency. *Plant Soil* 248, 129-136.
- Waters, B.M., Blevins, D.G., and Eide, D.J. (2002). Characterization of FRO1, a Pea Ferric-Chelate Reductase Involved in Root Iron Acquisition. *Plant Physiol.* 129, 85-94.
- Watt, M., and Evans, J.R. (1999). Proteoid Roots. Physiology and Development. *Plant Physiol.* 121, 317-323.
- Weisskopf, L., Abou-Mansour, E., Fromin, N., Tomasi, N., Santelia, D., Edelkott, I., Neumann, G., Aragno, M., Tabacchi, R., and Martinoia, E. (2006). White lupin has developed a complex strategy to limit microbial degradation of secreted citrate required for phosphate acquisition. *Plant, Cell & Environment* 29, 919-927.
- Whitford, R., Fernandez, A., Tejos, R., Pérez, Amparo c., Kleine-Vehn, J., Vanneste, S., Drozdzecki, A., Leitner, J., Abas, L., Aerts, M., Hoogewijs, K., Baster, P., De groodt, R., Lin, Y.-C., Storme, V., Van de peer, Y., Beeckman, T., Madder, A., Devreese, B., Luschnig, C., Friml, J., and Hilson, P. (2012). GOLVEN Secretory Peptides Regulate Auxin Carrier Turnover during Plant Gravitropic Responses. *Dev. Cell* 22, 678-685.
- Willemsen, V., Bauch, M., Bennett, T., Campilho, A., Wolkenfelt, H., Xu, J., Haseloff, J., and Scheres, B. (2008). The NAC Domain Transcription Factors FEZ and SOMBRERO Control the Orientation of Cell Division Plane in Arabidopsis Root Stem Cells. *Dev. Cell* 15, 913-922.
- Williamson, L.C., Ribrioux, S.P.C.P., Fitter, A.H., and Leyser, H.M.O. (2001). Phosphate Availability Regulates Root System Architecture in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 126, 875-882.
- Xiao, K., Katagi, H., Harrison, M., and Wang, Z.-Y. (2006). Improved phosphorus acquisition and biomass production in Arabidopsis by transgenic expression of a purple acid phosphatase gene from *M. truncatula*. *Plant Science* 170, 191-202.

- Yi, K., Menand, B., Bell, E., and Dolan, L. (2010). A basic helix-loop-helix transcription factor controls cell growth and size in root hairs. *Nat Genet* 42, 264-267.
- Zhang, S., Huang, L., Yan, A., Liu, Y., Liu, B., Yu, C., Zhang, A., Schiefelbein, J., and Gan, Y. (2016). Multiple phytohormones promote root hair elongation by regulating a similar set of genes in the root epidermis in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 67, 6363-6372.
- Zhang, Y., Jiao, Y., Liu, Z., and Zhu, Y.X. (2015). ROW1 maintains quiescent centre identity by confining WOX5 expression to specific cells. *Nat Commun* 6, 6003.
- Zhang, Z., Liao, H., and Lucas, W.J. (2014). Molecular mechanisms underlying phosphate sensing, signaling, and adaptation in plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 56, 192-220.
- Zhou, W., Wei, L., Xu, J., Zhai, Q., Jiang, H., Chen, R., Chen, Q., Sun, J., Chu, J., Zhu, L., Liu, C.M., and Li, C. (2010). Arabidopsis Tyrosylprotein sulfotransferase acts in the auxin/PLETHORA pathway in regulating postembryonic maintenance of the root stem cell niche. *Plant Cell* 22, 3692-3709.
- Zhu, J., Kaeppeler, S.M., and Lynch, J.P. (2005). Topsoil foraging and phosphorus acquisition efficiency in maize (*Zea mays*). *Functional Plant Biology* 32, 749-762.
- Zinn, K.E., Liu, J., Allan, D.L., and Vance, C.P. (2009). White Lupin (*Lupinus albus*) response to phosphorus stress: evidence for complex regulation of LaSAP1. *Plant Soil* 322, 1-15.

Annexes

A

Code échantillon	Concentration nanodrop (ng/μl)	ratio 260/280	ratio 260/230	RIN	28S/18S
LR10	210	2,07	2,22	4,7	0,2
LR6	326,8	2,08	2,22	5,2	0,1
LR7	123,8	1,76	0,82	7,8	1,3
LR8	174,9	2	2,08	5,6	0,6
NR10	348,2	2,1	2,22	8,2	1
NR6	387,3	2,04	1,98	5,4	0,1
NR7	54,81	2,07	1,16	7,2	1,2
NR8	41,46	1,96	1,2	7,2	1,2
TIP10	531,2	1,99	2,17	7,5	0,4
TIP6	426,4	1,98	2,05	7,4	0,4
TIP7	438,8	2,03	2,16	8,2	0,6
TIP8	378,2	2,08	2,52	6,9	0,5

B

Tissues	sample	total reads	reads after trimming	properly mapped reads	%
Long Rootlets	LR10	72360322	72360020	69367418	95,9
	LR6	64691436	64690966	62050292	95,9
	LR7	65618718	65618272	59824120	91,2
	LR8	71453052	71452660	68977964	96,5
Normal Rootlets	NR10	71250842	71250560	67946122	95,4
	NR6	61213736	61213336	58502656	95,6
	NR7	61811996	61811552	55768506	90,2
	NR8	69462036	69461630	65625316	94,5
Proteoïd Apex	TIP10	93299604	93299164	88517472	94,9
	TIP6	50590020	50589778	45127210	89,2
	TIP7	50458164	50457904	46756100	92,7
	TIP8	56369572	56369070	51119456	90,7
	Total	788579498	788574912	739582632	93,8

Table 1 : Qualité des ARNs et du séquençage des échantillons du jeu de données transcriptomiques « Longues rootlettes ». (A) Informations liées à la qualité des ARNs des échantillons. (B) Informations liées à la qualité du séquençage des échantillons.

Régulation	Lupin blanc gène ID	LogFC	<i>A. thaliana</i> homologue gène ID	Symbole
Négative	Lalb_Chr04g0264281	-10,97	AT4G25160	PUB35
	Lalb_Chr06g0176401	-9,73	na	na
	Lalb_Chr10g0094631	-8,66	AT2G32830.1	PHOSPHATE TRANSPORTER 1;5, PHOSPHATE TRANSPORTER 5, PHT1;5, PHT5
	Lalb_Chr18g0053931	-8,06	AT1G65690.1	NDRI/HIN1-LIKE 6, NHL6
	Lalb_Chr17g0339341	-7,43	AT1G01580.1	ATFRO2, FERRIC CHELATE REDUCTASE DEFECTIVE 1, FERRIC REDUCTION OXIDASE 2, FRD1, FRO2
	Lalb_Chr19g0137931	-7,35	AT5G60020.1	ATLAC17, LAC17, LACCASE 17
	Lalb_Chr08g0245581	-7,27	AT1G21140.1	ATVTL1, VACUOLAR IRON TRANSPORTER-LIKE 1, VTL1
	Lalb_Chr17g0339251	-6,99	AT1G01580.1	ATFRO2, FERRIC CHELATE REDUCTASE DEFECTIVE 1, FERRIC REDUCTION OXIDASE 2, FRD1, FRO2
	Lalb_Chr10g0091121	-6,87	AT5G13420.1	GLC-HYPERSENSITIVE MUTANT 2, GSM2, TRA2, TRANSALDOLASE 2
	Lalb_Chr14g0374421	-6,85	AT2G28160.1	ARABIDOPSIS FE-DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR 1, ATBHLH029, ATBHLH29, ATFIT1, BASIC HELIX-LOOP-HELIX PROTEIN 29, BHLH029, FE-DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR 1, FER-LIKE IRON DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR, FER-LIKE REGULATOR OF IRON UPTAKE, FIT, FIT1, FRU
	Lalb_Chr14g0374401	-6,82	AT2G28160.1	ARABIDOPSIS FE-DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR 1, ATBHLH029, ATBHLH29, ATFIT1, BASIC HELIX-LOOP-HELIX PROTEIN 29, BHLH029, FE-DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR 1, FER-LIKE IRON DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR, FER-LIKE REGULATOR OF IRON UPTAKE, FIT, FIT1, FRU
	Lalb_Chr17g0339321	-6,58	AT1G01580.1	ATFRO2, FERRIC CHELATE REDUCTASE DEFECTIVE 1, FERRIC REDUCTION OXIDASE 2, FRD1, FRO2
	Lalb_Chr23g0271221	-6,36	AT2G02040.1	ARABIDOPSIS THALIANA PEPTIDE TRANSPORTER 2, ATNPF8.3, ATPTR2, ATPTR2-B, NITRATE TRANSPORTER 1, NPF8.3, NRT1/ PTR FAMILY 8.3, NTR1, PEPTIDE TRANSPORTER 2, PTR2, PTR2-B
	Lalb_Chr04g0261771	-6,35	AT5G41761.1	
	Lalb_Chr18g0052421	-6,30	AT4G23160.1	CRK8, CYSTEINE-RICH RLK (RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE) 8
	Lalb_Chr20g0116481	-6,29	AT1G21280.1	
	Lalb_Chr10g0091111	-6,22	AT5G13420.1	GLC-HYPERSENSITIVE MUTANT 2, GSM2, TRA2, TRANSALDOLASE 2
	Lalb_Chr17g0336431	-5,92	AT2G32750.1	
	Lalb_Chr06g0171791	-5,91	AT5G28640.1	AN3, ANGUSTIFOLIA 3, ARABIDOPSIS GRF1-INTERACTING FACTOR 1, ATGIF1, GIF, GIF1, GRF1-INTERACTING FACTOR, GRF1-INTERACTING FACTOR 1
	Lalb_Chr05g0223261	-5,89	AT4G29140.1	ABS3, ACTIVATED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1, ADP1, ADS1, ALTERED DEVELOPMENT PROGRAM 1, ARABIDOPSIS ABNORMAL SHOOT3
	Lalb_Chr05g0218701	-5,88	AT2G29120.1	ATGLR2.7, GLR2.7, GLUTAMATE RECEPTOR 2.7, GLUTAMATE RECEPTOR 2.7
	Lalb_Chr08g0240731	-5,80	AT1G21360.1	GLTP2, GLYCOLIPID TRANSFER PROTEIN 2
	Lalb_Chr11g0069291	-5,73	AT5G50915.1	CKG, CYTOKININ-RESPONSIVE GROWTH REGULATOR
	Lalb_Chr02g0142181	-5,60	AT5G60660.1	PIP2;4, PIP2F, PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 2;4
	Lalb_Chr20g0117951	-5,56	AT2G16430.2	ATPAP10, PAP10, PHOSPHATASE UNDERPRODUCER 1, PUP1, PURPLE ACID PHOSPHATASE 10
	Lalb_Chr02g0151441	-5,54	AT2G36380.1	ABCG34, ATABCG34, ATP-BINDING CASSETTE G34, ATPDR6, PDR6, PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 6
	Lalb_Chr19g0124281	-5,53	AT1G07080.1	
	Lalb_Chr02g0157921	-5,42	AT4G36140.1	
	Lalb_Chr16g0385881	-5,37	AT4G37810.1	ATEPFL2, EPFL2
	Lalb_Chr20g0117991	-5,30	AT2G16430.2	ATPAP10, PAP10, PHOSPHATASE UNDERPRODUCER 1, PUP1, PURPLE ACID PHOSPHATASE 10
	Lalb_Chr10g0102971	-5,30	AT5G24660.1	LSU2, RESPONSE TO LOW SULFUR 2
	Lalb_Chr20g0117941	-5,30	AT2G16430.2	ATPAP10, PAP10, PHOSPHATASE UNDERPRODUCER 1, PUP1, PURPLE ACID PHOSPHATASE 10
	Lalb_Chr20g0117931	-5,28	AT2G16430.2	ATPAP10, PAP10, PHOSPHATASE UNDERPRODUCER 1, PUP1, PURPLE ACID PHOSPHATASE 10
	Lalb_Chr24g0399811	-5,10	AT4G10270.1	WIP4, WOUND-INDUCED POLYPEPTIDE 4
	Lalb_Chr20g0117961	-5,06	AT2G16430.2	ATPAP10, PAP10, PHOSPHATASE UNDERPRODUCER 1, PUP1, PURPLE ACID PHOSPHATASE 10
	Lalb_Chr01g0023681	-5,01	AT2G30400.1	ARABIDOPSIS THALIANA OVATE FAMILY PROTEIN 2, ATOFP2, OFP2, OVATE FAMILY PROTEIN 2
	Lalb_Chr02g0142171	-5,01	AT2G37170.1	PIP2;2, PIP2B, PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 2, PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 2;2
	Lalb_Chr25g0285901	-5,00	AT3G14940.1	ATPPC3, PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE 3, PPC3
	Lalb_Chr04g0249791	-4,99	AT5G20960.1	AAO1, ALDEHYDE OXIDASE 1, ALDEHYDE OXIDASE ALPHA, AO1, AOALPHA, ARABIDOPSIS THALIANA ALDEHYDE OXIDASE 1, AT-AO1, ATAO, ATAO1
	Lalb_Chr20g0108651	-4,84	AT3G12900.1	S8H, SCOPLETIN 8- HYDROXYLASE
	Lalb_Chr17g0346051	-4,83	AT5G37600.1	ARABIDOPSIS GLUTAMINE SYNTHASE 1;1, ARABIDOPSIS THALIANA GLUTAMINE SYNTHASE CLONE R1, ATGLN1;1, ATGSR1, GLN1;1, GLUTAMINE SYNTHASE 1;1, GLUTAMINE SYNTHASE CLONE R1, GSR 1
	Lalb_Chr14g0375781	-4,77	AT3G21690.1	
	Lalb_Chr02g0145381	-4,74	AT1G71040.1	LOW PHOSPHATE ROOT2, LPR2
	Lalb_Chr09g0329071	-4,70	AT3G03080.1	
	Lalb_Chr09g0322101	-4,48	AT3G51060.1	ATSTY1, SHI RELATED SEQUENCE 1, SRS1, STY1, STYLISH 1
	Lalb_Chr07g0188001	-4,45	AT2G30070.1	ATKT1, ATKT1P, ATKUP1, KT1, KUP1, POTASSIUM TRANSPORTER 1, POTASSIUM UPTAKE TRANSPORTER 1
	Lalb_Chr20g0116471	-4,45	AT2G24520.1	AHA5, H(+)-ATPASE 5, HA5
	Lalb_Chr13g0290931	-4,44	AT3G13610.1	F6'H1
	Lalb_Chr05g0221831	-4,42	AT5G60530.1	
	Lalb_Chr06g0160871	-4,38	AT1G24260.2	AGAMOUS-LIKE 9, AGL9, SEP3, SEPALLATA3

Table 2 : Les 50 gènes les plus sous-exprimés dans la condition LR comparé à la condition NR.

Régulation	White lupin gène ID	LogFC	<i>A. thaliana</i> homologue gène ID	Symbole
Négative	Lalb_Ch17g0339251	-17,95	AT1G01580.1	ATFRO2, FERRIC CHELATE REDUCTASE DEFECTIVE 1, FERRIC REDUCTION OXIDASE 2, FRD1, FRO2
	Lalb_Ch17g0339341	-15,76	AT1G01580.1	ATFRO2, FERRIC CHELATE REDUCTASE DEFECTIVE 1, FERRIC REDUCTION OXIDASE 2, FRD1, FRO2
	Lalb_Ch13g0300931	-15,33	AT2G24270.4	ALDEHYDE DEHYDROGENASE 11A3, ALDH11A3
	Lalb_Ch18g0059121	-15,09	AT1G68810.1	ABNORMAL SHOOT 5, ABS5, T5L1, TMO5-LIKE1
	Lalb_Ch03g0032611	-15,01	AT5G07050.1	UMAMIT9, USUALLY MULTIPLE ACIDS MOVE IN AND OUT TRANSPORTERS 9
	Lalb_Ch04g0257661	-14,73	AT4G37340.1	CYP81D3, CYTOCHROME P450, FAMILY 81, SUBFAMILY D, POLYPEPTIDE 3
	Lalb_Ch20g0108651	-14,67	AT3G12900.1	S8H, SCOPOLETIN 8- HYDROXYLASE
	Lalb_Ch10g0094631	-14,62	AT2G32830.1	PHOSPHATE TRANSPORTER 1;5, PHOSPHATE TRANSPORTER 5, PHT1;5, PHT5
	Lalb_Ch02g0149651	-14,61	AT4G00910.1	
	Lalb_Ch17g0339321	-14,52	AT1G01580.1	ATFRO2, FERRIC CHELATE REDUCTASE DEFECTIVE 1, FERRIC REDUCTION OXIDASE 2, FRD1, FRO2
	Lalb_Ch24g0393761	-13,96	AT4G10310.1	ATHKT1, HIGH-AFFINITY K+ TRANSPORTER 1, HKT1, HKT1;1
	Lalb_Ch08g0232401	-13,85	AT5G19890.1	
	Lalb_Ch13g0291001	-13,50	AT2G38600.1	
	Lalb_Ch10g0101861	-13,39	AT4G08290.1	UMAMIT20, USUALLY MULTIPLE ACIDS MOVE IN AND OUT TRANSPORTERS 20
	Lalb_Ch07g0184591	-13,09	na	
	Lalb_Ch07g0183271	-12,92	AT5G03860.1	MALATE SYNTHASE, MLS
	Lalb_Ch08g0245581	-12,78	AT3G43660.1	
	Lalb_Ch20g0108581	-12,73	AT1G79180.1	ATMYB63, MYB DOMAIN PROTEIN 63, MYB63
	Lalb_Ch18g0052421	-12,73	AT4G23160.1	CRK8, CYSTEINE-RICH RLK (RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE) 8
	Lalb_Ch04g0257631	-12,62	AT1G66840.1	PLASTID MOVEMENT IMPAIRED 2, PMI2, WEAK CHLOROPLAST MOVEMENT UNDER BLUE LIGHT 2, WEB2
	Lalb_Ch04g0261771	-12,59	AT5G41761.1	
	Lalb_Ch14g0374421	-12,33	AT2G28160.1	ARABIDOPSIS FE-DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR 1, ATBHLH029, ATBHLH29, ATFIT1, BASIC HELIX-LOOP-HELIX PROTEIN 29, BHLH029, FE-DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR 1, FER-LIKE IRON DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR, FER-LIKE REGULATOR OF IRON UPTAKE, FIT, FIT1, FRU
	Lalb_Ch17g0336431	-11,98	AT2G32750.1	
	Lalb_Ch07g0182301	-11,95	AT3G25730.1	EDF3, ETHYLENE RESPONSE DNA BINDING FACTOR 3
	Lalb_Ch07g0194701	-11,86	AT1G43760.1	
	Lalb_Ch17g0346061	-11,76	AT2G01670.1	ATNUDT17, NUDIX HYDROLASE HOMOLOG 17, NUDT17
	Lalb_Ch08g0240731	-11,68	AT1G21360.1	GLTP2, GLYCOLIPID TRANSFER PROTEIN 2
	Lalb_Ch20g0120911	-11,58	AT4G16260.1	
	Lalb_Ch01g0023681	-11,48	AT2G30400.1	ARABIDOPSIS THALIANA OVATE FAMILY PROTEIN 2, ATOFFP2, OFFP2, OVATE FAMILY PROTEIN 2
	Lalb_Ch10g0101851	-11,45	AT4G08290.1	UMAMIT20, USUALLY MULTIPLE ACIDS MOVE IN AND OUT TRANSPORTERS 20
	Lalb_Ch14g0374401	-11,42	AT2G28160.1	ARABIDOPSIS FE-DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR 1, ATBHLH029, ATBHLH29, ATFIT1, BASIC HELIX-LOOP-HELIX PROTEIN 29, BHLH029, FE-DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR 1, FER-LIKE IRON DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR, FER-LIKE REGULATOR OF IRON UPTAKE, FIT, FIT1, FRU
	Lalb_Ch13g0302171	-11,38	AT5G38550.1	
	Lalb_Ch18g0058761	-11,37	AT5G10600.1	CYP81K2, CYTOCHROME P450, FAMILY 81, SUBFAMILY K, POLYPEPTIDE 2
	Lalb_Ch05g0222511	-11,35	AT1G25440.1	B-BOX DOMAIN PROTEIN 15, BBX15, COL16
	Lalb_Ch18g0053931	-11,34	AT1G65690.1	NDR1/HIN1-LIKE 6, NHL6
	Lalb_Ch10g0100911	-11,24	AT5G54160.1	ATCOMT, ATOMT1, CAFFEATE O-METHYLTRANSFERASE 1, COMT1, O-METHYLTRANSFERASE 1, O-METHYLTRANSFERASE 3, OMT1, OMT3
	Lalb_Ch03g0036441	-11,18	AT4G32090.1	
	Lalb_Ch25g0287021	-11,15	AT5G20550.1	
	Lalb_Ch10g0097131	-11,13	AT2G45830.1	DOWNSTREAM TARGET OF AGL15 2, DTA2
	Lalb_Ch05g0218741	-11,05	AT5G60590.2	
	Lalb_Ch12g0200641	-10,97	AT3G53480.1	ABCG37, ATP-BINDING CASSETTE G37, ATPDR9, PDR9, PIS1, PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 9, POLAR AUXIN TRANSPORT INHIBITOR SENSITIVE 1
	Lalb_Ch22g0353101	-10,96	AT3G18400.1	ANAC058, NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 58, NAC058
	Lalb_Ch08g0244401	-10,91	na	
	Lalb_Ch10g0106301	-10,83	AT5G12330.4	LATERAL ROOT PRIMORDIUM 1, LRP1
	Lalb_Ch18g0059211	-10,83	AT1G73165.1	CLAVATA3/ESR-RELATED 1, CLE1
	Lalb_Ch03g0034921	-10,81	AT1G01490.1	ATHMP01, HEAVY METAL PROTEIN 1
	Lalb_Ch11g0069291	-10,77	AT5G50915.1	CKG, CYTOKININ-RESPONSIVE GROWTH REGULATOR
	Lalb_Ch08g0240741	-10,76	AT1G70260.1	RESISTANCE TO PHYTOPHTHORA PARASITICA 1, RTP1, UMAMIT36, USUALLY MULTIPLE ACIDS MOVE IN AND OUT TRANSPORTERS 36
	Lalb_Ch03g0032861	-10,73	AT5G12380.1	ANN8, ANNAT8, ANNEXIN 8
	Lalb_Ch08g0240751	-10,66	AT1G60050.1	MtN21

Table 3 : Les 50 gènes les plus sous-exprimés dans la condition TIP comparé à la condition NR.

Régulation	White lupin gène ID	LogFC	<i>A. thaliana</i> homologue gène ID	Symbole
Positive	Lalb_Ch04g0255371	10,91	AT2G04025.1	RGF2 ROOT MERISTEM GROWTH FACTOR-LIKE 2
	Lalb_Ch02g0143211	10,31	AT4G15802.1	ARABIDOPSIS THALIANA HEAT SHOCK FACTOR BINDING PROTEIN, ATHSBP, HEAT SHOCK FACTOR BINDING PROTEIN, HSBP
	Lalb_Ch21g0311841	8,65	AT5G62280.1	
	Lalb_Ch18g0048471	8,58	AT1G71380.1	ARABIDOPSIS THALIANA GLYCOSYL HYDROLASE 9B3, ATCEL3, ATGH9B3, CEL3, CELLULASE 3
	Lalb_Ch17g0347051	8,36	AT2G40435.1	
	Lalb_Ch15g0083861	8,26	AT1G31040.1	ORE15, ORESARA15, PLATZ3
	Lalb_Ch14g0366711	8,26	AT1G61170.1	
	Lalb_Ch17g0341561	8,09	AT2G04025.1	GLV7, GOLVEN 7, RGF3, ROOT MERISTEM GROWTH FACTOR 3
	Lalb_Ch09g0333721	8,00	AT5G66815.1	C-TERMINALLY ENCODED PEPTIDE 5, CEP5
	Lalb_Ch13g0303321	7,99	AT1G74500.1	ACTIVATION-TAGGED BRI1(BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1)-SUPPRESSOR 1, ATBS1, BASIC HELIX-LOOP-HELIX PROTEIN 135, BHLH135, BS1, PACLOBUTRAZOL RESISTANCE 3, PRE3, TARGET OF MONOPTEROS 7, TMO7
	Lalb_Ch09g0324471	7,89	AT1G62790.1	GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL-ANCHORED LIPID PROTEIN TRANSFER 7, LTPG7
	Lalb_Ch04g0262091	7,82	AT5G63700.1	
	Lalb_Ch12g0202301	7,81	AT5G50740.3	ATHMP52, HEAVY METAL ASSOCIATED PROTEIN 52
	Lalb_Ch08g0230841	7,73	AT3G26120.1	TEL1, TERMINAL EAR1-LIKE 1
	Lalb_Ch19g0139631	7,63	AT3G22200.2	GABA-T, GAMMA-AMINOBUTYRATE TRANSAMINASE, HER1, HEXENAL RESPONSE1, POLLEN-PISTIL INCOMPATIBILITY 2, POP2
	Lalb_Ch18g0044001	7,57	AT5G28640.1	AN3, ANGUSTIFOLIA 3, ARABIDOPSIS GRF1-INTERACTING FACTOR 1, ATGIF1, GIF, GIF1, GRF1-INTERACTING FACTOR, GRF1-INTERACTING FACTOR 1
	Lalb_Ch07g0177601	7,54	AT5G18560.1	PUCHI
	Lalb_Ch13g0301271	7,53	AT4G16515.1	CLE-LIKE 6, CLEL 6, GLV1, GOLVEN 1, RGF6, ROOT MERISTEM GROWTH FACTOR 6
	Lalb_Ch03g0036081	7,45	AT1G04220.1	3-KETOACYL-COA SYNTHASE 2, DAISY, KCS2
	Lalb_Ch16g0391481	7,42	AT5G42180.1	PER64, PEROXIDASE 64, PRX64
	Lalb_Ch11g0073261	7,30	AT2G43880.1	
	Lalb_Ch21g0308011	7,29	AT4G33800.1	
	Lalb_Ch01g0009671	7,21	AT5G24090.1	ATCHIA, CHIA, CHITINASE A, LYS1, LYSOZYME 1
	Lalb_Ch05g0220561	7,19	AT1G32540.1	LOL1, LSD ONE LIKE 1
	Lalb_Ch07g0187051	7,13	AT5G08391.1	
	Lalb_Ch05g0210841	7,11	AT4G05200.1	CRK25, CYSTEINE-RICH RLK (RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE) 25
	Lalb_Ch18g0058451	7,06	AT1G48100.1	PGX3, POLYGALACTURONASE INVOLVED IN EXPANSION3
	Lalb_Ch07g0190421	7,06	AT2G38540.1	ARABIDOPSIS THALIANA LIPID TRANSFER PROTEIN 1, ATLTP1, ATLTP1-4, LIPID TRANSFER PROTEIN 1, LP1, LTP1
	Lalb_Ch01g0020931	6,98	AT4G14750.1	IQ-DOMAIN 19, IQD19
	Lalb_Ch12g0201341	6,93	AT3G48160.2	DEL1, DP-E2F-LIKE 1, E2F-LIKE 3, E2FE, E2L3
	Lalb_Ch08g0233631	6,90	na	
	Lalb_Ch13g0301301	6,88	AT1G80530.1	
	Lalb_Ch06g0172641	6,82	AT3G52440.1	
	Lalb_Ch18g0060801	6,82	AT5G13170.1	ATSWEET15, SAG29, SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 29, SWEET15
	Lalb_Ch14g0370191	6,79	AT1G17860.1	ARABIDOPSIS THALIANA KUNITZ TRYPSIN INHIBITOR 5, ATKTI5
	Lalb_Ch24g0393541	6,77	na	
	Lalb_Ch13g0303751	6,75	AT5G18560.1	PUCHI
	Lalb_Ch23g0270311	6,74	AT1G72210.1	BHLH096, BHLH96
	Lalb_Ch22g0357151	6,70	AT5G54630.1	
	Lalb_Ch22g0352821	6,67	AT3G29300.1	
	Lalb_Ch14g0375681	6,66	AT1G05280.1	
	Lalb_Ch23g0270211	6,66	AT1G72210.1	BHLH096, BHLH96
	Lalb_Ch16g0382101	6,56	AT1G23380.2	KNAT6, KNAT6L, KNAT6S, KNOTTED1-LIKE HOMEBOX GENE 6
	Lalb_Ch21g0311921	6,53	AT4G14640.1	ATCML8, CALMODULIN 8, CALMODULIN-LIKE 8, CAM8, CML8
	Lalb_Ch20g0110271	6,46	AT1G74670.1	GA-STIMULATED ARABIDOPSIS 6, GASA6
	Lalb_Ch18g0054951	6,43	AT5G52800.3	PRIMPOL
	Lalb_Ch11g0070471	6,38	AT1G23380.2	KNAT6, KNAT6L, KNAT6S, KNOTTED1-LIKE HOMEBOX GENE 6
	Lalb_Ch16g0378261	6,38	AT2G23440.1	C-TERMINALLY ENCODED PEPTIDE 3, CEP3
	Lalb_Ch09g0334181	6,36	AT4G12520.1	
	Lalb_Ch08g0231441	6,35	AT3G51740.1	IMK2, INFLORESCENCE MERISTEM RECEPTOR-LIKE KINASE 2

Table 4 : Les 50 gènes les plus sur-exprimés dans la condition LR comparé à la condition NR.

Régulation	White lupin gène ID	LogFC	<i>A. thaliana</i> homologue gène ID	Symbole
Positive	Lalb_Chr04g0255371	12,82	AT2G04025.1	RGF2 ROOT MERISTEM GROWTH FACTOR-LIKE 2
	Lalb_Chr13g0303321	12,04	AT1G74500.1	ACTIVATION-TAGGED BRI1(BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1)-SUPPRESSOR 1, ATBS1, BASIC HELIX-LOOP-HELIX PROTEIN 135, BHLH135, BS1, PACLOBUTRAZOL RESISTANCE 3, PRE3, TARGET OF MONOPTEROS 7, TMO7
	Lalb_Chr02g0143211	12,04	AT4G15802.1	ARABIDOPSIS THALIANA HEAT SHOCK FACTOR BINDING PROTEIN, ATHSBP, HEAT SHOCK FACTOR BINDING PROTEIN, HSBP
	Lalb_Chr12g0202301	11,91	AT5G50740.3	ATHMP52, HEAVY METAL ASSOCIATED PROTEIN 52
	Lalb_Chr17g0347051	11,68	AT2G40435.1	
	Lalb_Chr18g0048471	11,62	AT1G71380.1	ARABIDOPSIS THALIANA GLYCOSYL HYDROLASE 9B3, ATCEL3, ATGH9B3, CEL3, CELLULASE 3
	Lalb_Chr21g0311841	11,18	AT5G62280.1	
	Lalb_Chr07g0177601	11,13	AT5G18560.1	PUCHI
	Lalb_Chr13g0303751	10,85	AT5G18560.1	PUCHI
	Lalb_Chr09g0333721	10,82	AT5G66815.1	C-TERMINALLY ENCODED PEPTIDE 5, CEP5
	Lalb_Chr08g0246241	10,70	AT1G20190.1	ATEXP11, ATEXPA11, ATHEXP ALPHA 1.14, EXP11, EXPA11, EXPANSIN 11, EXPANSIN 11
	Lalb_Chr18g0058451	10,60	AT1G48100.1	PGX3, POLYGALACTURONASE INVOLVED IN EXPANSION3
	Lalb_Chr14g0366711	10,48	AT1G61170.1	
	Lalb_Chr17g0341561	10,39	AT2G04025.1	RGF2 ROOT MERISTEM GROWTH FACTOR-LIKE 2
	Lalb_Chr09g0334181	10,09	AT4G12520.1	
	Lalb_Chr13g0301271	10,05	AT3G25480.1	
	Lalb_Chr04g0262091	10,00	AT5G63700.1	
	Lalb_Chr08g0230841	10,00	AT3G26120.1	TEL1, TERMINAL EAR1-LIKE 1
	Lalb_Chr19g0133921	9,93	AT2G31083.1	ATCLE5, CLAVATA3/ESR-RELATED 5, CLE5
	Lalb_Chr15g0083861	9,88	AT1G31040.1	ORE15, ORESARA15, PLATZ3
	Lalb_Chr01g0006711	9,88	AT2G31085.1	ATCLE6, CLAVATA3/ESR-RELATED 6, CLE6
	Lalb_Chr19g0139631	9,85	AT3G22200.2	GABA-T, GAMMA-AMINOBUTYRATE TRANSAMINASE, HER1, HEXENAL RESPONSE1, POLLEN-PISTIL INCOMPATIBILITY 2, POP2
	Lalb_Chr18g0044001	9,82	AT5G28640.1	AN3, ANGUSTIFOLIA 3, ARABIDOPSIS GRF1-INTERACTING FACTOR 1, ATGIF1, GIF, GIF1, GRF1-INTERACTING FACTOR, GRF1-INTERACTING FACTOR 1
	Lalb_Chr03g0036081	9,72	AT1G04220.1	3-KETOACYL-COA SYNTHASE 2, DAISY, KCS2
	Lalb_Chr01g0022531	9,68	AT2G39700.1	ATEXP4, ATEXPA4, ATHEXP ALPHA 1.6, EXPA4, EXPANSIN A4, XPA4
	Lalb_Chr11g0070471	9,60	AT1G23380.2	KNAT6, KNAT6L, KNAT6S, KNOTTED1-LIKE HOMEBOX GENE 6
	Lalb_Chr14g0364931	9,59	AT1G69560.1	ATMYB105, LATERAL ORGAN FUSION 2, LOF2, MYB DOMAIN PROTEIN 105, MYB105
	Lalb_Chr22g0357151	9,49	AT5G54630.1	
	Lalb_Chr22g0352821	9,47	AT3G29300.1	
	Lalb_Chr25g0281701	9,45	AT1G43800.1	AAD6, ACYL?ACYL CARRIER PROTEIN (ACP) DESATURASE 6, FLORAL TRANSITION AT THE MERISTEM1, FTM1, HUP7, HYPOXIA RESPONSE UNKNOWN PROTEIN 7, SAD6, STEAROYL-ACYL CARRIER PROTEIN Δ9-DESATURASE6
	Lalb_Chr21g0308011	9,45	AT4G33800.1	
	Lalb_Chr20g0123311	9,44	AT1G25270.1	UMAMIT24, USUALLY MULTIPLE ACIDS MOVE IN AND OUT TRANSPORTERS 24
	Lalb_Chr25g0281361	9,41	AT1G72610.1	A. THALIANA GERMIN-LIKE PROTEIN 1, ATGER1, GER1, GERMIN-LIKE PROTEIN 1, GLP1
	Lalb_Chr23g0271451	9,33	AT5G24105.1	AGP41, ARABINOGLACTAN PROTEIN 41
	Lalb_Chr20g0110271	9,32	AT1G74670.1	GA-STIMULATED ARABIDOPSIS 6, GAS6
	Lalb_Chr25g0281371	9,32	AT5G20630.1	ARABIDOPSIS THALIANA GERMIN 3, ATGER3, GER3, GERMIN 3, GERMIN-LIKE PROTEIN 3, GLP3, GLP3A, GLP3B
	Lalb_Chr16g0382101	9,31	AT1G23380.2	KNAT6, KNAT6L, KNAT6S, KNOTTED1-LIKE HOMEBOX GENE 6
	Lalb_Chr23g0265061	9,26	AT4G38650.1	
	Lalb_Chr19g0131161	9,25	AT5G65750.1	E1-OGDH2
	Lalb_Chr14g0363221	9,23	AT3G01840.1	LYK2, LYSM-CONTAINING RECEPTOR-LIKE KINASE 2
	Lalb_Chr01g0009671	9,21	AT5G24090.1	ATCHIA, CHIA, CHITINASE A, LYS1, LYSOZYME 1
	Lalb_Chr12g0207131	9,21	AT5G01600.1	ARABIDOPSIS THALIANA FERRETIN 1, ATFER1, FER1, FERRETIN 1
	Lalb_Chr15g0077231	9,20	AT2G45850.1	AHL9, AT-HOOK MOTIF NUCLEAR LOCALIZED PROTEIN 9
	Lalb_Chr14g0375681	9,20	AT1G05280.1	
	Lalb_Chr12g0208611	9,20	AT5G13170.1	ATSWEET15, SAG29, SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 29, SWEET15
	Lalb_Chr14g0370191	9,06	AT1G17860.1	ARABIDOPSIS THALIANA KUNITZ TRYPSIN INHIBITOR 5, ATKT15
	Lalb_Chr05g0210841	9,04	AT4G05200.1	CRK25, CYSTEINE-RICH RLK (RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE) 25
	Lalb_Chr18g0055601	9,01	AT5G18560.1	PUCHI
	Lalb_Chr11g0073261	9,00	AT2G43880.1	
	Lalb_Chr13g0301301	8,97	AT1G80530.1	

Table 5 : Les 50 gènes les plus sur-exprimés dans la condition TIP comparé à la condition NR.

Gene ID	Transcription factor family	LogFc LR/NR	LogFc TIP/NR	Homologue <i>A.thaliana</i>	Symbole
Lalb_Ch14g0374401	bHLH	-6,82	-11,42	AT2G28160.1	FIT1
Lalb_Ch11g0069291	bHLH	-5,73	-10,77	AT5G50915.1	/
Lalb_Ch01g0023681	OF1	-5,01	-11,48	AT5G01840.1	OF1
Lalb_Ch09g0322101	STY-LRP1	-4,48	-4,07	AT5G66350	SHI
Lalb_Ch06g0160871	MADS-MIKC	-4,38	-9,85	AT1G24260.2	AGL9
Lalb_Ch18g0046381	WRKY	-4,22	-5,00	AT4G01720.1	WRKY47
Lalb_Ch24g0400011	bZIP	-4,20	-10,65	AT3G58120.1	BZIP34
Lalb_Ch02g0150931	C2H2	-4,18	-5,80	AT1G64625.1	/
Lalb_Ch07g0183331	WD40-like	-4,01	-4,20	AT3G49180	RID3
Lalb_Ch18g0059121	bHLH	X	-15,09	AT1G68810.1	T5L1
Lalb_Ch20g0108581	MYB-HB-like	X	-12,73	AT1G79180.1	MYB63
Lalb_Ch05g0222511	C2C2-CO-like	X	-11,35	AT1G25440.1	BBX15
Lalb_Ch22g0353101	NAM	X	-10,96	AT3G18400.1	NAC058
Lalb_Ch10g0106301	STY-LRP1	X	-10,83	AT5G12330.4	LRP1
Lalb_Ch17g0343111	B3-Domain	X	-10,51	AT2G46870.1	NGA1
Lalb_Ch10g0100951	B3-Domain	X	-10,44	AT2G46870.1	NGA1
Lalb_Ch24g0394931	bHLH	X	-10,25	AT2G28160.1	FIT1
Lalb_Ch13g0302791	TCP	X	-10,04	AT5G60970.1	TCP5
Lalb_Ch04g0254291	Homobox-WOX	X	-9,99	AT2G46680.1	HB7
Lalb_Ch19g0135771	& lipid binding HD-SAD	X	-9,81	AT1G05230.1	HGD2
Lalb_Ch14g0367961	Homobox-WOX	X	-9,72	AT4G37790.1	HAT22
Lalb_Ch00c44g0412661	Hap2/NF-YA	X	-9,67	AT3G05690.1	NF-YA2
Lalb_Ch12g0205211	bZIP	X	-8,98	AT4G34590.1	bZIP11
Lalb_Ch16g0390251	MYB-HB-like	X	-8,92	AT1G63910	MYB103
Lalb_Ch11g0065231	C2H2	X	-8,85	AT3G05200	ATL6
Lalb_Ch21g0308121	AS2-LOB	X	-8,54	/	/
Lalb_Ch14g0374731	C2H2	X	-8,25	AT3G45260.1	BIB
Lalb_Ch19g0124041	OF1	X	-7,66	AT5G01840	OF1
Lalb_Ch06g0172671	Hap2/NF-YA	X	-7,62	AT3G49940	LBD38
Lalb_Ch02g0158621	bZIP	X	-7,60	AT3G30530.1	bZIP342
Lalb_Ch05g0212751	MYB/SANT	X	-7,47	AT4G39250	RL1
Lalb_Ch14g0375001	C2H2	X	-7,39	AT5G59820	ZAT12
Lalb_Ch04g0254101	B3-Domain	X	-7,38	AT2G46870.1	NGA1
Lalb_Ch14g0374381	C2H2	X	-7,37	AT5G22890.1	STOP2
Lalb_Ch16g0388531	Homeodomain-TALE-BEL	X	-7,23	AT4G36870.1	BLH2
Lalb_Ch16g0390231	Homeodomain-TALE-BEL	X	-7,15	AT5G41410.1	BELL 1
Lalb_Ch18g0044781	B3-Domain	X	-7,08	AT1G01030	AP2/B3-like
Lalb_Ch20g0122621	C2H2	X	-6,74	AT4G31360	AXX17
Lalb_Ch00c44g0412651	Hap2/NF-YA	X	-6,70	AT1G07980	NFYC10
Lalb_Ch14g0369501	bZIP	X	-6,70	AT1G75390	bZIP44
Lalb_Ch25g0286961	bHLH	X	-6,57	AT3G56970	ORG2
Lalb_Ch15g0086761	TCP	X	-6,57	AT4G18390.1	TCP2
Lalb_Ch09g0323741	bZIP	X	-6,49	AT3G49760.1	ATBZIP5
Lalb_Ch10g0092521	bZIP	X	-6,43	AT3G30530.1	bZIP42
Lalb_Ch10g0099381	bZIP	X	-6,26	AT1G13600.1	bZIP58
Lalb_Ch16g0378971	bZIP	X	-6,18	AT2G22850.1	bZIP6
Lalb_Ch02g0158781	MADS-MIKC	X	-6,13	AT3G30260.1	AGL79
Lalb_Ch05g0223191	C2H2	X	-6,08	/	/
Lalb_Ch10g0107661	Nin-like	X	-6,00	AT2G17150.1	/
Lalb_Ch22g0355881	Homobox-WOX	X	-5,98	AT4G37790	HATT22
Lalb_Ch19g0134341	NAM	X	-5,95	AT3G15510	NARS1
Lalb_Ch06g0164251	C2H2	X	-5,91	/	/
Lalb_Ch07g0180471	interactor and regulator AUX-IAA	X	-5,82	AT5G57420.1	IAA33
Lalb_Ch02g0149661	MYC/MYB, GAF domain-containing protein	X	-5,80	AT2G27230	/
Lalb_Ch20g0110191	bHLH	X	-5,79	AT2G41240.1	BHLH100
Lalb_Ch03g0028421	Homeodomain-TALE-BEL	X	-5,74	AT2G35940	BLH1

Table 6 : Liste des facteurs de transcription sous-exprimés dans les conditions LR et TIP comparé à la condition NR avec un LogFC < -4. En vert, les facteurs de transcription communs entre LR et TIP. En bleu, les facteurs de transcriptions spécifiques à la condition TIP.

Lalb_Chr02g0146961	MYB-HB-like	X	-5,73	AT2G47190	MYB2
Lalb_Chr05g0213031	Homeodomain-TALE-BEL	X	-5,66	AT2G23760.1	BLH4, SAW2
Lalb_Chr21g0304911	AP2-EREBP	X	-5,61	AT4G25480	CBF3
Lalb_Chr24g0393151	& lipid binding HD-SAD	X	-5,59	AT1G05230.1	HDG2
Lalb_Chr04g0252111	Putative transcription regulator GNAT	X	-5,58	AT2G30090.1	/
Lalb_Chr25g0282821	/ chromatin remodeling BED-type(Zn)	X	-5,44	AT3G13020.1	/
Lalb_Chr12g0195911	NAM	X	-5,41	AT2G02450	NAC035
Lalb_Chr06g0175781	AS2-LOB	X	-5,33	AT3G27650.1	LBD25
Lalb_Chr22g0350411	bHLH	X	-5,30	AT2G28160.1	FIT1
Lalb_Chr01g0015891	NAM	X	-5,22	AT3G12910.1	/
Lalb_Chr13g0303111	NAM	X	-5,21	AT5G61430.1	NAC100
Lalb_Chr06g0169861	C2H2	X	-5,20	AT5G06490	ATL71
Lalb_Chr02g0150671	C2C2-CO-like	X	-5,20	AT1G04500.1	/
Lalb_Chr02g0144101	C2H2	X	-5,17	AT1G76410	ATL8
Lalb_Chr02g0144061	C2H2	X	-5,16	AT5G59820.1	RHL41
Lalb_Chr02g0157031	NAM	X	-5,14	AT5G18270.1	ANAC087
Lalb_Chr07g0184571	C2H2	X	-5,13	AT1G49230.1	/
Lalb_Chr13g0296111	bZIP	X	-5,11	AT1G22070.1	TGA3
Lalb_Chr03g0032631	STY-LRP1	X	-5,11	AT5G12330	LRP1
Lalb_Chr25g0284881	NAM	X	-4,94	AT3G12910.11	/
Lalb_Chr01g0006461	NAM	X	-4,90	AT3G15510	NARS1
Lalb_Chr08g0242251	C2H2	X	-4,86	AT1G22500.1	/
Lalb_Chr09g0327951	C2H2	X	-4,77	AT2G42360	ATL41
Lalb_Chr12g0203731	AP2-EREBP	X	-4,77	AT2G22200.1	/
Lalb_Chr06g0168641	bHLH	X	-4,75	AT1G64625.11	/
Lalb_Chr19g0130181	AP2-EREBP	X	-4,73	AT5G64750.1	ABR1
Lalb_Chr11g0063111	Homeodomain-TALE-BEL	X	-4,66	AT3G47730	ATH1
Lalb_Chr03g0032961	bHLH	X	-4,61	AT1G12540.1	/
Lalb_Chr06g0171051	C2H2	X	-4,61	AT2G37430.11	/
Lalb_Chr20g0110551	HSF-type-DNA-binding	X	-4,58	AT2G41690.1	HSFB3
Lalb_Chr11g0072861	Homeodomain-TALE-KNOX	X	-4,56	AT4G32040.1	KNAT5
Lalb_Chr08g0244271	Homeodomain-TALE-KNOX	X	-4,51	AT4G32040.11	KNAT5
Lalb_Chr21g0314401	C2H2	X	-4,51	AT2G37430.12	/
Lalb_Chr06g0162521	C2H2	X	-4,49	/	/
Lalb_Chr14g0375651	bHLH	X	-4,48	/	/
Lalb_Chr24g0403271	WRKY	X	-4,47	AT3G01970.1	WRKY45
Lalb_Chr05g0213831	Homobox-WOX	X	-4,46	AT2G22800.1	HAT9
Lalb_Chr19g0127421	C2H2	X	-4,46	AT1G02030.1	/
Lalb_Chr09g0329351	Homobox-WOX	X	-4,45	AT2G22800.11	HAT9
Lalb_Chr06g0169421	C2H2	X	-4,43	AT3G23140.1	URO
Lalb_Chr22g0350431	C2H2	X	-4,40	AT5G22890.1	/
Lalb_Chr17g0344321	C2H2	X	-4,39	/	/
Lalb_Chr14g0375851	WRKY	X	-4,30	AT1G62300.1	WRKY6
Lalb_Chr11g0065421	MYB-HB-like	X	-4,29	AT1G34670.1	MYB93
Lalb_Chr09g0320881	Homeodomain-TALE-BEL	X	-4,27	AT5G41410.1	BEL1
Lalb_Chr22g0351221	WD40-like	X	-4,24	/	/
Lalb_Chr03g0026861	MYB-HB-like	X	-4,21	AT3G46130.1	MYB48
Lalb_Chr11g0062091	MADS-MIKC	X	-4,19	AT3G54340.1	AP3, ATAP3
Lalb_Chr25g0289271	AP2-EREBP	X	-4,16	AT2G28550	AP2
Lalb_Chr21g0318101	bZIP	X	-4,14	AT3G30530.11	bZIP42
Lalb_Chr09g0322751	Homeodomain-TALE-BEL	X	-4,08	AT2G23760.11	BLH4, SAW2
Lalb_Chr13g0303181	C2C2-Dof	X	-4,04	AT3G47500.1	CDF3
Lalb_Chr04g0251941	WRKY	X	-4,03	AT2G38470	WRKY33
Lalb_Chr23g0266501	bZIP	X	-4,02	AT1G75390.1	AtbZIP44, bZIP44
Lalb_Chr02g0155141	HSF-type-DNA-binding	X	-4,02	AT5G03720	HSF3
Lalb_Chr01g0006321	bHLH	X	-4,01	/	/

Table 6 (suite) : Liste des facteurs de transcription sous-exprimés dans les conditions LR et TIP comparé à la condition NR avec un LogFC < -4. En vert, les facteurs de transcription communs entre LR et TIP. En bleu, les facteurs de transcriptions spécifiques à la condition TIP.

Gene ID	Transcription factor family	LogFc LR/NR	LogFc TIP/NR	Homologue <i>A.thaliana</i>	Symbole
Lalb_Chr17g0347051	bHLH	8,36	11,68	AT2G40435.1	SCREAM-like
Lalb_Chr13g0303321	bHLH	7,99	12,04	AT1G74500.1	BS1
Lalb_Chr18g0044001	SSXT	7,57	9,82	AT5G28640.1	AN3
Lalb_Chr07g0177601	AP2-EREBP	7,54	11,13	AT5G18560.1	PUCHI
Lalb_Chr05g0220561	Znf-LSD	7,19	8,93	AT1G32540.1	LOL1
Lalb_Chr12g0201341	E2F-DP	6,93	8,18	/	/
Lalb_Chr06g0172641	C2C2-Dof	6,82	8,26	/	/
Lalb_Chr13g0303751	AP2-EREBP	6,75	10,85	AT5G18560.1	PUCHI
Lalb_Chr23g0270311	bHLH	6,74	8,74	AT1G72210.1	BHLH096
Lalb_Chr22g0357151	C2H2	6,70	9,49	AT5G54630.1	/
Lalb_Chr23g0270211	bHLH	6,66	8,68	AT1G72210.1	BHLH96
Lalb_Chr16g0382101	Homeodomain-TALE-KNOX	6,56	9,31	AT1G70510.1	KNAT2
Lalb_Chr11g0070471	Homeodomain-TALE-KNOX	6,38	9,60	AT1G23380.2	KNAT6
Lalb_Chr16g0385821	NAM	6,32	7,81	AT1G26870.1	FEZ
Lalb_Chr06g0175441	Homobox-WOX	6,28	8,86	AT5G15150.1	HB7
Lalb_Chr05g0222461	bHLH	6,01	7,31	AT1G18400.1	BEE1
Lalb_Chr02g0159641	bHLH	5,96	6,52	AT1G26945.1	KDR
Lalb_Chr18g0052701	Homobox-WOX	5,90	8,57	AT3G11260.1	WOX5
Lalb_Chr03g0026971	C2C2-CO-like	5,73	7,04	AT5G59990.1	/
Lalb_Chr18g0055601	AP2-EREBP	5,65	9,01	AT5G18560.1	PUCHI
Lalb_Chr10g0106161	HSF-type-DNA-binding	5,50	7,05	AT1G46264.1	HSBF4
Lalb_Chr02g0142291	AS2-LOB	5,43	7,00	AT2G42430.1	LBD16
Lalb_Chr06g0175411	bHLH	5,28	5,40	AT3G28857.1	PRE5
Lalb_Chr03g0030941	bZIP	5,15	7,39	AT3G58120.1	BZIP61
Lalb_Chr01g0003341	AP2-EREBP	5,09	7,27	AT1G51190.1	PLT2
Lalb_Chr14g0376131	TUBBY	5,08	6,62	AT1G16070.2	TLP8
Lalb_Chr06g0168521	AP2-EREBP	5,07	6,09	AT5G17430.1	BBM
Lalb_Chr05g0223131	AP2-EREBP	4,97	6,54	AT5G25810.1	TINY
Lalb_Chr07g0177941	bHLH	4,94	6,58	AT1G74500.1	BS1
Lalb_Chr09g0329411	bHLH	4,89	5,76	AT4G37850.1	/
Lalb_Chr20g0111481	OFPP	4,86	6,36	AT3G52525.1	OFPP6
Lalb_Chr10g0098151	bHLH	4,73	6,25	AT1G26945.1	PRE6
Lalb_Chr01g0003331	AP2-EREBP	4,72	6,36	AT3G20840.1	PLT1
Lalb_Chr05g0224601	C2H2	4,66	5,65	AT1G63840.1	/
Lalb_Chr01g0013141	C2C2-GATA	4,66	6,23	AT4G32890.1	GATA9
Lalb_Chr25g0288591	C3H-WRC/GRF	4,60	5,48	AT3G52910.1	GRF4
Lalb_Chr23g0271441	AP2-EREBP	4,56	7,01	AT4G27950.1	CRF4
Lalb_Chr02g0145241	bHLH	4,52	7,06	AT3G19500.1	/
Lalb_Chr02g0158971	bHLH	4,46	5,27	AT3G29370.1	P1R3
Lalb_Chr03g0029801	bZIP	4,45	5,53	AT3G58120.1	BZIP61
Lalb_Chr02g0147231	MYB-HB-like	4,43	6,87	AT4G01680.2	MYB55
Lalb_Chr09g0325961	AP2-EREBP	4,41	6,05	AT5G10510.3	PLT3
Lalb_Chr06g0168991	AUX-IAA	4,40	6,25	AT5G43700.1	IAA4
Lalb_Chr16g0381611	AP2-EREBP	4,29	5,32	AT5G10510.3	AIL6
Lalb_Chr14g0371771	AP2-EREBP	4,29	5,82	AT5G11590	TINY2
Lalb_Chr14g0368051	C3H-WRC/GRF	4,23	5,37	AT2G22840.1	GRF1
Lalb_Chr24g0395981	AUX-IAA	4,23	5,86	AT2G22670.4	IAA8
Lalb_Chr09g0322361	C2C2-GATA	4,23	6,09	AT3G50870.1	GATA18
Lalb_Chr16g0379461	HD-ZIP	4,16	5,17	AT4G16780.1	HB2
Lalb_Chr21g0311471	AP2-EREBP	4,15	5,03	AT5G17430.1	PLT4
Lalb_Chr25g0284001	NAM	4,14	5,74	AT1G79580.1	SMB
Lalb_Chr05g0222871	OFPP	4,12	5,48	AT5G19650.1	OFPP8

Table 7 : Listes des facteurs de transcription sur-exprimés dans les conditions LR et TIP comparées à la condition NR avec un LogFC > 4. En vert, les facteurs de transcription communs à LR et à TIP. En jaune, les facteurs de transcription spécifiques à la condition LR. En bleu, les facteurs de transcriptions spécifiques à la condition TIP.

Lalb_Chr14g0363031	C2H2	4,05	5,19	AT3G27330.1	/
Lalb_Chr08g0242231	bHLH	4,04	5,94	AT1G72210.1	BHLH96
Lalb_Chr17g0345921	Homeodomain-LIKE	4,01	4,76	AT5G16560.1	KAN1
Lalb_Chr15g0083861	PLATZ	8,26	X	AT1G31040.1	PLATZ3
Lalb_Chr13g0301291	PLATZ	4,95	X	AT2G12646.1	RITF1
Lalb_Chr18g0052201	PLATZ	4,87	X	AT1G31040.1	PLATZ3
Lalb_Chr07g0179421	PLATZ	4,35	X	AT2G12646.1	RIFT1
Lalb_Chr18g0046371	AUX-IAA	4,13	X	AT3G17600.1	IAA31
Lalb_Chr14g0364931	MYB-HB-like	X	9,59	/	/
Lalb_Chr15g0086951	AP2-EREBP	X	6,91	AT5G18560.1	PUCHI
Lalb_Chr01g0019701	AS2-LOB	X	6,45	/	/
Lalb_Chr18g0046361	bHLH	X	6,37	AT2G46970.1	PIL1
Lalb_Chr21g0317301	MYB-HB-like	X	6,33	/	/
Lalb_Chr21g0310931	MYB	X	5,95	AT5G28300.1	GT2L
Lalb_Chr12g0202381	bHLH	X	5,89	AT5G50915.1	CKG
Lalb_Chr05g0216661	Homeodomain-TALE-KNOX	X	5,89	AT1G23380	KNAT65
Lalb_Chr22g0355891	Homeodomain-TALE-KNOX	X	5,88	AT4G08150.1	KNAT1
Lalb_Chr22g0354741	MYB/SANT	X	5,82	AT2G21650.1	RL2
Lalb_Chr11g0066491	C2C2-Dof	X	5,82	AT1G21340.1	/
Lalb_Chr06g0162491	AS2-LOB	X	5,78	AT2G42430.1	LBD16
Lalb_Chr14g0373151	AUX-IAA	X	5,77	AT4G29080.1	PAP2
Lalb_Chr02g0148721	MYB	X	5,70	AT5G28300.1	GT2L
Lalb_Chr19g0138171	AP2-EREBP	X	5,65	AT1G51190.1	PLT2
Lalb_Chr06g0168011	MYB	X	5,60	AT5G28300.1	T2L
Lalb_Chr21g0318241	, K-box	X	5,58	AT5G60910	AGL8
Lalb_Chr21g0311081	SSXT	X	5,56	AT5G28640.1	AN3
Lalb_Chr09g0324291	HD-ZIP	X	5,50	AT4G16780.1	HB2
Lalb_Chr11g0064521	C2C2-GATA	X	5,44	AT5G25830.1	GATA12
Lalb_Chr01g0015701	NAM	X	5,28	AT1G79580.1	SMB
Lalb_Chr04g0252131	C2H2	X	5,21	AT5G58580.1	TL63
Lalb_Chr09g0322371	MYB-HB-like	X	5,18	AT1G75250	RAD-like 6
Lalb_Chr06g0169831	C2H2	X	5,12	AT4G16810	/
Lalb_Chr21g0318231	MADS-type1	X	5,06	AT1G69120	AP1
Lalb_Chr10g0097421	& lipid binding HD-SAD	X	5,01	AT4G00730.1	AHDP
Lalb_Chr01g0004341	C2C2-GATA	X	4,94	AT1G08010.1	GATA11
Lalb_Chr17g0348291	bHLH	X	4,87	AT3G58850.1	PAR2
Lalb_Chr20g0121631	AP2-EREBP	X	4,85	AT1G28360	ERF12
Lalb_Chr05g0225041	GRAS	X	4,81	AT1G63100	SCL28
Lalb_Chr12g0208411	C3H-WRC/GRF	X	4,81	AT2G42590	GRF9
Lalb_Chr21g0311481	AP2-EREBP	X	4,80	AT3G20840.1	PLT1
Lalb_Chr12g0199451	AP2-EREBP	X	4,78	AT5G57390.1	AIL5
Lalb_Chr04g0262921	C2C2-GATA	X	4,76	AT4G32890.1	GATA9
Lalb_Chr05g0213131	C2C2-Dof	X	4,76	AT3G50410.1	DOF3.4
Lalb_Chr16g0377801	C2C2-GATA	X	4,75	AT2G18380.1	GATA20
Lalb_Chr08g0236061	MYB-HB-like	X	4,71	AT1G63910	MYB103
Lalb_Chr11g0063771	AP2-EREBP	x	4,66	AT5G11190	SHN2
Lalb_Chr21g0304981	lipid binding HD-SAD	X	4,66	AT4G00730	ANL2
Lalb_Chr21g0312331	C2H2	X	4,66	At1g04360	ATL1
Lalb_Chr09g0331181	OFPP	X	4,65	AT5G19650.1	OFPP8
Lalb_Chr02g0150051	AUX-IAA	X	4,64	AT3G23050	IAA7
Lalb_Chr23g0265311	bZIP	X	4,63	AT4G34590	/
Lalb_Chr23g0267061	HSF-type-DNA-binding	X	4,63	AT1G46264	HSFB4
Lalb_Chr14g0367281	bZIP	X	4,62	AT2G42380.2	BZIP34

Table 7 (suite) : Listes des facteurs de transcription sur-exprimés dans les conditions LR et TIP comparées à la condition NR avec un LogFC > 4. En vert, les facteurs de transcription communs à LR et à TIP. En jaune, les facteurs de transcription spécifiques à la condition LR. En bleu, les facteurs de transcriptions spécifiques à la condition TIP.

Lalb_Chr16g0389731	GRAS	X	4,60	AT1G63100	SCL28
Lalb_Chr03g0032391	AP2-EREBP	X	4,60	AT3G54320.1	ASML1
Lalb_Chr01g0003371	MADS-MIKC	X	4,58	AT1G71692.1	AGL12
Lalb_Chr14g0368931	MYB-HB-like	X	4,56	AT5G42630	KAN4
Lalb_Chr09g0323261	bHLH	X	4,53	/	/
Lalb_Chr09g0328911	B3-Domain	X	4,51	AT1G16640	AP2/B3-like
Lalb_Chr22g0355791	C3H-WRC/GRF	X	4,50	AT2G22840	GRF1
Lalb_Chr08g0246681	bZIP	X	4,49	AT4G34590	BGF6
Lalb_Chr16g0386131	MYB-HB-like	X	4,48	AT4G18020.1	PRR2
Lalb_Chr11g0062301	MYB/SANT	X	4,48	/	/
Lalb_Chr18g0056111	bHLH	X	4,45	AT3G06120.1	MUTE
Lalb_Chr19g0132891	AS2-LOB	X	4,43	AT5G63090	LOB
Lalb_Chr23g0267271	MYC/MYB	X	4,39	AT1G49160	WNK
Lalb_Chr05g0213121	C2H2	X	4,38	AT2G19180	/
Lalb_Chr12g0206081	SBP	X	4,35	AT1G27360	SPL11
Lalb_Chr07g0184841	Hap3/NF-YB	X	4,32	AT4G14540	NFY-B3
Lalb_Chr01g0007631	AP2-EREBP	X	4,30	AT4G36920	AP2
Lalb_Chr02g0158231	AS2-LOB	X	4,30	AT1G67100.1	LBD40
Lalb_Chr18g0055161	ARF	X	4,30	AT1G30330.2	ARF6
Lalb_Chr07g0183521	SBP	X	4,30	AT5G50570.1	SPL13
Lalb_Chr09g0320711	AP2-EREBP	X	4,28	AT3G61630.1	CRF6
Lalb_Chr09g0320321	WD40-like	X	4,28	AT4G33270.1	CDC20.1
Lalb_Chr14g0368601	HSF-type-DNA-binding	X	4,28	AT1G46264.11	HSFB4
Lalb_Chr13g0291671	C3H-WRC/GRF	X	4,28	AT2G42590	GRF9
Lalb_Chr10g0107581	WD40-like	X	4,25	AT1G10580	WD40
Lalb_Chr13g0299501	C3H-WRC/GRF	X	4,24	AT3G13960	GRF5
Lalb_Chr23g0267011	B3-Domain	x	4,22	AT5G42700.1	AP2/B3-like
Lalb_Chr05g0213181	AS2-LOB	X	4,19	AT5G66870.1	ASL1
Lalb_Chr10g0096591	C2H2	X	4,17	/	/
Lalb_Chr06g0167811	bHLH	X	4,16	/	/
Lalb_Chr09g0325741	bHLH	X	4,14	/	/
Lalb_Chr02g0150521	C2H2	X	4,12	AT1G04360.11	/
Lalb_Chr03g0024221	WD40-like	X	4,12	AT3G51930.1	/
Lalb_Chr10g0098131	Homobox-WOX	X	4,11	AT1G26960.1	HB23
Lalb_Chr11g0063571	AP2-EREBP	X	4,10	AT5G25190.1	/
Lalb_Chr16g0380521	C2H2	X	4,08	AT5G45290.2	/
Lalb_Chr10g0104611	WD40-like	X	4,06	AT5G13840.1	FZR3
Lalb_Chr05g0218551	C2H2	X	4,05	AT1G56280	DI19
Lalb_Chr21g0311971	AUX-IAA	X	4,04	AT1G04250.11	IAA17
Lalb_Chr21g0316021	C2H2	X	4,03	AT2G35910.1	/
Lalb_Chr04g0254741	AP2-EREBP	X	4,03	AT1G25470.1	/
Lalb_Chr23g0268551	AP2-EREBP	x	4,03	AT1G15360.11	WIN1
Lalb_Chr18g0053641	MYB-HB-like	X	4,02	AT5G16560.1	KAN1
Lalb_Chr05g0220501	bHLH	X	4,00	AT2G22750.2	/
Lalb_Chr01g0000181	NAM	X	4,37	AT1G33280.1	BRN1

Table 7 (suite) : Listes des facteurs de transcription sur-exprimés dans les conditions LR et TIP comparées à la condition NR avec un LogFC > 4. En vert, les facteurs de transcription communs à LR et à TIP. En jaune, les facteurs de transcription spécifiques à la condition LR. En bleu, les facteurs de transcriptions spécifiques à la condition TIP.

Nom de l'amorce	Gène de lupin blanc	Séquence
LaROW1-F	Lalb_Chr01g0019561	TTGGCAGAGACTGAACGATG
LaROW1-R		CATTTCAAGGTTCTGGTGGT
LaWOX5.1-F	Lalb_Chr04g0250731	CACAAATCTTTGGTGGGATGT
LaWOX5.1-R		CTAATGGTGGGTGCTCCACT
LaWOX5.2-F	Lalb_Chr18g0052701	TTTCAGAACCCGAAAGGTTG
LaWOX5.2-R		GTGGGTGATCCATTTGTTCC
LaMTP11-F	Lalb_Chr04g0257941	TTGAAGTGCTTGAGGGCTTT
LaMTP11-R		GGCAGCAAAAAGAACCATGT
LaVIT-F	Lalb_Chr07g0189361	GCATGGCAATTGGAGAGTTT
LaVIT-R		CCAAAGCACCCACAGAAAAT
LaWR3-F	Lalb_Chr07g0183011	TGCTTCAAACAAAACGTTGC
LaWR3-R		CTGATTGCTTGACCTCAAA
LaREG1-F	Lalb_Chr13g0291391	TGCTGTGGTTGGAATAGCTG
LaREG1-R		ATCGCCACACTCCATAAG
LaHA9-F	Lalb_Chr18g0052441	GCTCTTATGGCTGGTCTTGC
LaHA9-R		TTCATCTCCGGGATTCTTTG
LaKCO5-F	Lalb_Chr15g0077901	GCCTTTAAGACCCCTTTTGG
LaKCO5-R		CAGCAAGCAAATCCTCAACA
LaSULTR1.3-F	Lalb_Chr20g0123111	TGGGAAGCTTCAAGGGACTA
LaSULTR1.3-R		GCGACATTCGATGACAAGA
LaNH4-F	Lalb_Chr07g0184111	CAAGGATGGGCTGCAATAGT
LaNH4-R		GTGCACTTAGACGTGGCTCA
LaCYS4-F	Lalb_Chr25g0283641	AGGAATTGCGTAGTCGTGCA
LaCYS4-R		ATCTGATCCAGCGCAGAACC
LaALMT-F	Lalb_Chr07g0183271	TGGTGAACCTGCAACTGGTT
LaALMT-R		TGCTGCCCATGTTCCATCAT
LaPIP2;4-F	Lalb_Chr03g0027361	GCACCACTACCCATTGGATT
LaPIP2;4-R		CAGCTGCAAATGCTCCAATA
LaALM10-F	Lalb_Chr02g0149651	GGAAATGCTATGTGGGCAGT
LaALM10-R		ATTCGTTGCCAGCTCTCCTA
LaCSC1-F	Lalb_Chr14g0362681	CGGCTTGGCCTATGTTGTAT
LaCSC1-R		TGCAATGAGAAACGGAGTTG
LaHAKT1-F	Lalb_Chr24g0393761	ACCACGGAAATGAAACCAA
LaHAKT1-R		GCAGCTGTACCCTGTTGTGA
LaPHT1.5-F	Lalb_Chr04g0259111	GCTCGTGATGAATTGGGAGT
LaPHT1.5-R		AGTGCCACAAAGTGCAACAC

Table 8 : Liste des amorces utilisées pour les expériences de qPCR. Les amorces ont été générées avec Primer3Plus (<http://primer3plus.com>)

Résumé : Le phosphate (Pi) est un nutriment indispensable au développement des végétaux, connu pour faire partie d'une signalisation nutritionnelle responsable de modifications importantes du système racinaire. Chez le lupin blanc (*Lupinus albus*), la carence en Pi induit la formation de structures racinaires spécialisées appelées racines protéoïdes, sur lesquelles se développent de denses amas de racines courtes à croissance déterminée que nous appellerons les rootlettes. De nombreuses études ont mis en évidence la capacité spectaculaire de ces rootlettes à améliorer l'acquisition du Pi, mais peu d'informations sont disponibles sur leur développement spécifique et en particulier le caractère déterminé de leur croissance. Les travaux de cette thèse visent à mettre en évidence les mécanismes moléculaires impliqués dans la croissance déterminée des rootlettes de racines protéoïde de lupin blanc. En ce sens, une caractérisation anatomique et physiologique des rootlettes, associée à une approche transcriptomique, a permis de définir 5 stades de développement, menant à l'identification d'une profonde transition à la fois structurale et fonctionnelle. Ainsi, les rootlettes évoluent d'une phase de croissance, impliquant la présence d'une activité méristématique, vers une phase entièrement dédiée à la nutrition associée à la différenciation complète de leur méristème. Dans le but de mettre en évidence les acteurs moléculaires de cette transition, les gènes *LaWOX5.1-like* et *LaWOX5.2-like*, homologues de *AtWOX5* connu chez la plante modèle *Arabidopsis* pour son rôle central dans le maintien du méristème, ont été sur-exprimés dans des racines de lupin blanc par transformation génétique hairy-root. Cependant, les phénotypes racinaires obtenus n'ont pas permis de confirmer une implication de ces gènes dans la transition développementale des rootlettes. Il est acquis que les rootlettes émergent de manière successive et génèrent un gradient développemental le long de la racine protéoïde. Notre attention s'est focalisée sur des rootlettes particulières qui se distinguent par une longueur plus importante, interrompant donc ce gradient caractéristique. La caractérisation anatomique de ces rootlettes anormalement longues a démontré de fortes similitudes avec la structure d'un apex de racine protéoïde à croissance indéterminée. Un jeu de données transcriptomiques a été généré afin de comparer : rootlettes longues, apex de racines protéoïdes et rootlettes courtes (standard). L'analyse de ces données a permis de montrer qu'un réseau de gènes impliqués dans l'auto-maintien du méristème est fortement exprimé dans les rootlettes longues par rapport aux rootlettes courtes (standard) juxtaposées. L'analyse de ce transcriptome a également permis de mettre en évidence le gène *LaRGF2-like*, homologue du peptide *AtRGF2* connu pour être impliqué dans la régulation du méristème. La sur-expression de *LaRGF2-like* par transformation hairy-root dans des racines de lupin blanc semble permettre le maintien de la zone méristématique dans une majorité de rootlettes des racines transformées, suggérant un rôle important de ce gène dans la transition vers la croissance déterminée. Ainsi, les travaux menés au cours de cette thèse ont permis d'apporter de nouvelles connaissances quant aux acteurs impliqués dans le développement déterminé des rootlettes. La compréhension du développement de ces structures spécialisées pourra éventuellement permettre de transférer la capacité à produire des racines protéoïdes ou des racines courtes dédiées à la nutrition chez d'autres espèces d'intérêt agronomique.

Mots clés : Racines protéoïdes, lupin blanc, croissance déterminée, phosphate

Abstract : Phosphate (Pi) is an essential plant nutrient but by far the least mobile and least available for plants, therefore representing a limiting factor for their growth and development. It is well known that Pi deprivation triggers developmental adaptations in plants, including the modification of their root architecture. In white lupin (*Lupinus albus*), low Pi induces the formation of very specialized roots called cluster roots. These structures are made up of hundreds of short rootlets with a determinate growth, forming one or more very dense clusters. The spectacular ability of rootlets to improve Pi nutrition has been widely studied, though little information is known about the determinate development of these structures. My thesis project aims to unravel the molecular players involved in the determinate growth of white lupin rootlets. To this extent, an anatomical and physiological description of the rootlets, combined with transcriptomic approaches, allowed us to define 5 developmental stages, leading to the identification of a major transition change in rootlet development, both at the structural and functional level. Indeed, rootlets evolve from a growth phase, involving root meristem activity, to a functional phase fully dedicated to nutrition in which the meristem has disappeared. In order to unravel the molecular actors implied in rootlet determined growth, *LaWOX5.1-like* and *LaWOX5.2-like*, homologous genes of *AtWOX5* known in the model plant *Arabidopsis* for being involved in the maintenance of the root meristem, were overexpressed in white lupin roots with hairy-root transformation. However, the obtained phenotypes did not allow us to confirm the involvement of *LaWOX5.1-like* and *LaWOX5.2-like* in the developmental transition of rootlets. It is known that rootlets emerge in a successive manner along the cluster root leading to the formation of a continuous spatial gradient of rootlet development. Abnormally long rootlets, differing from standard short rootlets by their longer size, caught our attention. Anatomical studies showed that long rootlet apex structure is very similar to the cluster root indeterminate apex. A transcriptomic data set was generated, allowing to compare: long rootlets, cluster root apexes and normal rootlets. The study of the transcriptomic data set revealed the high expression of a network of genes involved in the meristem maintenance in long rootlets compared to normal rootlets. In addition, its analysis allowed the identification of *LaRGF2-like* gene, homologous to *AtRGF2* peptide, known to be involved in the meristem maintenance. Overexpression of *LaRGF2-like* in white lupin roots seems to maintain meristem activity in transformed rootlets, suggesting that this gene is a key gene in the molecular switch leading to rootlet determined growth. Finally, this thesis work has enabled the acquisition of knowledge and a better understanding of the molecular mechanisms involved in the determined growth of rootlets. In the long term, the understanding of the development of these special structures could make it possible to transfer the ability of producing cluster roots to other crop species, thereby improving their phosphate nutrition.

Key words : Cluster root, white lupin, determinate growth, phosphate